

Natif ve Denatüre Serum Albüminin Evan Mavisi Muvacehesinde Kâğıt Elektroforezi

Paper Electrophoresis of Native and Denatured Serum Albumin in the Presence of Evan's Blue

Nevzat ÖNER *

Proteinlerin bazı boyarmaddeler ile birleştikleri eskidenberi bilinmektedir. Proteinlerin bu özelliğinden bilimsel araştırmalarda olduğu kadar klinik ve teknik alanda da istifade edilmektedir. Çeşitli protein fraksiyonlarının bromfenol mavisi ve Ponceaux kırmızısı 2R vb. ile kâğıt elektroforezinde, doku proteinlerinin gentian moru ve demir-hematoksin ile histolojide boyanmaları, kan hacminin kongo kırmızısı veya Evan mavisi ile ölçülmesi, fenol kırmızısı ile böbrek fonksiyonlarının incelenmesi, teknikte protein liflerini (yün, ipek) boyama usulleri vb., bu boyarmaddelerin proteinlerle birleşmesinden faydalanılarak geliştirilmiş metodlardır.

Rowentree ve Geraghty⁽¹⁾ tarafından ilk defa böbrek fonksiyonlarının incelenmesinde kullanılan fenol kırmızısının plazma proteinleri ile birleştiği, daha sonra, de Haan⁽²⁾ ve Marshall ve Vickers⁽³⁾ tarafından tespit edilmiştir. Grollman⁽⁴⁾, fenol kırmızısının serum albümin tarafından serum globülin, ovalbümin ve jelatine nazaran çok daha kuvvetle adsorbe edildiğini ultrafiltrasyonla göstermiş ve pH'nın bu adsorpsiyon üzerine tesirini incelemiştir. Bennhold⁽⁵⁻⁶⁾, bir taraftan naftol sarısı S ve kongo kırmızısı vb. gibi çeşitli boyaların serum albümin fraksiyonu ile birleştiklerini tespit etmiş, diğer taraftan, kolloidal Sudan kırmızısını kolesterol-globülin kompleksini boyamak için kullanarak kolesterolün sadece serum globülin fraksiyonlarına bağlandığını göstermiştir. Bu araştırmaların

* Biokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

dan, Bennhold, serum proteinlerinin hayvan organizmasında daha küçük molekülleri ve iyonları taşıyıcı bir rolü olduğu neticesini çıkarmıştır. Klotz ve arkadaşları⁽⁷⁾, metil oranjın serum albümin ile birleştiğini, dializ dengesi tekniği ile ve Klotz⁽⁸⁾ metil oranj, oranj I ve oranj II nin aynı protein ile birleştiğini spektrofotometrik olarak göstererek bu birleşmeden bilhassa adı geçen boyalardaki sülfonat gruplarının mesul olduğunu ileri sürmüşlerdir. Önce Davis⁽⁹⁾, daha sonra, Klotz ve Urquhart⁽¹⁰⁾, serum albüminin metil oranja ilgisinin denatürasyon ile azaldığını da tespit etmişlerdir. Laurence⁽¹¹⁾, flüoresein, eosin vb. gibi flüoresan boyaların da serum albümin tarafından adsorbe edildiğini, flüoresan ışığın polarizasyonunu ve şiddetini ölçmek suretile göstermiştir. Haurowitz ve arkadaşları⁽¹²⁾, kongo kırmızısını kullanarak proteinlerin ısı denatürasyonu esnasında katyonik grupların açığa çıktığını ve denatüre proteinlerin natiflerine nazaran daha çok kongo kırmızısı ile birleştiğini spektrofotometrik olarak göstermişlerdir. Tekman ve Öner⁽¹³⁾, asitlendirilmiş kongo kırmızısının serum albüminin ısı ile koagülasyonuna engel olduğunu ve dolayısıyla kâğıt elektroforezinde göçmesini sağladığını tespit etmişlerdir. Öner ve Öncel⁽¹⁴⁾ ise, asitlendirilmiş kongo kırmızısı vasıtası ile, proteinin ısı denatürasyonunda anyonik grupların açığa çıktığını müşahede etmişlerdir.

