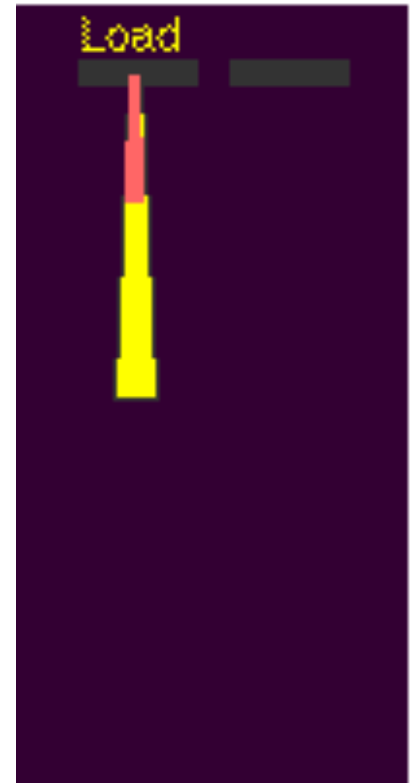


# 5. Hafta

# DNA JEL ELEKTROFOREZİ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



# Tanımı

- “*Electro*” elektrik enerjisi anlamına gelmektedir. “*Phoresis*” ise, Yunanca “*phoros*”tan türeyerek içinden taşımak anlamına gelmektedir.
- Elektroforez uygulamasında moleküller uygulanan elektrik akımı sayesinde agaroz olarak adlandırılan özel bir matriks içerisinde bir yön boyunca taşınırlar

# Jel Elektroforezi nedir?

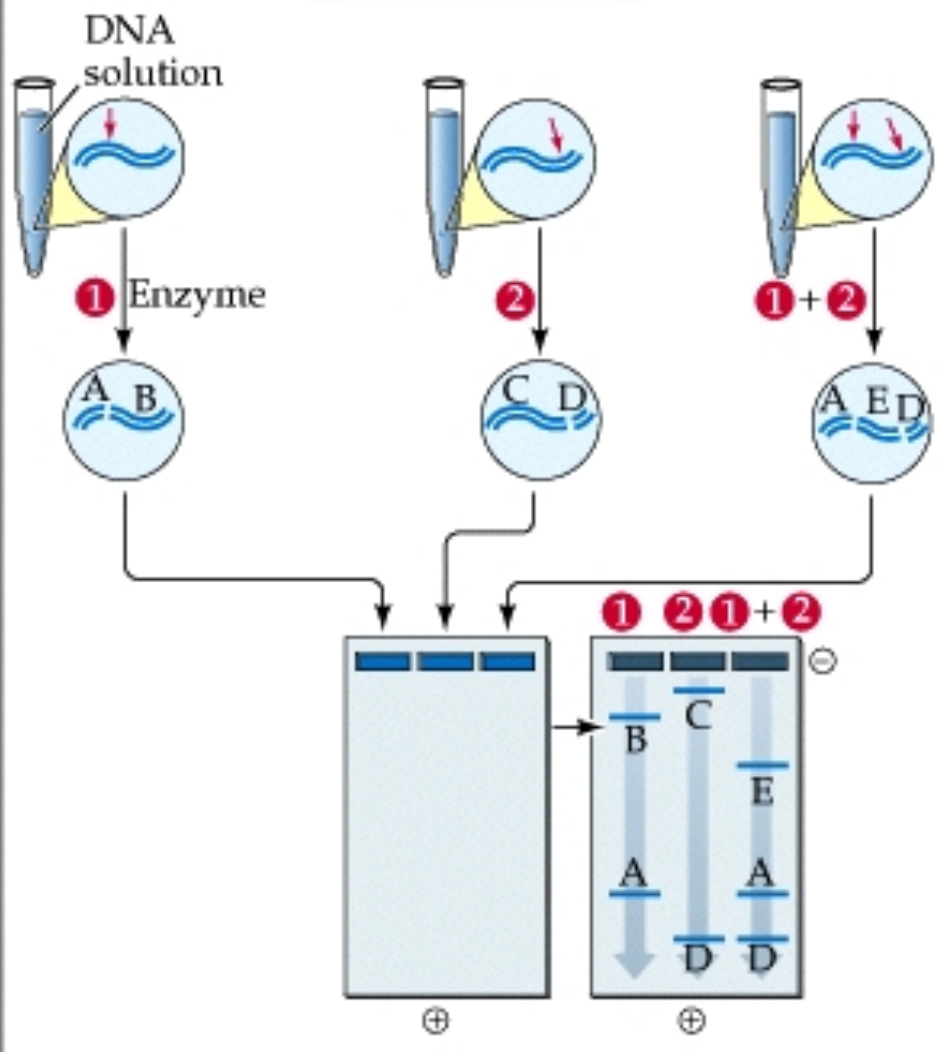
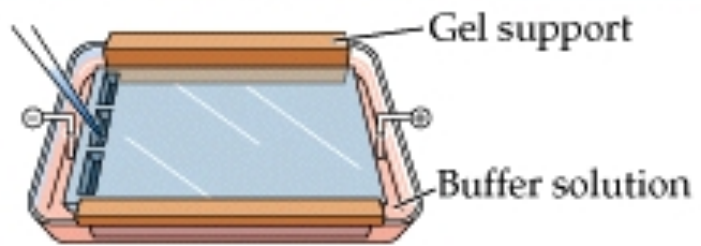
- Elektroforez laboratuvarında yüklü moleküllerin separasyonunda kullanılan bir tekniktir
- DNA negatif yüklü bir moleküldür
- DNA agaroz ya da poliakrilamidden matriksinden geçirilen bir elektrik akımıyla hareket ettirilir “koşturma”

- Jel elektroforezi makromolekülleri (proteinler veya nukleik asitler) moleküler büyüklüklerine, elektrik yüklerine ve diğer fiziksel özelliklerine bağlı olarak birbirinden ayırır

# **Elektroforez;**

- **Separasyon**
- **İdentifikasyon**
- **Purifikasyon**
- **Restriksiyon analizi**
- **Genotiplendirme (PFGE)**

# RESEARCH METHOD



# Restriksiyon analizi

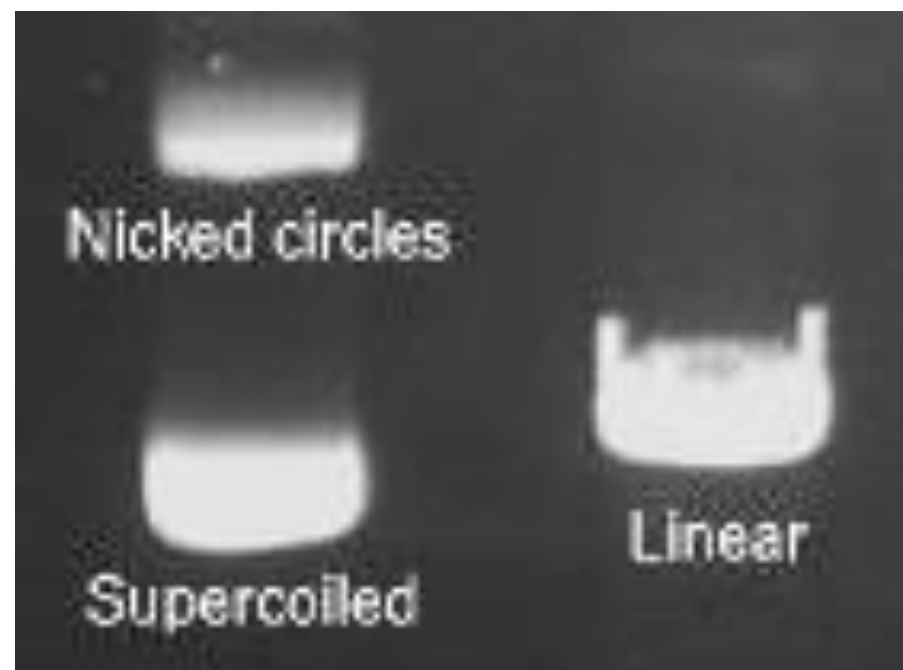
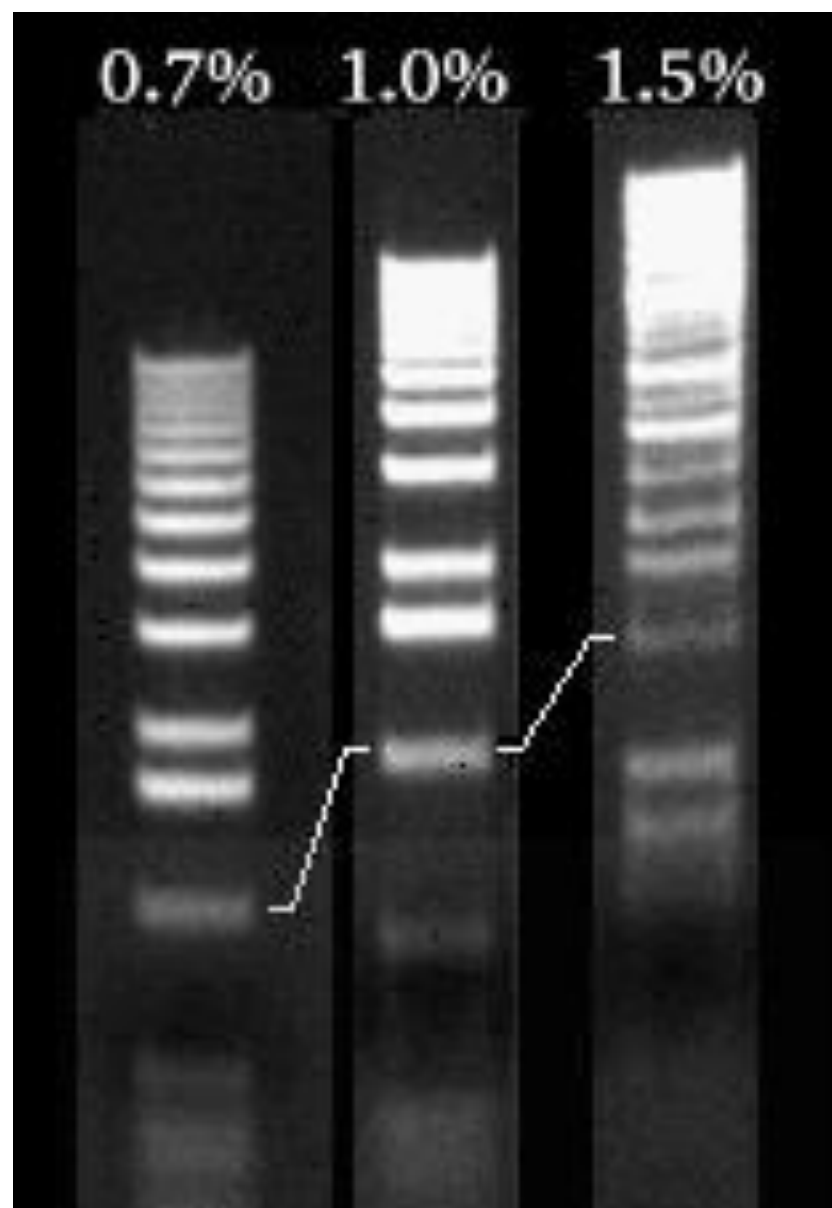
# **Teknik;**

- **Basit**
- **Hızlı**
- **Density gradient centrifugation gibi bazı tekniklerle ayırt edilemeyen DNA'ların ayrımı**
- **EtBr ile 1-10 ng, SYBR Gold ile 20 pg'a kadar saptama**



# **DNA'nın agaroz jellerde göç oranı**

- **DNA'nın moleküler büyüklüğü**
- **Agaroz konsantrasyonu**
- **DNA'nın yapısı**
- **Jel ve elektroforez tamponunda EtBr'ün varlığı**
- **Uygulanan voltaj**
- **Agaroz tipi**
- **Elektroforez tamponu**



Amount of Agarose in Gel (%)	Efficient Range of Separation of linear DNA Molecules (kb)*
0.3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-02
2,0	3-0,1

# Separasyon (Moleküllerin Ayrılması)

- Jel katılaştıktan sonra üzerinde bulunan gözlere DNA örnekleri eklenir = “yükleme”
- Elektrik akımı başlatılır
- Separasyon başlıca 2 faktöre bağlı olarak gerçekleşir
- Molekül şekli ve büyüklüğü
- Molekül yükü

- Elektroforez tankının bir bölgesinden uygulanan elektrik akımı molekülleri iterken diğer bölge molekülleri çeker
- Elektroforez esnasında, elektrik akımı uygulandığında moleküller porların içerisinden geçerek hareket etmeye zorlanırlar

- Moleküllerin elektriksel alan boyunca hareket oranları uygulanan akım şiddetine, moleküllerin büyüklük ve şekline bağlı olmaktadır
- Molekül büyüklüğü arttıkça molekülün porlardan geçişi azalır
- Molekül üzerindeki iyonik yük arttıkça akıma bağlı hızı artar

# Agaroz

- Agaroz deniz yosunundan ekstrakte edilmiş şeker molekül zinciridir
- Kimyasal oldukça pahalı olup 500 mg'ı yaklaşık 200 \$'dır



# Poliakrilamid

- Poliakrilamid deri elektrodlarında ve yumuşak kontakt lenslerde kullanılan materyal
- Her iki jel de moleküllerin içlerinden geçtiği porlar içerir
- Poliakrilamid daha sentetik bir materyal olup farklı elektroforez tiplerinde porların miktarı ve çapları kontrol edilebilmektedir

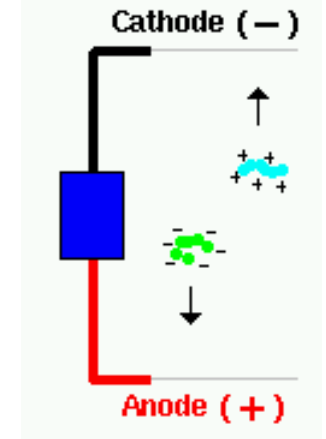


# Farklılıklar

- Karşılaştırıldıklarında, agarozun daha doğal ve saf bir matriks olduğu buna karşılık daha pahalı olduğu görülmektedir
- Agarozun daha evrensel bir por çapı vardır
- Poliakrilamid ise sentetiktir ancak por çapı ve yoğunluğu ayarlanabilmektedir

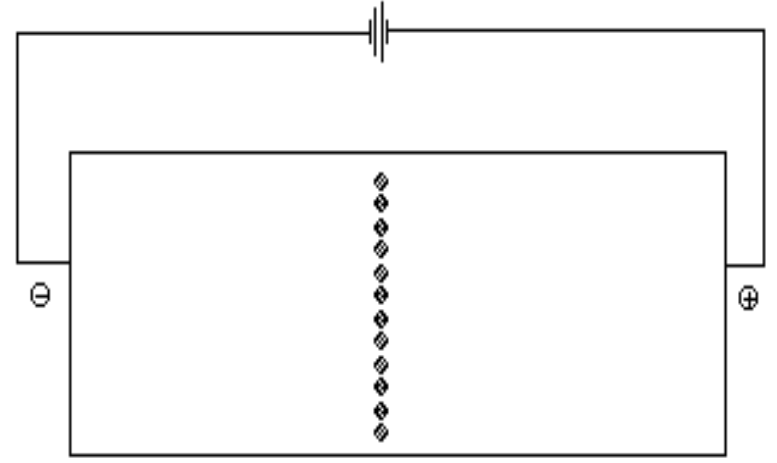
# Elektroforez

- Yüklü moleküller bir elektriksel alana konulduklarında yüklerine göre ya pozitif (anod) ya da negatif (katod) kutba hareket ederler =“göç”
- Proteinlerin net pozitif yüklü olanları ya da net negatif yüklü olanları vardır (örn. katodik veya anodik peroksidazlar).
- Nukleik asitlerin fosfatlarına bağlı olarak sabit negatif yükü bulunmaktadır



# Elektroforez

- Proteinler ve nukleik asitler bir matriks ya da jel içerisinde elektroforeze edilirler. Çoğunlukla jel, örneklerin yüklenmesi için gözler içeren ince bir kalıptır. Bütün jel elektroforez tamponu içerisinde daldırılmıştır
- Tampon içerisinde yer alan iyonlar akımı taşırlar ve pH'yi işlem boyunca sabit tutmaya çalışırlar.

