

## **Boyanmış Proteinin Kâğıt Elektrofrez**

### **Paper Electrophoresis of Dyed Protein**

**Nevzat ÖNER\***

Proteinlerin bazı boyarmaddelerle birleşme özelliğinden çeşitli alanlarda faydalanılmaktadır. Kâğıt elektrofrezinin yeni bir buluş olarak ortaya konmasından sonra, elektrofrezde ayrılan protein fraksiyonlarını göstermek için bazı protein boyama metotları geliştirilmiştir. Bu boyama usullerinde proteinler, genel olarak, elektrofrezden sonra proteinleri denatüre ederek tespit eden maddeler muvacehesinde boyarmadde ile muamele edilir, sonra boyanın fazlası kâğıdın su veya başka sıvılarla yıkanması ile uzaklaştırılır. Böyle bir boyama usulünün kusursuz olması için boyarmaddenin protein üzerinde tam ve değişmez bir şekilde tespit edilmesi ve boyanan proteinin homogen olması gerekir. Bu iki şartın hiçbiri tam gerçekleşmemekle beraber, kâğıt üzerinde boyama usullerinin kolay ve sür'atli olması sebebiyle bu usuller oldukça geniş uygulama alanı bulmuştur.

Kâğıt elektrofrezinde proteinleri boyamak için çeşitli boyarmaddeler kullanılmaktadır. En çok kullanılanlar bromfenol mavisi<sup>(1)</sup>, Azocarmin B<sup>(2)</sup>, Amidoschwarz 10 B<sup>(3-4)</sup>, Lichtgrün F. S.<sup>(5-6)</sup> ve Ponceaux kırmızısı 2 R<sup>(7)</sup> dir.

Gregersen ve Gibson<sup>(8)</sup> Evan mavisinin (T-1824) de plazma proteinleri ile birleştiğini ileri sürmüşler, Rawson<sup>(9)</sup> ise bu boyarmaddenin plazma proteinlerinden bilhassa albümin ve daha az nispette  $\alpha$  ve  $\beta$  globülinlerle de birleştiğini ve bu fraksiyonlarla birlikte göç ettiğini, fakat  $\gamma$  globülin ile birleşmediğini Tiselius elektrofrezini ile göstermiştir.

Bu çalışmada, protein gözetisine elektrofrezden önce ilâve edilebilen, Evan mavisinin kâğıt elektrofrezinde de serum protein fraksiyonlarının boyanmasında bir boyarmadde olarak kullanılıp kullanılmayacağı ve serum albümin fraksiyonunu en az hangi konsantrasyonda bariz şekilde boyadığı araştırıldı.

\* Biokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

## M A T E R Y E L ve M E T O T

Deneylerde, normal insan serumu, sığır serum albümini ve Evan mavisi kullanılmıştır.

Sığır serum albümini, serumun amonyum sülfatla fraksiyonlu çöktürülmesi ile elde edildi. Amonyum sülfat dializ ile uzaklaştırıldı. Bu suretle 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.

Evan mavisi (E. Merck A. G. Darmstadt)'nin sudaki % 1-4 lük çözeltileri kullanıldı.

Kâğıt elektroforezi için, Shandon (Power Supply Type 2540) elektroforez cihazı ve 120 × 345 mm boyutunda Whatman No. 3 ve 150 × 345 mm boyutunda Whatman No. 31 kâğıt kullanıldı. Kâğıtlar kurşun kalemle çizilerek 30 mm lik şeritlere ayrıldı. Elektroforez pH sı 8.6 ve iyon kuvveti 0.06 olan barbital/barbital-sodyum tamponu ile 150 ve 300 voltta 7 saat müddetle yapıldı.

## D E N E L K I S I M

## I. İnsan serumu ile yapılan deneyler :

Dört adet deney tübünden herbirine 1 er ml insan serumu (72 mg protein) kondu, sonra birinci tübe 3 ml su, ikinci tübe 3 ml % 2 lik, üçüncü tübe 3 ml % 3 lük ve dördüncü tübe 3 ml % 4 lük Evan mavisi çözeltileri ilâve edildi.

