

# AGARUZ JEL VE İMMUNFİKSASYON ELEKTROFOREZİ UYGULAMALARI

DR. ÇİĞDEM SÖNMEZ

S.B.Ü. DR. ABDURRAHMAN YURTARSLAN ANKARA ONKOLOJİ EAH

# ELEKTROFOREZ

Bir ayrıştırma tekniği

Elektriksel alan altında yüklü moleküllerin farklı göç özelliklerine dayanır.

İki kelimenin birleşimi

**Electro**=Elektrik

**Phoresis**= Göç-taşıma Migration- Carry across

# ELEKTROFOREZ TARİHÇE

*Journal of Chromatography*, 480 (1989) 3–19  
Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROM. 21 695

## HISTORY OF ELECTROPHORETIC METHODS

OLOF VESTERBERG

*Division of Medical Chemistry, National Institute of Occupational Health, S-171 84 Solna (Sweden)*

4

CHROMATOGRAPHY  
TODAY

December 2010

# 200 years of Electrophoresis

*By David Perrett*

*William Harvey Research Institute, Barts & the London School of Medicine and Dentistry,  
Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London EC1M 7BQ U.K.*





# ELEKTROFOREZ PRENSİBİ

Prensip:

Genellikle sulu çözeltide (Tampon) içinde destek matriksinde

Değişken yükleri ve kütleleri nedeniyle, karışımdaki farklı moleküller ve parçacıklar farklı hızlarda göç eder.

Elektriksel alanda yüklü moleküller ve parçacıklar ters yüke göç eder.

- Pozitif yüklü partiküller (katyon) negatif yüklü elektroda (katod)
- Negatif yüklü partiküller (anyon) pozitif yüklü elektroda (anod) doğru ilerler

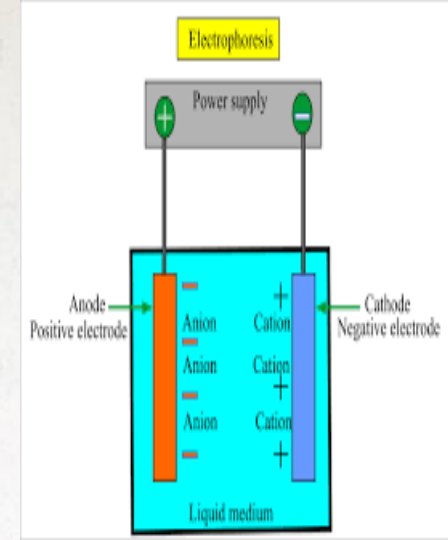
Sonuç olarak; tek fraksiyonlara (bantlar) ayrılır.

Proteinler ve nükleik asitler başta olmak üzere yüklü biyomoleküllerin

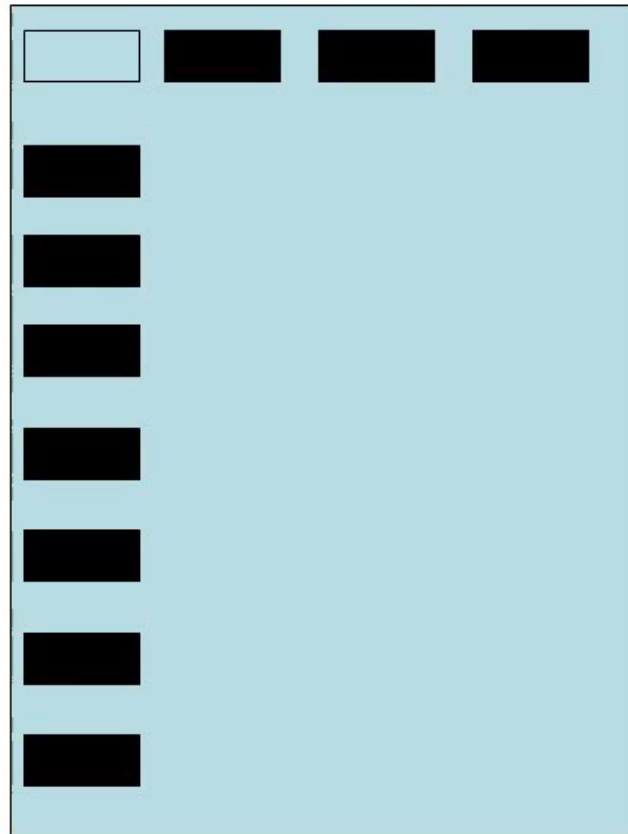
ayrılmasını,

tanımlanması,

molekül ağırlığının belirlenmesi (rutinde belirlenmez).

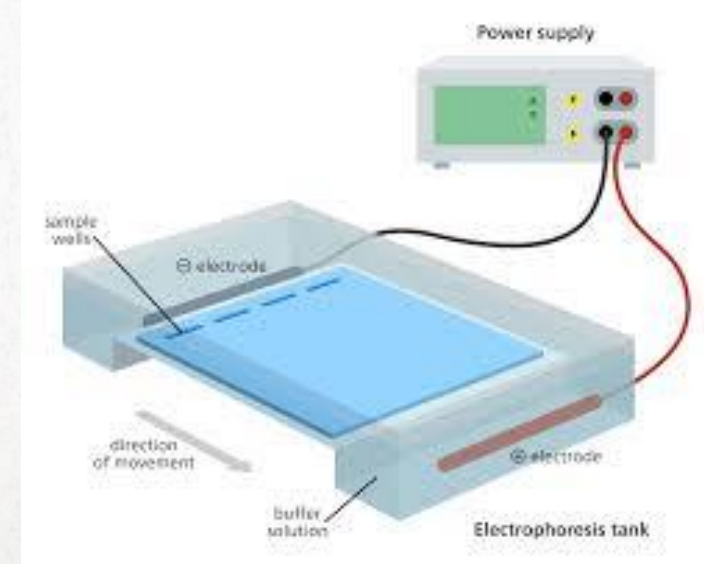
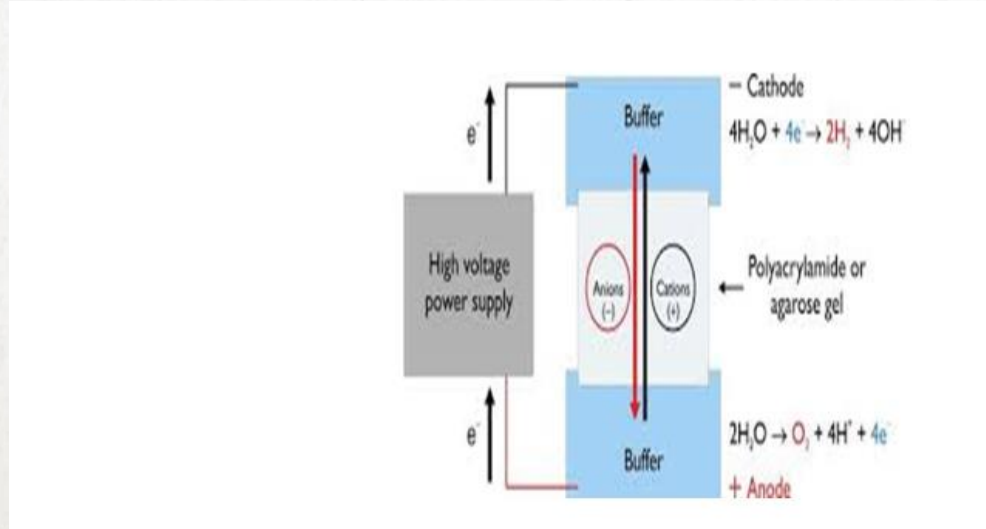


# Simple Gel Electrophoresis Animation



# ELEKTİRİKSEL ALAN

- Doğrusal akım (DC) sağlayan güç kaynakları kullanılır.
  - Voltaj arttıkça göç süresi kısalmır
  - Ama düşük resolusyona ve yüksek ısıya neden olur. Dolayısıyla ayırışma kalitesi kötü olur.
  - Deneysel yaklaşım gözlem ve tecrübe ile elektriksel alan değerlendirilir.





# TAMPON

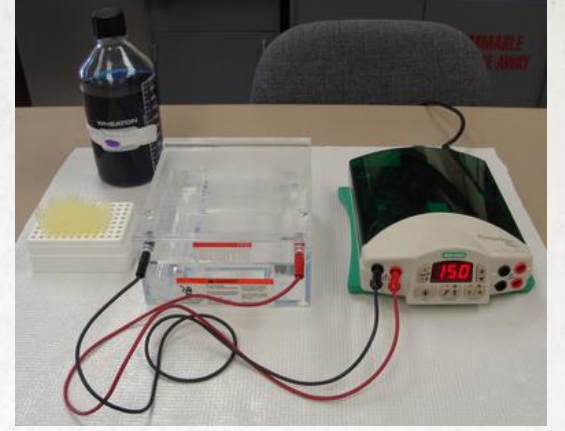
İki temel görevi var:

- Uygulanan elektrik akımını taşır.
- Ortam pH'sını sabit tutarak, elektroforez süresince protein yükünün sabit kalmasını sağlar,

Tamponun pH'ı, konsantrasyonu, iyonik gücü analitlerin göçü üzerinde etkilidir;

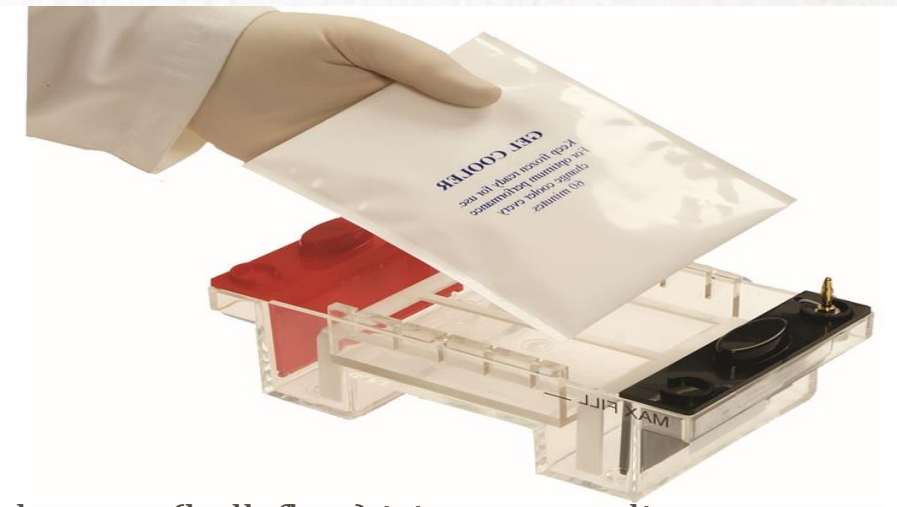
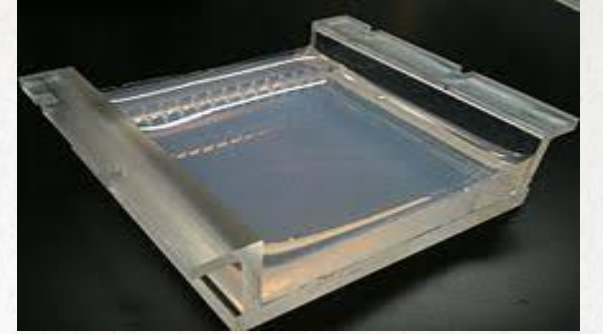
Standart Protein elektroforezinde pH 8.0-9.0

- Sıklıkla kullanılan tamponlar :
  - Tris Borate EDTA (TBE)-Stabilpahalı uzun ayrışma zamanı pH 8.0civarı
  - Tris Acetate EDTA (TAE)-ucuz, kısa ayrışma zamanı pH 8.0dan yukarıda short separation time.
  - Phosphate EDTA (TPE) -pH 7.0 civarı



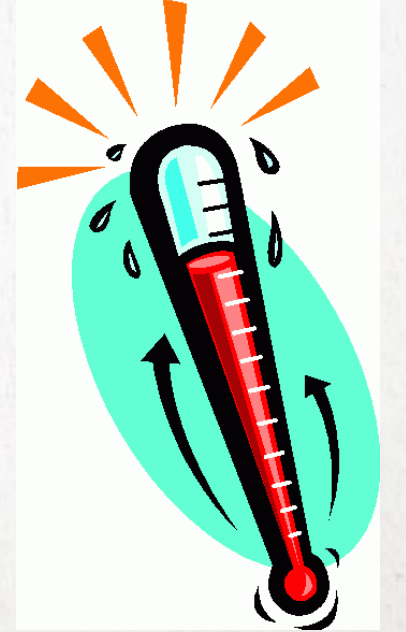
# DESTEK MATRİKS

- Ayrıştırılacak materyalin serbestçe penetrasyonuna izin vermeli
- Elektroforezi yapılacak moleküller ile etkileşime girmemeli
- Kendisi elektrik yük taşımamalı.
- Ayrışma molekülün ağırlık -yük oranına ve destek ortamın pore genişliğine bağlıdır.
- Sınıflandırma da oldukça önemlidir
- Kullanılan jeller
  - Kağıt
  - Sellüloz asetat
  - İnce tabakalar
  - Agaroz jel
  - Poliakrilamid jel
  - Üre jel
- Örneğin uygulandığı yerde çökerek makromoleküllerin elektroforezine engel olmasına (bulk flow) izin vermemeli.