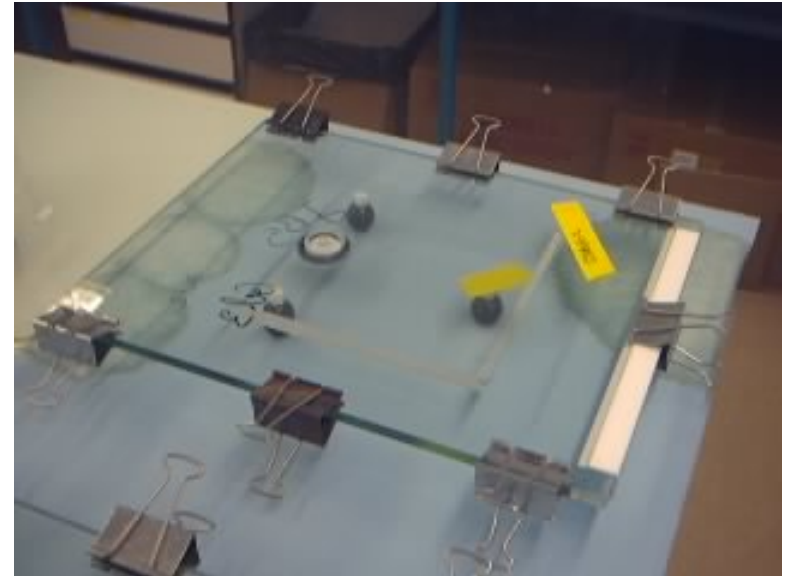
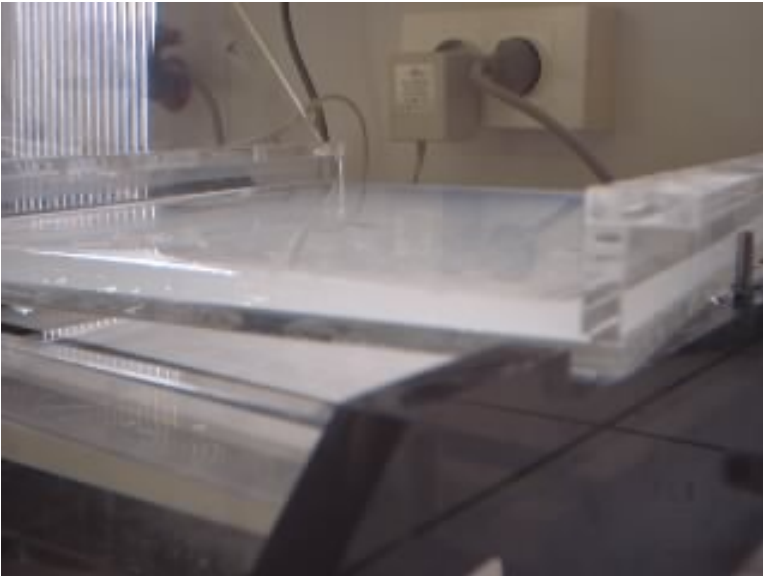


# Agaroz jeller

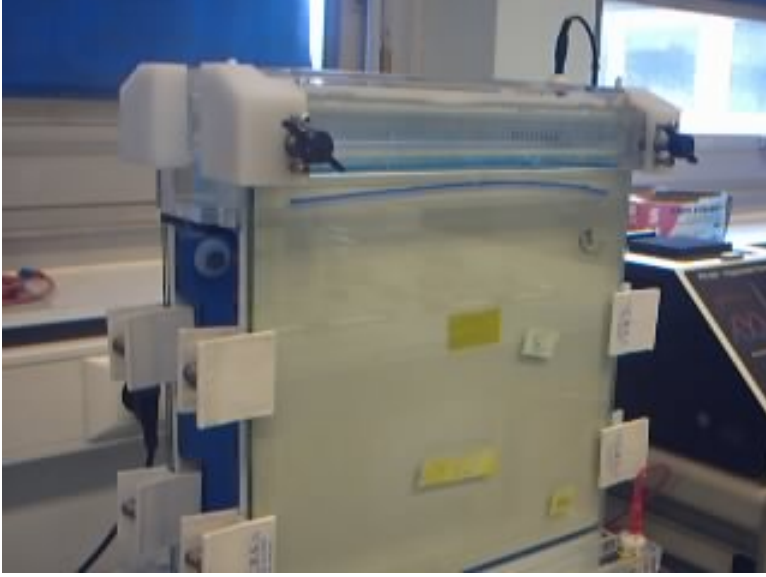
- Agaroz jellerin hazırlanması çok kolaydır: toz haldeki agaroz tampon solusyonu karıştırılır, ısı kullanılarak eritilir ve elektroforez kalıbına dökülür.
- Agaroz deniz yosunundan ekstrakte edilmiştir (toksik değildir). Agaroz konsantrasyonu arttıkça, çözünürlük artar.
- *Low melting* agarozlar 65 C'de erir. Bu özel agarozlar çift-iplikçikli DNA'nın jelden kesilerek saflaştırılması (purifikasyon) amacıyla kullanılır.

# Jeller

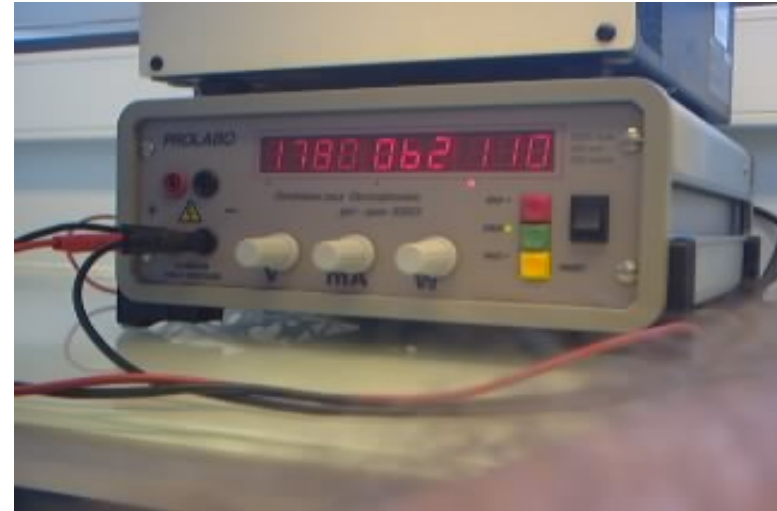
- Protein ve nukleik asit separasyonunda agaroz ya da poliakrilamid jellerden faydalanılır.



# Akrilamid jeller

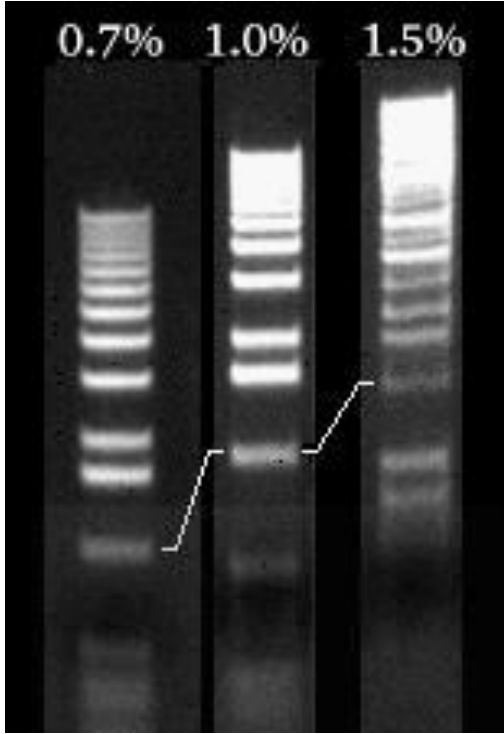


- Akrilamid jel elektroforezinde kullanılan ekipman ve güç kaynakları da oldukça basittir.
- Bir elektroforez cihazı ve güç kaynağı
  - Cam kalıplar.
  - Jelde örnek gözlerinin açılmasında kullanılan taraklar



# Agaroz jeller

- Agaroz jeller geniş bir separasyon oranı bulunurken göreceli olarak düşük ayırt edici güce sahiptirler. Agarozun yoğunluğu değiştirilerek 100 bp'den 50000 bp'ye kadar olan DNA fragmentleri standart teknikler kullanılarak ayrılabilirler



*Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) tekniğinde, elektroforez alanındaki akım yönü periyodik olarak değiştirilmektedir. Bu 50000'den x milyona bp'e değin moleküler büyüklükteki DNA parçalarının ayırımına olanak verir*

# Agaroz jeller

- Voltaj

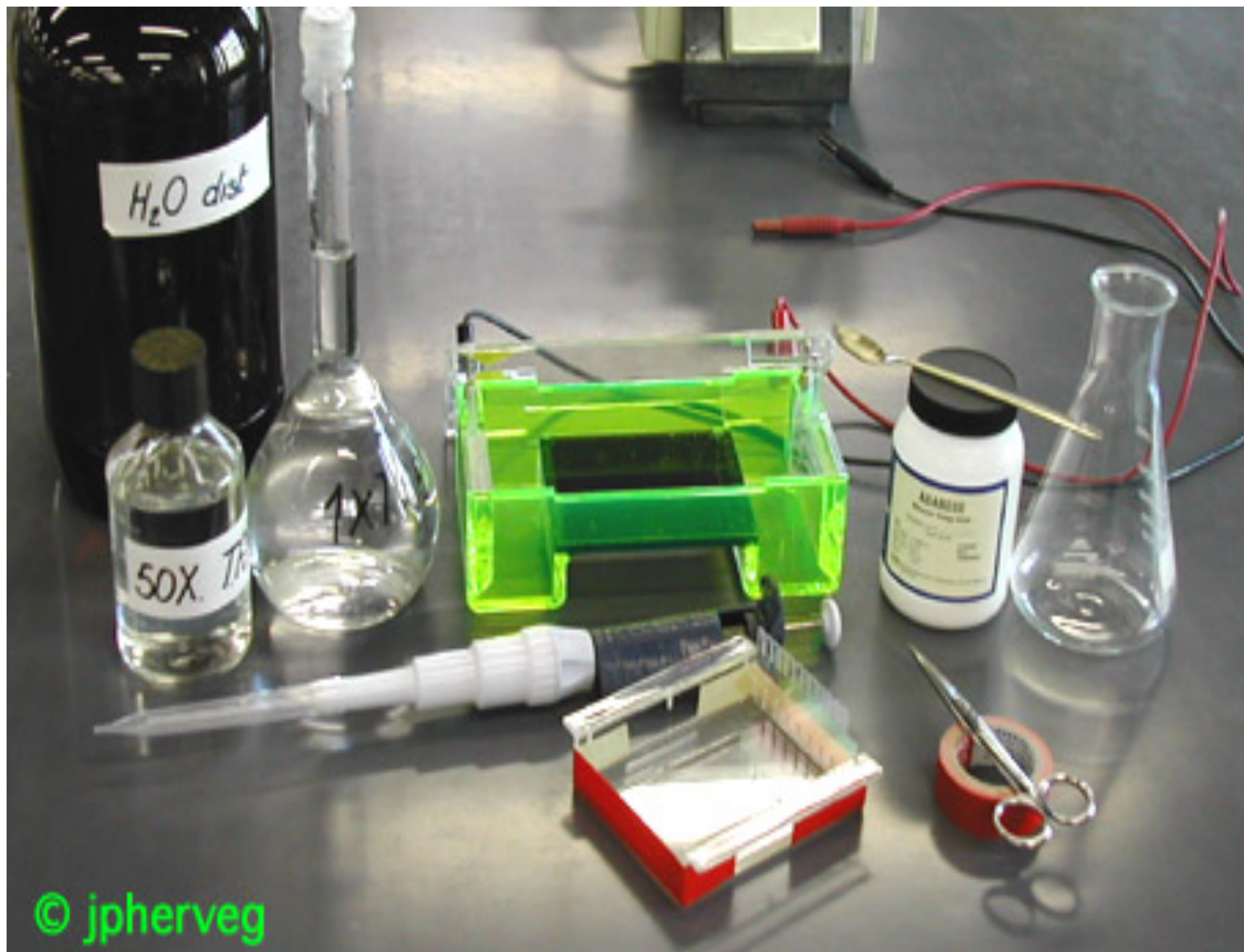
Jele uygulanan voltaj artırılırsa büyük fragmentler küçüklere oranla daha hızlı hareket ederler. Bu nedenle, 2 kb'dan daha büyük fragmentlerin optimal çözünürlüğünü sağlamak amacıyla jelin elektrodlar arasında kalan kısmına cm başına 5 voltu geçmeyecek şekilde akım uygulanır. (cm değeri iki elektrod arasındaki mesafedir jelin boyu değildir).





# Agaroz jeller

- Agaroz jel elektroforezinde kullanılan ekipman ve güç kaynakları şunlardır:
  - Bir elektroforez tankı ve güç kaynağı.
  - Jel dondurma kalıpları (farklı büyüklüklerde ve UV-geçirgen plastikten)
  - Jelde örnek yükleme gözleri oluşturmak için taraklar.
  - Transilluminatör (bir ultraviyole ışık kaynağı)
  - Fotoğraf makinası



© jpherveg

# Agaroz jeller

## Kimyasallar ise;

- Electroforez tamponu, çoğunlukla **Tris-acetate-EDTA (TAE)** or **Tris-borate-EDTA (TBE)**. İyonik güçleri farklı olup nukleik asitler için farklı göç oranları sağlarlar.
- Yükleme tamponu, örneğin gözlere yerleşmesi için yoğunlaştırıcı bir bileşen (örn. **sucrose**) ve jelde örneklerin hareketlerini izlemek amacıyla bir ya da iki mavi renk sağlayan boyadan oluşur.
- Nukleik asitlerin boyanmasında kullanılan florasan boya örn. **Ethidium bromide**.