Gregersen ve Gibson⁽¹⁵⁾, kan hacminin ölçülmesinde kullanılan bazı tetrazo boyarmaddelerinin absorpsiyon spektrumlarına plazma protein ve sodyum klorüründeki değişikliklerin tesirlerini inceleyerek kan hacminin ölçülmesine en uygun boyanın Evan mavisini (T-1824) olduğunu bulmuşlar ve Evan mavisinin plazma proteinleri ile birleştiği kanaatine de varmışlardır. Efskind⁽¹⁶⁾, plazma albümininin Evan mavisini ile nispeten sabit bir bileşik meydana getirdiğini ve bu bileşimin proteinin koagülasyonu ile tamamen parçalanmadığını müşahade etmiştir. Rawson⁽¹⁷⁾, Evan mavisini (T-1824)'nin plazma albümini ile birleşerek birlikte göç ettiğini Tiselius elektroforezi ve ultrasantrifüj ile göstermiştir. Cope ve Moore⁽¹⁸⁾, radiaktif dibrom Evan mavisini ile, yanık şoklarında albüminin kapiler permeabilitesini incelemişlerdir. Le Veen ve Fishman⁽¹⁹⁾, Evan mavisini (T-1824)'nin albümine plazmanın herhangi bir protein fraksiyonundan çok daha fazla ilgisi olduğunu tespit etmiş, Crepet ve arkadaşları⁽²⁰⁾, Evan mavisini böbrek hastalıklarında albümin klirensinin bir indikatörü olarak kullanmışlardır.

Bu çalışmada, Evan mavisinin serum albüminin ısı ile koagülasyonuna engel olup olmadığı, natif ve ısıtılmış serum albüminler arasında Evan mavisi ile birleşme ve mobilite bakımından kâğıt elektrofrezinde gözle görülür bir fark bulunup bulunmadığı araştırılmıştır.

MATERYEL ve METOD

Deneylerde, sığır serum albümini ve Evan mavisi kullanılmıştır.

Sığır serum albümini, serumun amonyum sülfatla fraksiyonlu çöktürülmesi ile elde edildi. Amonyum sülfat dializ ile uzaklaştırıldı. Elde edilen serum albümin çözeltisinin konsantrasyonu refraktometrik ve pH sı elektrometrik olarak tayin edildi. Serum albüminin konsantrasyonu % 1.8 ve pH sı 5.8 bulundu.

Asitlendirilmek suretile pH sı 2.9 ve 3.0 e ayarlanmış, % 0.2 lik Evan mavisi (E. Merck A. G. Darmstadt) çözeltileri hazırlandı. Bunun için, 200 mg Evan mavisi suda çözüldü ve 0.1 N sülfürik asit ile istenen pH ya ayarlanarak hacmi 100 ml ye tamamlandı.

Kâğıt elektrofrez için Shandon (Power Supply Type 2540) elektrofrez cihazı ve 140 × 345 mm boyutunda Whatman No. 31 kâğıt kullanıldı. Elektrofrez, pH sı 8.6 ve iyonik direnci 0.06 olan veronal/sodyum veronal tamponu ile ve 150 voltta 7 saat müddetle yapıldı.

Elektrofrezden sonra, boyanmış proteinlerin renk şiddetlerini gösteren eğriler Joyce, Chromoscan (Double-Beam Recording and Integrating Densitometer, Serial No. 744)'da otomatik olarak çizildi.

DENEYSEL KISIM

Dört adet zimparalanmış cam kapaklı tüp alındı :

I. tübe, 1 ml serum albümin çözeltisi (18 mg protein) kondu, üzerine 5 ml pH sı 3.0 olan, % 0.2 lik Evan mavisi çözeltisi (10 mg Evan mavisi) ilâve edildi, karıştırıldı, pH sı ölçüldü, 6.0 bulundu.

II. tübe, 1 ml serum albümin çözeltisi ve üzerine pH sı 2.9 olan % 0.2 lik Evan mavisi çözeltisinden 5 ml ilâve edildi, karıştırıldı, pH sı ölçüldü, 5.8 bulundu.