# SICAKLIK

- Her aşamada ısı kontrolü önemlidir.
- Sabit sıcaklık; ısıya hassas proteinlerin denatürasyonunu önlemek açısından da önemlidir
- Isı kontrol edilmez ise jeldeki pore çapları değişir.
- Protein göçü etkilenir.



# ELEKTROFOREZİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Numune Kaynaklı	Elektroforez İşlemi Kaynaklı
Molekülün yükü ve yükünün gücü	Elektriksel alan gücü
Partikülün şekli veya büyüklüğü	Destek matriks pore genişliği
Molekülün yükünün yoğunluğu	Ortam ısısı
Molekül ağırlığı	Ortam pH
Proteinin yapısı 3. ve ya 4. yapısı	Tampon viskozitesi

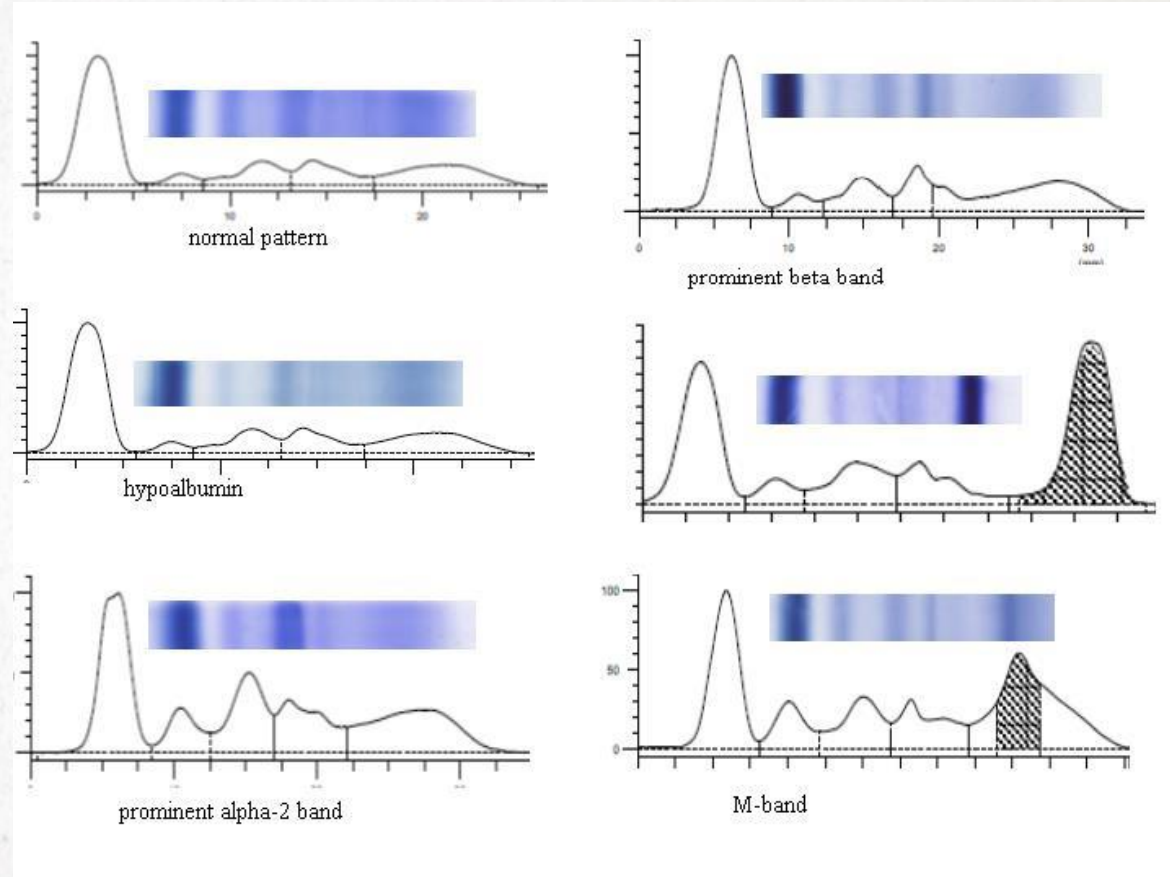
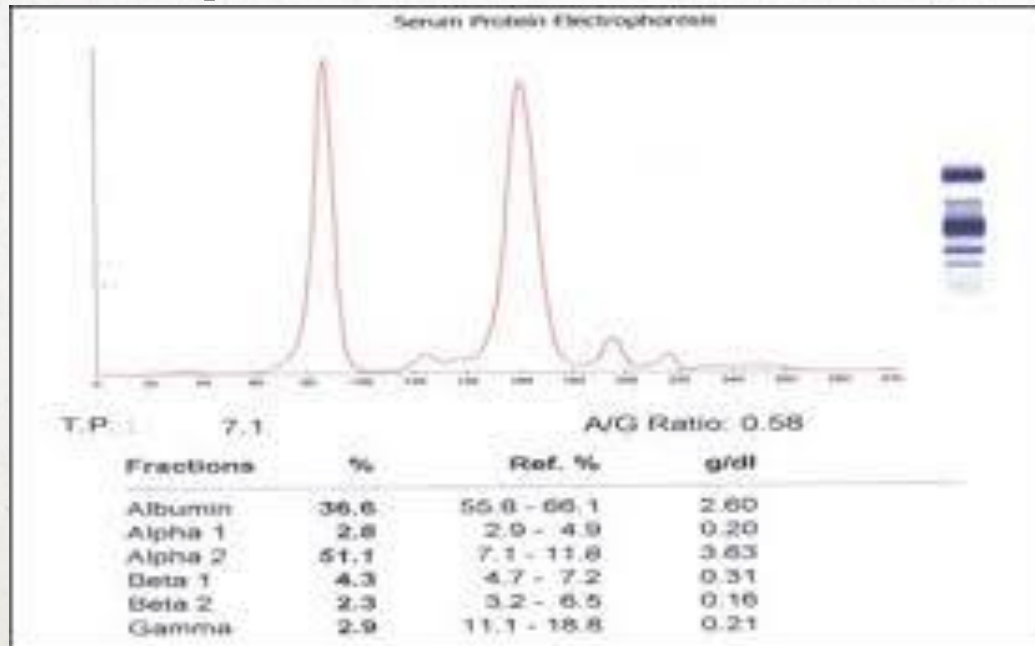
# BOYAMA

- Elektroforez işleminde yürütme sonrasında jel
- Yıkanır fixe edilir ve kurulanır
- Boyama ve sonra yıkama işlemine tabi tutulur
- Boyama aşamasında asetik asit veya metanol ile muamele edilir
- Kullanılan bazı boyalar
  - Plazma proteinleri
    - Amidoblack
    - Bromfenol mavisi
    - Coomassie Brilllant Blue
  - Lipo proteinler
    - Sudan black



# DANSİTOMETRE

- Tarama
- Kantitasyon
- Raporlama



# ELEKTROFOREZ BİLEŞENLERİ

## Elektroforez

- Numune
- Elektriksel yük
- Destek matriks
- Isı
- pH
- Tampon
- Maske
- Pipetler
- Süre

## Boyama

- Sudan black
- Bromfenol blue
- Asit blue
- Asit violet
- Ethidium bromit
- Amino black
- Oil Red O
- Nitrotetrazolium blue
- Coomassie Brilliant blue

## Dansitometre

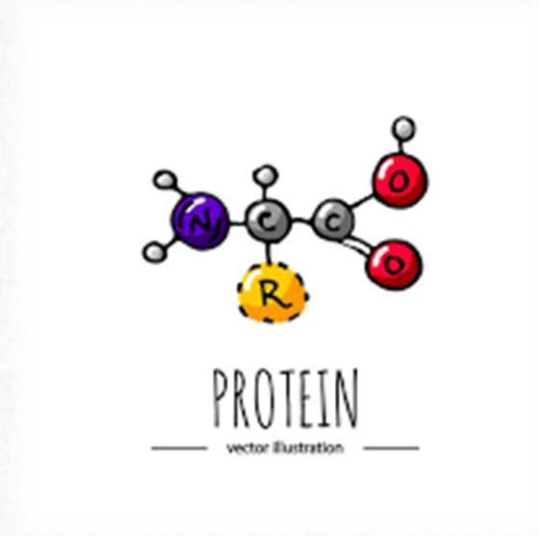
- Tarama
- Farklı dalga boyları
- Yazılım

## Raporlama

- Değerler
- Görüntü
- Grafik
- Yorum/açıklama

# ELEKTROFOREZ TESTİ İLE

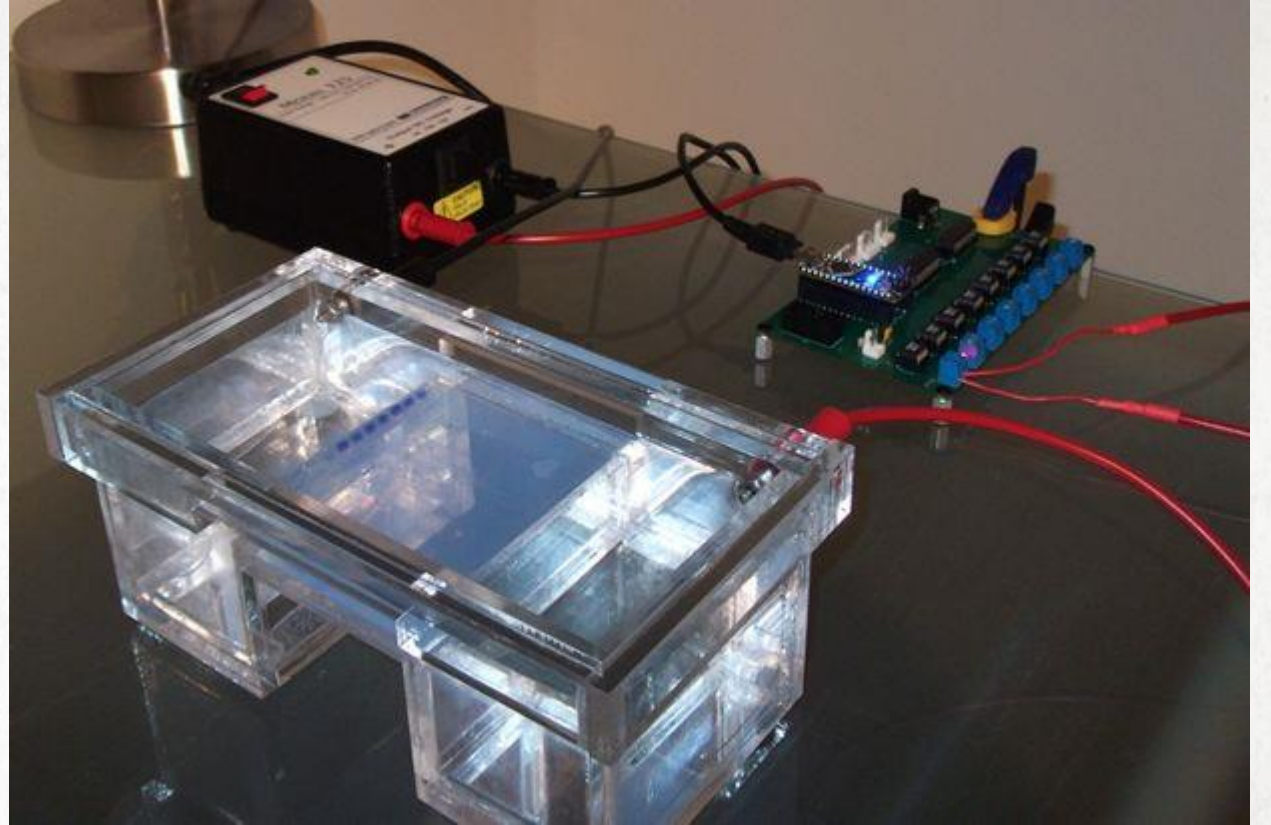
- – İyonik yük taşıyan her şey ayrıştırılır.
  - –Nükleik asitler, DNA, RNA
  - –Proteinler, peptid, Amino asitler
  - –Organik asitler/bazlar
  - –Enzimler- izoenzimler
  - –Hemoglobin
  - –İlaçlar- pestisitler
  - –Inorganic anyon/katyonlar





# KLİNİK BRANŞLAR

- Biyoloji
- Biyokimya
- Farmakoloji
- Genetik
- Patoloji
- Hematoloji
- Adli tıp
- Araştırma Laboratuvarları V.s