# Akrilamid jeller

- Akrilamid güçlü bir neurotoksindir.
- Toz halindeki akrilamid tartılırken maske takılması, akrilamid solüsyonları ile çalışılırken de eldiven giyilmesi gerekmektedir.
- Poliakrilamid non-toksik olarak bilinmesine karşın serbest akrilamid içerebileceği düşünülerek eldiven giyilerek jeller tutulmalıdır.

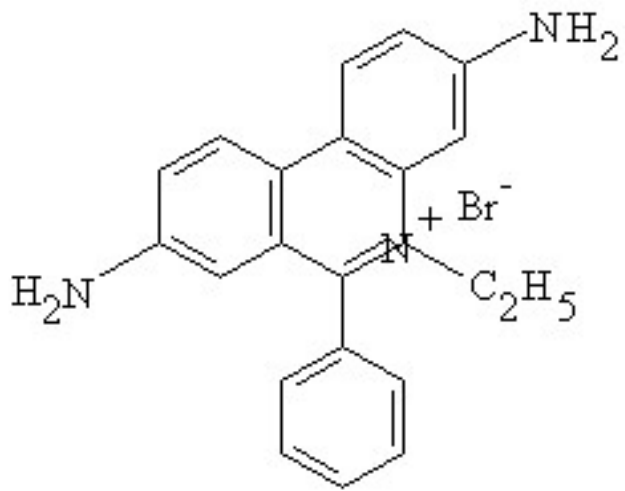
# Akrilamid jeller

- Poliakrilamid apraz bağlı bir akrilamid polimeridir
- Polimer zincirlerinin uzunluğu kullanılan akrilamidin yoğunluğu tarafından belirlenir (%3.5-20).
- Oksijen polimerizasyon iřlemine engellediėinden bu jeller cam plakalar arasına dökülür (veya silindirlere).
- Poliakrilamid jellerin hazırlanması agaroz jellere göre daha zordur.

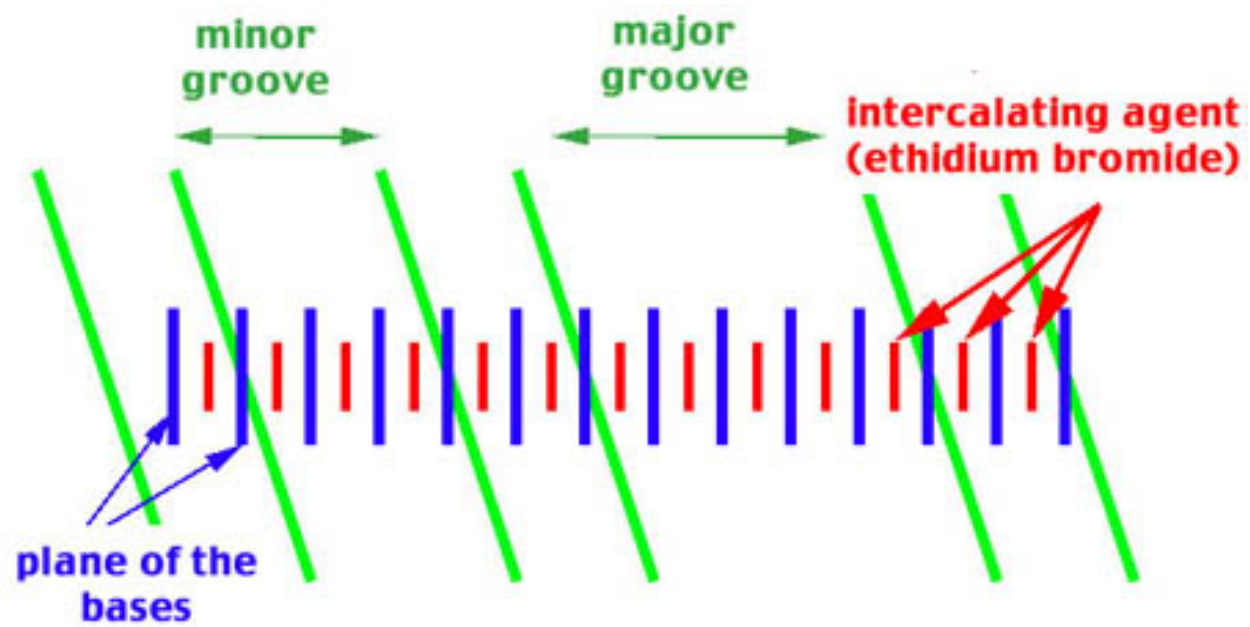
# Ethidium Bromid

- ✓ EtBr nukleik asitlerin bazıları arasına bağlanarak DNA fragmentlerinin jelde saptanmalarını sağlayan florasan boyadır.
- ✓ Agaroz jellere **önceden** ya da **DNA örneklerine** karıştırılabileceği gibi **elektroforez sonrasında bir tank içerisinde** belirli yoğunlukta (**0.5 ug/ml**) hazırlanarak jel bu solüsyona daldırılabilir.
- ✓ EtBr'nin DNA'ya bağlanması DNA'nın ağırlığı ve bütünlüğünü dolayısıyla da hareketliliğini değiştirebileceğinden bu son yöntemin uygulanması tavsiye edilmektedir.

