

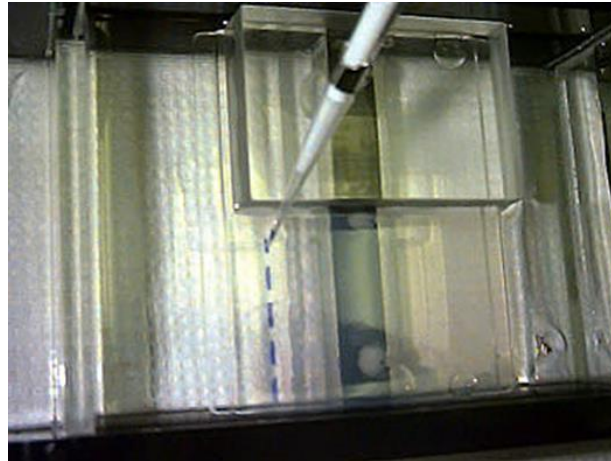
# AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

DOÇ.DR. DEMET CANSARAN  
DUMAN

# ***ELEKTROFORETİK YÖNTEMLER***

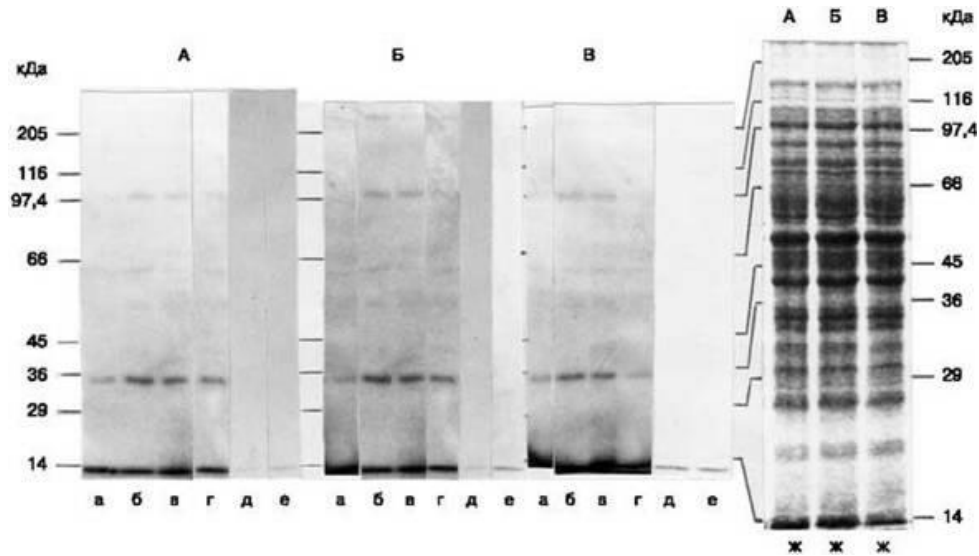
DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla beraber tüm laboratuvarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri **jel elektroforezi**'dir.

Yöntemin avantajları basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan DNA fragmentlerinin ayrılmasını sağlamaktır.



- DNA'nın elektroforetik analizinin temeli, bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır.
- Bu göç hızı,
- molekülün büyüklüğüne,
- yapısına,
- jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna
- iyonik kuvvete ve
- uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir

Elektroforezin çalışma ilkesi molekül ağırlığı ve molekülde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yükten diğerine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktır.



## ➤ **Agaroz Jel Elektroforezi**

### ➤ **Denatüre edici olmayan (Native):**

- Büyük moleküler ağırlıklı DNA yürütülecekse (genomik DNA gibi) %0.8-1 arası jel hazırlanmalıdır.
- PCR örneklerinin kontrolünde (100 bç- birkaç kb arası) %2'lik jele ihtiyaç vardır.

### ➤ **Denatüre edici (Formaldehitli)**

- Denatüre edici ortamda ise bu moleküller ikincil yapı oluşturamayacakları için moleküler ağırlıklarına göre yürürler.

Jel elektroforezinde kullanılan destekleyici madde (matriks) mekaniksel etkiyi engellemek ve molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılır.

Matriks nişasta, poliakrilamid, agaroz veya agaroz akrilamid karışımı olabilir.

Poliakrilamid jeller genellikle küçük DNA fragmentleri ve RNA moleküllerinin ayırımında kullanılır.

Ancak poliakrilamid jelleri hazırlamak zordur ve uzun süre alır.