# ELEKTROFOREZ ÇEŞİTLERİ

Moving boundry Electrophoresis

Zone Electrophoresis

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

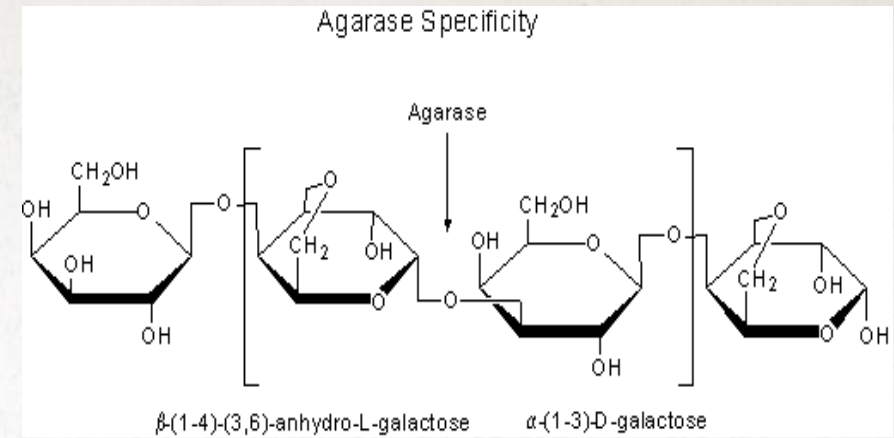
Kapiller elektroforez

# JEL ELEKTROFOREZİ

- Jelatinöz bir yapı destek ortam olarak görev yapar
  - Sıklıkla kullanılan jeller
  - **Agaroz jel**
  - Poliakrilamid jel
  - Nişasta
  - Pulsed field Jel Elektorofrezi
  - İzoelektirik Fokuslma
  - Diğer
-

# AGARoz JEL

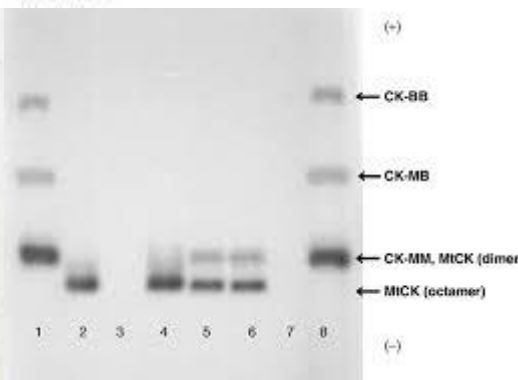
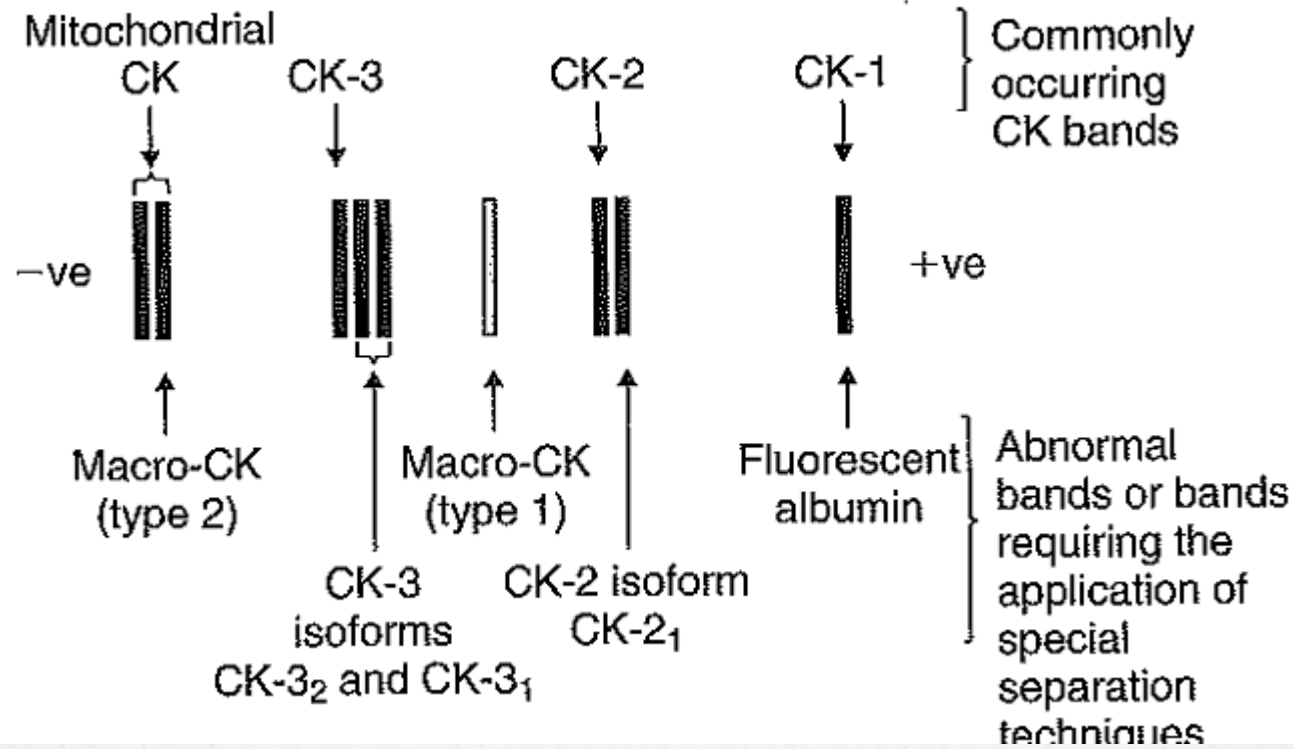
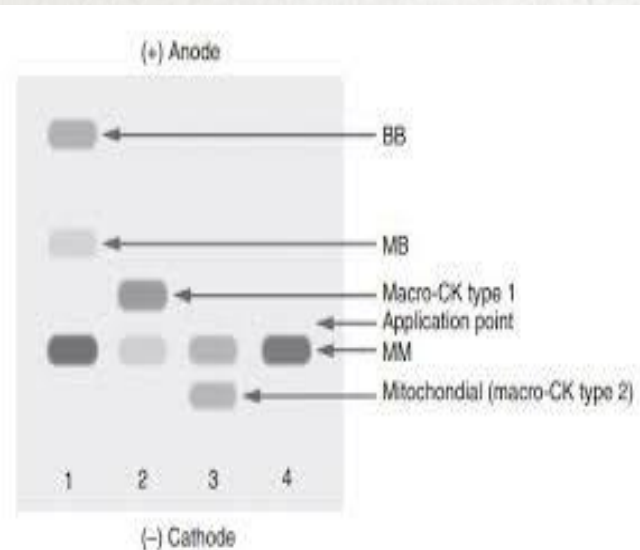
- Kolay, hızlı, ucuzdur.
- Deniz yosunundan elde edilen bir polisakkarittir
- Agaroz ile daha düşük elektroozmotik etki meydana geldiğinden agara tercih edilir.
- $\beta$ -1,3-D-galaktoz / 3,6-anhidro- $\alpha$ -1,4-galaktoz • Kaynar suda çözülür ve sertleşir, soğurken jelleşir.
- Poliakrilamid jele göre daha büyük pore sahiptir.
- proteinlere daha düşük afinitesi, mükemmel dansitometrik okumaya olanak sağlayan kurutulduktan sonra kalan doğal saydamlığıdır.
- Hazır ticari preparatlar, serum proteinlerinin LDH izozimlerinin, lipoprotein fraksiyonlarının analizinde başarıyla kullanılmaktadır.



# ELEKTROFOREZ TESTİ TESTLERİ

- Protein elektroforez
  - Lipid elektroforezi
  - Hemoglobin elektroforezi
  - BOS immünelektroforez
  - İzoenzimler CK-LDH-ALP
-

# CK İZOENZİM ELEKTROFOREZİ



**Creatine Kinase**

- Isoenzyme Testing
  - Fractionation of CK
    - Immunoinhibition
    - Mass Assay
    - Electrophoresis

CK-MM

CK-MB

CK-AB

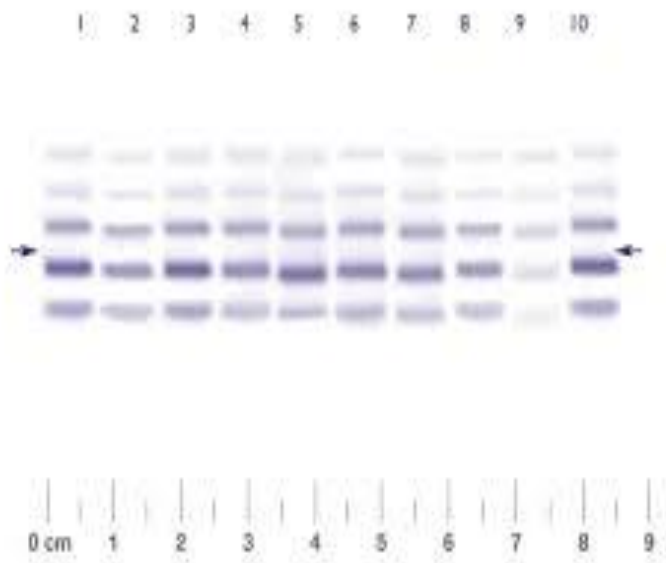
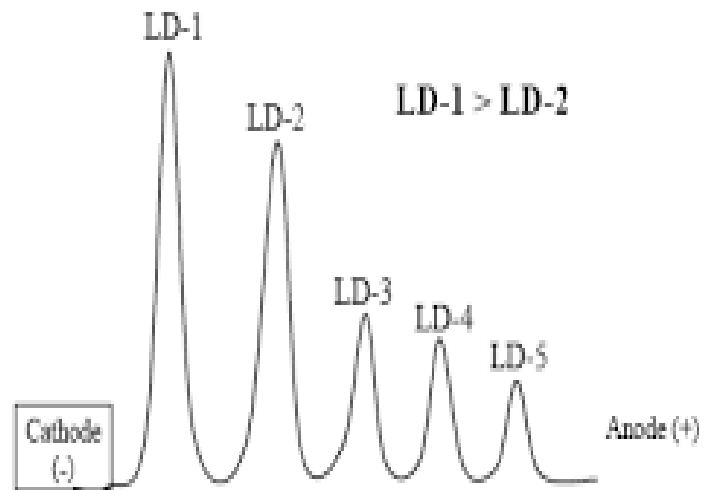
CK-BB

Sample 1 2 3 Control 4 5

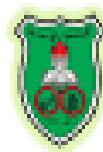
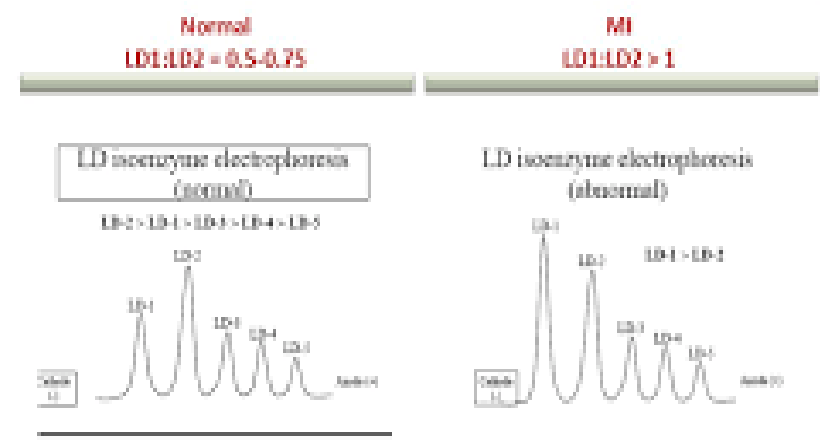


# LDH İZOENZİM ELEKTROFOREZİ

LD isoenzyme electrophoresis  
(abnormal)