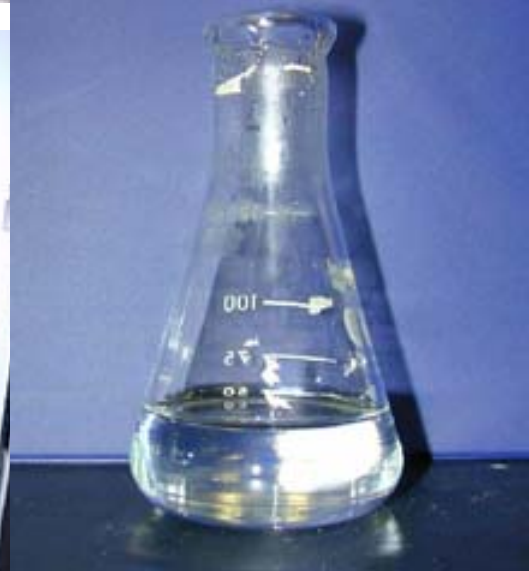
# Ethidium Bromide



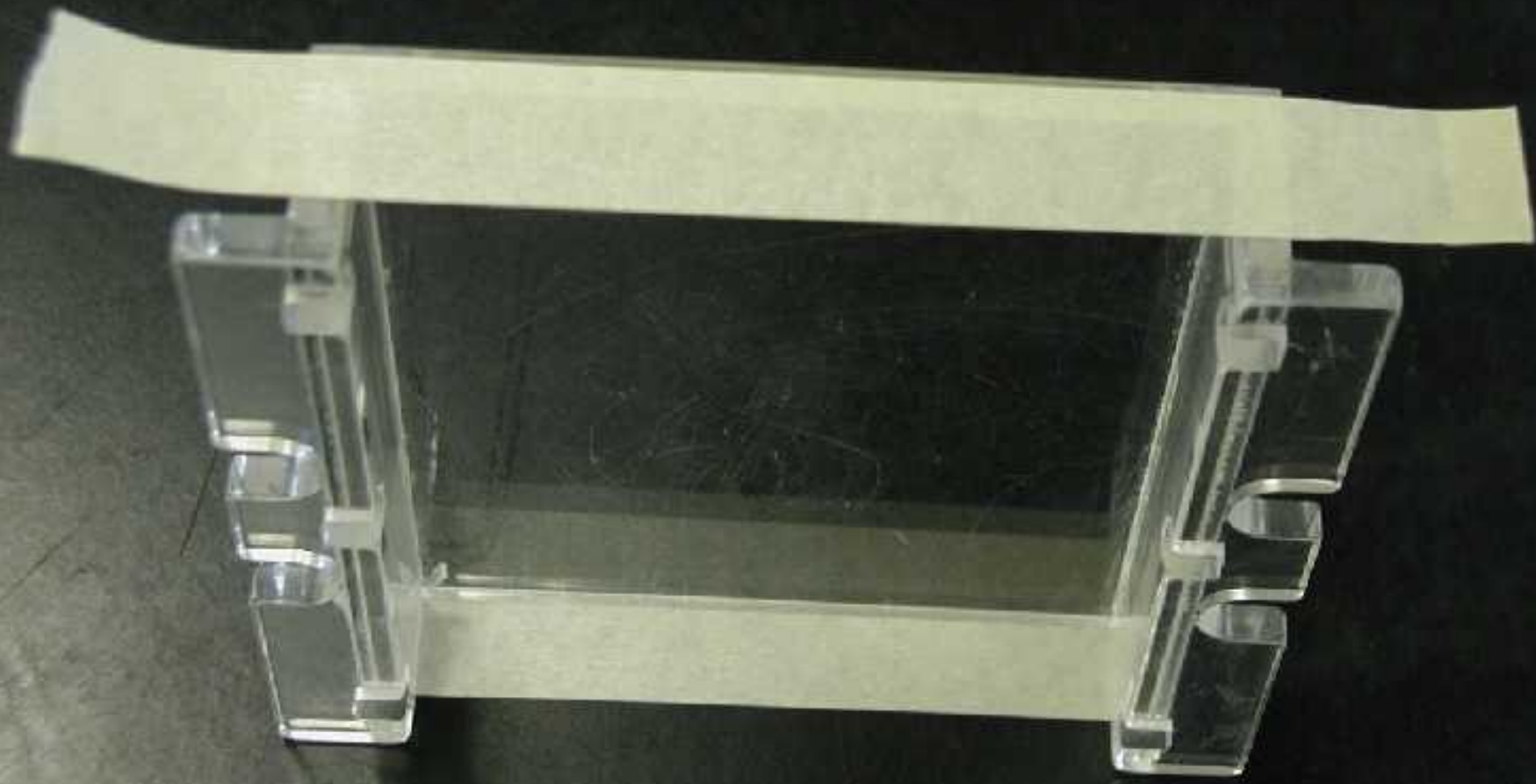
Ethidium Bromide

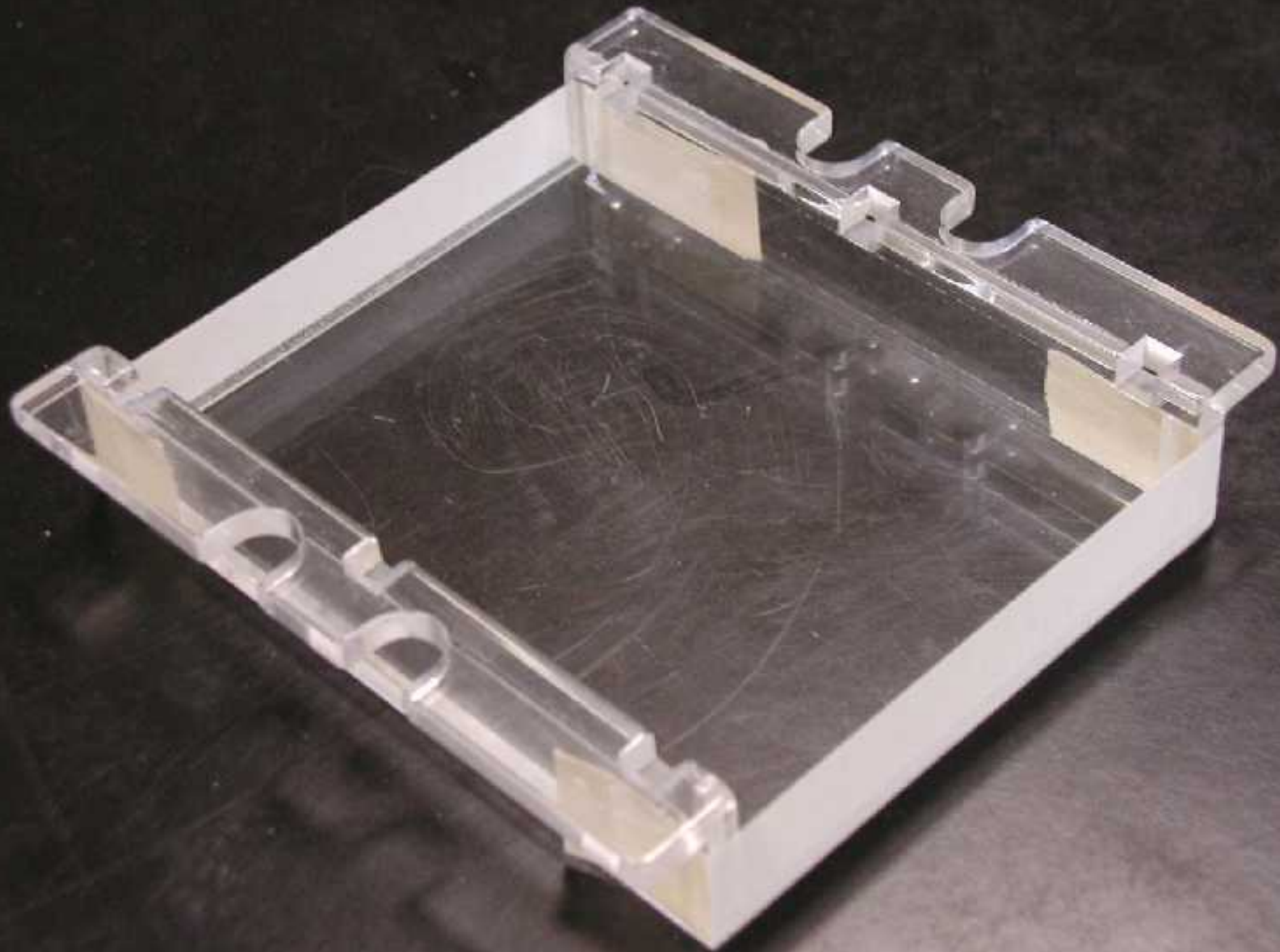


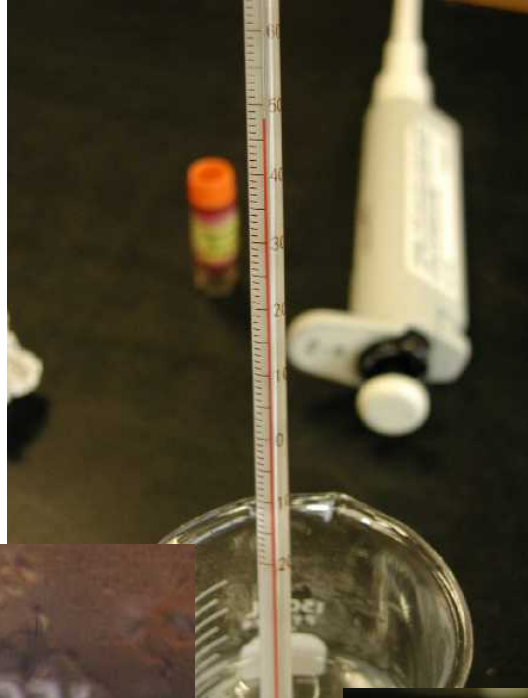




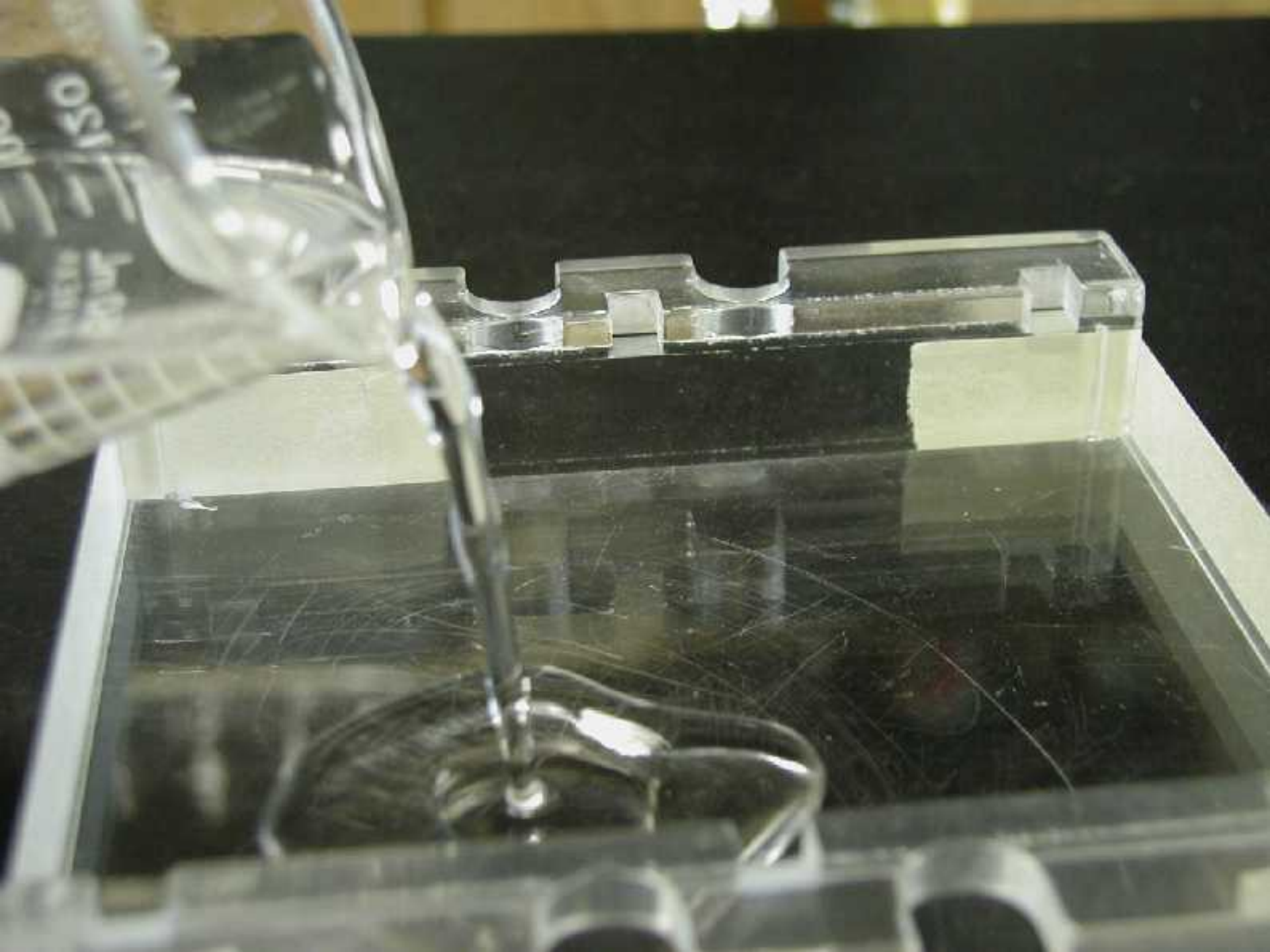


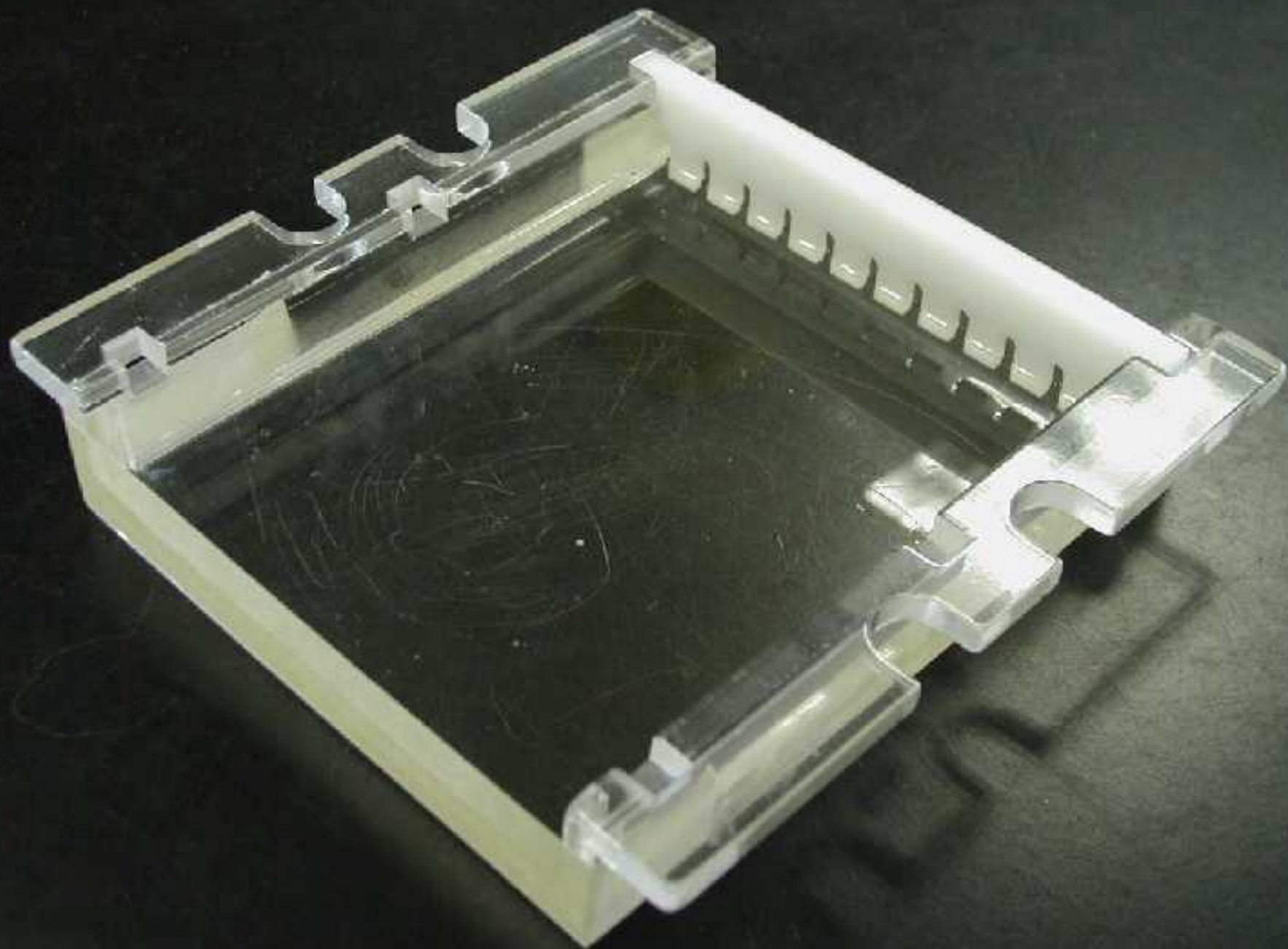


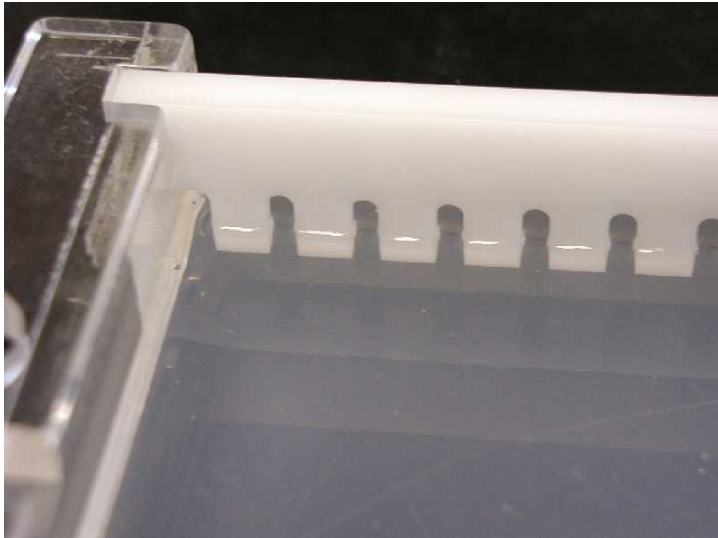
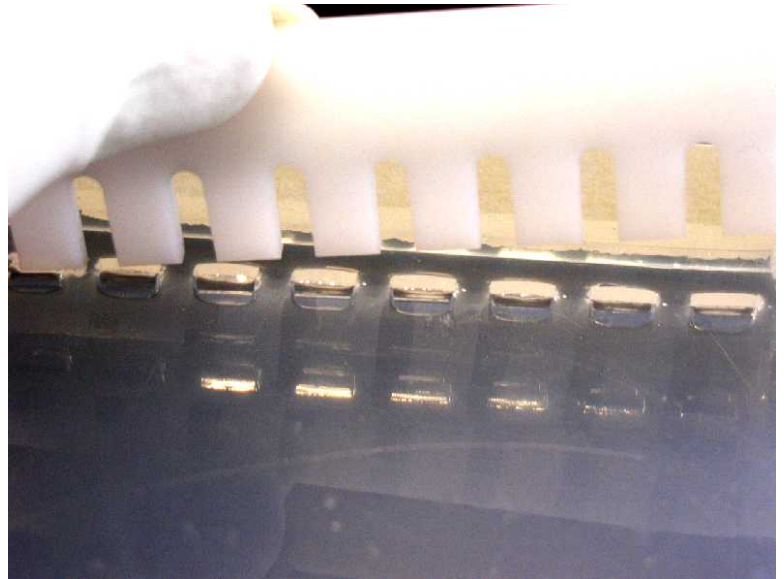
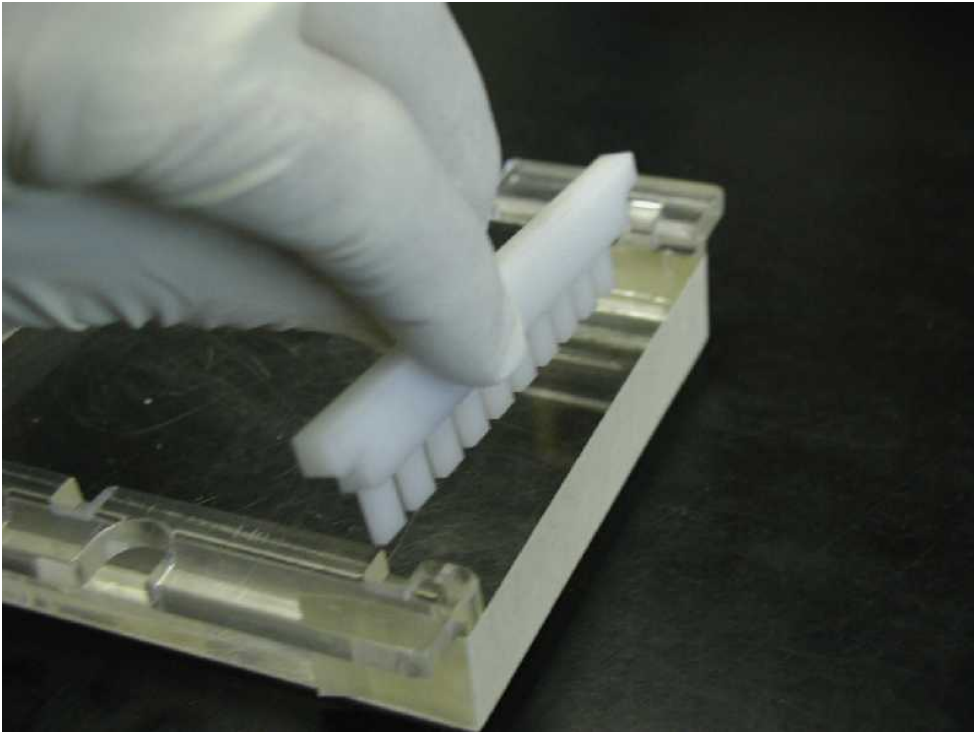


