

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

NÜKLEİK ASİTLERİN ELEKTROFOREZİ

Yüksek Lisans Semineri

Hazırlayan: Venhar ÇELİK

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Dilek Turgut-BALIK

NÜKLEİK ASİTLERİN ELEKTROFOREZİ

1. Elektroforezin Temel Prensibi

2. Agaroz Jel Elektroforezi

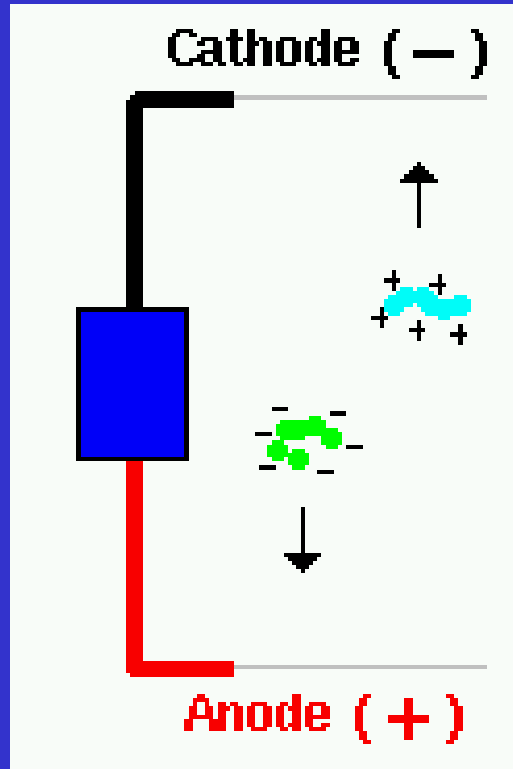
3. Agaroz Jel Elektroforezinin Kullanım Amaçları

NÜKLEİK ASİTLERİN ELEKTROFOREZİ

- * Elektroforez büyüklükleri, yükleri veya konformasyonları farklı olan biyolojik moleküllerin – özellikle protein ve nükleik asitlerin – saflaştırılması, tespiti ve ayrılmasında yaygın olarak kullanılır.

1. ELEKTROFOREZİN TEMEL PRENSİBİ

- * Elektroforez, elektriksel alanda yüklü partiküllerin hareketidir.
- * Elektroforez sırasında pozitif yüklü partiküller katoda doğru hareket eder ve böylece katyon olarak adlandırılır. Negatif yüklü partiküller anoda doğru hareket eder ve bundandan dolayı anyon olarak adlandırılır.



* Bir partikülün göç oranı ;

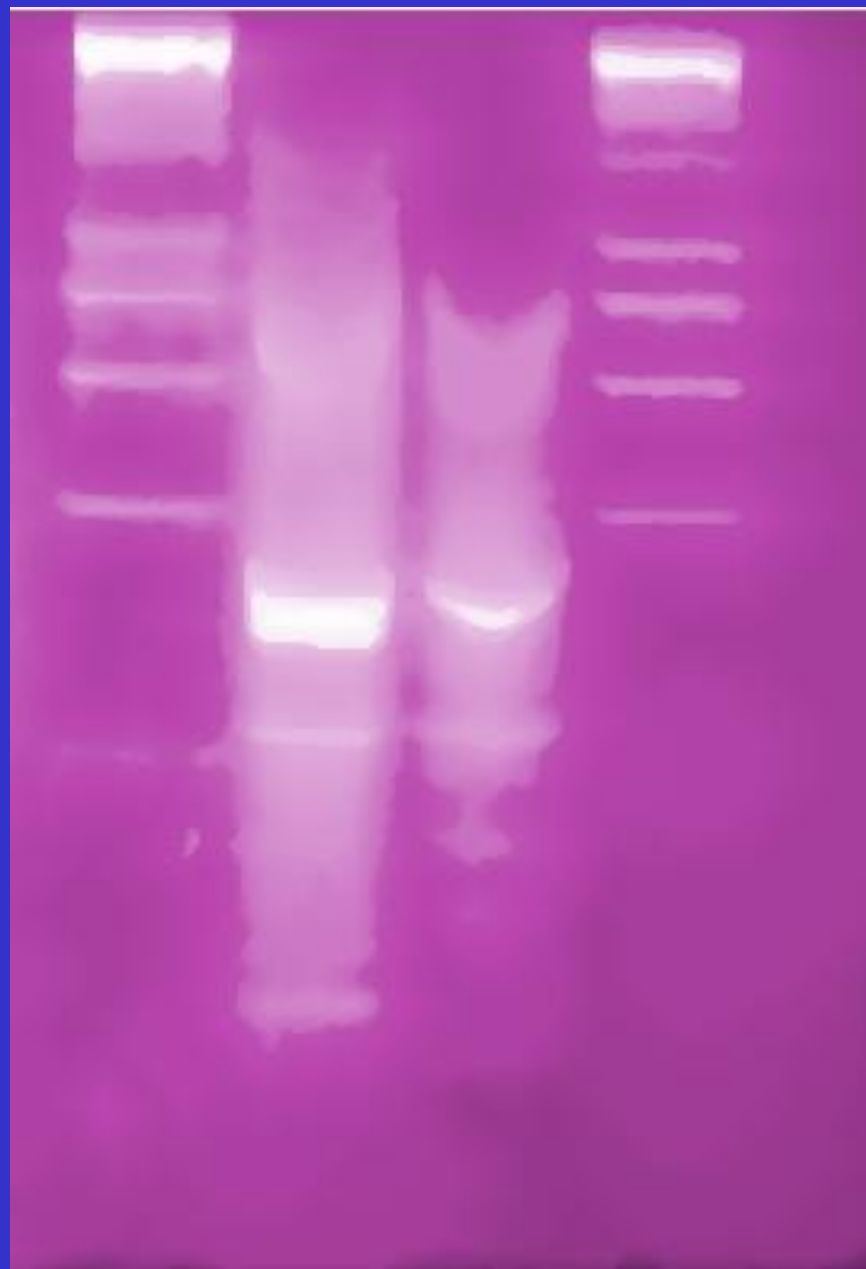
- Elektriksel alan gücüne,
- Partikülün net yüküne,
- Elektroforetik ortamın yoğunluğuna bağlıdır.