Normal vs. MI



# ALP İZOENZİM ELEKTROFOREZİ

## Alkaline Phosphatase in Bone diseases

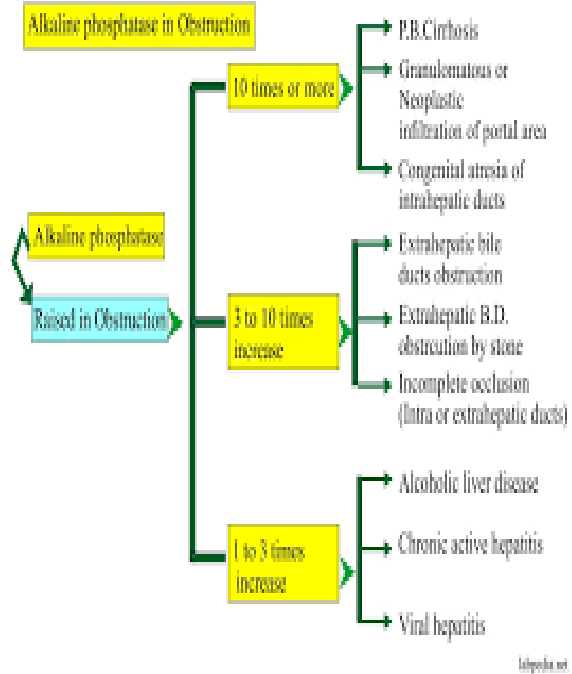
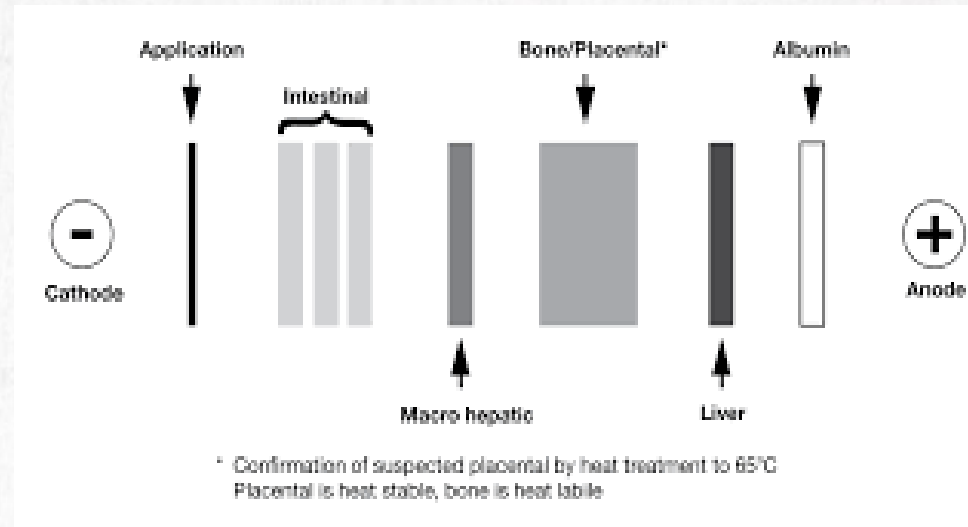
Paget's disease	→ 10 to 25 times	→ Due to osteoblastic cells activity
Osteomalacia	→ Moderate increase	→ Normal with treatment
Ricket's	→ 2 to 4 time	→ Decreases with treatment
Osteogenic sarcoma	→ Increased	→ Osteoblastic cells activity
Healing bone fracture	→ Increased	
Physiologic bone growth	→ Increased	

labpedia.net

## Alkaline phosphatase isoenzyme



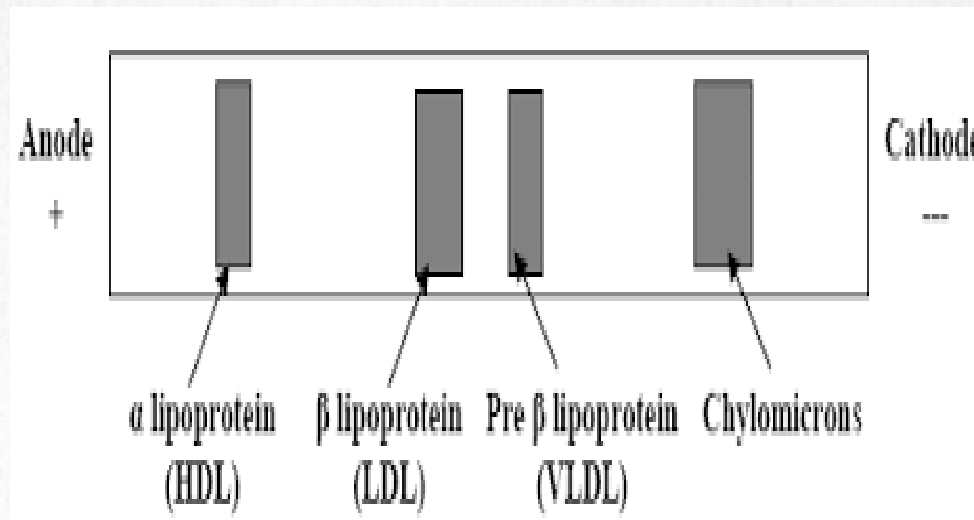
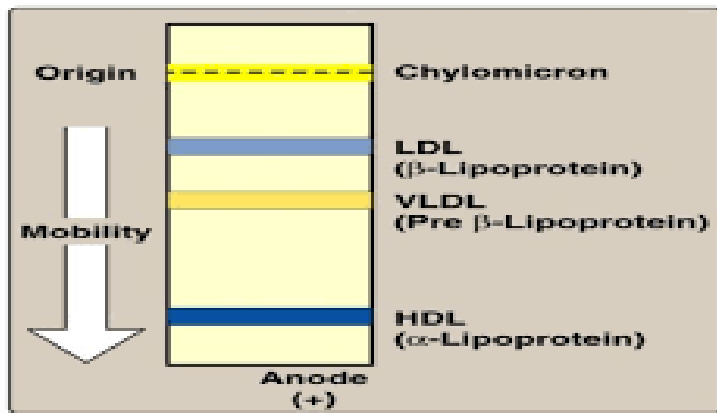
- 1 Liver ALP
- 2 Bone ALP
- 3 Intestinal ALP
- 4 Placental ALP





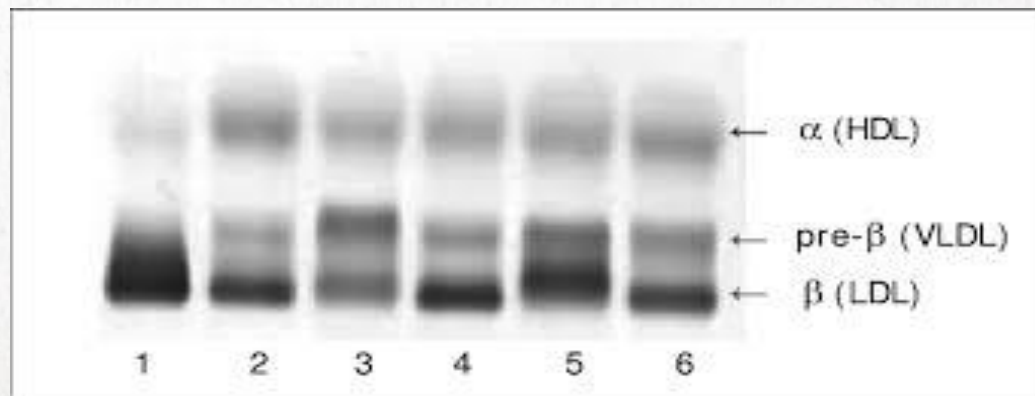
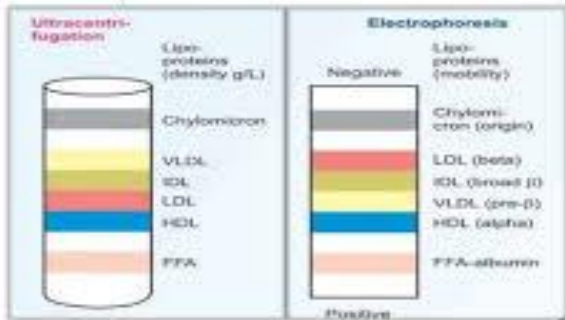
# LIPID ELEKTOROFORZI

## Lipoprotein Electrophoresis

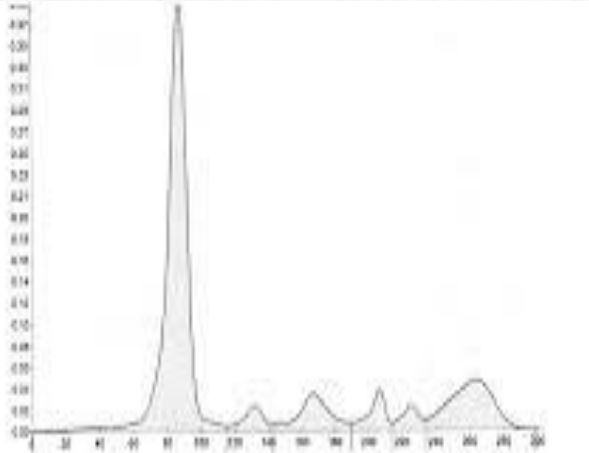
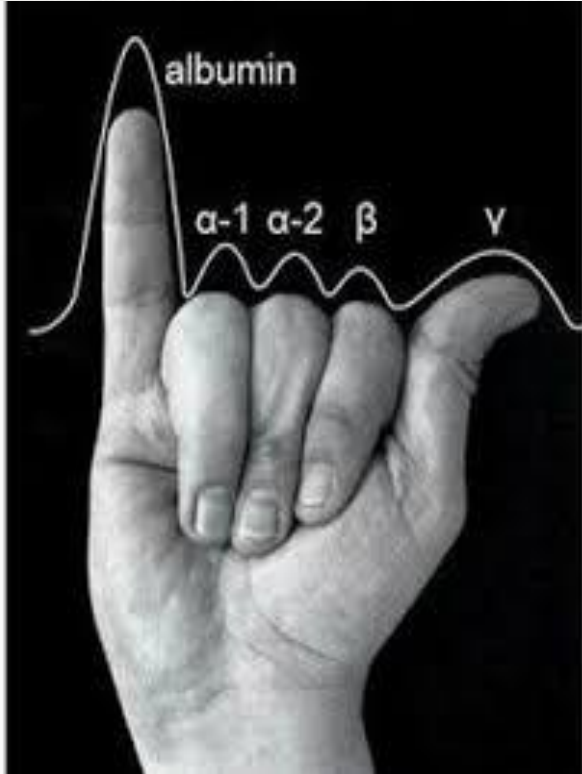


## Classification of Lipoproteins

- Lp can be classified based on...
  - Density
  - Electrophoresis



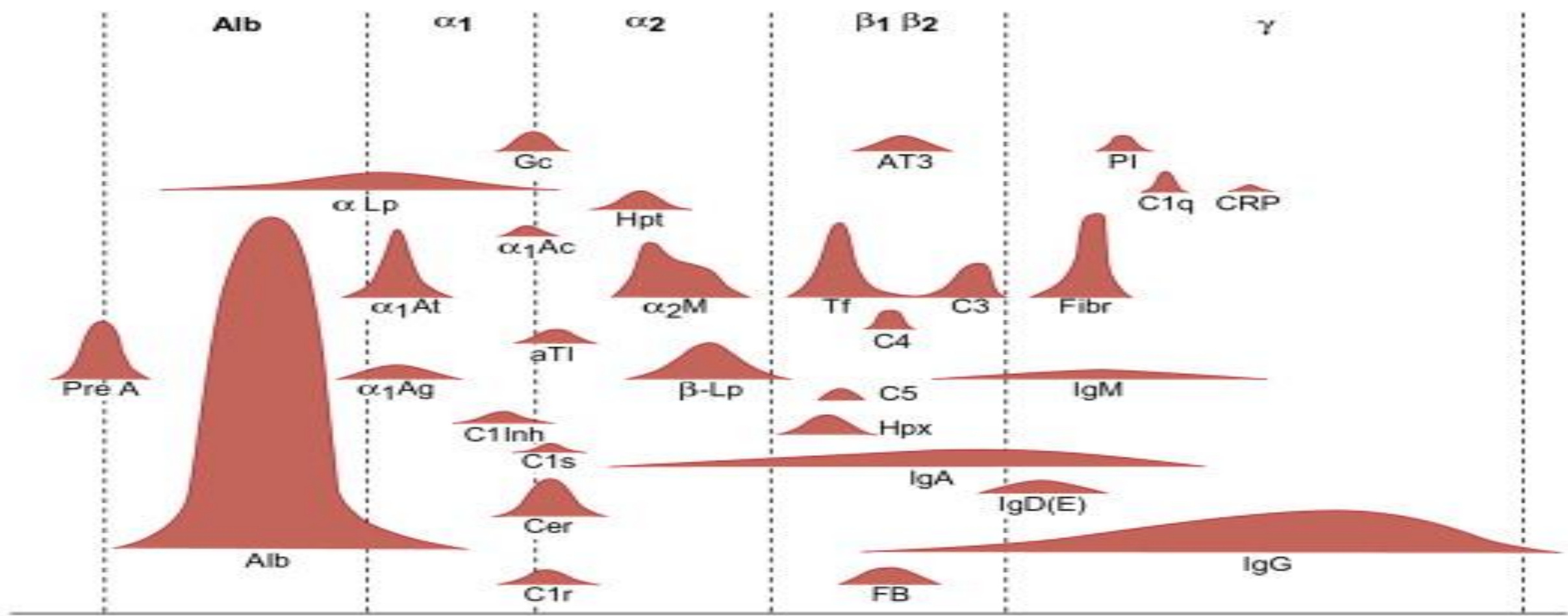
# PROTEİN ELEKTROFOREZİ



Fractions	Rel.Area(%)	Conc(g/dL)	Ref. Conc(g/dL)
Albumin	63.0	4.4	3.3 - 5.7
Alpha 1	3.9	0.3	0.1 - 0.4
Alpha 2	8.6	0.6	0.3 - 0.9
Beta 1	4.8	0.3	0.1 - 0.7
Beta 2	3.4	0.2	0.1 - 0.5
Gamma	16.3	1.1	0.5 - 1.6