III. tübe, 2 ml serum albümin çözeltisi ve 9.8 ml saf su konduktan sonra 0.01 N sodyum hidroksit ile pH sı 6.0 ya ayarlanarak hacmi saf su ile 12 ml ye iblâğ edildi. Tüp muhteviyatı iki eşit kısma bölündü ve ayrılan numune IV. tübe kondu.

II ve IV numaralı tüpler kaynar su banyosunda 15 dakika ısıtıldı. Evan mavisi ihtiva etmeyen albümin çözeltisi (IV. tüp) bulundu. Evan mavisi muvacehesinde ısıtılan albümin çözeltisi (II. tüp) ise berrak kaldı, akar su altında soğutulduktan sonra, pH sı ölçüldü, 6.0 bulundu.

Bundan sonra, kurşun kalemle çizilerek, 35 mm lik dört şeride ayrılan elektroforez kâğıdına dört numunenin her birinden 0.1 ml tatbik etmek suretiyle elektroforez yapıldı. Elektroforezi müteakip kâğıt, 70 - 80°C de kurutuldu ve önceden çizgi ile ayrılmış yerlerinden makasla kesilerek dört şeride ayrıldı. III ve IV numaralı şeritler serum albümininin yerini tespit etmek için bromfenol mavisi ile boyandı⁽²³⁾, akar su altında yıkandı, kurutuldu.

Evan mavisi ile boyanmış I ve II numaralı şeritler ile, bromfenol mavisi ile boyanmış III numaralı şeritteki albüminlerin renk şiddetlerini gösteren eğriler, Chromoscan'ın *specimen drive gear ratio* düğmesi 1:1 durumunda tutularak ve kırmızı filtre kullanılarak, çizildi.

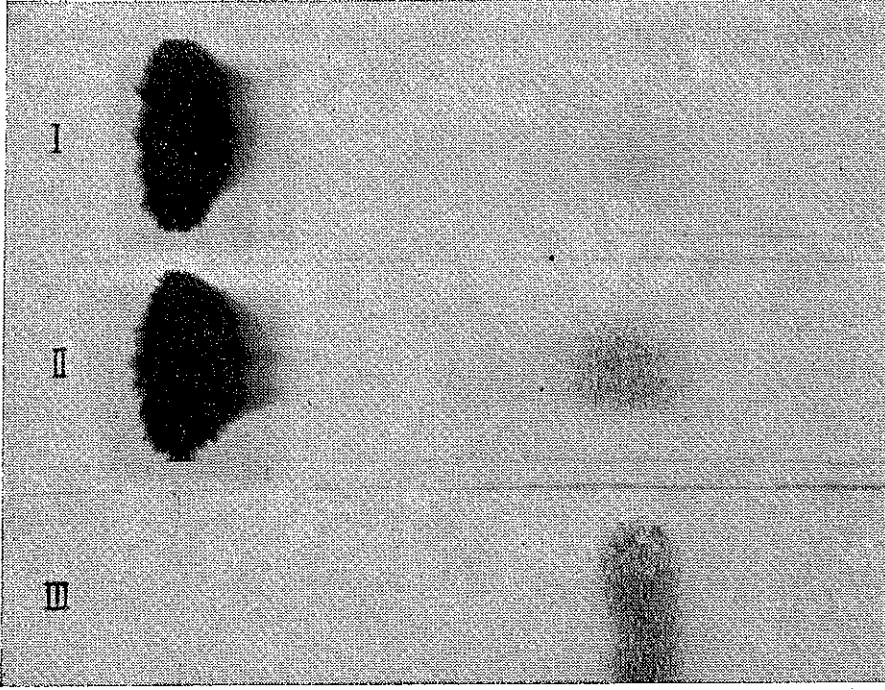
BULGULAR

Evan mavisi pH 6.0 da serum albümininin ısı ile koagülasyonuna engel olmakta ve dolayısıyla kâğıt elektroforezinde göç etmesine imkân vermektedir (Şekil 1. II).

Evan mavisi muvacehesinde ısıtılmış ve ısıtılmamış serum albümininin kâğıt elektroforezinde, serum albümininin Evan mavisi ile, her iki numunede de gözle görülür şekilde boyandığı, ayrıca boyamağa lüzum kalmadığı müşahede edilmektedir (Şekil 1. II ve I).