* Jel elektroforezi için kullanılan cihazların elektrik devreleri Ohm kanunu ile tanımlanır :

$$V = I \times R$$

* Elektroforez cihazında direnç ;

- Tamponun iyonik kuvveti,
- Jelin kesit alanı,
- Jelin uzunluğu,

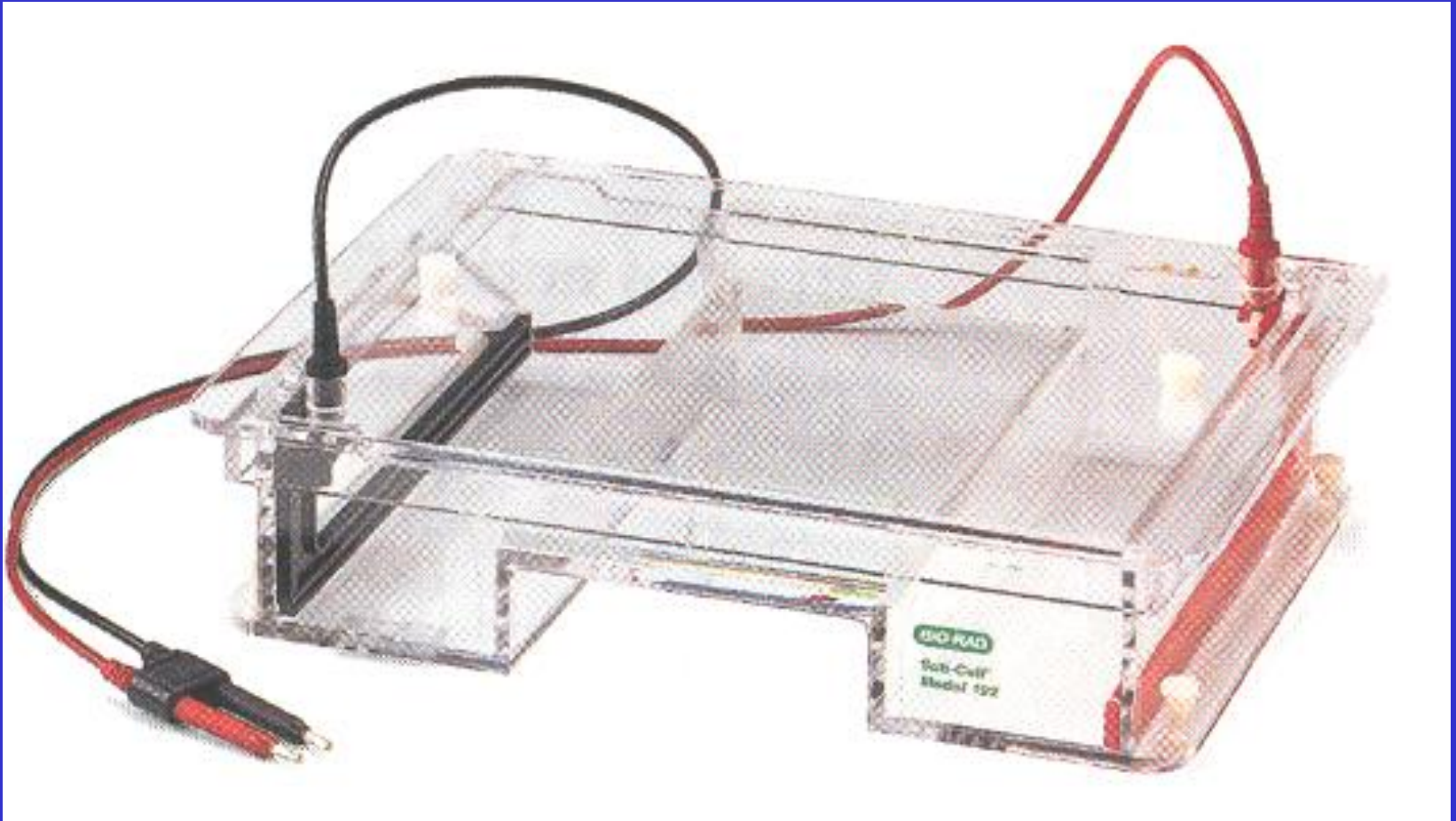


2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

* DNA moleküllerinin analizinde tüm laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan en temel yöntemlerden biridir. Yöntem basit, hızlı ve diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan DNA fragmentlerinin ayrılabilmesi için avantajlıdır.