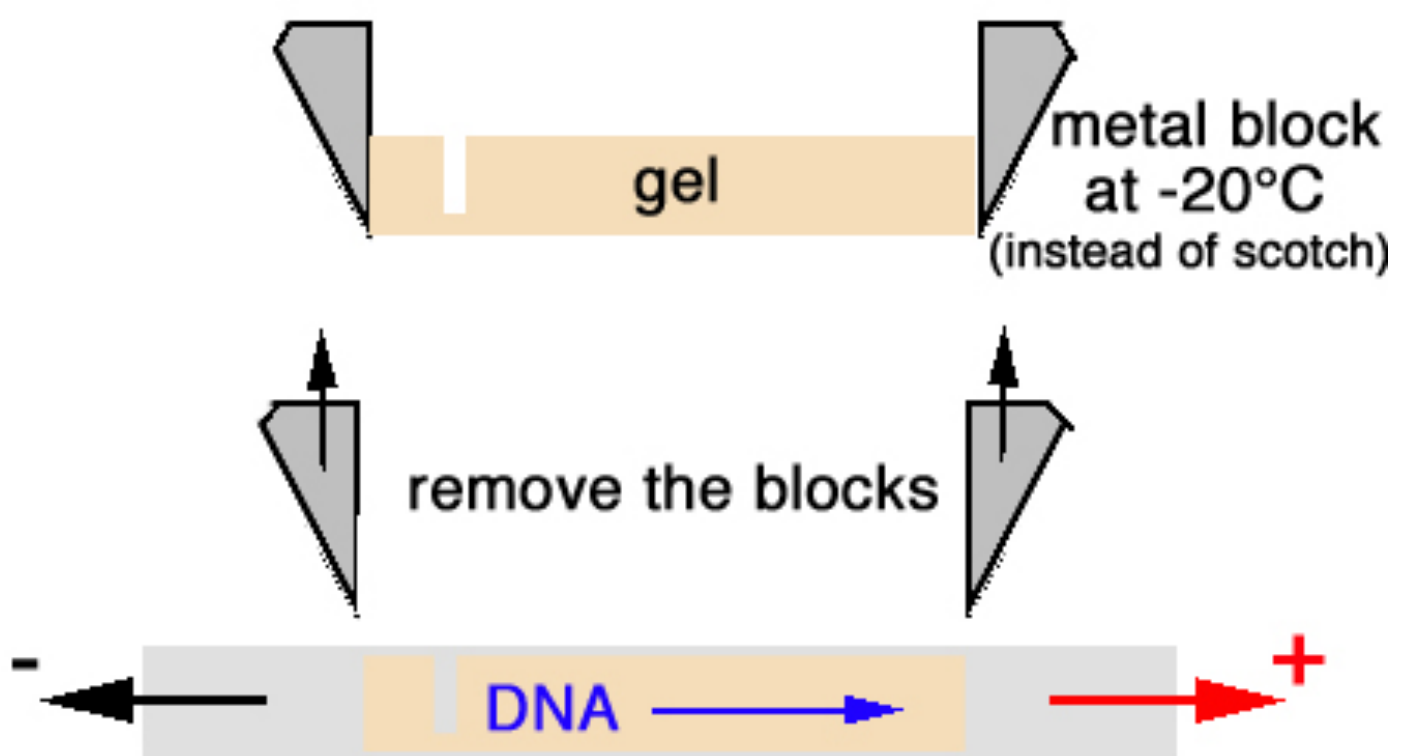




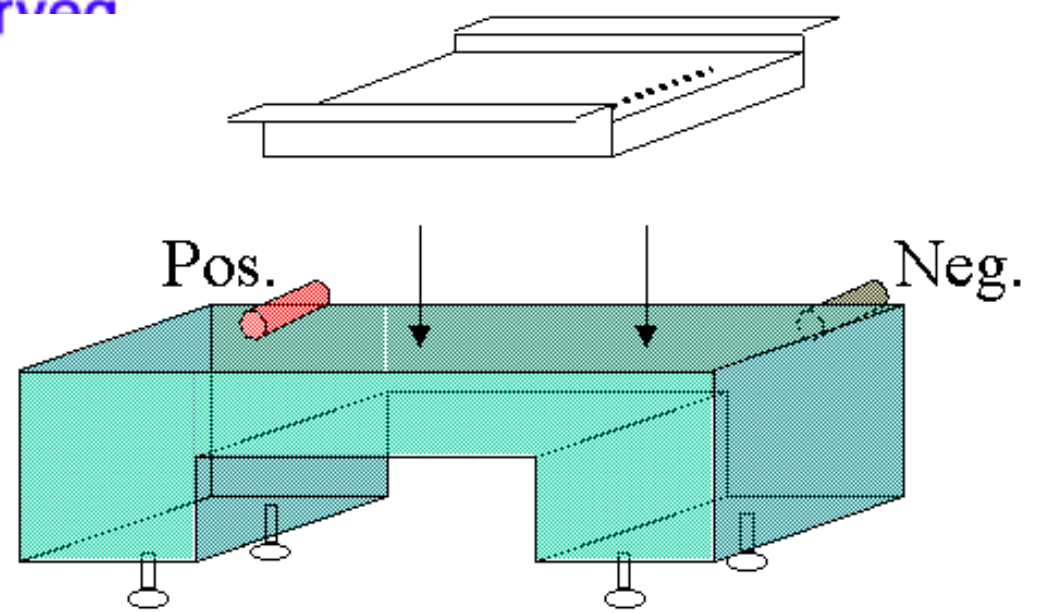




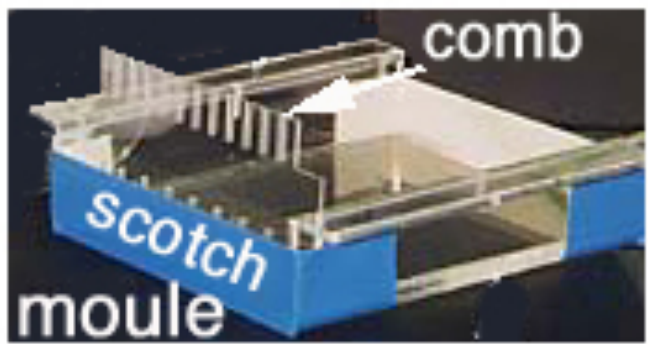
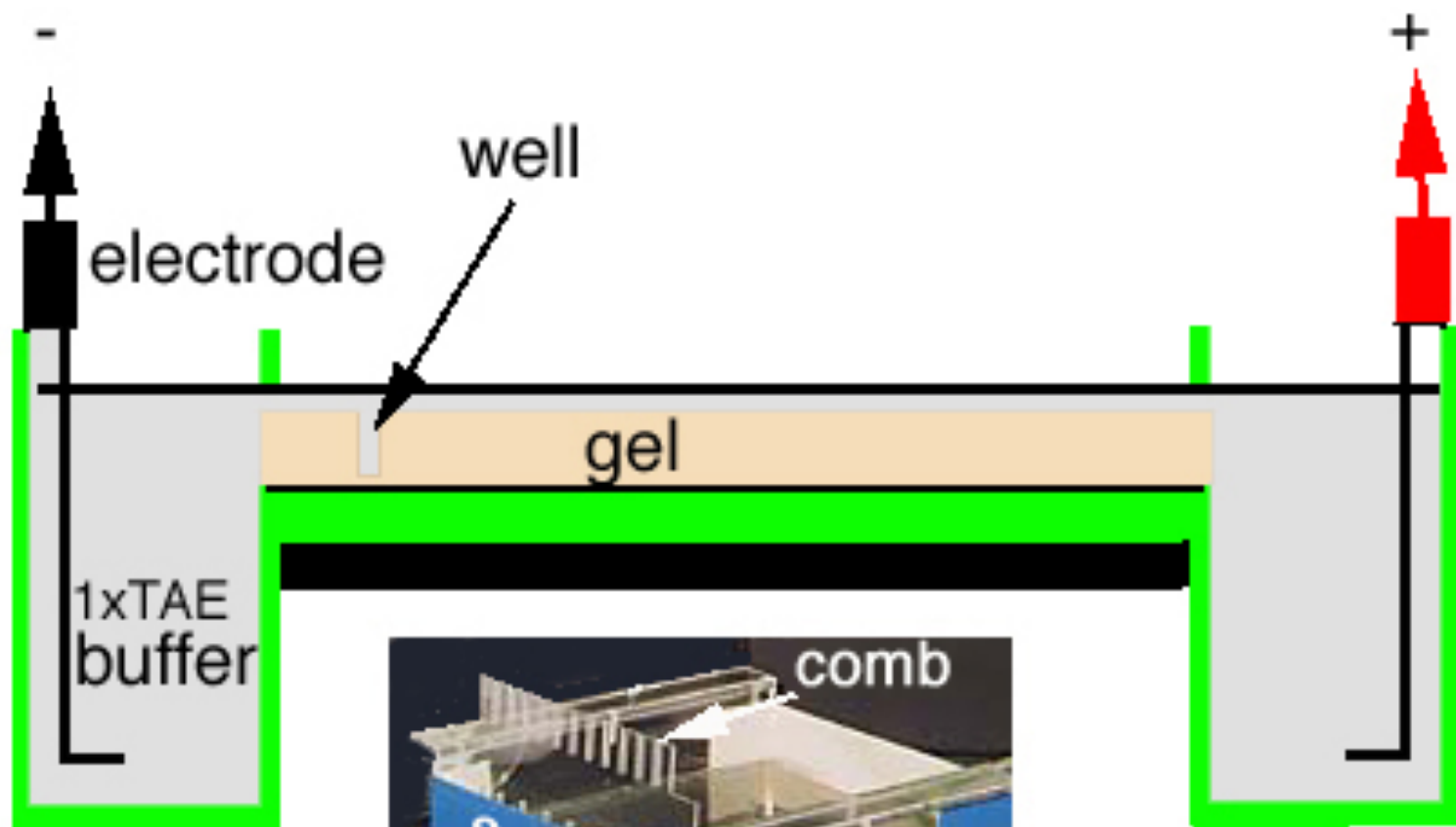




© jphervee

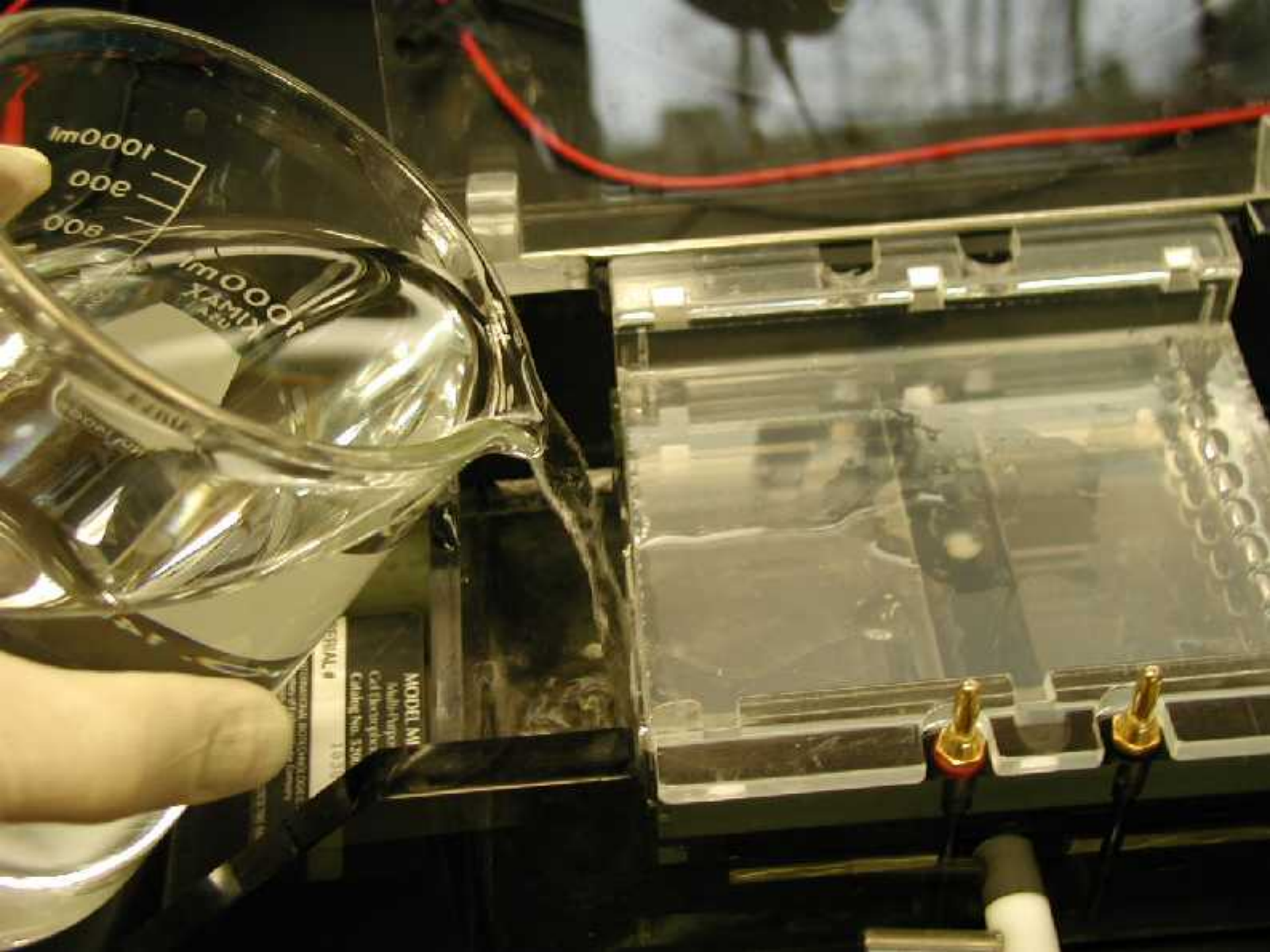






© jpherveg

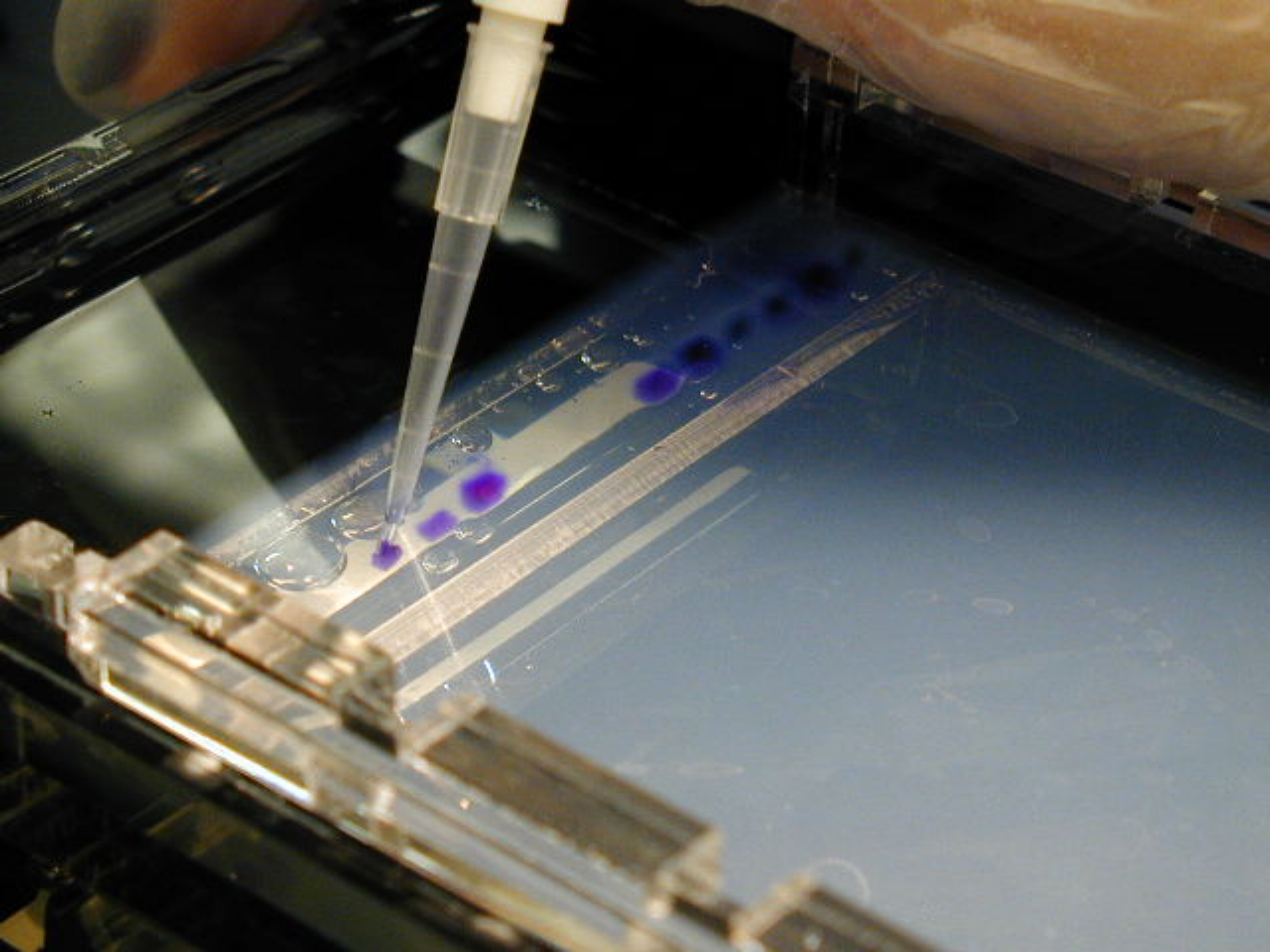




1m000l  
00e  
00s

1m000l  
KIMAX  
100ml

MODEL M1  
Multi-Channel  
Cell Electroporation  
Catalog No. 1290  
SERIAL # 1021





