

SELLÜLOZ ASETAT İLE PROTEİN ELEKTROFOREZİNDE ÇEŞİTLİ BOYALARIN PROTEİN FRAKSİYONLARINA ETKİSİ

Dr. Özgül ÖZGÜVEN

Dr. Ender TEKİN

ÖZET

40 vak'anın kan serumu kullanılarak yapılan bu çalışmada, sellüloz a-
setat elektroforezinde kullanılan üç ayrı boyanın protein fraksiyonlarına o-
lan etkisi araştırılmıştır.

Amidoschwarz ve Panceau-s boylarıyla alınan sonuçların özdeş oldu-
ğu ; Vert de Lissamine'in, bu iki boyaya oranla, albümin lehine, alpha-1
ve alpha-2 globulinler aleyhine farklı sonuçlar verdiği anlaşılmıştır.

SUMMARY

We investigated the effects of three different dyes on protein fractions
during the cellulose acetate electrophoresis by using the blood sera of 40
cases.

We concluded that ; the results of Amidoschwarz and Panceau-s dyes
are equivalent but if we compare the results of Lissamine green with the
results of these two above-mentioned dyes we understand that Lissamine
green has different results which are against to alpha-1 and alpha-2 glo-
bulins and supporting the albumin.

İlk defa 1950 yılında Durrum kâğıt elektroforeziyle serum pro-
teinlerini fraksiyonlarına ayırmayı başarmış ve bu metod geniş tat-
bik sahası bulmuştur (1). 1957 yılında (2) elektroforezde taşı-
yıcı vasat (support) olarak kâğıt yerine sellüloz asetat kullanmış,
bu yeni vasat pür ve çok az absorban oluşu sebebiyle kâğıda ter-
cih edilmiştir.

Zamanla, geniş ölçüde kullanılan bu metottan en iyi şekilde fay-
dalanmak için teknikle ilgili araştırmalar ağırlık kazanmıştır. Bu

İzmir: Ege Üniv. Tıp Fak. İç Hast. Kürsüsü Öğretim Üyesi
İstanbul Üniv. Bursa Tıp Fak. İç Hast. Kürsüsü Asistanı.

meyanda tamponun PH'sı ve formülü (3), kullanılan volt ve migrasyon süresi (4, 5), kullanılan boyaların cinsi ve boyama süresi (6,7,8) boyaların albümine olan affiniteleri (6, 7, 8) gibi faktörlerin üzerinde durulmuştur. Bütün bu araştırmaların sonunda protein fraksiyonlarına ait elektroforetik değerlerin teknik şartların farklılığı ile değiştiği: klinikte, özellikle araştırmalarda, ancak aynı şartlarda gerçekleştirilen elektroforogramlara ait değerlerin faydalı ve mukayese edilebilir olduğu anlaşılmıştır (6, 7, 8). Buna rağmen çeşitli tampon, boya, hatta taşıyıcı vasat kullanılarak elde edilen elektroforez değerlerinin birbiriyle mukayese edildiği yayınlara seyrek olmayarak rastlanmaktadır.

Sellüloz asetat ile yapılan protein elektroforezinde amidoschwarz (6, 5, 7), vert de lissamine (6, 7, 8), vert sulfo (7, 8), violet sulfo (8), panceau-s (6), carmin d'indigo (8) gibi çeşitli boyalar kullanılabilmektedir.

Çeşitli boyalar kullanılarak yapılan mukayeseli araştırmalarda boyama süresi, boyanmanın netliği ve stabilitesi, özellikle boyaların albümine olan affinitesi araştırılmış, bazı farkların olduğu bildirilmiştir (6, 7, 8).

Bu çalışmanın amacı, günümüzde en çok kullanılan üç boyanın (Amidoschwarz, Panceau-s, Vert de lissamine) albümin ve globulin fraksiyonlarına ait "yüzde değerleri" (pourcentage) yönünden bir farklılık gösterip göstermediğini araştırmaktır.

METERYAL

Bu araştırma 15.2.1974-18.3.1974 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Kliniği ve laboratuvarlarında yapılmıştır.

8'i normal, 32'si çeşitli hastalıklardan klinikte yatmakta olan 40 vak'ının kan serumu üzerinde çalışılmıştır.

Vak'aların 19'u kadın, 21'i erkektir. 19 kadın vak'ının yaş ortalaması 39.5 (20-60), 21 erkek vak'ının yaş ortalaması 40.8 (22-68) olup, toplam 40 vak'ının yaş ortalaması 40.1 (20-68)dir.