Methodology : Capillary Electrophoresis Total Protein : 7 g/dL

Protein EP (serum)		B3000006		
Fraction	Result (g/dL)	Percentage (%)	Normal	Unit
Albumin	4.4	60.08	3.3-4.8	g/dL
Alpha1	0.1	1.46	0.1-0.3	g/dL
Alpha2	0.7	9.86	0.7-1.1	g/dL
Beta	0.8	10.39	0.8-1.2	g/dL
Gamma	1.3	18.21	0.7-1.8	g/dL
A/G ratio	1.51	1.51		
Total SPE	7.3	100.00	6.3-8.3	g/dL



**$\alpha_1$ Ac**  
 **$\alpha_1$ Ag**  
 **$\alpha_1$ At**  
 **$\alpha_2$ M**  
 **$\alpha$ -LP**  
**Alb**  
**At3**  
 **$\alpha$ -Lp**  
**C1Inh**

$\alpha_1$ -antichymotrypsin  
 $\alpha_1$ -acid glycoprotein  
 $\alpha_1$ -antitrypsin  
 $\alpha_2$ -macroglobulin  
 $\alpha$ -lypoprotein  
 albumin  
 antithrombin III  
 $\alpha$ -lipoprotein  
 C1 esterase inhibitor

**Cer**  
**CRP**  
**Gc**  
  
**FB**  
**Fibr**  
**Hpt**  
**Hpx**  
**PI**

Ceruloplasmin  
 C-reactive protein  
 Gc-globulin (vitamin  
 D-binding protein)  
 Factor B  
 Fibrinogen  
 Haptoglobin  
 Hemopexin  
 Plasminogen

**Pre A**  
**Tf**  
**Complement**  
**components:**  
**C1q, C1r, C1s**  
**C3, C4, C5**  
**Immunoglobulins:**  
**IgA, IgD, IgE, IgM**

Prealbumin  
 Transferrin  
 As designated  
  
 As designated



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40



41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60



SPE

GEOSPEC01K Rev. 2

14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

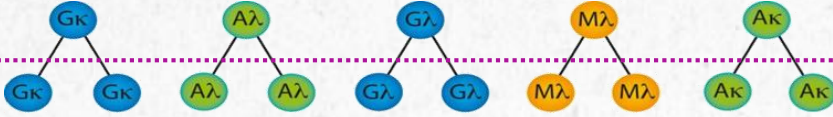
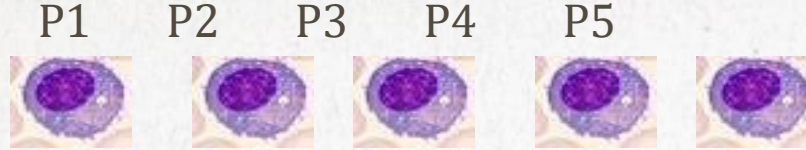
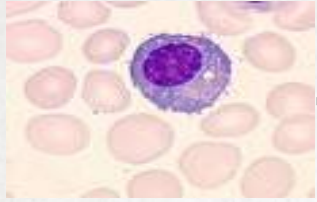
ID 266567

Gel N° \_\_\_\_\_

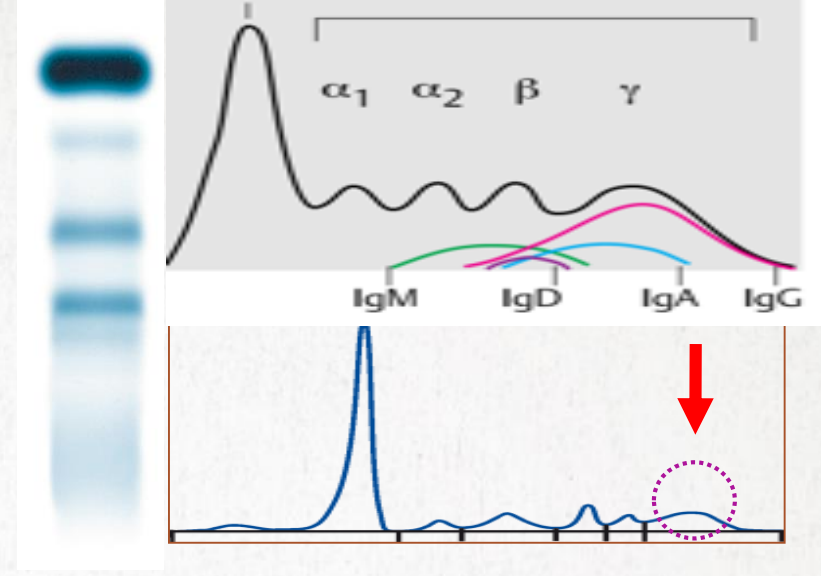
Date \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

# Monoklonal immünglobulin ve serum protein elektroforezi

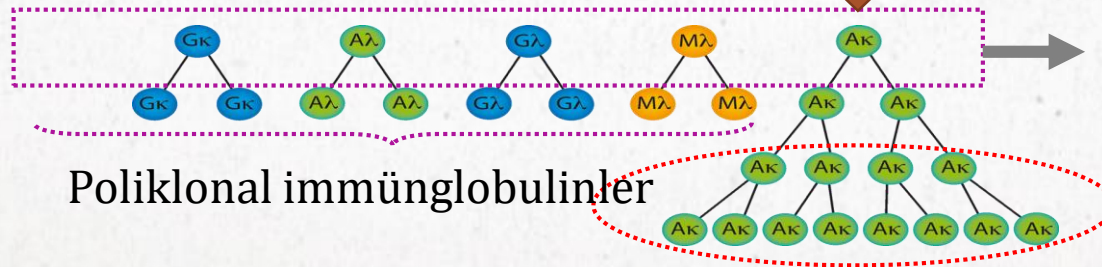
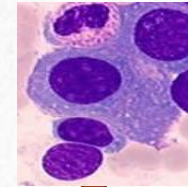
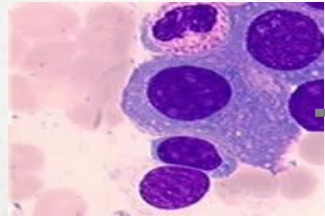
Normal plazma hücreleri



Poliklonal immünglobulinler

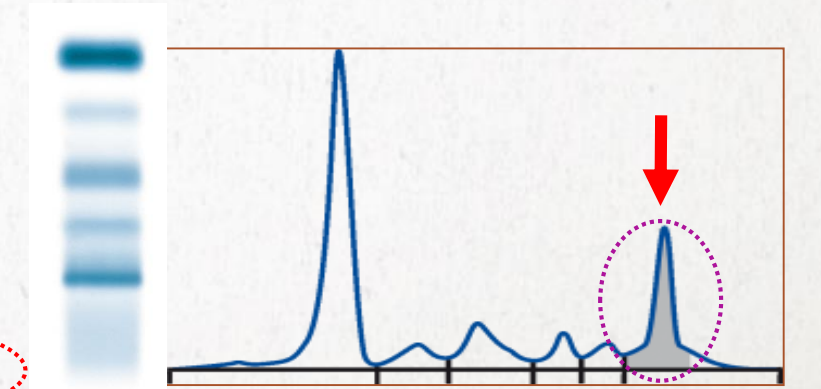


Bir plazma hücrelerinin malign transformasyonu



Poliklonal immünglobulinler

Monoklonal immünglobulin



Serum protein elektroforezinde kalitatif ve/veya kantitatif deęişiklikler

# M PROTEİN

- Çoğu serolojik tümör markörünün aksine, M-proteinleri son derece çeşitlidir.
- M-proteinlerinin her biri benzersiz değişken bölge sekanslarına sahiptir
- Pentamerik IgM'den (~ 900.000 Dalton), monomerik serbest hafif zincirlere (~ 24.000 Dalton) kadar deęişebilir.
- Bazı proliferatif plazma hücresi bozukluklarında serum konsantrasyonları ile oldukça yüksek iken bazılarında M-proteinine çok az ya da hemen hemen rastlanmaz.
- Tedavi yanıtının değerlendirilmesinde kullanılır.
- M protein azalma miktarı önemlidir

# İDRAR PROTEİN ELEKTROFOREZİ

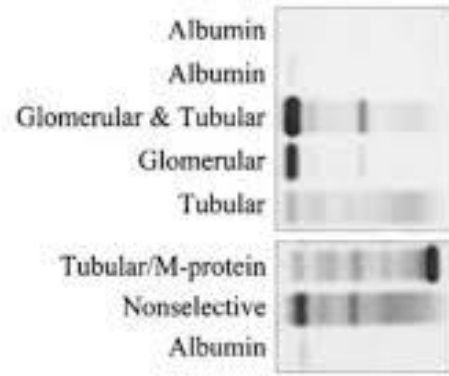
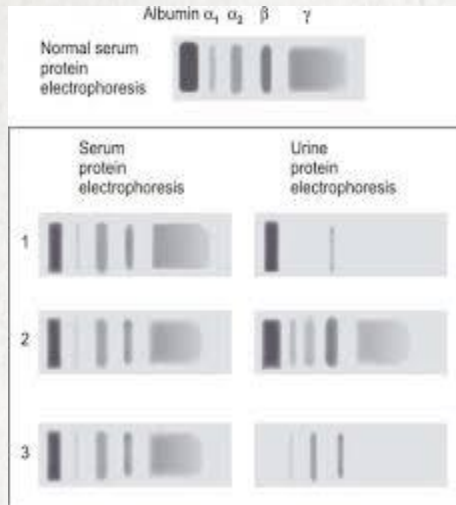
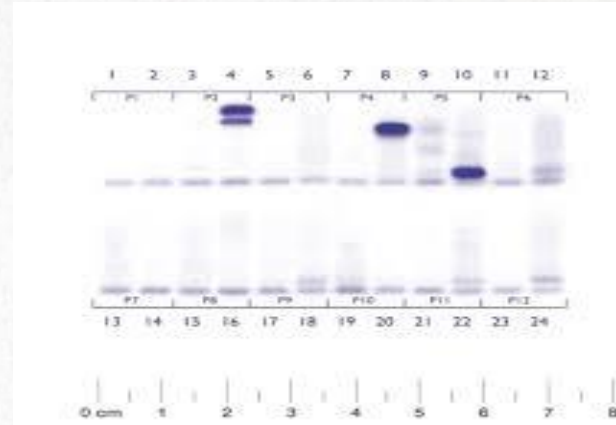


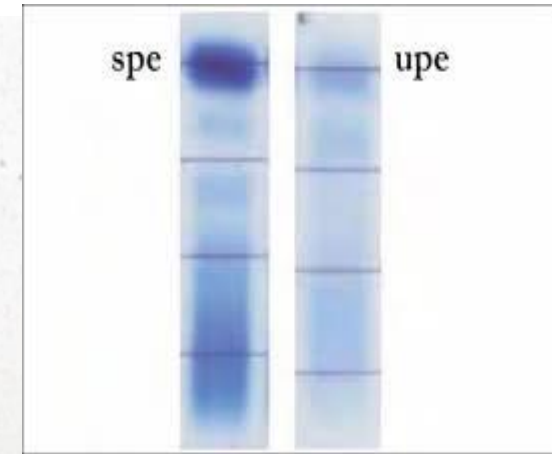
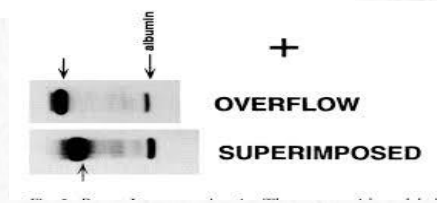
FIGURE 15 Several urine protein electrophoretic patterns for concentrated urine samples.



## UPCK™ Urine Protein Concentration Kit



- ANALYSIS**
- ELISA
  - 2-Dimensional Gel Electrophoresis
  - Western Blot
  - Chromatography
  - Mass Spectrometry (LC-MS, MALDI-TOF MS)
  - Protein Arrays
  - Protein Detection
  - Immunoassays
  - Bioinformatics





# İDRAR PROTEİN ELEKTOROFOREZİ

- 24 saatlik idrar
- İdrar toplamasında prezervatif olarak sadece tolüen ve timol kullanılabilir.
- İdeal olan prezervatifsiz toplanmasıdır.
- Buzdolabında 14 gün, donmuş 7 gün stabildir.
- İdrar protein miktarı tayini (günlük atılan protein miktarı )
- MM hastalarında tanı ve takip de kullanılır
- M Protein varlığı ve immunifikasyon elektroforezi le birlikte değerlendirilir .