Running Buffer

DNA + LOADING DYE

Agarose Gel

set the volume



blue/Orange loading dye



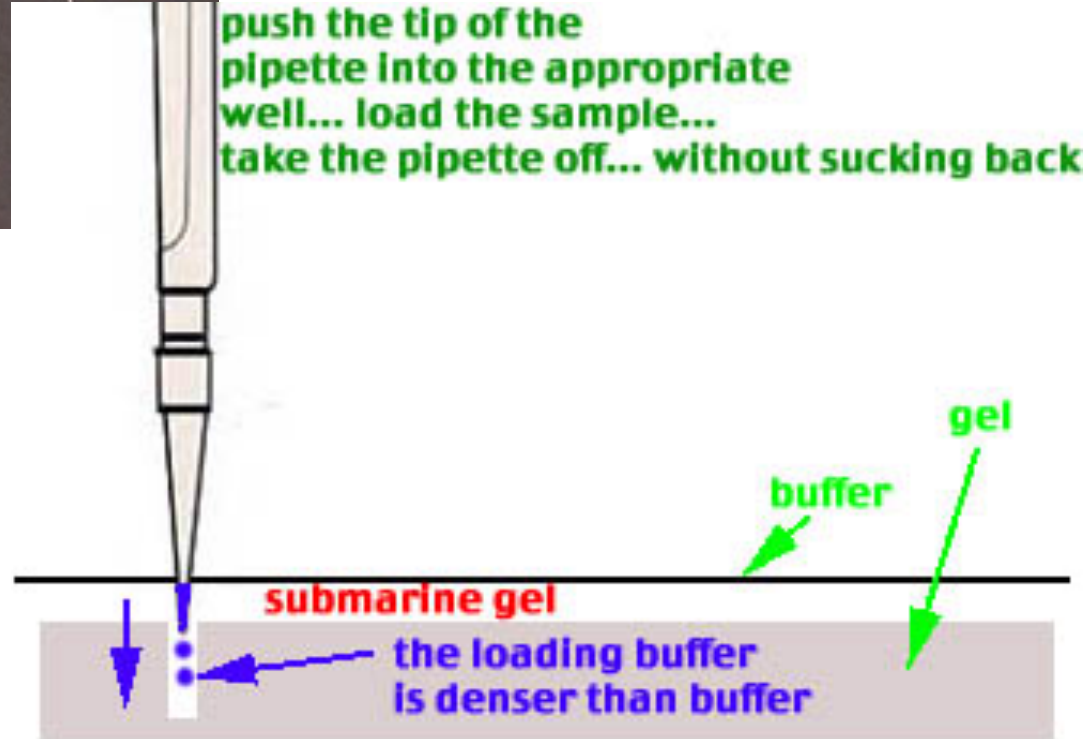
DNA ladder

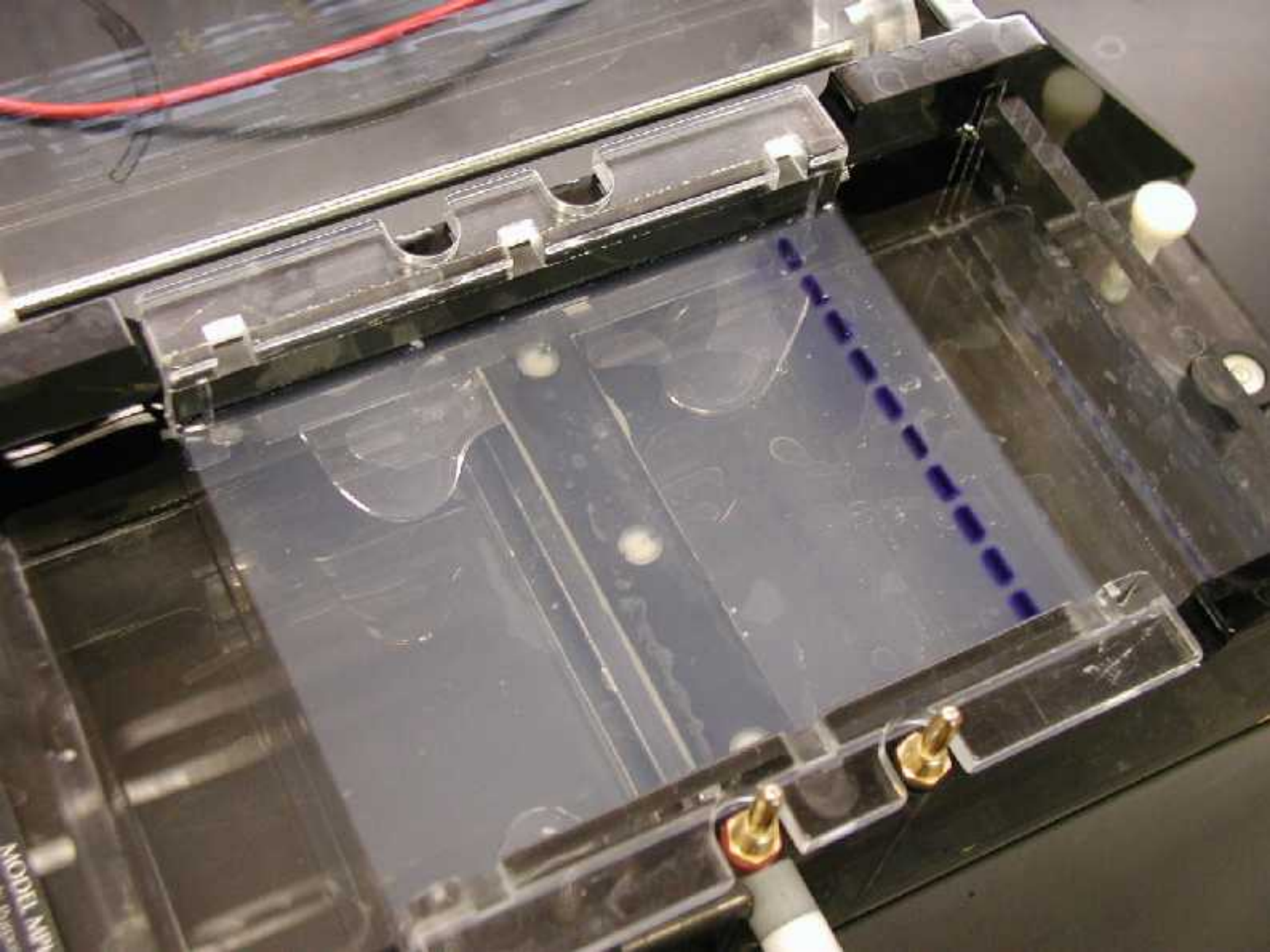


DNA sample



push the tip of the pipette into the appropriate well... load the sample... take the pipette off... without sucking back





MODEL NPH





E-C Apparatus Corporation  
St. Petersburg, Florida

003

EC-54

**WARNING**

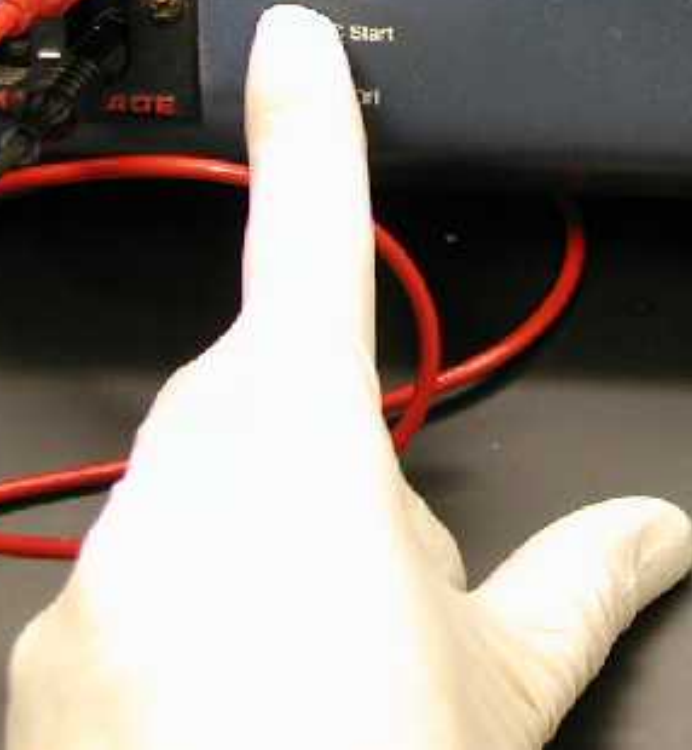
A red cable and a black cable are plugged into the front panel. The red cable is labeled "HIGH" and the black cable is labeled "GND".

- Overcurrent
- DC On
- Start
- Stop

Volts Millamps  
Display

Min Max

AC Power  
Off



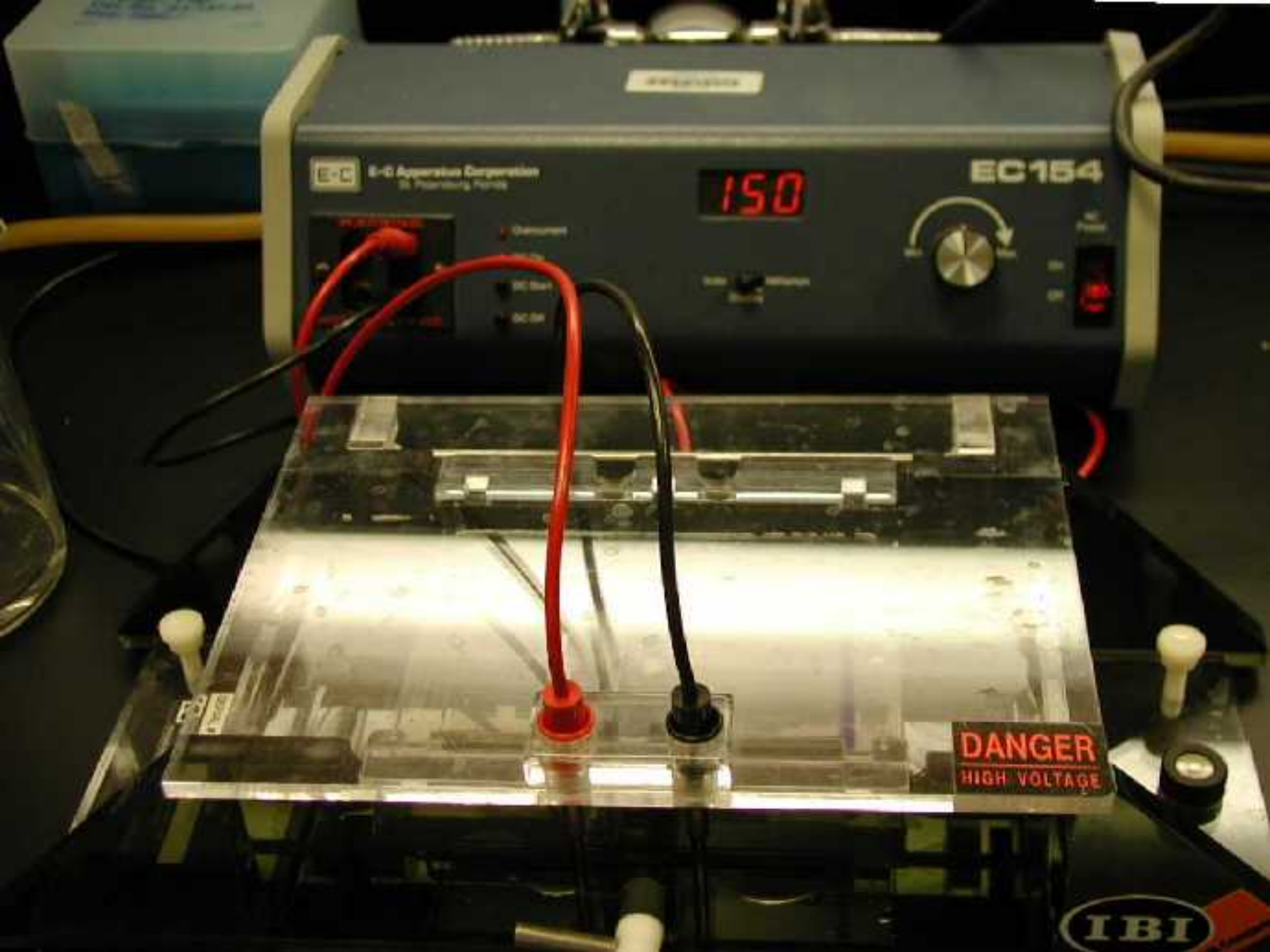
EGG E-G Apparatus Corporation  
St. Petersburg, Florida