Evan mavisi muvacehesinde ısıtılmış serum albümininin, Evan mavisi ile muamele edilmiş, fakat ısıtılmamış serum albümine nazaran daha koyu boyandığı ve elektroforetik mobilitesinin de biraz azaldığı görülmektedir (Şekil 1. II ve I). Evan mavisi ihtiva eden ve Evan mavisi ihtiva etmeyen, fakat elektroforezden sonra bromfenol mavisi ile boyanmış, natif albüminlerin elektroforetik mobili-

teleri arasında fark görülmemektedir (Şekil 1. I ve III). Buna göre, serum albümine elektroforezden önce ilâve edilen Evan mavisi, deney şartlarında, natif serum albüminin mobilitesinde bir fark meydana getirmemiştir.

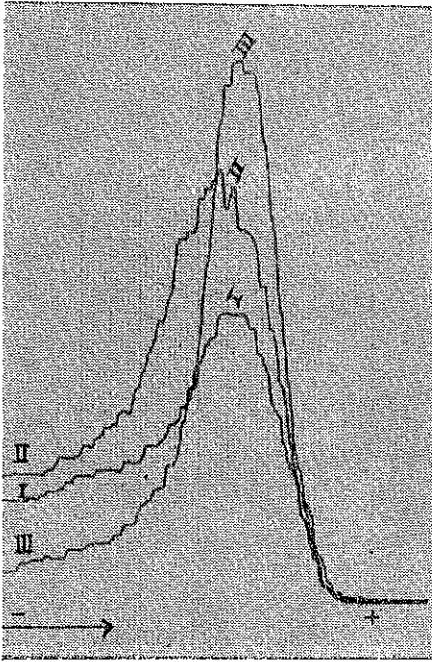


Şekil 1. Evan mavisi ile muamele edilmiş, ısıtılmamış (I), ısıtılmış (II) ve Evan mavisi ihtiva etmeyen (elektroforezden sonra bromfenol mavisi ile boyanmış) serum albüminin kâğıt elektroforezi.

Evan mavisi ile muamele edildikten sonra ısıtılmamış ve ısıtılmış serum albüminlerde ve bromfenol mavisi ile boyanmış serum albüminde görülen boyanma ve mobilite farklarını, objektif olarak da tespit etmek maksadiyle Chromoscan'da otomatik olarak çizilmiş dansitometre eğrileri Şekil 2 de görülmektedir. Bu eğrilerde ordinat, Evan mavisi ile muamele edilmiş, fakat ısıtılmamış (I), Evan mavisi muvacesinde ısıtılmış (II) ve Evan mavisi ihtiva etmeyen,

fakat bromfenol mavisi ile boyanmış (III) serum albüminlerin renk şiddetlerini (optik dansitelerini) göstermektedir. Absis ise, bu serum albüminlerin, mm cinsinden, katoda olan uzaklığına ve dolayısıyla elektroforetik mobilitesine tekabül etmektedir.

Bileşimi sabit tutulan çözücüde, konsantrasyonu ile optik dansitesi arasındaki münasebet Lambert-Beer kanununa tamamen uyan Evan mavisi⁽¹⁵⁾ muvacehesinde ısıtılmış serum albüminin renk şiddetinin ısıtılmamışınkine oranı 1.5/1 kadardır (Şekil 2. II ve I).



Şekil 2. Evan mavisi ile muamele edilmiş, ısıtılmamış (I), ısıtılmış (II) ve Evan mavisi ihtiva etmeyen (elektroforezden sonra bromfenol mavisi ile boyanmış) (III) serum albüminlerin dansitometre eğrileri.