# İDRAR PROTEİN ELEKTROFOREZİ

## Avantajları

Basit manuel semiotomatik tam otomatik metod

- 30 mg/L konsantre idrarda sensitif(100 kat konsantre edilence
- Kantitatif
- Desavantajları
  - Böbrek fonksiyonundan etkilenir
- Laboratuvar
  - Yoğun emek kosnantasyon ile birlikte protein kaybı
  - 24 saatlik idrar toplamada zorluk
  - Hasta şikayetleri
  - Geniş hacimler
  - Subjektif değerlendirme
  - DKK de kötü tekrarlanbilirlik sonuçları

# PATOLOJİK SERUM PROTEİN PATERNLERİ

Gamopati (gamma, beta veya alfa-2 bölgesinde M-proteini saptanır)

Monoklonal –biklonal gamapati

Poliklonal gamopati

- ❑ Karaciğer hastalığı
- ❑ Bağı dokusu hastalığı
- ❑ Kronik enfeksiyon
- ❑ Hematolojik olmayan malignansi

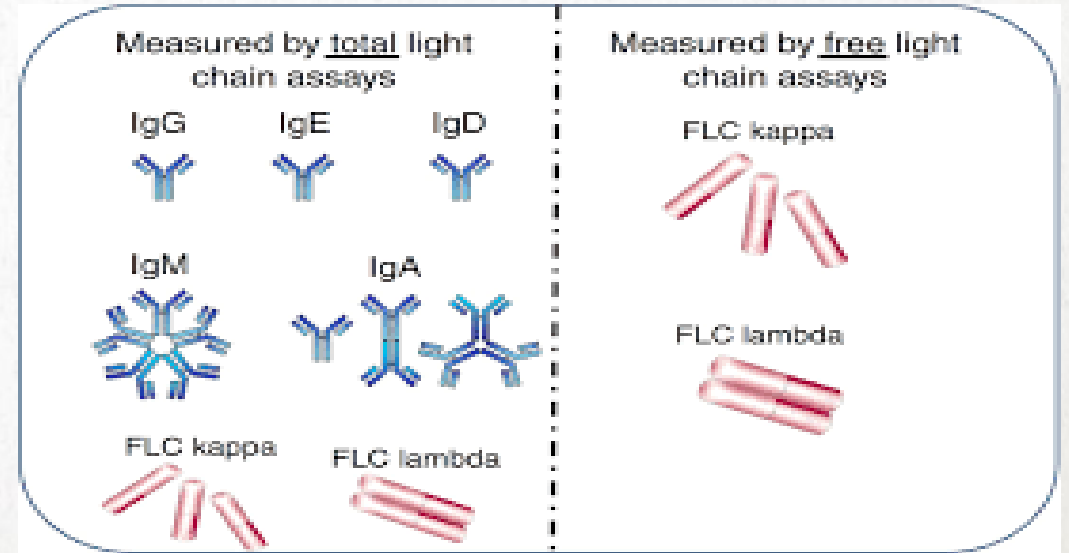
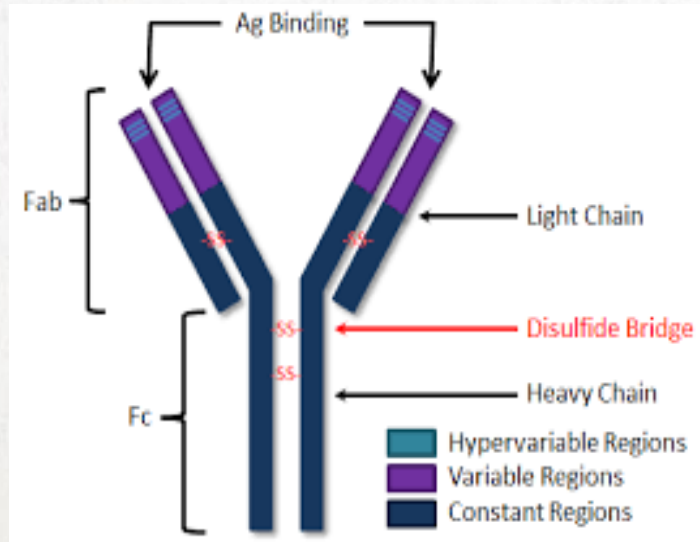
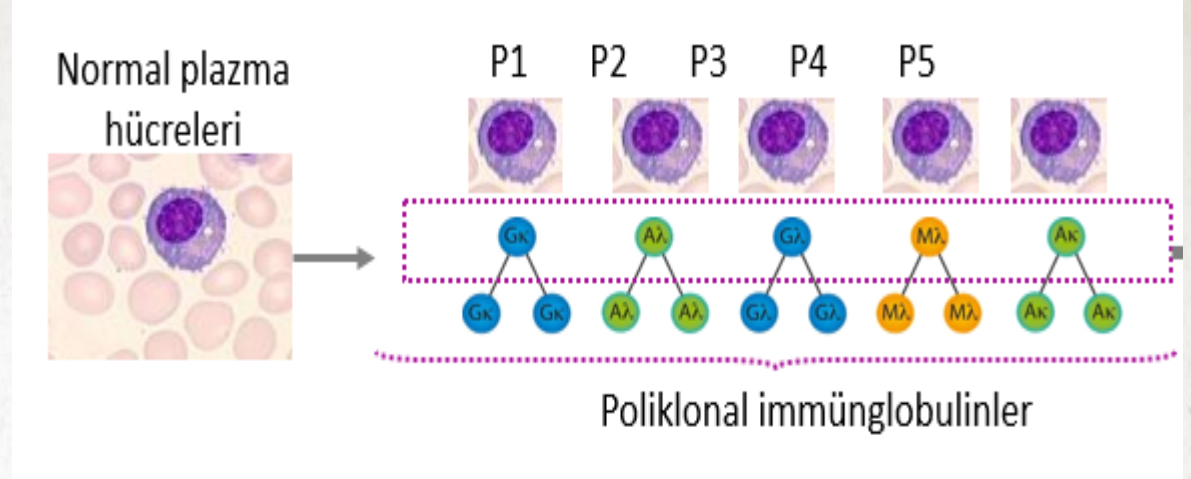
Hipogammaglobulinemi

Diğerleri

- ❑ Azalmış albümin ve artmış  $\alpha$ -1 ve  $\alpha$ -2 globulinler (enfeksiyon veya metastatik malignansi)
- ❑ alfa-1 antitripsin eksikliği  $\alpha$ -1 globulinde belirgin azalma
- ❑ Bisalbunemi İki albümin bandı (bisalbüminemi)
- ❑ Nefrotik sendrom albümin ve  $\gamma$  bölgesinde azalma, artmış  $\alpha$  bölgesi
- ❑ Karaciğer hastalığı albümin ve  $\beta$  bölgesinde azalma, artmış  $\gamma$  bölgesi

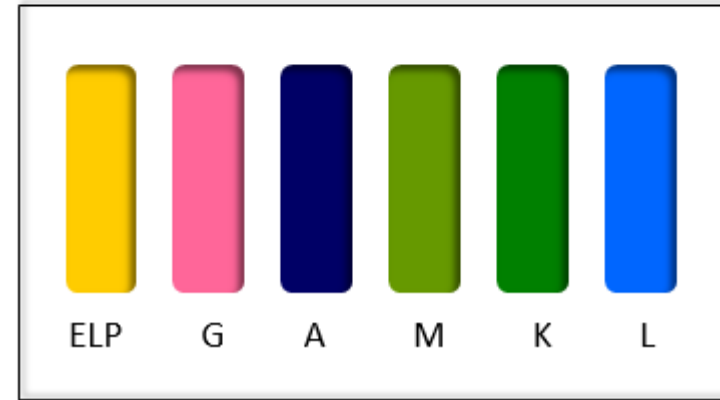
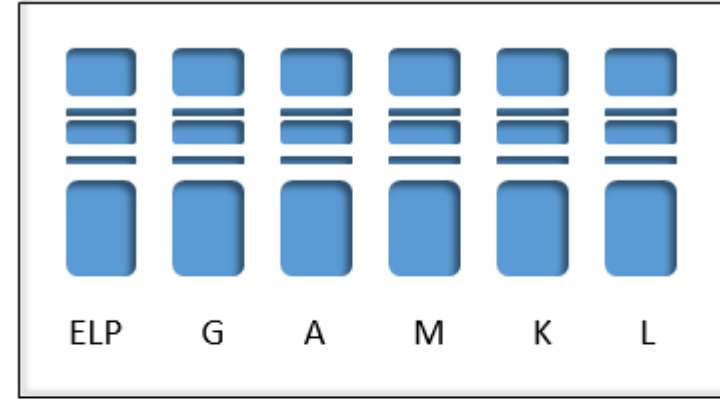
# İMMUNGLOBULİNLER

- Plasma hücreleri tarafından üretilirler
- Hafif Zincir Fab-Ağır Zincir Fc
- Disülfid bağları ile bağlanması ile meydana gelirler

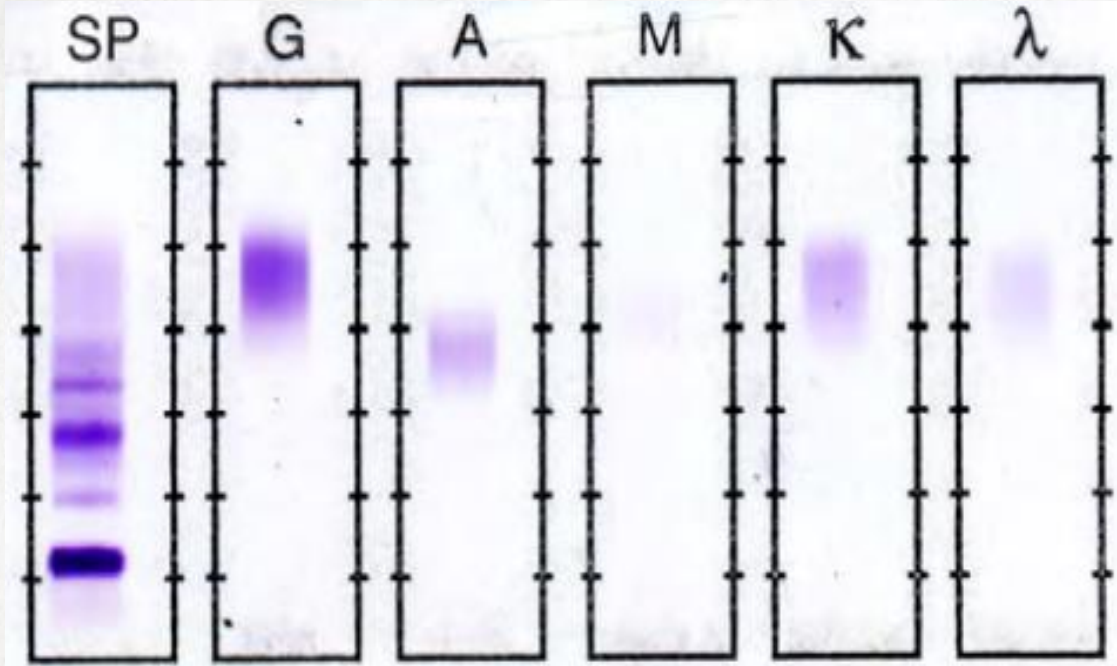


# İMMUNFİKSASYON ELEKTROFOREZİ

- Örnek aplikasyonu
- Yürütme
- Anti serum uygulama
- Presipitasyon (bekleme)
- Yıkama
- Boyama
- Değerlendirme



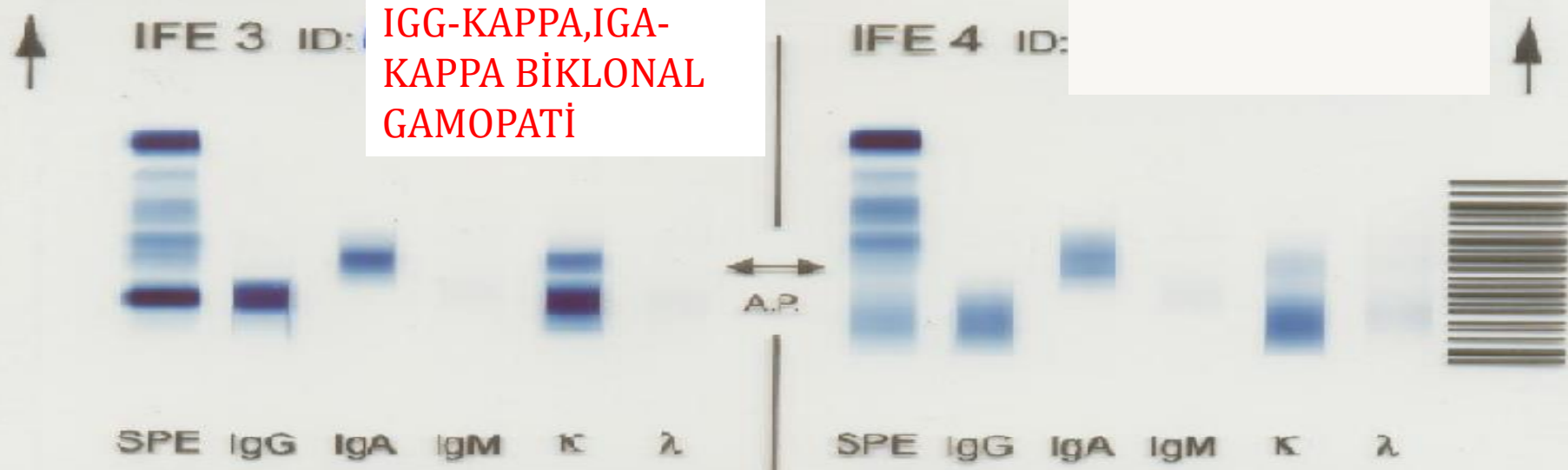
# İMMÜNİKSASYON



Normal görünüm  
En koyu IgG boyanır  
Bunu daha hafif IgA izleyebilir  
IgM boyanmaz veya belli belirsiz  
K > L (K ve L görünümünde uygunsuzluk  
varsa M-proteini için dikkat!)

