

## Bahçe Bitkilerinde Biyoteknoloji

Konu: DNA İzolasyonu, PCR reaksiyonu, Jel elektroforezinin temel prensipleri

Bitki Yaprak Örneklerinden DNA İzolasyonu

1. Genç yaprak örneklerin havanda sıvı azot ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) içerisinde ezilmesi



2. Öğütülen örneklerde nuclei lysis aşaması ile hücre çekirdeği içerisindeki DNA'nın serbest bırakılmasının sağlanması

3. Sıcak su banyosunda  $65^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyon

4. Proteinlerin çöktürülmesi aşaması

5. Örneklerin Santrifüj edilmesi

6. Üstte kalan sıvı fazın temiz bir eppendorf tüpüne aktarılması

7. Üzerine izopropanol eklenmesi, tüpün hafifçe çalkalanması

8. Alkol ile yıkama aşaması

9. DNA'nın moleküler su veya tuz çözeltisi içerisinde elüsyon aşaması

10. RNA'nın uzaklaştırılması için RNase aşaması uygulanabilir.

Elde edilen DNA'ların %1 agaroz jelde kontrolünün yapılması.

DNA konsantrasyonu ve elde edilen DNA'nın temizliği spektrofotometrik olarak 260/280 absorbans

değerinde ölçülerek belirlenir.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR aşamaları

1. Çift zincirli DNA molekülünün denatürasyonu ( $94^{\circ}\text{C}$ )

2. Primerin bağlanması (annealing) (primerin  $T_m$  derecesine göre belirlenen sıcaklık)

3. Taq polşmeraz aracılığı ile zincir uzaması (extension) (72°C)

Döngülerin tekrarlanması sonucu DNA'nın hedef bölgesinin çoğaltılması

PCR Reaksiyonuna katılan bileşikler:

DNA (İncelenecek DNA örneđi)

Primer: Kullanılan moleküler marker yöntemine göre DNA üzerinde çoğaltılacak bölgeyi hedef alan 10-25bp uzunluğunda sentetik olarak üretilmiş DNA parçası

dNTP: Zincir uzaması sırasında gerekli olan bazların sağlanması

MgCl<sub>2</sub>: Enzimin aktivasyonuna katkı sağlar

Buffer (Tampon): Enzimin özelliđine göre, genellikle enzimle birlikte temin edilir.

Taq polimearaz enzimi: Zincir uzamasını sağlayan polimeraz enzimi

Jel Elektroforezi:m Agaroz jel veya PAGE kullanılabilir.

-Agaroz jel hazırlığı

-Elektroforez aşaması: 1xTBE tampon çözeltisi kullanılarak yaratılan elektrik alanı içerisinde negatif yüklü DNA molekülünün (-) ve (+) kutuplar arasında hareketi

-Görüntüleme aşaması: UV ışık altında görüntüleme