Çalışmada kullanılan vak'alar, araştırmanın amacı ile ilgisi olmadığı için, özel bir seçime ve değerlendirmeye tabi tutulmamıştır.

METOD

Serum protein elektroforezi jel halindeki sellüloz asetat (Cellogel) üzerinde yapılmıştır. Elektroforez için Kohn tipi kuvet (model:2 PAC/5) ve veronal tampon (PH:8.6, f.i.:0.05) kullanılmış, migrasyon 150 volt x 90 dk. ile çalışılarak gerçekleştirilmiştir. (4, 5)

Elektroforez kuvetine 5 band konarak bir vak'a'ya ait serumun aynı şartlarda elektroforezi yapılmış, 1. ve 2. bandlar amidoschwarz, 3. ve 4. bandlar panceau-s ve vert de lissamine ile boyanmışlardır. Böylece üç boyanın mukayesesi yapılırken, bir boyaya ait (amidoschwarz) fizyolojik varyasyon da araştırılarak, değerlendirmenin güvenilirliği sağlanmıştır.

Elektroforogramların değerlendirilmesi elüsyon metodu ile yapılmış (4; okumalar Spectronic-70'te amidoschwarz için 630, panceau-s için 512, vert de lissamine için 625 milimikronda yapılmıştır.

Elektroforogramlara ait neticeler Ege Üniversitesi Rektörlüğü Elektronik Beyin İşlem Merkezi'nde istatistiki metodlarla değerlendirilmiştir.

TABLO : I(x)

	<u>Amido.I</u>	<u>Amido.II</u>	<u>Panceau-S</u>	<u>Vert de Lisa</u>
Albümin :	61.08±1.60 (B)	61.05±1.59 (B)	60.18±1.59 (B)	62.76±1.51 (A)
Alpha-1 :	3.31±0.20 (A)	3.29±0.21 (A)	3.21±0.24 (A)	2.85±0.17 (B)
Alpha-2 :	7.50±0.42 (A)	7.61±0.43 (A)	7.68±0.42 (A)	7.04±0.39 (B)
Beta :	10.17±0.30 (A)	9.01±0.62 (A)	10.47±0.30 (A)	10.06±0.30 (A)
Gamma :	17.82±1.12 (A)	17.68±1.08 (A)	18.13±1.08 (A)	17.58±1.06 (A)

(x) : Benzer olmayan harfler arasındaki fark signifikandır (P<0.05).

TARTIŞMA

Elde edilen ve Tablo: I'de belirtilen neticelere göre verti-
delissamine'e ait albümin, alpha-1 ve alpha-2 globulin değerleri, Amidoschwarz ve Panceau-s boyalarına ait değerlerden signifikant olarak farklı bulunmuştur. Her üç boyaya ait alpha-2 ve gamma değerleri arasında ise signifikant bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Aynı

boyanın iki defa kullanılmasıyla (amido.I ve Amido.II) elde edilen değerler arasında hiçbir fraksiyon için signifikan bir farkın bulunmamış olması bulgularımızın güvenilirliğini göstermektedir.

Paget ve ark. (7) yaptıkları mukayeseli bir araştırmada, Vert de Lissamine ve Vert Sulfo'nun Amidoschwarz'a nazaran albümin pursatajında hafifçe daha yüksek değerler verdiğini bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz neticeler bu araştırmanın neticelerine tam uygunluk göstermektedir. Çeşitli boyalarla albümin pursantaajında farklılıkların oluşu, Pre'e ve ark. (8) tarafından boyaların albümine olan affiniteleri ile izah edilmiş, bu görüş daha sonra da desteklenmiştir (7).

Bulgularımıza Dayanarak, protein elektroforezinde Amidoschwarz ve Panceau-s boylarıyla alınan sonuçların özdeş olduğu, bu boyların birbirinin yerine kullanılabileceği kanısına varmış bulunuyoruz. Aksine, Vert de Lissamine boyasının, Amidoschwarz ve Panceau-s boylarına oranla, albümin lehine, alpha-1 ve alpha-2 globulinlealeyhine farklı sonuçlar verdiği, bu nedenle Vert de Lissamine'e ayrı neticelerin adı geçen diğer iki boyaya ait neticelerle mukayese edilmemesi gerektiği anlaşılmıştır.