Evan mavisi ihtiva etmeyen ve pH 6.0 da ısıtıldığı zaman bulan serum albümin (IV. tüp) elektroforezde geçmediği gibi, kontrol olmak üzere, pH sı 6.0 olan ısıtılmış ve ısıtılmamış Evan mavisi çözeltilerinden de kâğıt elektroforezi yapılmış ve boyanın da geçmediği tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Sudaki % 0.2 lik çözeltisinin pH sı 7.7 olan Evan mavisi her ne kadar serum albüminin ısı ile koagülasyonuna engel olursa da, al-

kalik ortamın da serum albüminin ısı ile koagülasyonunu önleyebilmesi sebebiyle, bu şartlar altında, bu koruyucu tesir Evan mavisine atfedilemez. Fakat, Evan mavisini ihtiva etmeyen ve pH sı 6.0 olan serum albüminin çözeltisi kaynar su banyosunda ısıtıldığı zaman bulandığı halde, asitlendirilmiş Evan mavisini de, aynı pH da, serum albüminin ısı ile koagülasyonuna engel olmaktadır. Anyonik boya vb. gibi bazı maddelerin serum albüminin ısı ile koagülasyonunu önleme etkisinin, bu maddeleri adsorbe eden globüler albümin moleküllerinin birbirleriyle birleşip agregat teşkil etmelerini önleyen, geniş hidrofik kompleksler meydana getirmelerinden ileri geldiği farzedilmektedir⁽²²⁾. Evan mavisinin serum albüminin ısı ile koagülasyonunu önleme etkisi için de aynı izah tarzı ileri sürülebilir.

Natif ve denatüre serum albümin ile birleşebilen kongo kırmızısının⁽¹²⁾ serum albüminini kâğıt elektroforezinde gösterecek kadar boyamamasına rağmen^(18,23) Evan mavisinin boyaması, Evan mavisinin serum albümin ile daha çok birleştiğini göstermektedir. Klotz ve arkadaşları⁽⁷⁻⁸⁾, kongo kırmızısının proteinlerle birleşmesinde boyanın sülfonat grupları ile proteinin katyonik gruplarının rolü olduğunu ileri sürmüşlerdi. Haurowitz ve arkadaşları ise⁽¹²⁾, kongo kırmızısındaki sülfonat gruplarından başka konjüge çifte bağlar zincirinin de boya-protein kompleksinin teşekkülünde etkili olabileceği neticesine varmışlardır. Molekül yapısı bakımından kongo kırmızısına oldukça benzeyen Evan mavisinin serum albümin ile kongo kırmızısından daha fazla birleşmesi, Evan mavisinin daha fazla sayıda sülfonat grubu ihtiva etmesinden ileri gelmiş olabilir.

Proteinlerin ısı ile denatürasyonu esnasında, natif protein moleküllerindeki tuz köprüleri, peptit zincirlerinin termik hareketleri ile açılarak moleküllerini ve moleküllerarası yeni tuz köprüleri meydana gelmekte ve neticede protein koagüle olmaktadır⁽²⁴⁾. Bu fikri kabul etmeyen bazı araştırmacılar ise⁽²⁵⁻²⁹⁾, termik hareketlerle açılan protein moleküllerinin koagülasyonunda yeni intermoleküler S — S köprülerinin meydana geldiği kanaatindedirler.

Evan mavisini, serum albüminin ısı ile denatürasyonunun koagülasyon safhasına engel olmakla beraber protein moleküllerinin açılmasını önleyememektedir. Bu keyfiyet, Evan mavisini muvacehesinde ısıtılmış serum albüminin elektroforetik mobilitesinin azalmış olmasından ve Evan mavisini ile daha koyu boyanmasından anlaşılmalıdır. Zira, koagülasyonu önleyen bir ortamda ısı ile denatüre edilmiş

serum albüminin elektroforetik mobilitesi daha azdır⁽³⁰⁾. Proteinlerin ısı ile denatürasyonu esnasında, katlanmış moleküllerin açılması neticesinde meydana çıkan katyonik grupların denatüre proteinlerin daha fazla kongo kırmızısı ile birleşmelerine sebebiyet verdikleri spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir⁽¹²⁾.

Ö Z E T

Asitlendirilmiş Evan mavisinin serum albüminin ısı ile koagülasyonuna pH 6.0 da engel olduğu ve dolayısıyla kâğıt elektroforezinde göç etmesine imkân verdiği müşahede edildi. Evan mavisi muvacehesinde ısıtılmış serum albüminin, ısıtılmamışa nazaran daha koyu boyanması dolayısıyla, daha çok Evan mavisi ile birleştiği ve elektroforetik mobilitesinin daha az olduğu tespit edildi.