2.1. Agaroz Jel Elektroforez Sistemi

- Elektroforez tankı



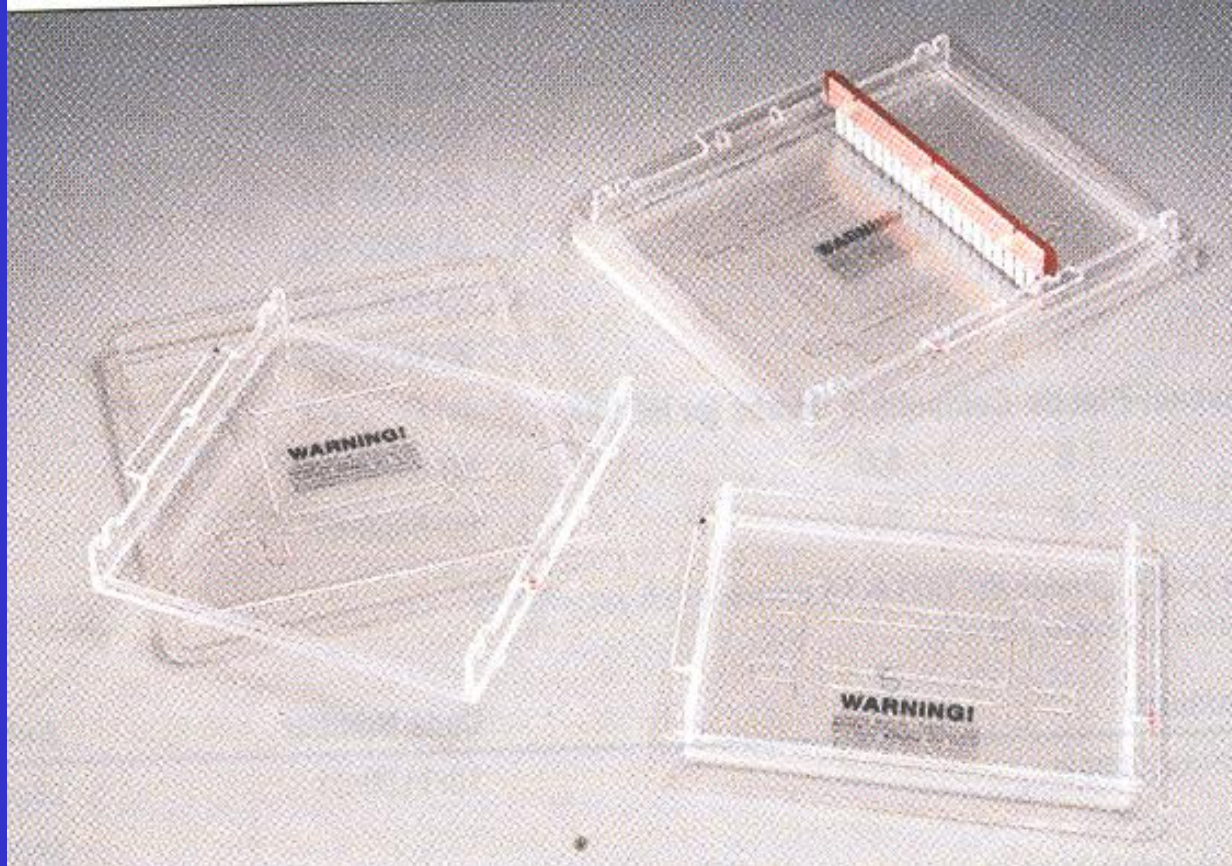
2.1. Agaroz Jel Elektroferez Sistemi

- Güç kaynađı



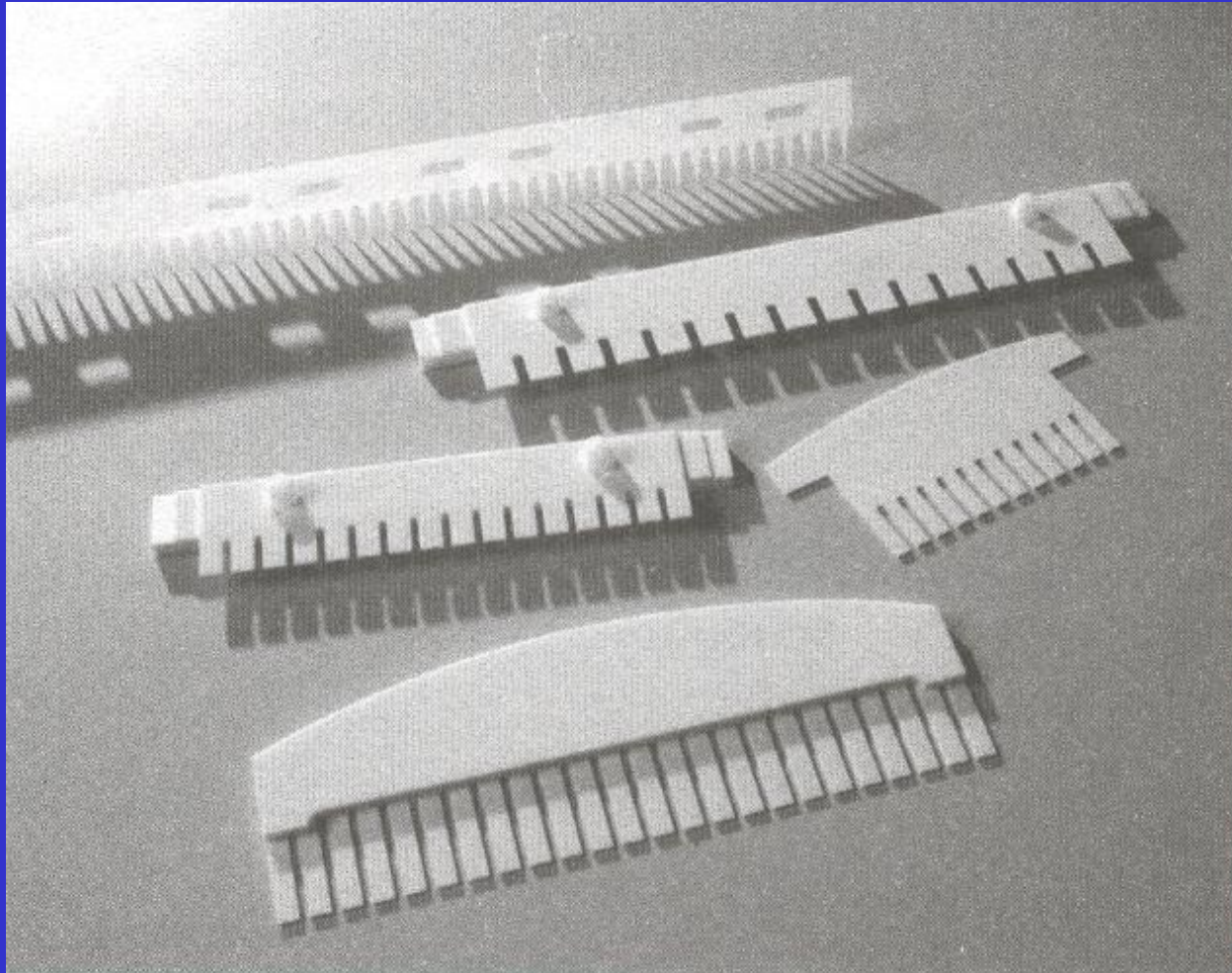
2.1. Agaroz Jel Elektroforez Sistemi

- Jel dökme tepsileri



2.1. Agaroz Jel Elektroforez Sistemi

- Taraklar



* Horizontal jel elektroforez sisteminin bazı avantajları :

- Düşük agaroz konsantrasyonu kullanılabilir.
- Jeller çeşitli büyüklüklerde dökülebilir.
- Jellerin dökülmesi, yüklenmesi çok kolaydır ve elle dokunulur.
- Cihaz dayanıklı ve ucuzdur.

2.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Matriks

- * Agaroz jel matriksi, elektroforez sırasında mekaniksel etkiyi engellemek ve molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılır.
- * Agaroz kırmızı bir alg türü olan *Agar agar* 'dan izole edilir.
- * Agaroz nispeten ucuz, toksik olmayan, düşük konsantrasyonda yüksek jel kuvvetine sahip ve kullanımı kolaydır.
- * DNA'nın elektroforetik ayırımı için rutin olarak kullanılan agaroz jel por çapının büyüklüğünden dolayı proteinler ve çok küçük DNA fragmentlerinin analizi için çok kullanışlı değildir.