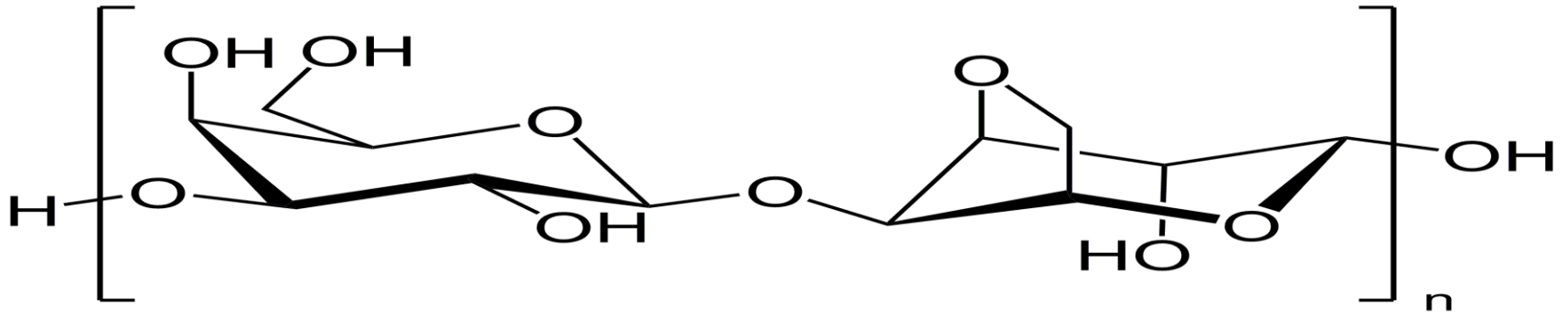
Ayrıca uygulanacak DNA'nın yüksek konsantrasyonda olması gerektiğinden bu tip jellerin kullanılması pratik değildir.

Bu nedenle rutin olarak en fazla kullanılan yöntem **agaroz jel elektroforezidir**.

## **2. Agaroz Jel Elektroforezinin Bileşenleri**

### **2.1. Agaroz**





- 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.

- Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür.
- Ticari olarak üretilen agarozların saflık dereceleri farklı olabilmektedir. Bu durum DNA'nın göç hızını etkiler. Ayrıca kimyasal yapısı değiştirilerek düşük sıcaklıkta eriyebilen agaroz tipleride geliştirilmiştir. Bu agarozların ayırım gücü çok fazladır. DNA jelden geri kazanılacaksa bu tip agaroz uygun olur.
- Agaroz konsantrasyonu % 0.5- 1.5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanabilir.

Table 1 Değişik boyutlardaki nükleik asit fragmanlarının ayırımı için uygun agaroz konsantrasyonları

<b>Agaroz Konsantrasyonu (% ağırlık/hacim)</b>	<b>Doğrusal DNA molekülü (kb)</b>
<b>0.3</b>	5.0 - 60.0
<b>0.6</b>	1.0- 20.0
<b>0.7</b>	0.8-10.0
<b>0.9</b>	0.5- 7.0
<b>1.2</b>	0.4- 6.0
<b>1.5</b>	0.2- 3.0
<b>2.0</b>	0.1- 2.0

# Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

\* Tamponlar akımı ileten iyonları taşır ve pH'ı sabit bir değerde tutar.

\* DNA moleküllerinin elektroforezinde çok yaygın olarak kullanılan tamponlar Tris-Asetat-EDTA (TAE) ve Tris-Borat-EDTA (TBE)'dir.



- Agaroz jeller TBE (Tris Borik asit EDTA) veya TAE (Tris Asetik asit EDTA) ile hazırlanır.
- DNA düşük voltajda uzun yürütmek gerektiğinde (RE ile kesilmiş genomik DNA'yı Southern öncesi yürütmek gibi) TAE tamponu uygundur.
- Kısa süreli yüksek voltajda yürütmek için TBE seçilmelidir.

## ➤ **Agaroz Jel Elektroforezi**

- TBE 5X veya 10X konsantrasyonda hazırlanıp 1X konsantrasyonda kullanılır. Uzun süre beklediğinde çökelti oluşturur.
- TAE 50X konsantrasyonda hazırlanabilir.

# ***AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ***

- Elektroforezin alışma ilkesi moleköl ağırlığı ve molekulde bulunan elektrik enerjisinin jel içinden bir yekten diğesine giderken kat ettiği mesafe farklılıklarını ele almaktır.
- Agaroz konsantrasyonu %0,5-1,5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için ise düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanır.

Tablo 2. Agaroz jel elektroforezi aşamasında kullanılacak malzemeler

<b>Gerekli Malzemeler</b>	
<b>Agaroz</b>	
<b>Tris-asetat (TAE) tamponu pH 8.0 (50x/litre)</b>	242 g Trizma-base 57.1 ml Glasiyel asetik asit 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
<b>Tris-borat (TBE) tamponu pH 8.0 (5x/litre)</b>	54 g Trizma-base 27.5 g Borik asit 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)
<b>Yükleme Tamponu (Bromophenol blue=BB)</b>	4 M Üre 0.025 M EDTA %60 Sukroz % 0.025 Bromophenol blue %0.025 Ksilen
<b>TE tamponu, pH 8.0</b>	10 mM Tris-HCl pH 8.0 1mM EDTA pH 8.0
<b>Etidyum bromür (10 mg/ml)</b>	