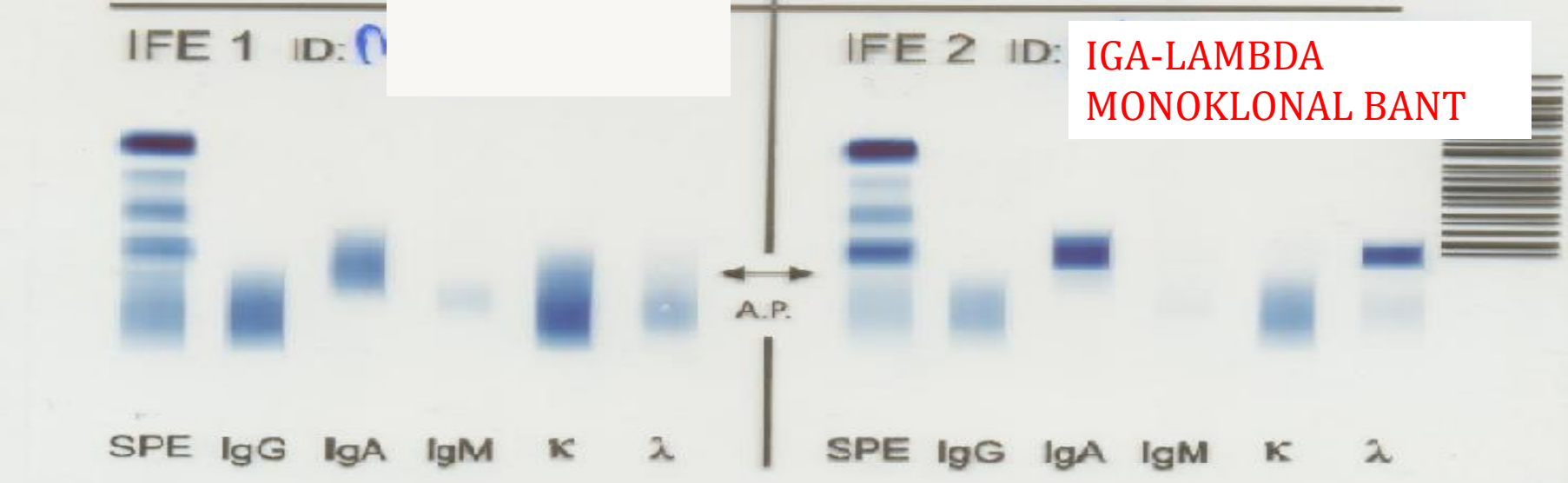
- M-proteinini 0,2 g/L'ye dek saptayabilir

# IFE 4



**IGG-KAPPA, IGA-KAPPA BIKLONAL GAMOPATI**

[redacted]



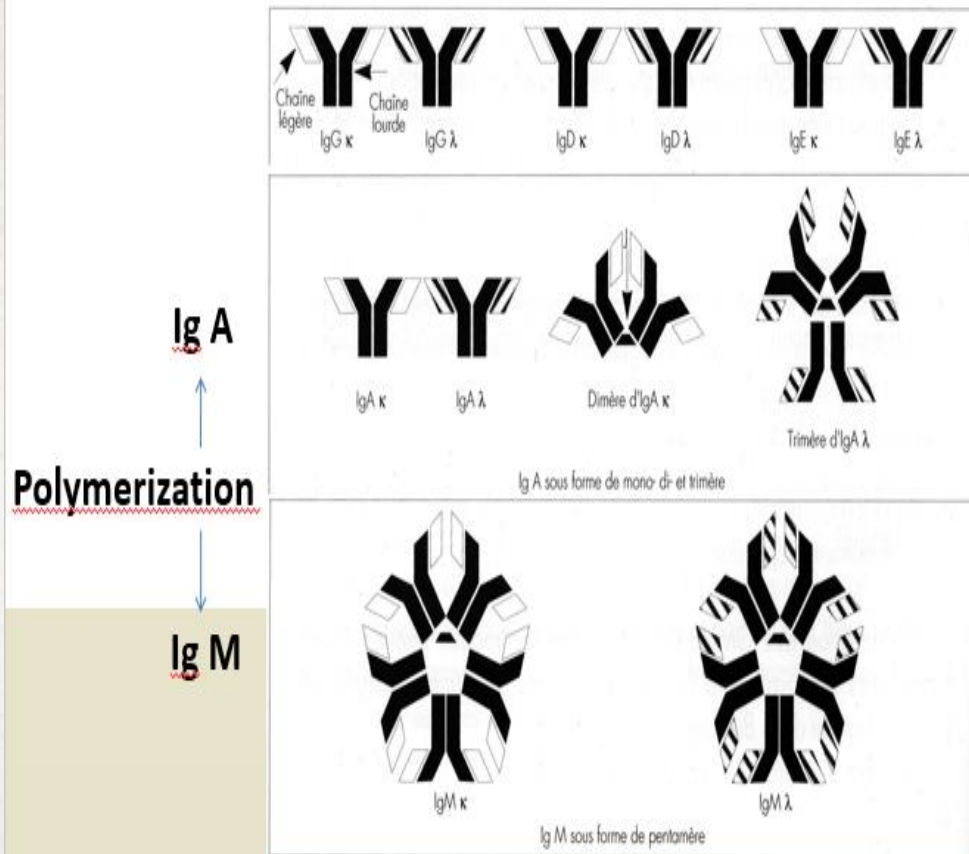
**IGA-LAMBDA MONOKLONAL BANT**

ID 602

Gel N°

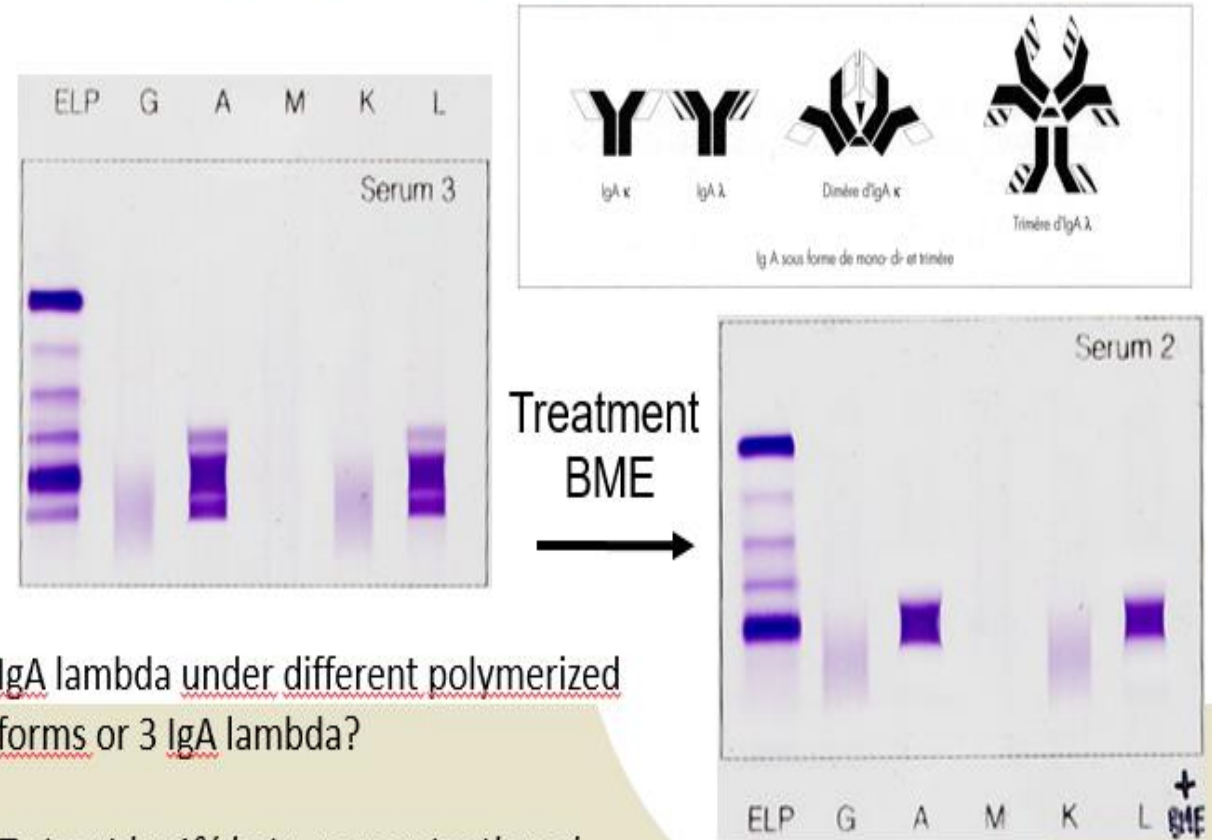
Date / /

## Polymerized monoclonal immunoglobulins



Based on their conformation and charge, these polymer migrate differently on electrophoresis

## Gammopathy with polymerized monoclonal Ig A



IgA lambda under different polymerized forms or 3 IgA lambda?

To treat by 1% beta-mercaptoethanol (BME) due to his depolymerizing effect

After BME treatment: polymerized IgA lambda



## Detecting only light chains, now what?

Jacobs JF<sup>1</sup>, Joosten I, Klasen IS.

71 yaşında Kadın  
Sırt ağrısı dizde ve omuzda artralji  
Rutin X-ray taramada litik kemik  
lezyonları  
kemik iliği aspirasyonunda %24 plasma  
h.  
SPE M protein 24% plasma cells.  
Serum IFE Lambda monokonal bant  
Kemik iliği plasma h. Oranı ve  
semptomlar MM tanısı koydurabilirler .  
M protein tipi belirlenmeden de MM  
tanısı konabilir. Ancak M protein tipi  
önemlidir.  
Tedaviyi takibi ve prognozu belirler