2.3. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

- * Tamponlar akımı ileten iyonları taşır ve pH'ı sabit bir değerde tutar.
- * DNA moleküllerinin elektrofrezinde çok yaygın olarak kullanılan tamponlar Tris-Asetat-EDTA (TAE) ve Tris-Borat-EDTA (TBE)'dir.

2.4. DNA'nın Elektroforetik Göç Oranını Etkileyen Faktörler

- DNA'nın Molekül Büyüklüğü

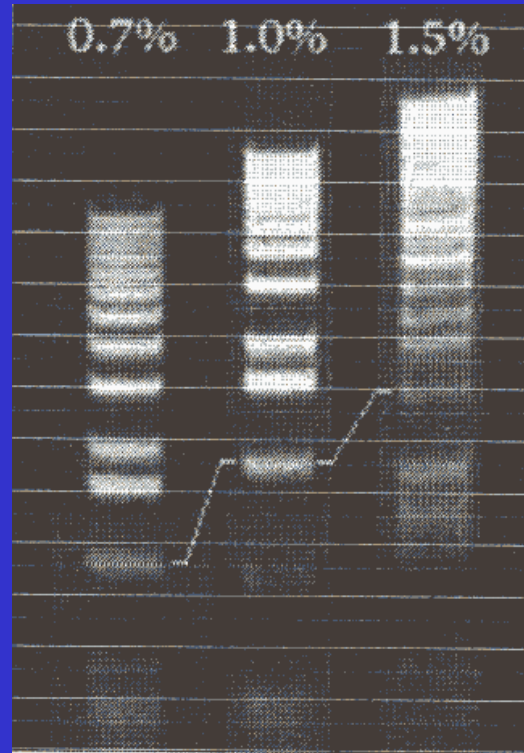
* Büyük DNA molekülleri jeldeki küçük porlardan geçerken engellenir.

Böylece büyük DNA fragmentleri küçük DNA fragmentlerinden daha yavaş hareket eder.



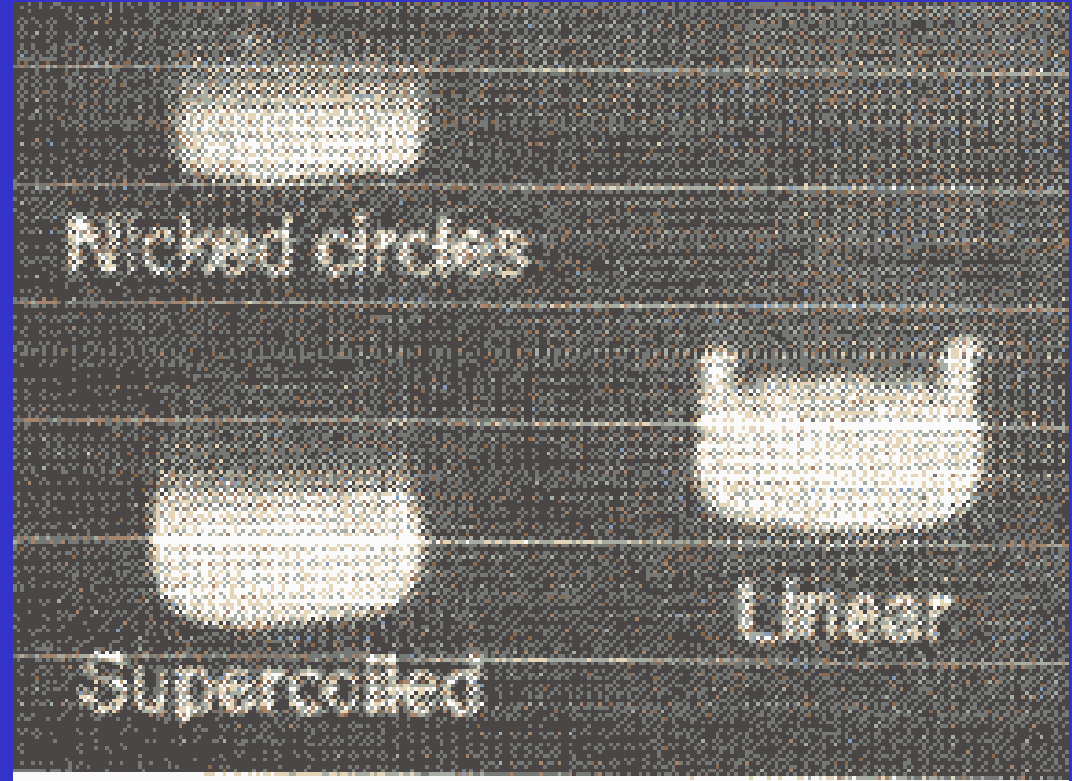
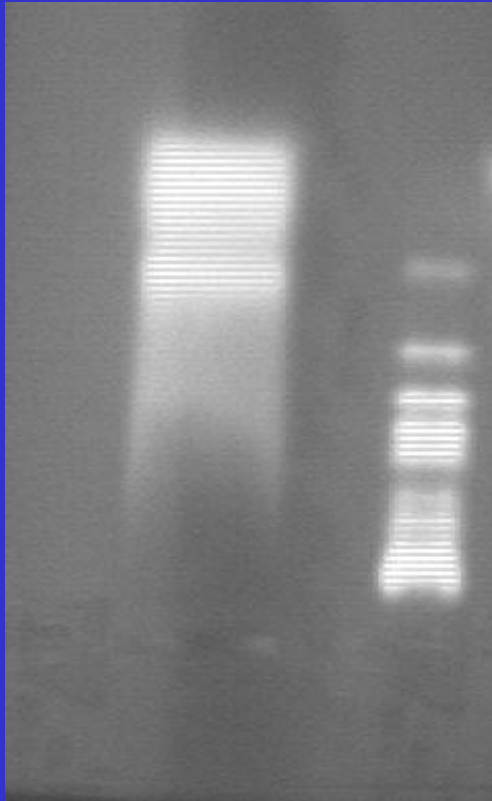
• Agaroz Konsantrasyonu

- * Belirli bir büyüklükteki DNA fragmenti agarozun farklı konsantrasyonlarını içeren jeller boyunca farklı oranlarda göç eder.
- * Düşük agaroz konsantrasyonu büyük DNA'ların ayrılmasını sağlarken, yüksek agaroz konsantrasyonu küçük DNA'ların ayrılmasını kolaylaştırır.