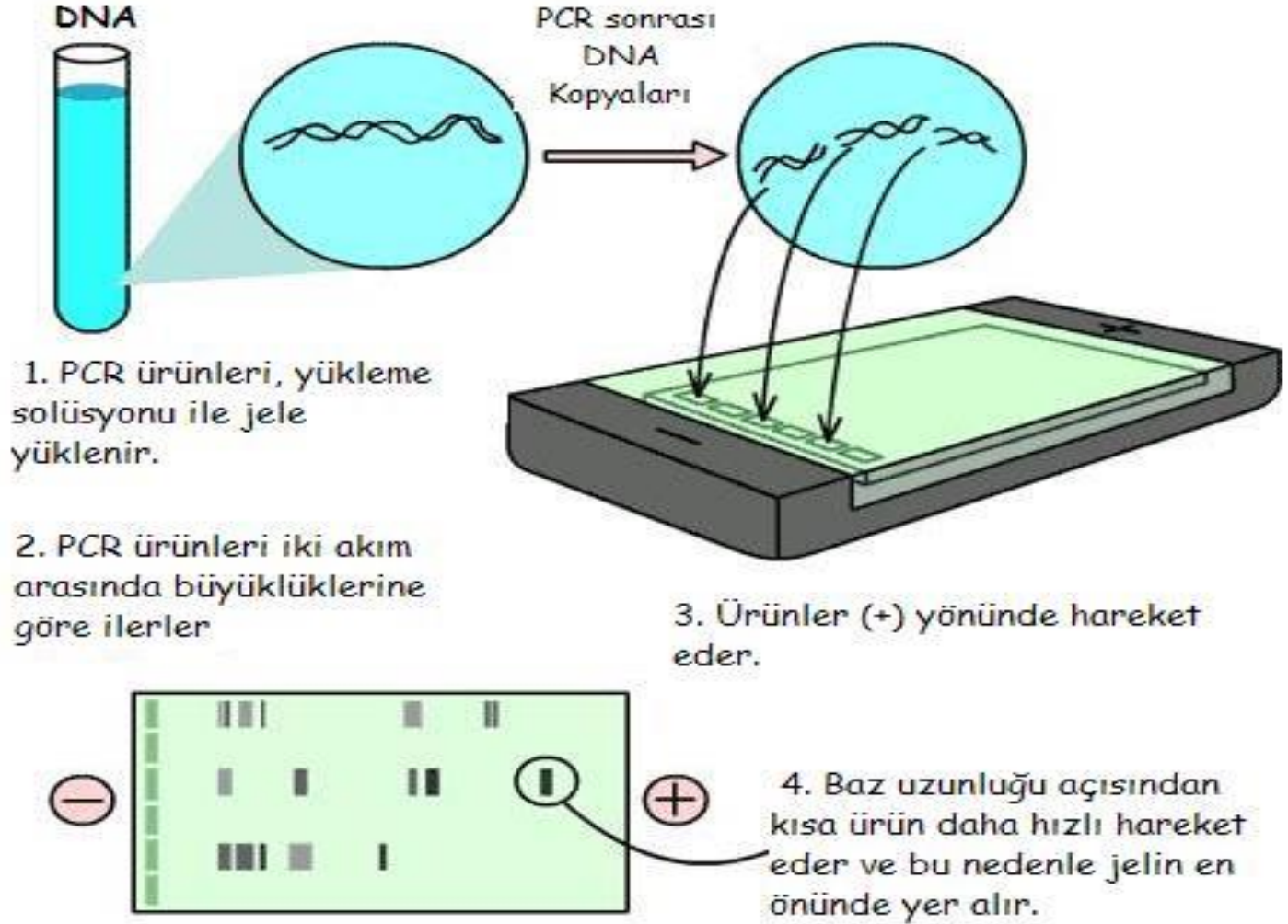


# 3.1. Yöntem

## 3.1.1. %0.8'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

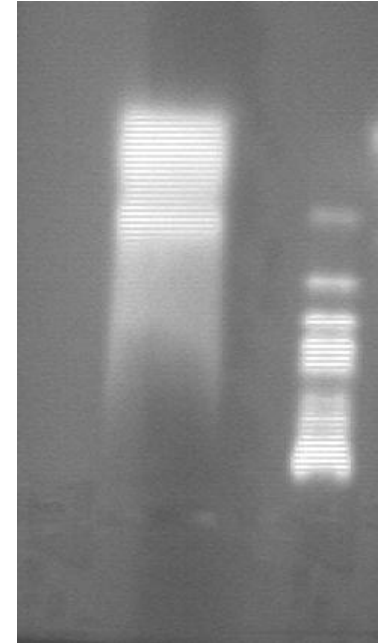
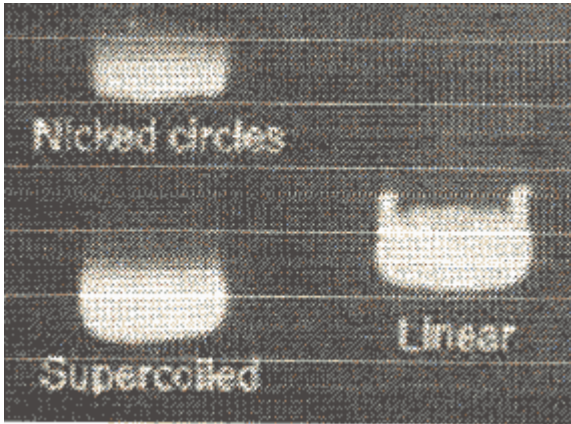
- Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz TBE veya TAE tampon içerisinde kaynatma yolu ile (mikrodalga) çözündürülür.
- 55-60 °C sıcaklığa düştüğünde 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edilir.
- Kenarları kapatılmış cam yüzey üzerine dökülür.
- Cepleri oluşturacak tarak yerleştirilerek donması beklenir.
- Tarak dikkatlice uzaklaştırılır ve jel elektroforez tankına geçirilir.
- Örneğin; yaklaşık 2µl DNA, 0.4 µl jel yükleme tamponu (BB) ile karıştırılıp, 0.5 µg/ml EB içeren %0.8'lik agaroz jele yüklenir.

## JEL ELEKTROFOREZİ



### 3.1.2. Genomik/Plazmid DNA'nın Jelde Görüntülenmesi

- İzole edilen DNA'nın genomik yada plazmid DNA'sı olmasına göre jeldeki görünümü farklılık gösterir.
- Genomik DNA keskin bir bant ile bu bantın aşağı yukarı kısmına doğru biraz yayılan bir görüntü verir.
- Plazmid DNA ise genellikle üç farklı biçimi gözlenir.
  - **Plazmid DNA'sına ait süper sarmal biçim** (form 1),
  - **gevşek sarmal biçim** (form 2), ve
  - **doğrusal biçim** (form 3).



Şekil 4: Plazmid (A) ve genomik (B) DNA'nın jelde görünümü

## 3.2. Etidyum Bromür

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