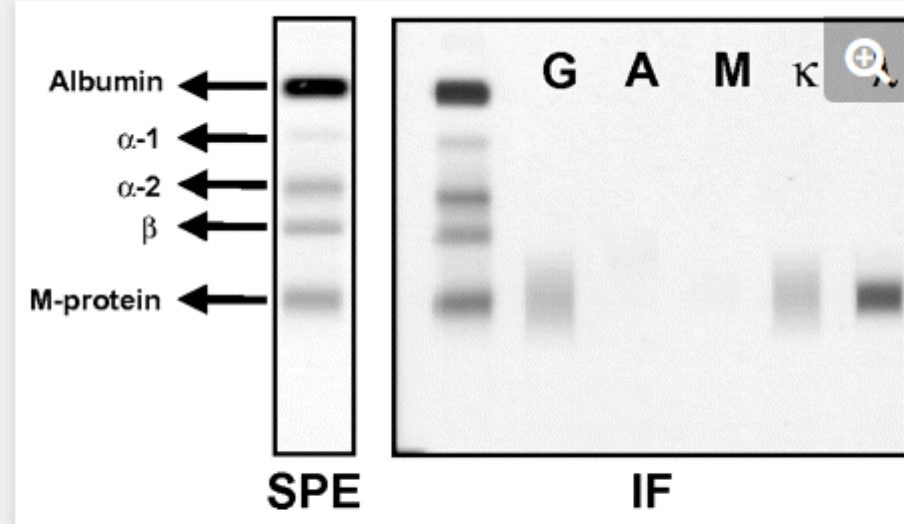
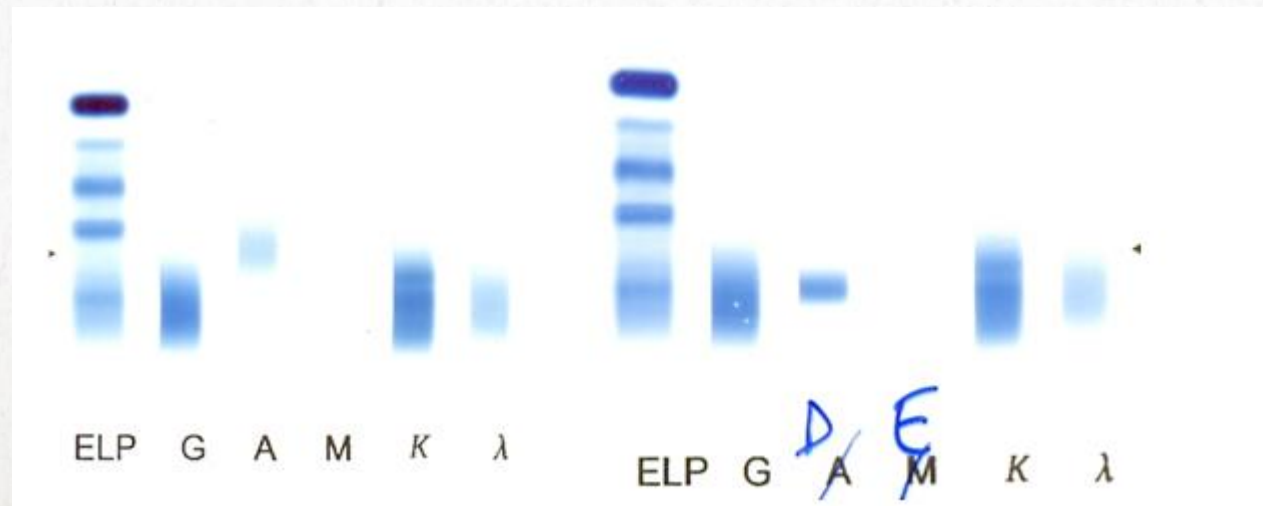
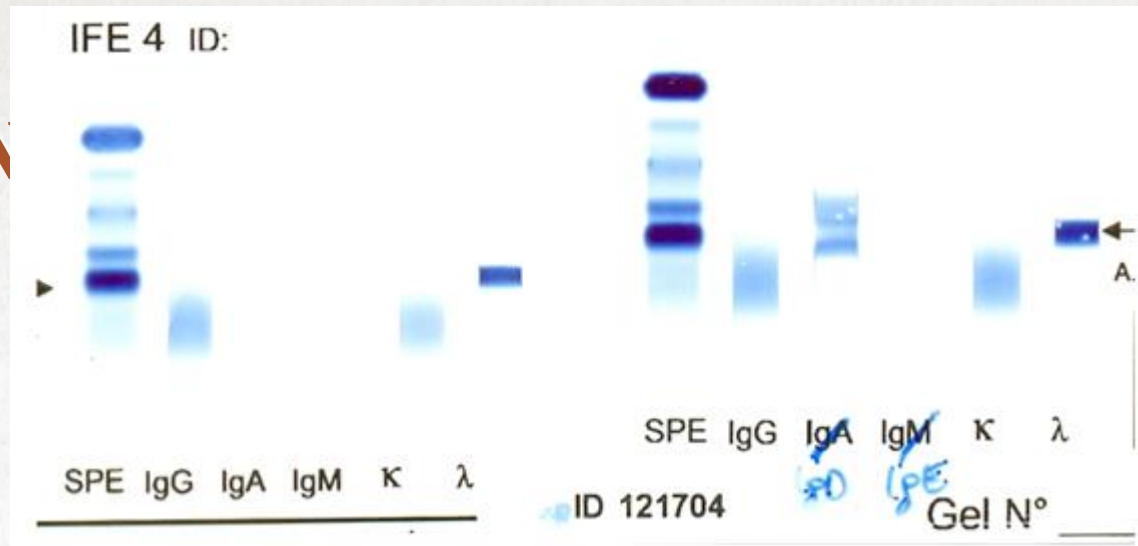


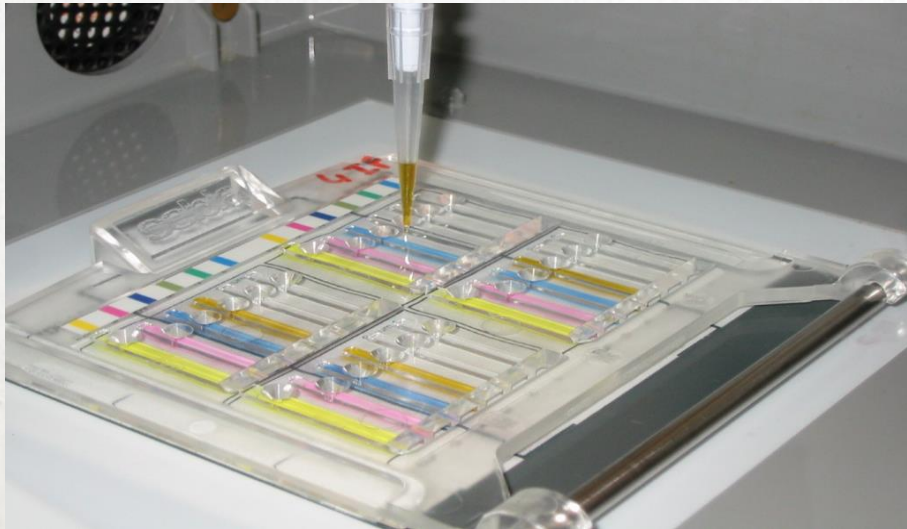
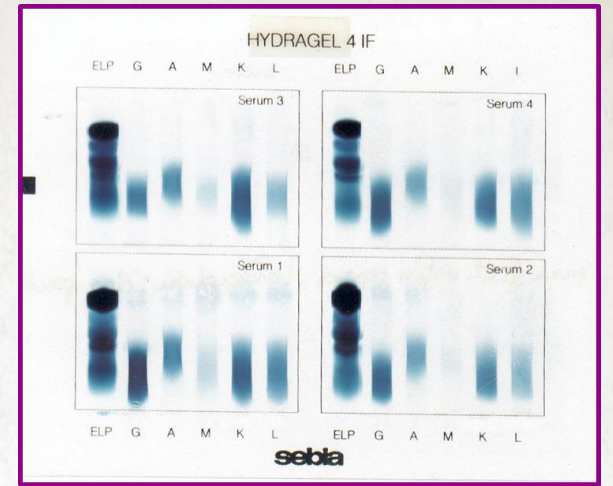
Fig. 1.

[Download figure](#) | [Open in new tab](#)

Serum protein electrophoresis (SPE) shows a clear monoclonal band of 10.2 g/L (left). Immunofixation (IF) shows a λ band with no corresponding IgG, IgA, or IgM heavy chain.

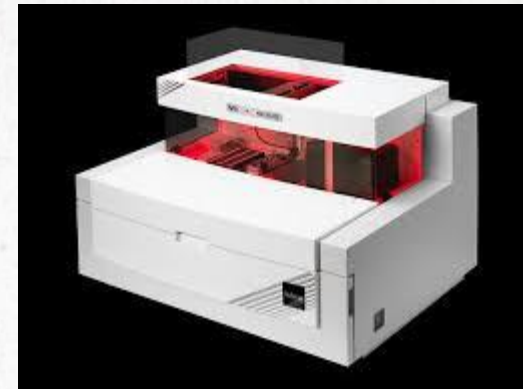
# IMMUN





# ELEKTROFOREZ SİSTEMLERİ

- Manuel
- Yarı otomatik
- Tam otomatik
- Entegre sistemler



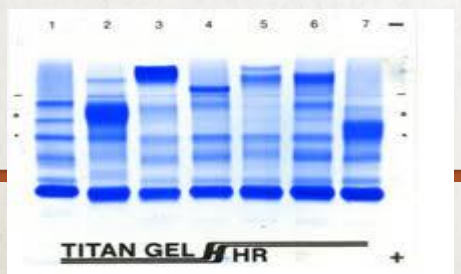
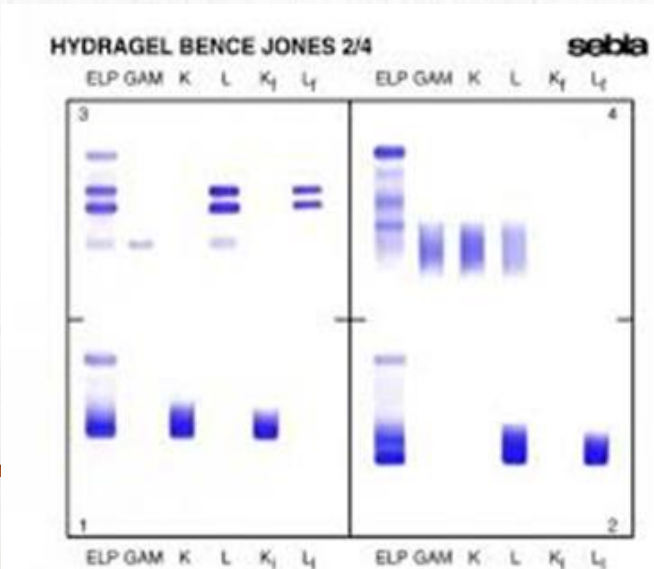
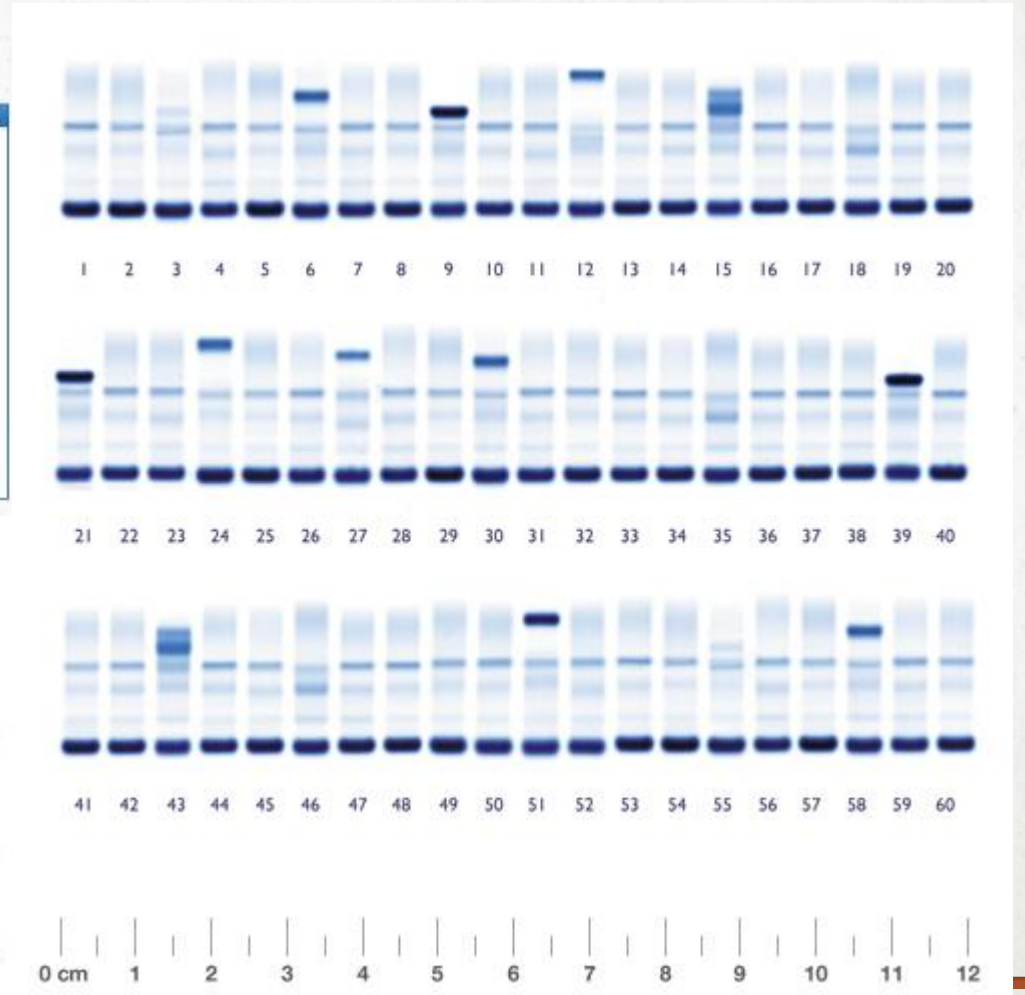
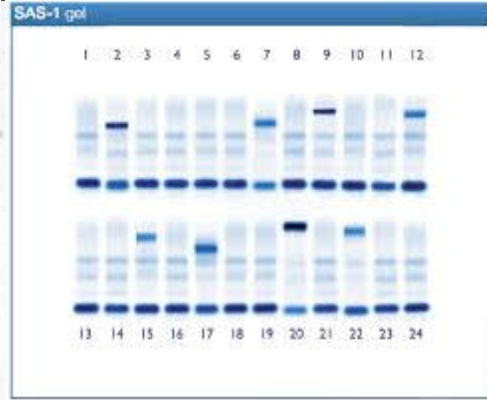
**V8 NEXUS**

V8 NEXUS Capillary SP      Gel Tray Preparation      SAS-3 Gel IFE



# ELEKTROFOREZ VE İMMUNFİKSASYON SİSTEMLERİ

- Gel ve anti serum seçimi
- IG-G, IG-A-IG-M
- IG-D, IG-E
- Kappa
- Lambda
- FL-Kappa
- FL-Lambda



**TEŐEKKÜR EDERİM.....**

Dr. iđdem Sönmez

S.B.Ü. Dr. Abdurrahman Yurtarlan Ankara Onkoloji EAH

---