• DNA'nın Konformasyonu

* DNA'nın genomik ya da plazmid DNA'sı olmasına göre jeldeki görünümleri farklılık gösterir.



• Uygulanan Akım

- * Düşük voltajda lineer DNA fragmentlerinin göç oranı uygulanan voltajla orantılıdır.
- * Elektriksel alan gücü artırılırsa büyük fragmentlerin göçü küçük fragmentlerinkine oransal olarak artar. DNA fragmentlerinin maksimum ayrılmasını sağlamak için jeller düşük akımda koşturulmalıdır.

• Elektroforez Tamponları

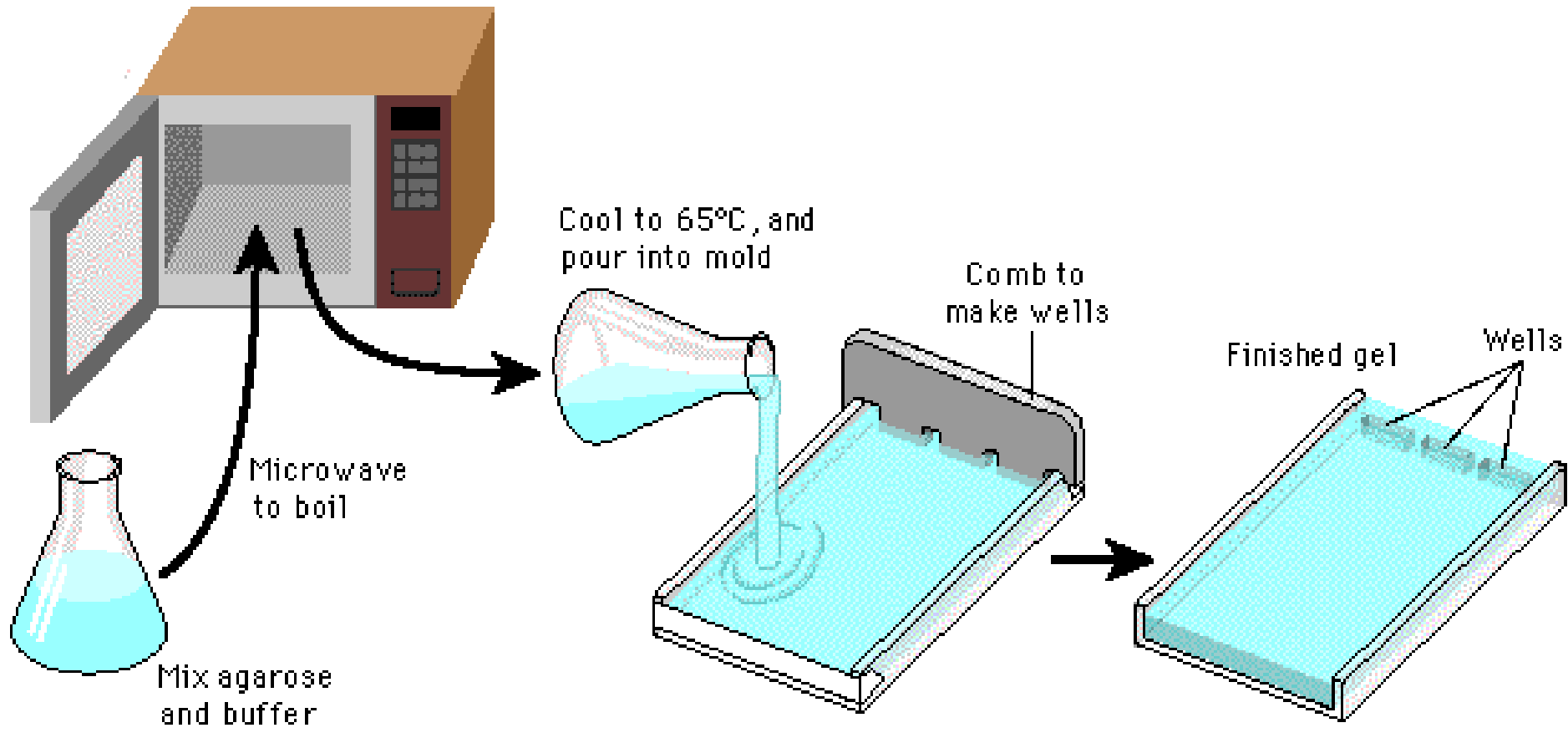
- * Tamponun yerine yanlışlıkla su kullanılırsa jelde DNA göçü olmaz.
- * Aynı şekilde konsantre tampon kullanılırsa jelde fazla miktarda ısı üretilir ve böylece jel erir.

• Etidyum Bromür'ün Etkisi

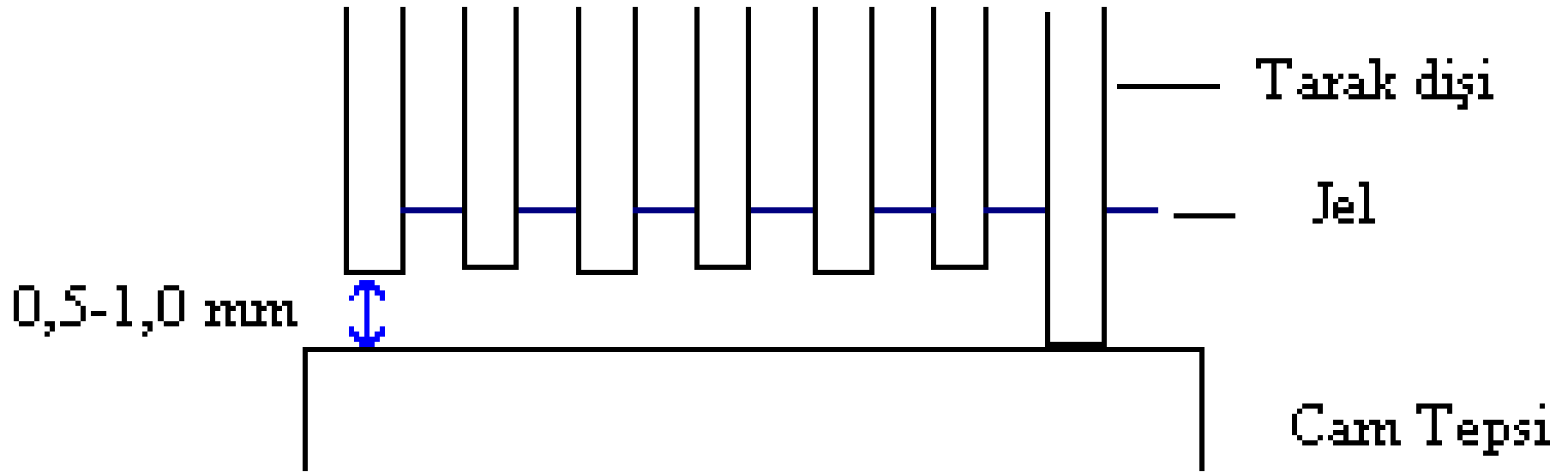
* Etidyum bromür DNA bağları arasına bağlanarak UV ışığı altında fluoresan etki göstermesi sonucu DNA'nın jelde görünmesi sağlanır.