\* Etidyum Bromür eklenen DNA örnekleri bekletilirse DNA etidyumbromüre bağlanarak kütlesi, sertliği ve hareketi değişir.

DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi **etidyum bromürün** DNA bağları arasına bağlanarak 300 veya 360 nm'de ışığı absorblaması sonucu fluerosan etki göstermesi ile olur.

- **Etidyum Bromur – kanserojen**

Bu kimyasallar duzgun bir sekilde kullanılırsa zararlı değildir. Potansiyel zehirli kimyasalları kullanırken her zaman eldiven giyin ve asla ağzınızla pipetlemeyin. Eğer bu kimyasallardan herhangi birini kazayla uzerinize sıcratmissanız, bu alanı tamamen, **hemen suyla yıkayın ve** lab asistanına haber verin. Atık maddeyi uygun bir kapla cope atın.



### **3.2.1. Etidyum Bromür (EtBr) Jelleri ve Çözeltilerinin Atık Prosedürü**

Etidyum Bromür Jelleri tehlikeli atık işaretli sızdırmaz konteynerlerde toplanmalıdır. Etidyum Bromür kimyasal atık olduğundan tıbbi atık poşetlerine konmamalıdır.

Etidyum Bromür Çözeltileri ise sıkıca kapatılmış şişelere konmalıdır. Eğer etidyum bromür filtre edilerek çözeltiden çıkarıldıysa filtre matrisi bertaraf edilmelidir. Filtrelenmiş çözelti doğrudan lavaboya deşarj edilebilir.

## **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. 4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve DNA'nın Jele Yüklenmesi