Bundan sonra, Whatman No. 3 elektroforez kâğıdına bu nümunelerin herbirinden 0.06 ml tatbik edilerek 300 voltta elektroforez yapıldı. Elektroforezden sonra kâğıt 70-80°C de kurutuldu ve Evan mavisi ihtiva etmiyen şerit çizgi ile ayrılmış yerinden makasla kesilerek ayrıldı, bu kısım bromfenol mavisi ile boyandı.

## II. Sığır serum albümini ile yapılan deneyler :

Onbeş adet deney tübü alındı, ilk onikisine 2 şer ml (36 mg) ve son üçüne 1 er ml (18 mg) sığır serum albümini kondu. Bundan sonra, ilk beş tübe % 1 lik Evan mavisi çözeltisinden sırasıyla 0.4; 0.8; 1.2; 1.6 ve 2 ml ilâve edildi. İlk dört tübün muhteviyatı distile su ile 4 ml ye tamamlandı, karıştırıldı. Herbirinin pH sı ölçüldü, 6.8-6.95 arasında bulundu.

İkinci beş tübe % 2 lik Evan mavisi çözeltisinden sırasıyla 1.2; 1.4; 1.6; 1.8 ve 2 ml kondu ve ilk dört tübün muhteviyatı 4 ml ye

tamamlanacak şekilde distile su ilâve edildi, karıştırıldı, herbirinin pH sı ölçüldü, pH lar 6.95-7.0 arasında idi.

Üçüncü beş tüpten birincisine % 3 lük, ikincisine % 4 lük Evan mavisi çözeltilerinden 2 ml, üçüncü, dördüncü ve beşinci tüplere sırasıyla % 2, % 3 ve % 4 lük Evan mavisi çözeltilerinden 3 er ml kondu, karıştırıldı. Herbirinin pH sı ölçüldü, 7.25-7.3 arasında bulundu.

Whatman No. 31 elektrofrez kâğıtlarına bu nünunelerin 2 ml serum albümin ihtiva edenlerinden 0.04 er ml ve 1 ml serum albümin ihtiva edenlerinden 0.08 er ml tatbik edildi ve 150 voltta elektrofrez yapıldı. Elektrofrez müteakip kâğıtlar 70-80°C de kurutuldu.

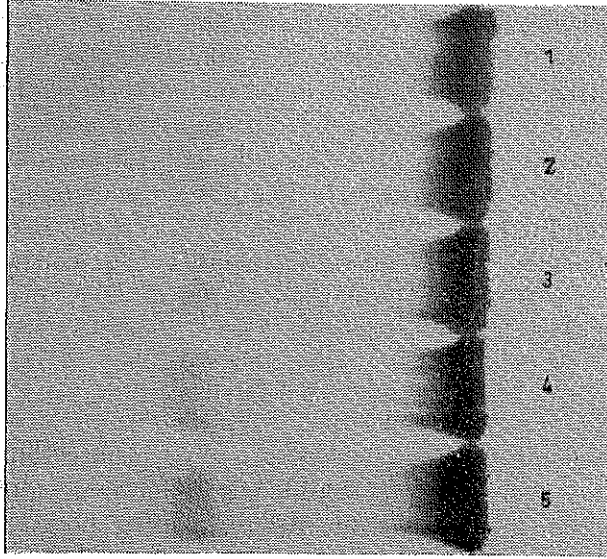
#### BULGULAR

İnsan serumunun Evan mavisi ile kâğıt elektrofrezinde, göç eden albümin fraksiyonu bariz şekilde boyandığı halde, globülin fraksiyonları tefrik edilememektedir. Kontrol olarak bromfenol mavisi ile boyanan nünunede ise bütün serum protein fraksiyonları görülmektedir.