Bu müşahedelerden, Evan mavisi muvacehesinde ısıtılmış serum albüminin koagüle olmamasına rağmen denatürasyona uğradığı neticesi çıkarıldı.

S U M M A R Y

The acidified Evan's blue prevents the coagulation of the bovine serum albumin at pH 6.0 and permits paper electroforetic migration of the heat-treated protein.

The electrophoretic mobility of the heat-treated serum albumin is less than that of the native serum albumin, in the presence of Evan's blue, and the former combines with much more dye than the latter.

It was concluded from these observations that, the heat-treated serum albumin does not coagulate in the presence of Evan's blue, but it denatures.

L İ T E R A T Ü R

1. Oser, B. L., *Hawk's Physiological Chemistry*, 1275, McGraw-Hill, New York (1965).
2. de Haan, J., *J. Physiol.*, **56**, 444 (1922).
3. Marshall, E. K., Vickers, J. L., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **34**, 1 (1923) - Ref. *Advanc. Prot. Chem.*, **3**, 463 (1947).
4. Grollman, A., *J. Biol. Chem.*, **64**, 141 (1925).
5. Bennhold, H., *Ergeb. inn. Med. u. Kinderheilk.*, **42**, 273 (1932) - Ref. *Advanc. Prot. Chem.*, **3**, 466 (1947).

6. Bennhold, H., Kylin, E., Rusznyak, S., *Die Eiweißkörper des Blutplasmas*, 470. Theodor Steinkopff, Dresden and Leipzig (1938) - Ref. *Advanc. Prot. Chem.*, **3**, 466 (1947).
7. Klotz, I. M., Walker, F. M., Pivan, R. B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **68**, 1486 (1946).
8. Klotz, I. M., *ibid.*, **68**, 2299 (1946).
9. Davis, B. D., *Amer. Scientist*, **34**, 611 (1946) - Ref. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 2265 (1952).
10. Klotz, I. M., Urquhart, J. M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **71**, 1597 (1949).
11. Laurence, D. J. R., *Biochem. J.*, **51**, 168 (1952).
12. Haurowitz, F., Dimoia, F., Tekman, S., *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 2265 (1952).
13. Tekman, S., Öner, N., *Nature (London)*, **204**, 287 (1964).
14. Öner, N., Öncel, İ., *İstanbul, Ec. Fak. Mec.*, **3**, 125 (1967).
15. Gregersen, M. I., Gibson, J. G., *Amer. J. Physiol.*, **120**, 494 (1937).
16. Efskind, L., *Acta Med. Scand.*, **103**, 382 (1940).
17. Rawson, R. A., *Amer. J. Physiol.*, **138**, 708 (1943).
18. Cope, O., Moore, M. F. O., *J. Clin. Invest.*, **23**, 241 (1944) - Ref. *Amer. J. Physiol.*, **151**, 26 (1947).
19. Le Veen, H. H., Fishman, W. H., *Amer. J. Physiol.*, **151**, 26 (1947).
20. Crepet, M., Chiesura, P., Gobbato, F., *Minerva nefrol.*, **1**, 145 (1954) - Ref. *C. A.*, **50**, 9587 i (1956).
21. Durrum, E. L., *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950).
22. Haurowitz, F., *The Chemistry and Functions of Proteins*, 165, Academic Press, New York (1963).
23. Tekman, S., Öner, N., *Negredilmemis Deneyler*.
24. Haurowitz, F., *Chemistry and Biology of Proteins*, 129, Academic Press, New York (1950).
25. Jensen, E. V. et al., *J. Biol. Chem.*, **185**, 411 (1950).
26. Kauzmann, W. et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5139 (1953).
27. Halwer, M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 183 (1954).
28. Hospelhorn, V. D. et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 2827 (1954).
29. Warner, R. C., Levy, M., *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 5735 (1958) - Ref. Haurowitz, F., *The Chemistry and Functions of Proteins*, 163, Academic Press, New York (1963).
30. Tekman, S., *İst. Tıp Fak. Mec.*, **28**, 85 (1965).

(Redaksiyona verildiği tarih : 14 Eylül 1967)