150

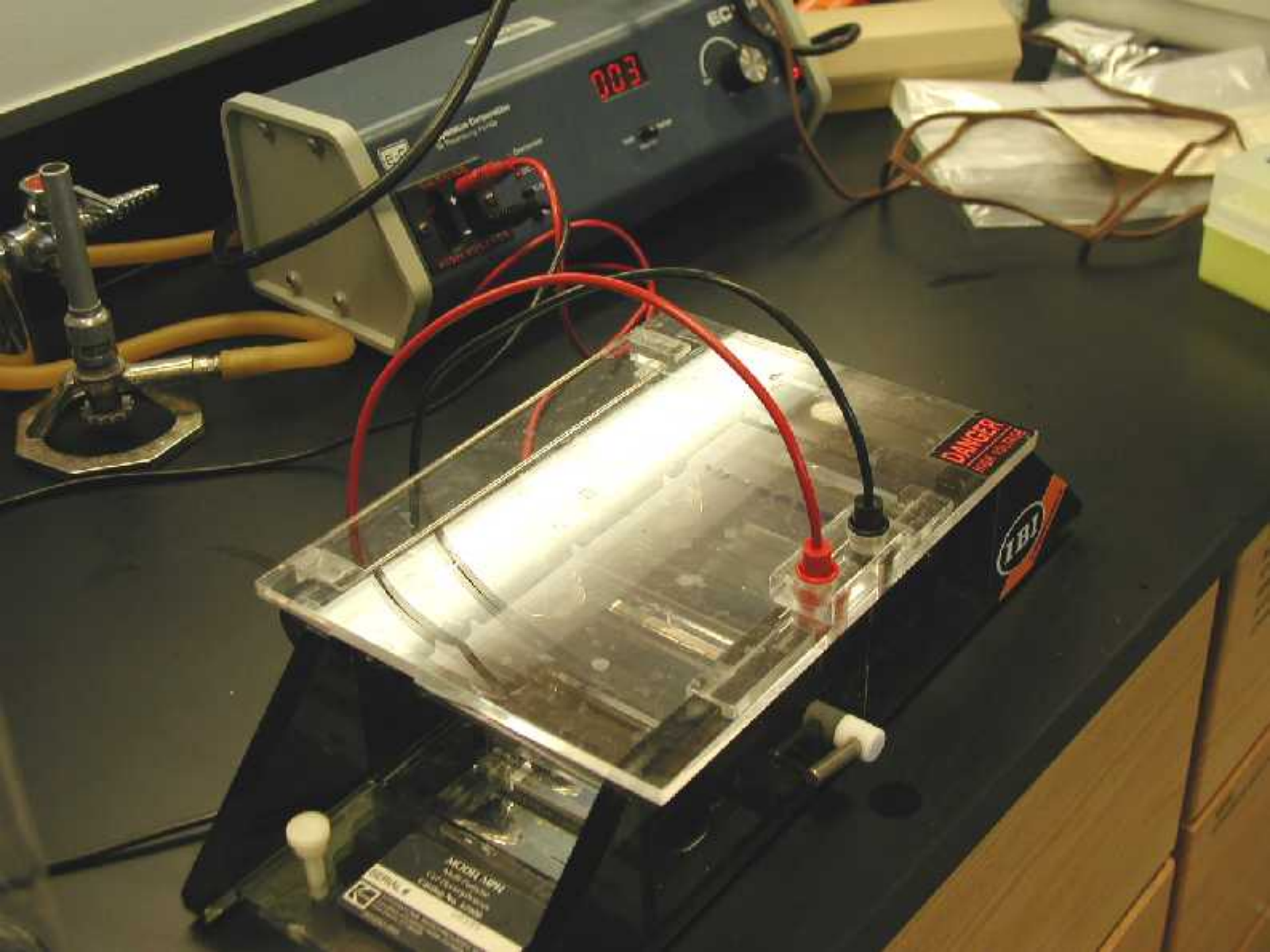
EC154

**DANGER**  
HIGH VOLTAGE

IBI









# Agaroz Jellerin Görüntülenmesi



welder masks equipped  
with glass windows

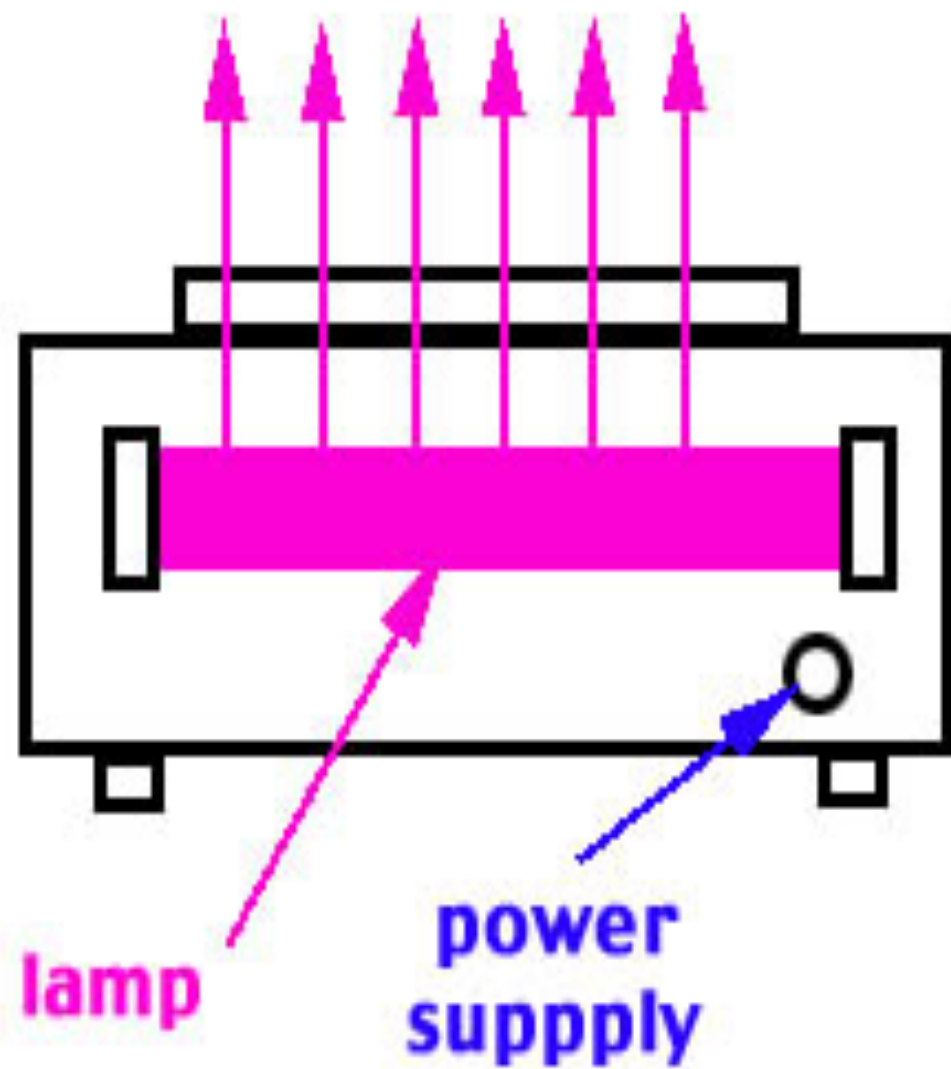
camera



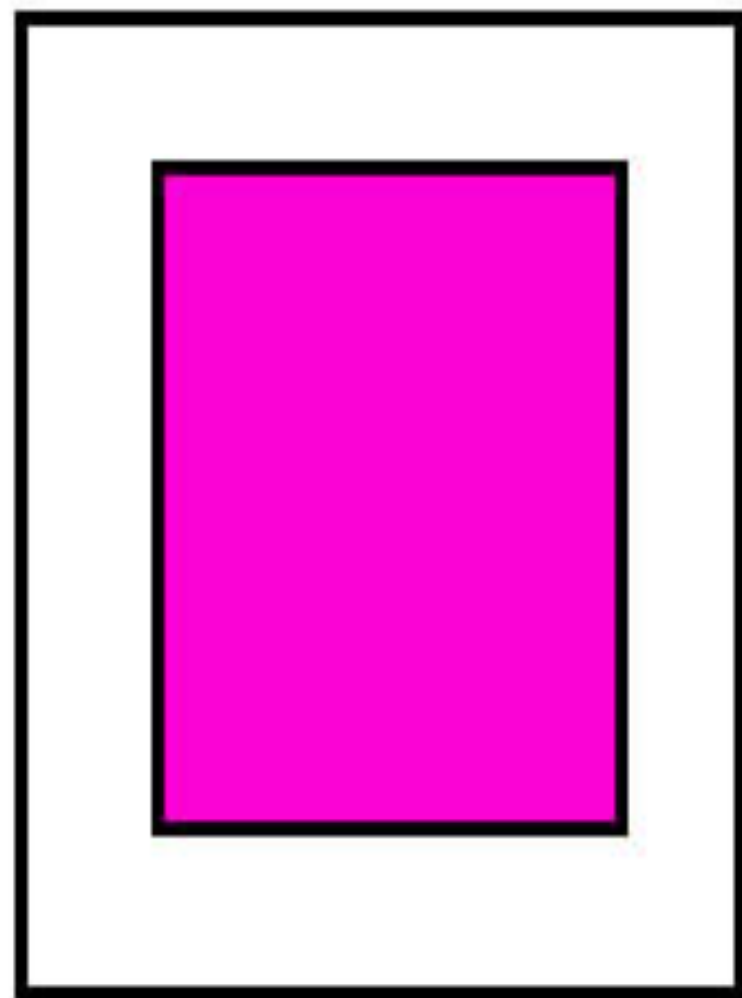
UV transilluminator

on/off switch

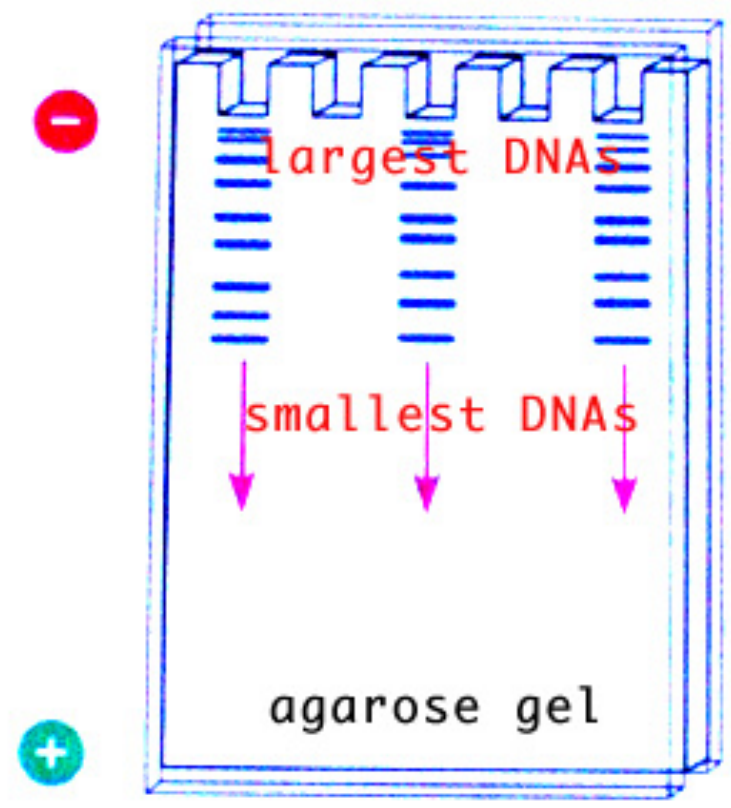
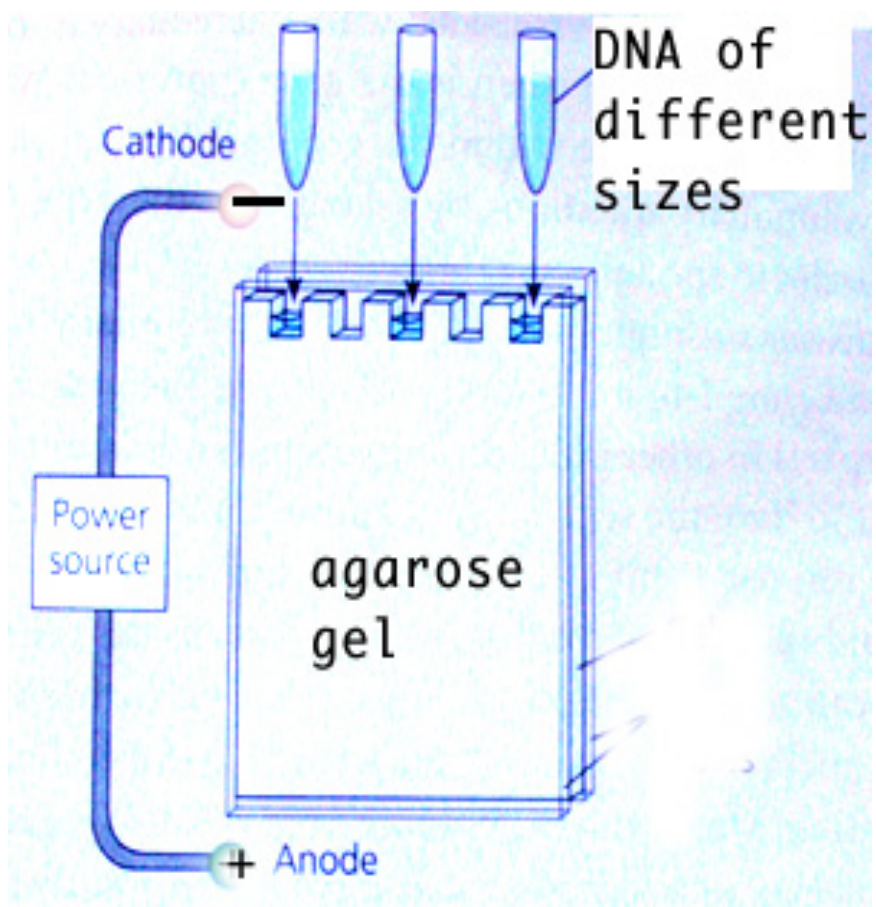
# UV transilluminator

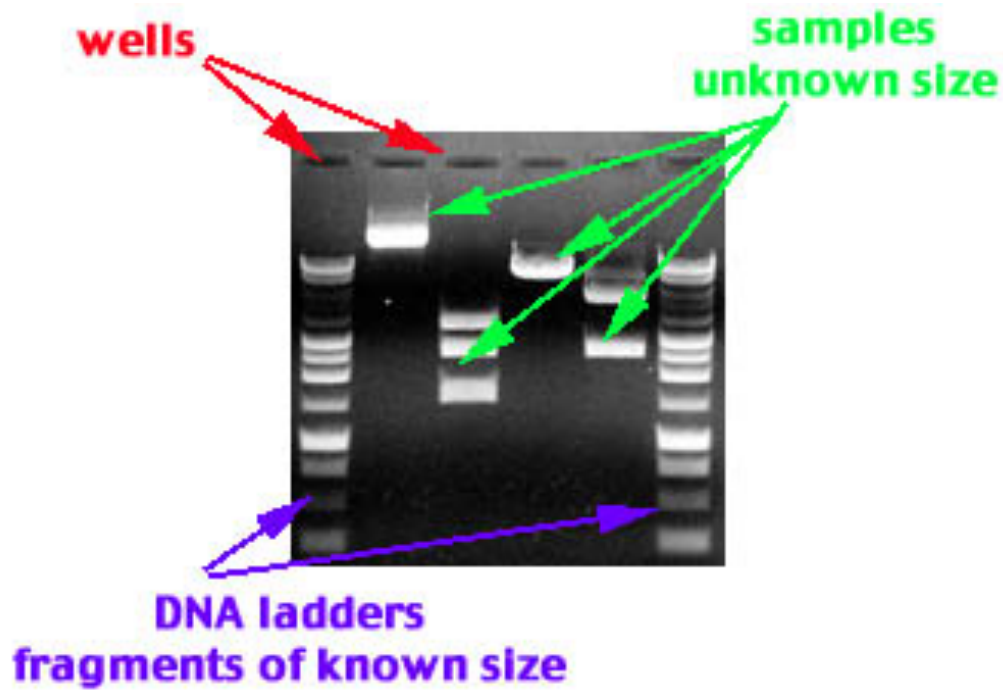
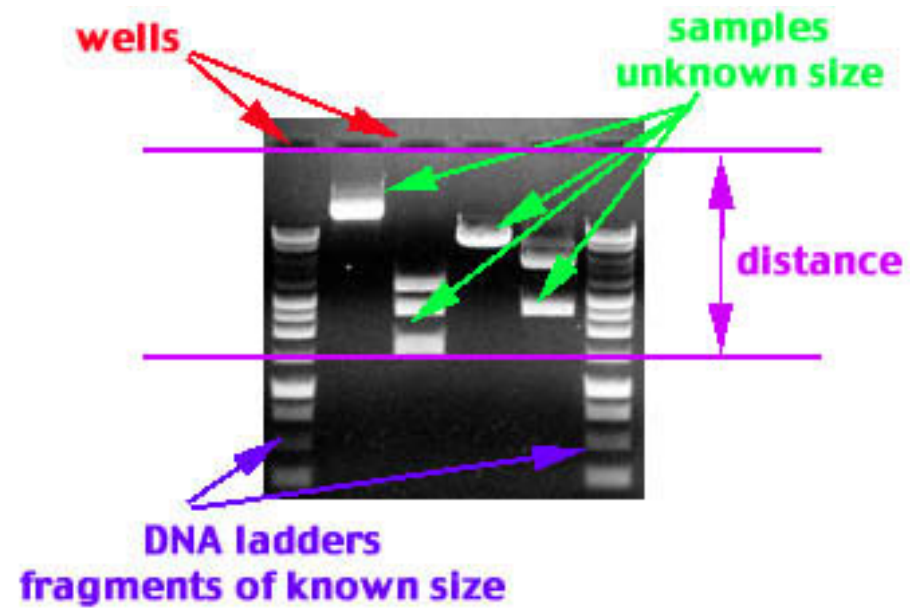