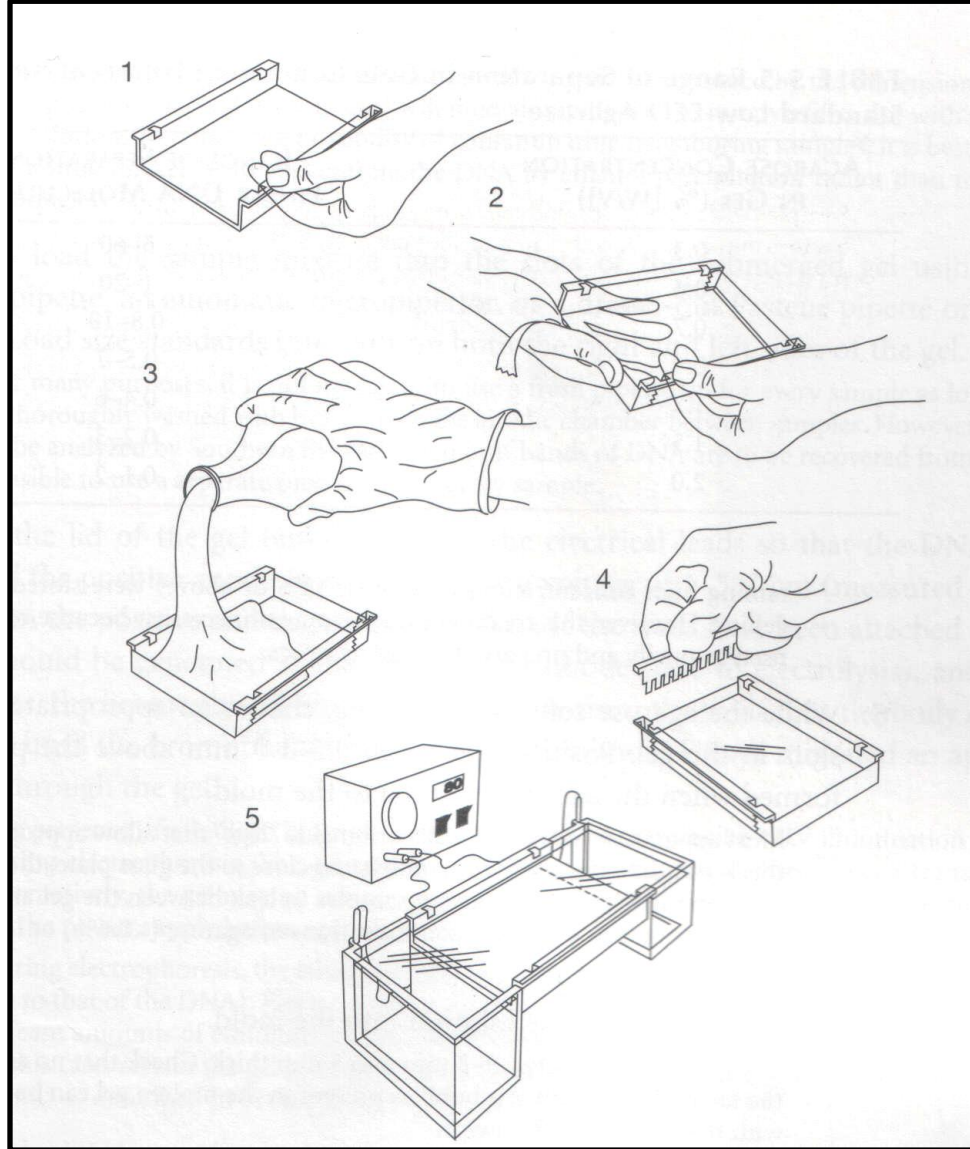
Yüzde (w/v) = 100 ml solusyondaki ağırlık (g);