* Etidyum Bromür eklenen DNA örnekleri bekletilirse DNA etidyum bromüre bağlanarak kütlesi, sertliği ve hareketi değişir.

2.5. Agaroz Jelin Hazırlanması



2.5. Agaroz Jelin Hazırlanması



2.6. DNA Örneklerinin Hazırlanması

- * DNA örnekleri gliserol, sükroz ve iz bırakan boya içeren yükleme tamponu ile karıştırılır.
- * Sükroz ve gliserol DNA solüsyonunun yoğunluğunu artırarak DNA örneklerinin, tanktaki tamponla karışmadan daldırıldığı kuyu içerisine dökülmesini sağlar.
- * İz bırakan boya DNA örneklerinin jeldeki göçünün izlenmesini ve ne kadar ilerlediğinin görüntülenmesini sağlar.

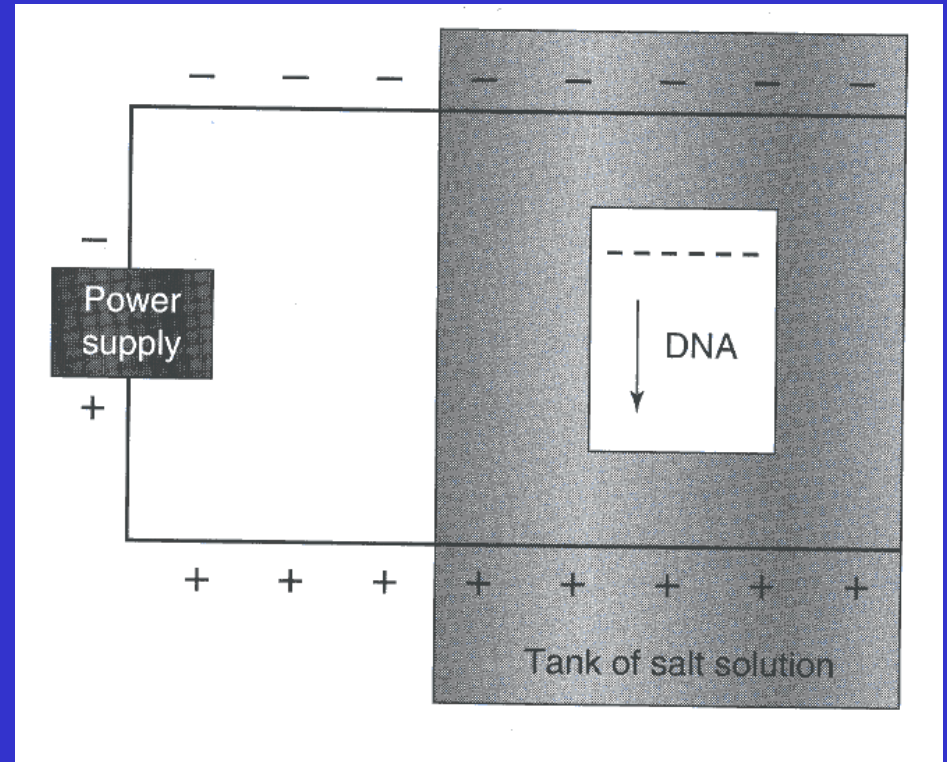
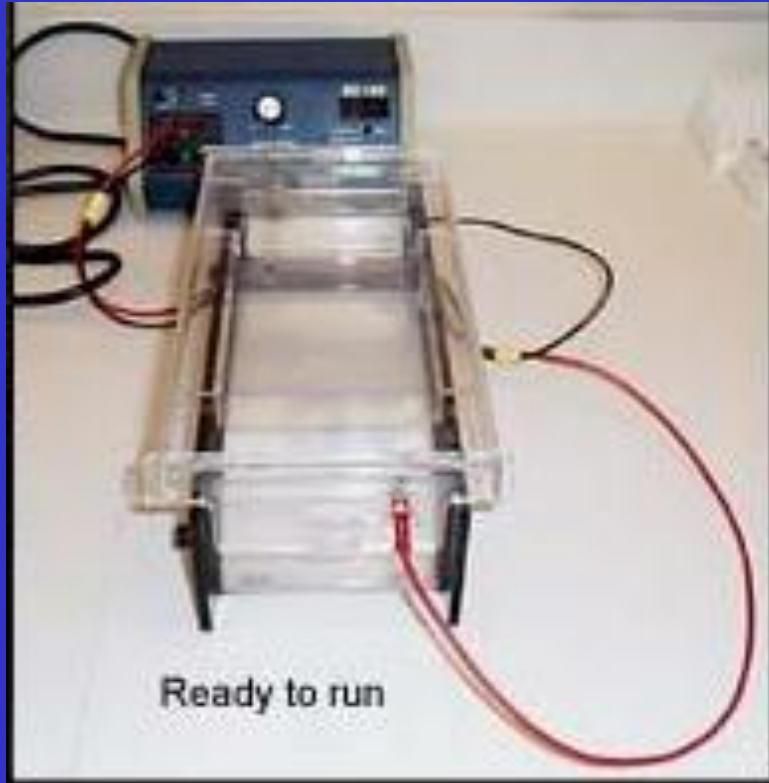
2.7. Agaroz Jelde DNA Örneklerinin Koşturulması

- * Jel elektroforez tankına alınır. Elektroforez tankı, jeli ve elektrodları kapatacak şekilde tampon ile doldurulur.
- * Hazırlanan DNA örnekleri ve marker jel üzerindeki kuyulara yüklenir.