front view

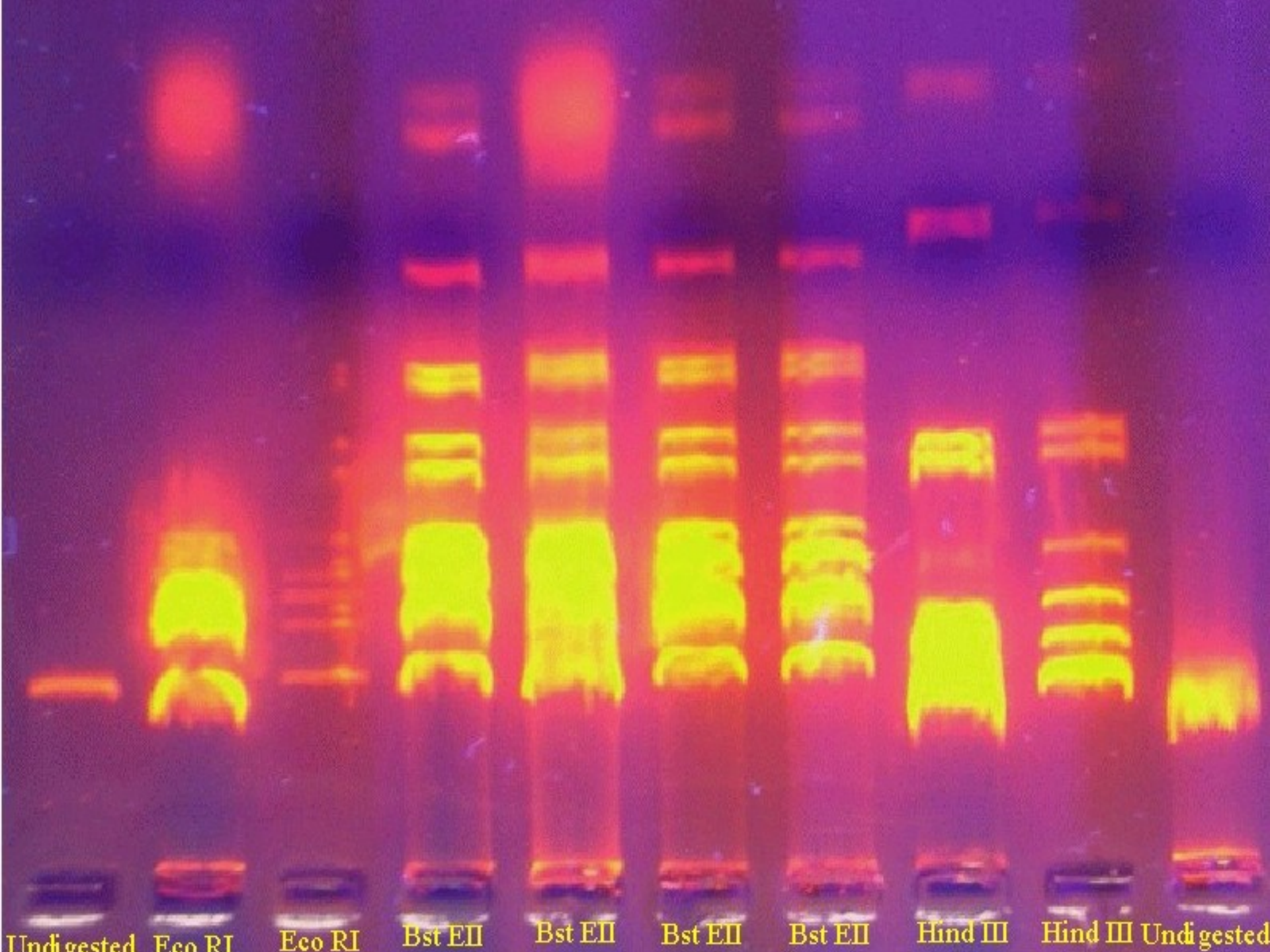


top view

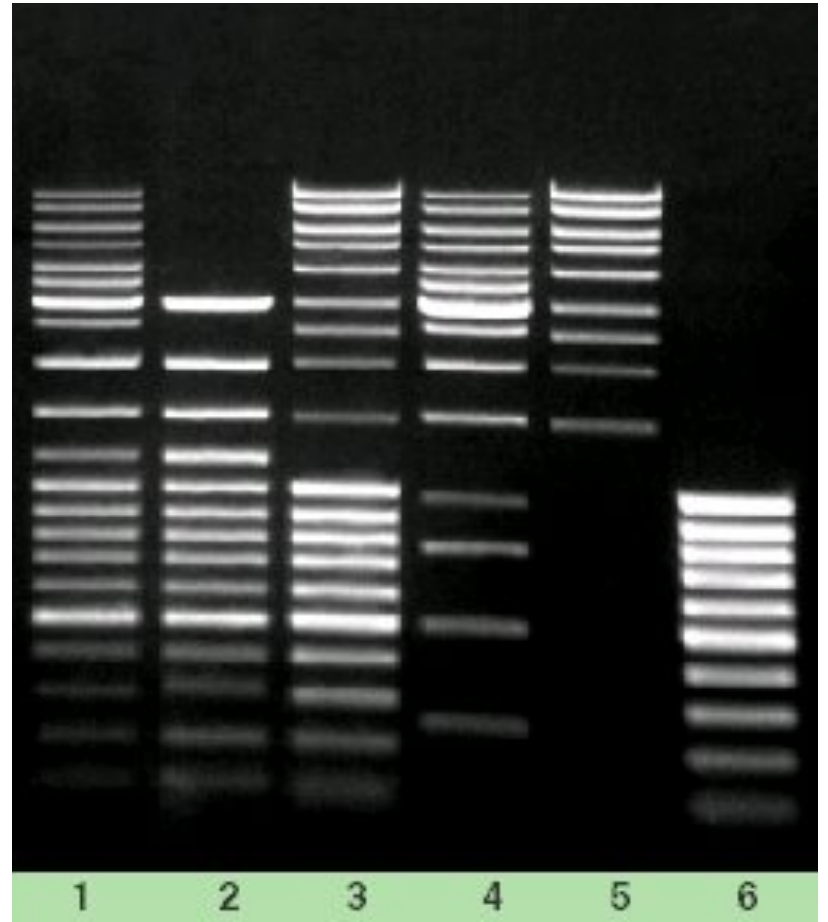
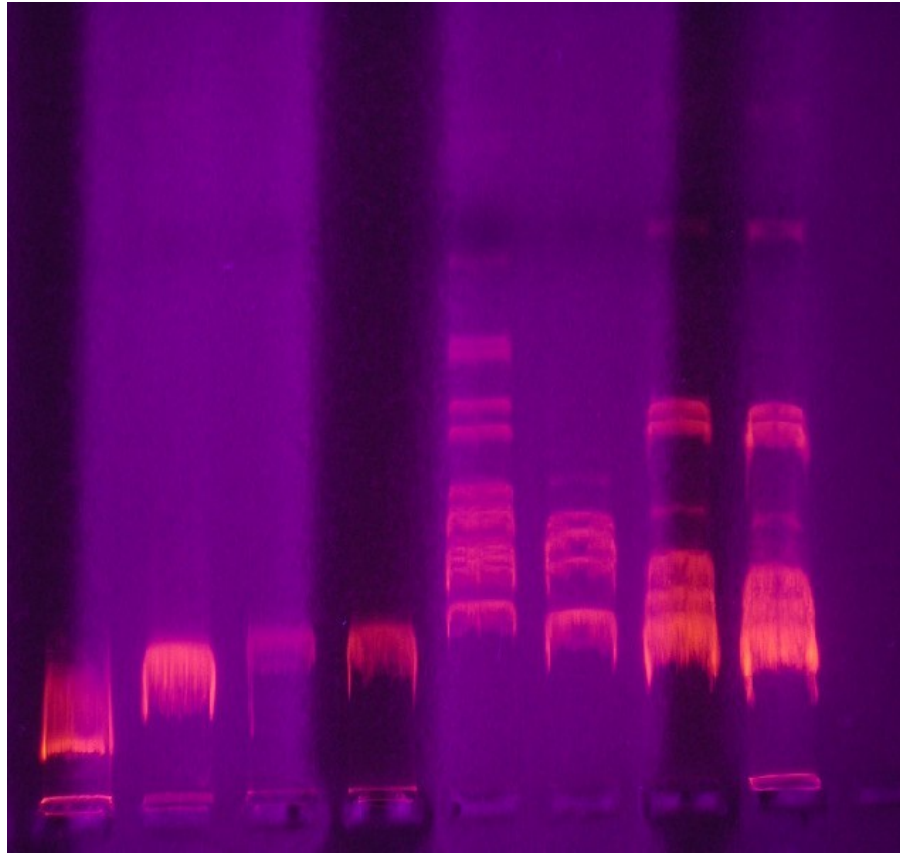


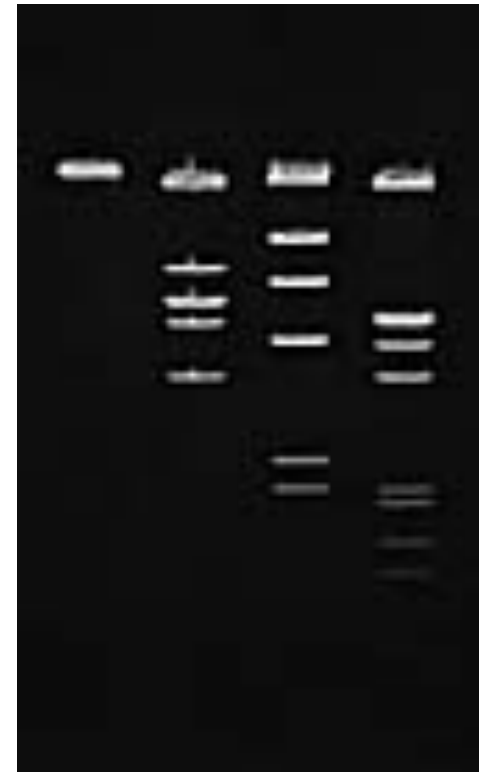
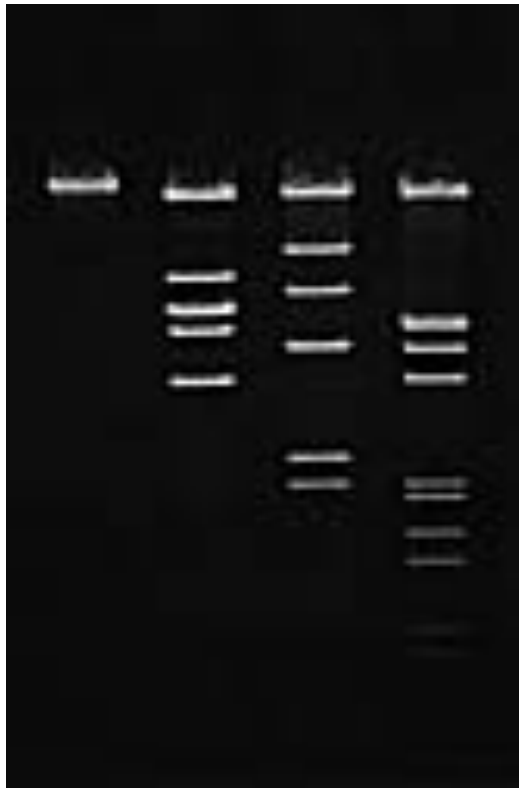






Undigested Eco RI Eco RI Bst EII Bst EII Bst EII Bst EII Hind III Hind III Undigested





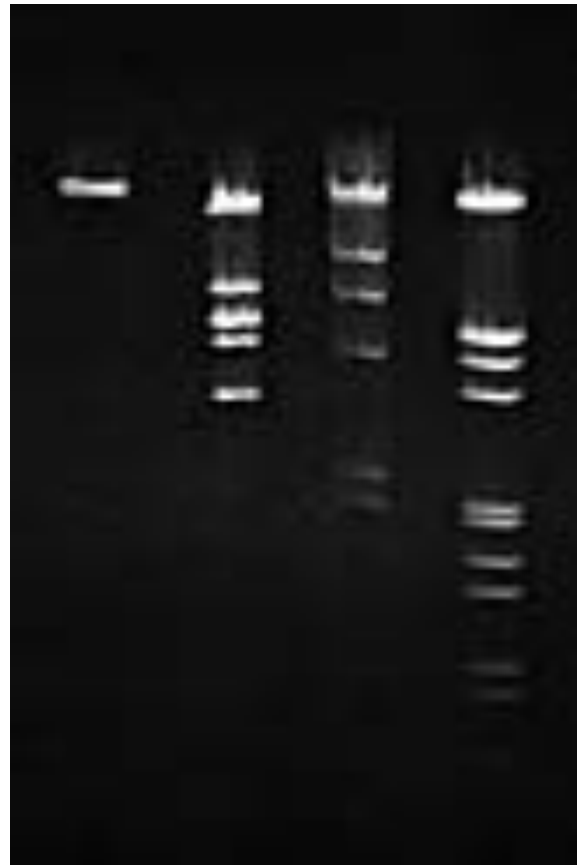
0.8% agarose mini-gel in  
1X TBE buffer run at 60  
Volts for 2 hours.

Bands smeared in all lanes.  
Too much DNA loaded.

During loading, Lane 2  
was punctured with  
the micropipette tip. In  
more severe cases,  
DNA is lost through the  
hole in the well.



Bump in band in Lane 4. Bubble in Lane 4 of agarose gel.



Wavy bands in all lanes. Comb removed before gel was completely set. In this case, comb was removed eight minutes after pouring gel.



Bands smeared in all lanes. Water, instead of 1X TBE buffer, was used to prepare agarose.