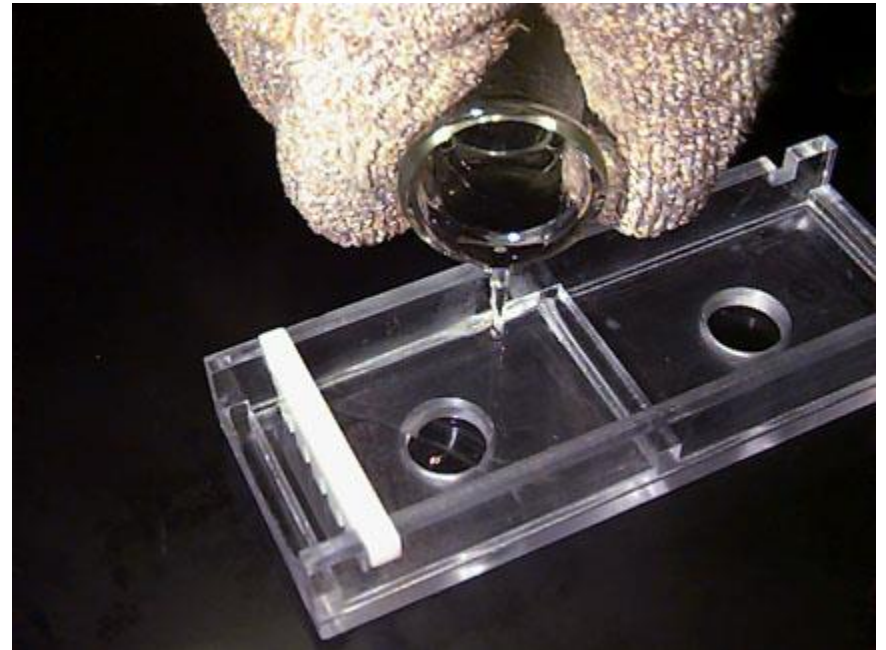
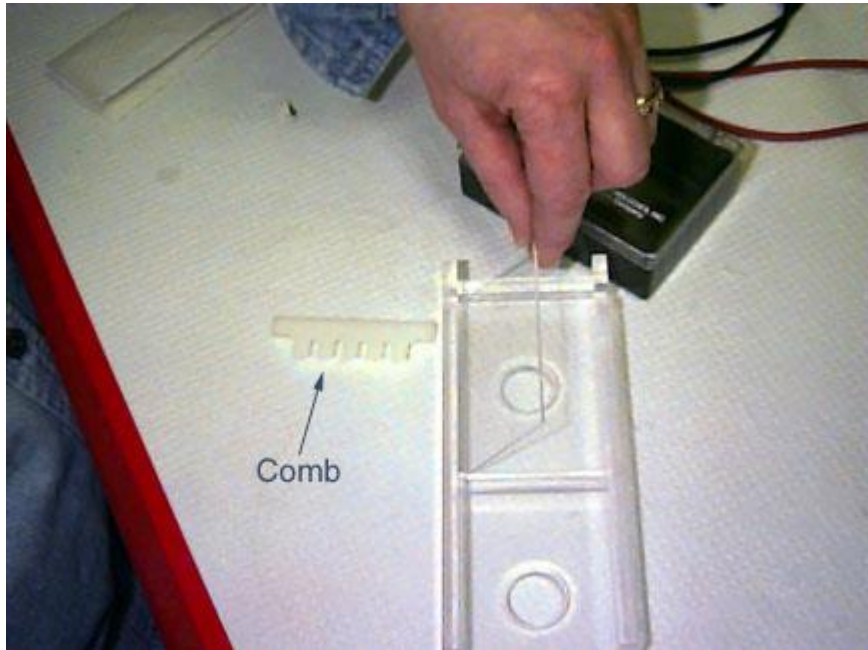
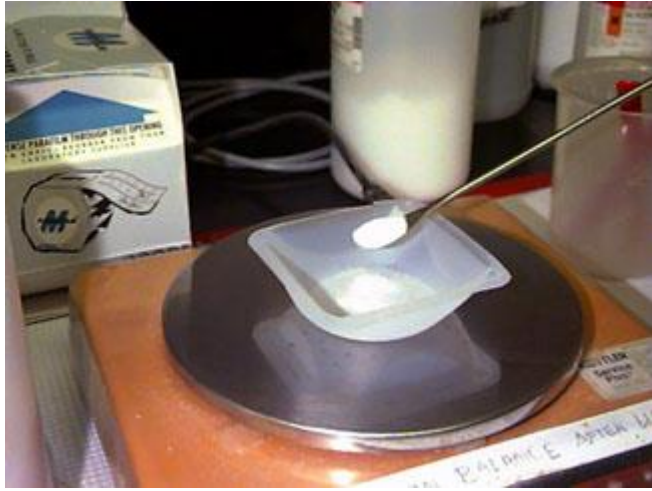
Yüzde (v/v) =100 ml solusyondaki hacim (ml).

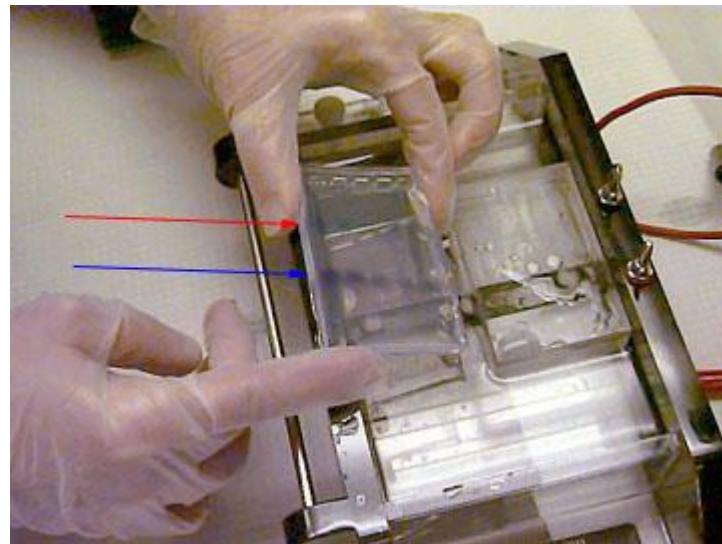