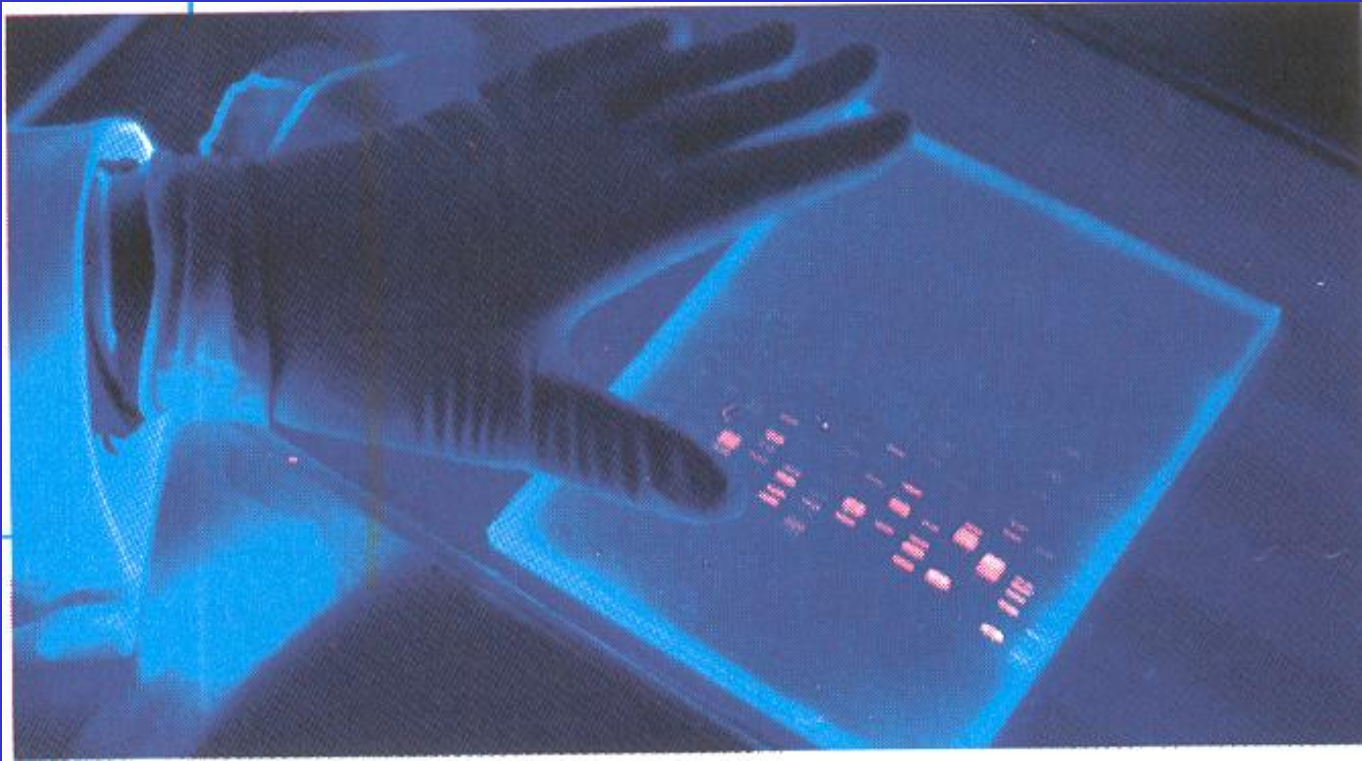
2.7. Agaroz Jelde DNA Örneklerinin Koşturulması

* Elektroforez tankının kapağı kapatılır, cihaz güç kaynağına bağlanır ve akım uygulanır.

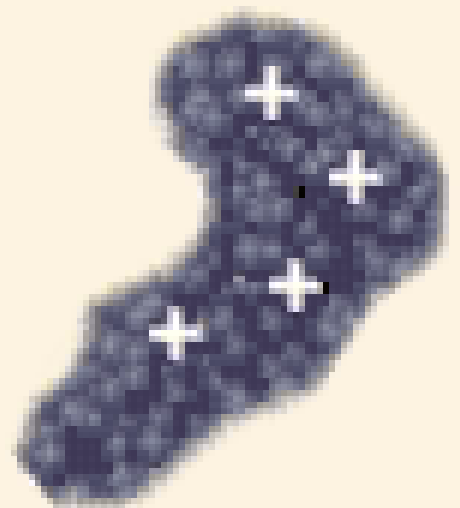
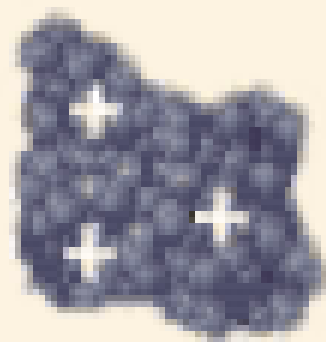


2.8. Agaroz Jeldeki DNA Örneklerinin Görüntülenmesi

* DNA örneklerini görüntüleme yolu etidyum bromür ile boyamadır. Etidyum bromür jeldeki çift zincirli DNA moleküllerinin bazıları arasına girerek UV ışıklı transillüminatör üzerinde görüntülenebilir.