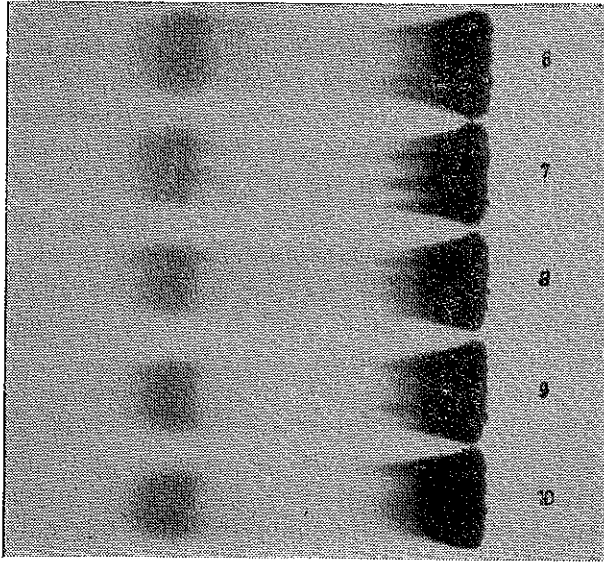
Sığır serum albümini ile yapılan deneylerde, bir mol serum albümin için yaklaşık olarak 8 mol Evan mavisi ihtiva eden protein-boyarmadde karışımında bariz bir boyanma müşahede edilmemektedir (Şekil 1, 1). Fakat, bir mol serum albümine isabet eden Evan mavisi miktarını sekizer mol arttırmak suretiyle yapılan deneylerde serum albüminin boyanmasının, sâbit serum albümin konsantrasyonunda, boyarmaddenin konsantrasyonu ile arttığı gözle tefrik edilmektedir (Şekil 1 ve 2). Ancak, Şekil 1 de 1 ile 5 arasındaki boyanma farkı çok bariz olduğu halde Şekil 2 de 6 ile 10 arasındaki fark Şekil 1 deki kadar bariz değildir.

Şekil 1 ve 2 de görüldüğü gibi, Evan mavisinin en büyük kısmı protein boyarmadde karışımının hemen hemen kâğıda tatbik noktasında kalmakta, ancak pekaz bir kısmı serum albümin ile birleşerek birlikte göç etmektedir. Bir mol serum albümin için birbirinden daha çok farklı konsantrasyonda (120, 160, 240, 360, 480 mol) Evan mavisi ihtiva eden deneylerde (son beş tüp) serum albüminin kâğıt elektrofrezinde boyanması da boyarmadde konsantrasyonu ile artmakta devam etmektedir.

Bütün bu müşahedelerden anlaşıldığına göre, Evan mavisinden, kâğıt elektrofrezinde, serum protein fraksiyonlarından sadece serum albüminin boyanmasında faydalanılabilir. Serum albüminin Evan ma-



1



2

Şekil 1 ve 2. Konsantrasyonu sâbit tutulan serum albüminin, artan konsantrasyonda Evan mavisi muvacehesinde kâğıt elektroforezi.

visi ile birleşerek boyanması boyarmaddenin aşırı bir konsantrasyonuna ihtiyaç göstermekte ve bir mol serum albüminin boyanması için ortamda en az 16 mol Evan mavisinin bulunması gerekmektedir.

Evan mavisinin serum veya serum albümine, elektrofözezen önce ilâve edilmesi, serum albüminin kâğıt üzerindeki göçünü gözle takip etme imkânı sağlamaktadır.

#### TARTIŞMA

Serum albümine büyük ilgisi olan Evan mavisinin, albüminden başka diğer serum protein fraksiyonlarından  $\alpha$  ve  $\beta$  globülinlerle de birleştiği Tiselius elektrofözezi ile gösterildiği halde<sup>(9)</sup>, ortamda kâfi konsantrasyonda Evan mavisi bulunmasına rağmen globülin fraksiyonları kâğıt elektrofözezinde tefrik edilememektedir. Bu farkın serum albümünde Evan mavisi ile birleşen grupların serum globülinlerde, albümine nazaran, çok daha az olmasından ileri gelmiş olması muhtemeldir.