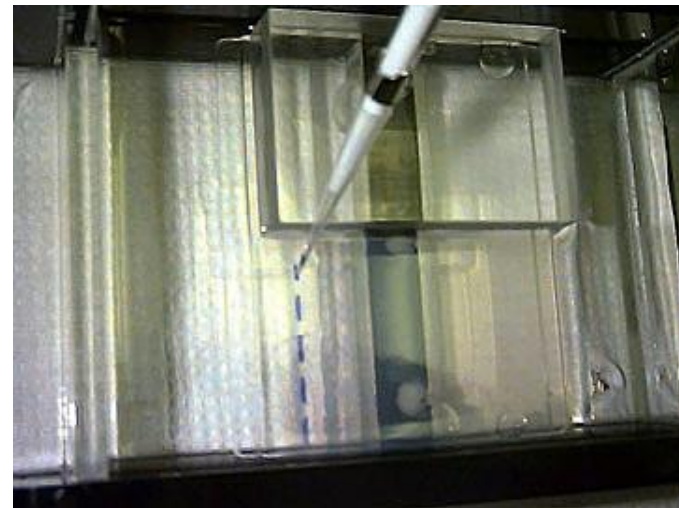
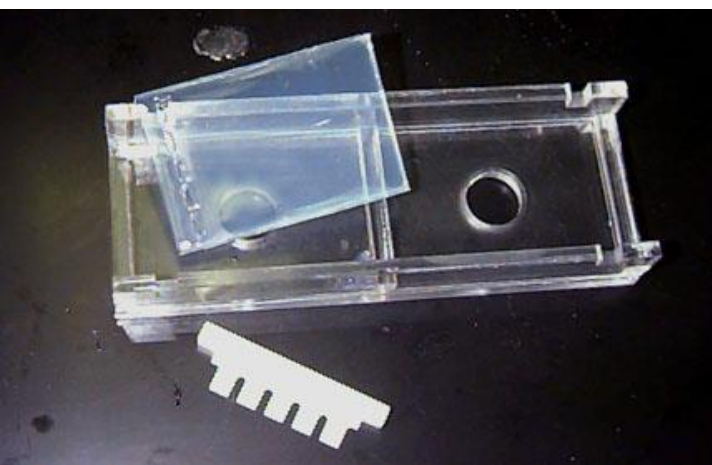
Uygulama; TBE bufferın içinde %0.7'lik agaroz solüsyonu yapmak için; 0.7 gram agarozu ölçün ve hacmini TBE buffer ile 100 ml'ye tamamlayın.