GEL ELECTROPHORESIS



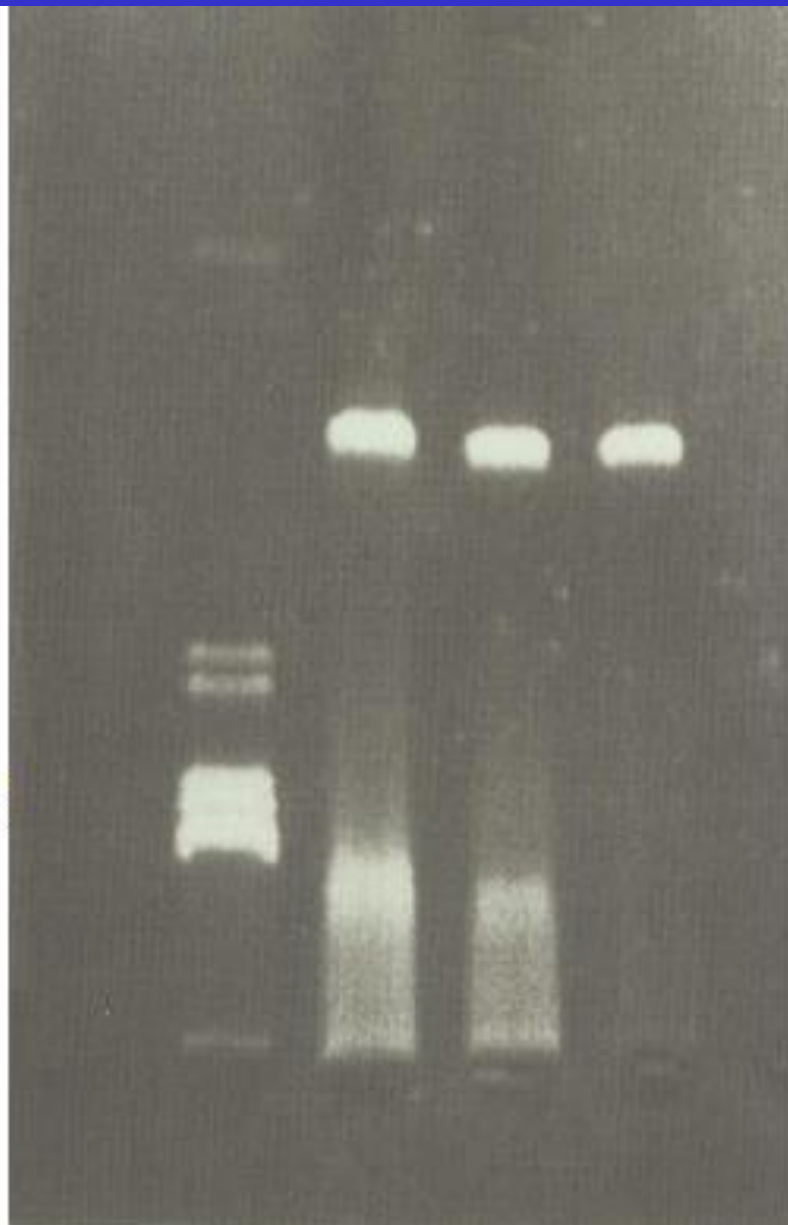
3. Agaroz Jel Elektroforezinin Kullanım Amaçları

* Agaroz jel elektroforezi DNA fragmentlerinin molekül ağırlığı, miktarı ve oligonükleotidlerin dizi analizi gibi analitik çalışmalarda rutin olarak kullanılır.

6 ng
564 bp

25 ng
20 ng
2027 bp

45 ng
70 ng
100 ng
240 ng

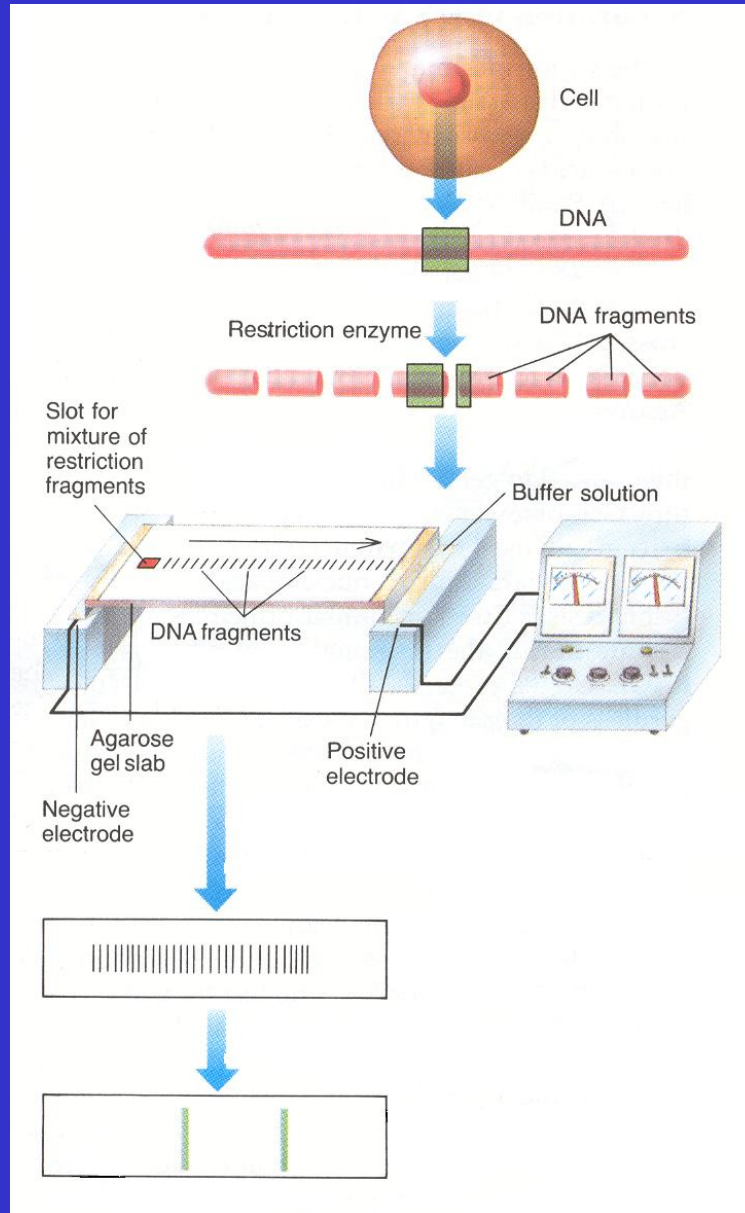


951 bp

3.1. DNA'nın Jelden Geri Alınması

* DNA düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz kullanarak jelde koşturulur ve UV transillüminatör ile görüntülenen etidyum bromür boyalı jelin istenen parçası bir jilet veya bistüri ile kesilip çıkarılır ve çeşitli işlemlerle saflaştırılır.

3.2. Southern-Blot Yöntemi



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

NÜKLEİK ASİTLERİN ELEKTROFOREZİ

Yüksek Lisans Semineri

Hazırlayan: Venhar ÇELİK

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Dilek Turgut-BALIK