Rawson'un bulgularına göre<sup>(9)</sup>, bir mol serum albümin en çok 8-14 mol Evan mavisi ile birleşmektedir. Serum albümin - Evan mavisi karışımında, bir mol protein için sekiz mol boyarmadde bulunmasına rağmen, boyarmaddenin en büyük kısmı serum albümin ile birleşmediğinden, bariz bir boyanma görülmemektedir. Bu durum, serum albümin - Evan mavisi kompleksinin gözle görülecek kadar teşekkülü için, kütlelerin tesiri kanununa göre, boyarmaddenin ortamda aşırı bir miktarının bulunmasına ihtiyaç olmasından ileri gelmiş olabilir.

Evan mavisinin kalitatif ve —bileşimi sâbit tutulan çözücüde Lambert - Beer kanununa riayet ettiğinden<sup>(9)</sup>— bazı kantitatif maksatlarla serum albümini boyama vasıtası olarak kullanılması mümkündür. Nitekim, bundan önceki bir çalışmada<sup>(10)</sup> Evan mavisinin serum albümini boyamasından faydalanılarak denatüre serum albüminin natif serum albümine nazaran daha çok Evan mavisi ile birleştiği kâğıt elektrofözezi ile gösterilmiştir.

#### Ö Z E T

İnsan serumu ve sığır serum albümini ile Evan mavisi muvacehesinde kâğıt elektrofözezi yapıldı. Serumda albüminden başka pro-

tein fraksiyonlarının tefrik edilecek kadar boyanmadığı müşahede edildi.

Serum albüminin Evan mavisi ile boyanması, sâbit protein konsantrasyonunda boyarmaddenin konsantrasyonu ile artmaktadır. Bir mol serum albümin için ortamda en az 16 mol Evan mavisi bulunduğu zaman bariz bir boyanma görülmektedir.

Protein çözeltisine kâğıt elektroforezinden önce ilâve edilebilen Evan mavisinin serum albüminin göçünün gözle izlenmesini sağlayan bir boyarmadde olarak kullanılabilceği ileri sürüldü.

#### SUMMARY

Paper electrophoresis of human serum and bovine serum albumin was carried out, in presence of Evan's blue. It was observed that only the albumin fraction of the serum was stained whereas globulin fractions were not.

The concentration of the serum albumin being constant, the staining increases with the concentration of the dye. When 16 mol of dye exists per 1 mol of serum albumin, a quite obvious staining is observed.

It is suggested that, Evan's blue, added in the protein solution before paper electrophoresis, can be used as a dye which renders possible the detection of the serum albumin migration.

#### LİTERATÜR

1. Durrum, E. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950).
2. Turba, F., Enekel, H., *Naturwiss.*, **37**, 93 (1950). - Ref. Lederer, M., *Introduction to Paper Electrophoresis and related methods*, 97, Elsevier, Amsterdam (1955).
3. Grassmann, W., Hunnig, K., *Z. Physiol. Chem.*, **290**, 1 (1952).
4. Grassmann, W., Hunnig, K., *Naturwiss.*, **37**, 496 (1950). - Ref. Lederer, M., *Introduction to Paper Electrophoresis and related methods*, 97, Elsevier, Amsterdam (1955).
5. Wunderly, Ch., *Die Papierelektrophorese*, Sauerlander et Co, Aarau-Frankfurt/main (1960). - Ref. Başar, M., Bodur, H., *Klinikte Elektroforez*, **40**, İstanbul Matbaası, İstanbul (1964).
6. Caspani, R., Magistrelli, M., *Plasma*, **2**, 1 (1954). - Ref. *ibid.*
7. Röttger, H., *Naturwiss.*, **39**, 451 (1952). - Ref. *ibid.*
8. Gregersen, M. I., Gibson, J. G., *Am. J. Physiol.*, **120**, 494 (1937).
9. Rawson, R. A., *ibid.*, **133**, 708 (1943).
10. Öner, N., *İstanbul Ecz. Fak. Mec.* **3**, 195 (1967).

(Redaksiyona verildiği tarih: 2 Aralık 1967)