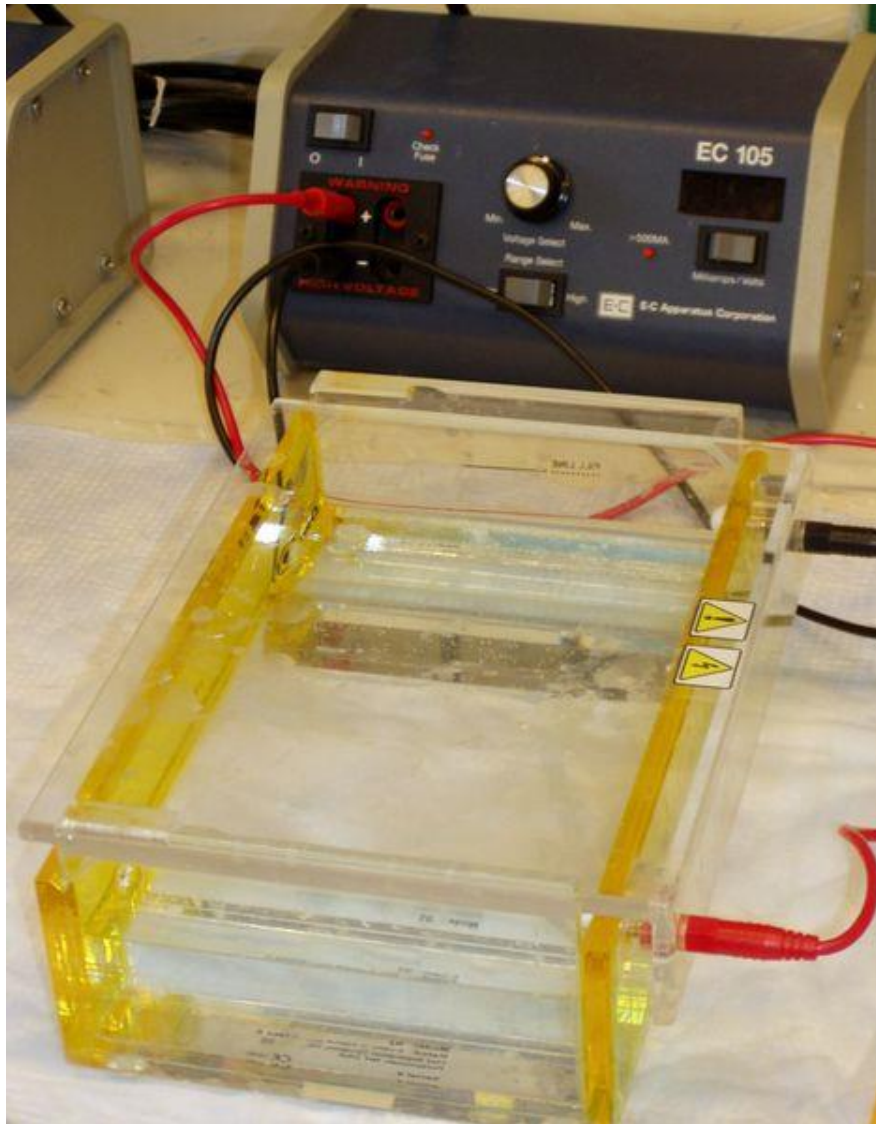


# Agaroz Jel Yapımı









# Agaroz Jelin Görüntülenmesi

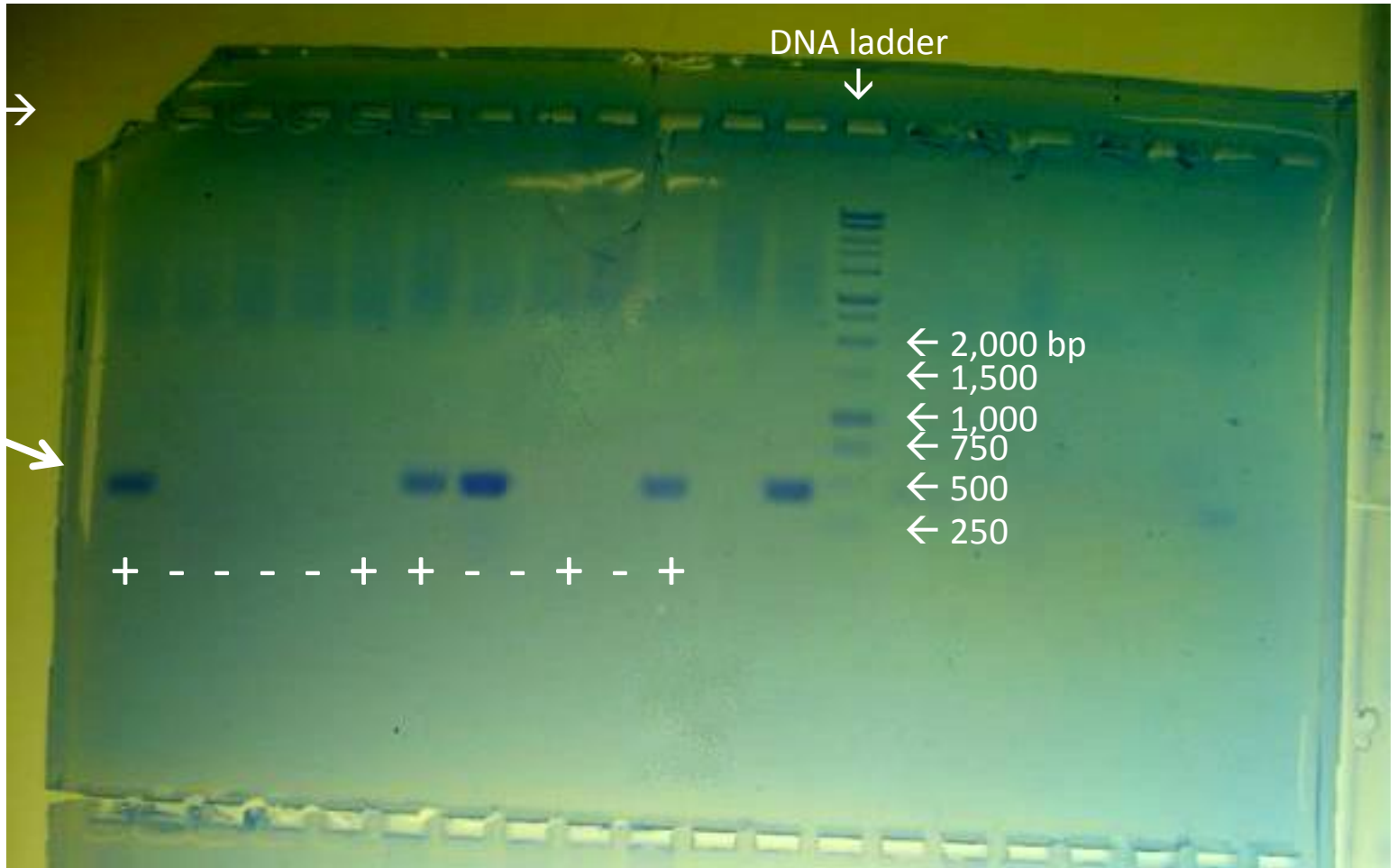




## Ultraviyole (Morotesi) ısıık

Mor otesi (UV) ısıığa maruz kalmak siddetli goz hasarlarına neden olur. Retina UV ısıığını fark edemediğinden; ciddi goz tahribatına neden olabilir. Bunu maruz kaldıktan sonra 30 dakika 24 saat arası fark edemeyebilirsiniz. Bu yuzden **UV lambalarını kullanırken her zaman uygun goz koruması kullanınız.**





Samples # 1, 6, 7, 10 & 12 DNA VAR



<http://biyokure.org/agaroz-jel-elektroforezi-egitim-videosu/7381/>