Boya solüsyonları :

Amidoschwarz	0,5 g.
M'ethanol	40.0 ml.
H ₂ O	35.0 ml.
Ac.aétique	10.0 ml.
(Yıkama : Méthanol 1 / H ₂ O / Ac.acétique = 60 / 35 / 5 ml.)	
(Eritici : % 80 ac. acétique)	
Panceau-s	1.0 g.
Ac.tric. (%5)	200.0 ml.
(Yıkama : Ac.acétique %5)	
(Eritici : Ac.acétique % 80)	

Vert de Lissamine	0.5 g.
Méthanol	50.0 ml.
H ₂ O	40.0 ml.
Ac.acétique	10.0 ml.
(Yıkama : Ac.acétique % 5)	
(Eritici : Ac.acétique % 80)	

Neticeler

Albümin'in durumu : Amido .I, Amido .II ve Panceau-s boyalarına ait albümin "yüzde değerleri" arasında signifikan bir fark bulunmamış ; Vert de Lissamine'e ait değer ise öteki boyalara ait değerlerden yüksek ve signifikan olarak farklı bulunmuştur ($P < 0,05$).

Alpha-1 globulin'in durumu : Amido .I, Amido .II ve Panceau-s boyalarına ait alpha-1 globulin değerleri arasında signifikan bir fark bulunmamış ; Vert de Lissamine'e ait değer öteki boyalara ait değerlerden düşük ve signifikan olarak farklı bulunmuştur ($P < 0,05$).

Alpha-2 globulin'in durumu : Amido .I, Amido .II ve Panceau-s boyalarına ait alpha-2 globulin değerleri arasında signifikan bir fark bulunmamış ; Vert de Lissamine'e ait değer öteki boyalara ait değerlerden düşük ve signifikan olarak farklı bulunmuştur ($P < 0,05$).

Beta, ve Gamma globulinler'in durumu : Amido .I, Amido .II, panceau-s ve Vert de Lissamine boyalarına ait beta ve gamma globulin değerleri arasında signifikan bir fark bulunmamıştır.

Çeşitli boyalara ait protein fraksiyonları "yüzde değerleri" Tablo : I'de topluca görülmektedir.

Sonuçlar

Araştırmamızdan elde edilen bulguların değerlendirilmesinden varılan sonuçlar şöyle sıralanabilir :

1. Sellüloz asetat ile yapılan protein elektroforozinde kullanılan boyaların, fraksiyonlara ait "yüzde değerlerine" etkisi vardır.
2. Amidoschwarz ve Panceau-s boyalarıyla elde edilen neticeler özdeştir. Vert de Lissamine, bu iki boyaya oranla, albümin lehine, alpha-1 ve alpha-2 globulinler aleyhine farklı sonuçlar verir.
3. Her araştırmada kullanılan boya belirtilmeli : aynı boya veya sadece özdeş neticeler verdiği bilinen boyalar kullanılarak elde edilen elektroforetik bulgular birbiriyle mukayese edilmelidir.

1. GİRARD, M. ; Pratique d'électrophorèse sur papier, G. Doin et Cie. Editeurs, Paris, 1958, s:24.
2. KOHN, J. : A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis, Clin. Chim. Acta, 2:297, 1957.
3. GUÏLLOT, M. :Divers aspects physico-chimiques de l' électrophorèse de zones, Ann. Biol. Clin. , 14:8, 1958.
4. ÖZGÜVEN, Ö. :Jelatinö selluloz asetat ile ultra-rapid mikroeletroforez, Ege Üniv. Tıp Fak. Mec. , 6:409, 1967.
5. ÖZGÜVEN, Ö. : Cellogel ile protein elektroforezi , Ege Üniv. Tıp Fak. Mec. , 6:271, 1967.
6. FRIEDMAN, H. S. :A standardized procedure for serum protein electrophoresis on cellulose acetate membrane strips, Clin. Chim. Acta , 6: 775, 1961.
7. PAGET, M. , COUSTENOBLE, P. :Microélectrophorèse des proteines du serum sur acéetate de cellulose gélatineux, Ann. Biol. Clin. , 23: 1209 , 1965.
8. PRE, J. , BOÏGNE. J. M. :Technique rapide de coloration par le vert lumière et d'élution en milieu acide des protéinogrammes électrophoretiques sur papier, Ann. Biol. Clin. , 21:149, 1963.