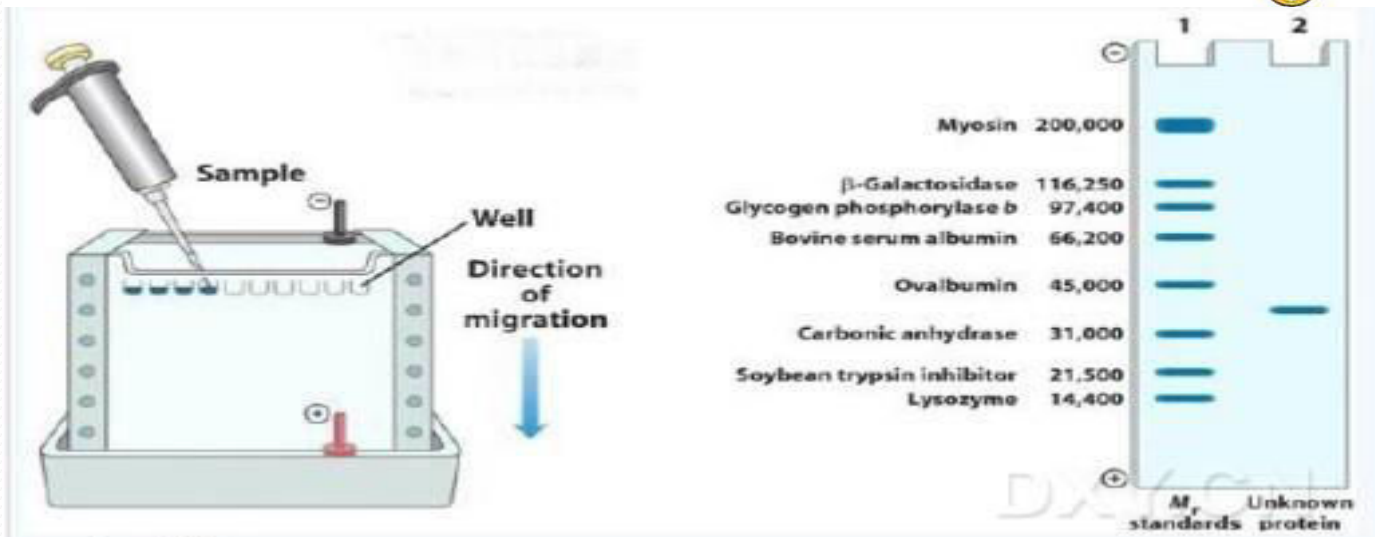
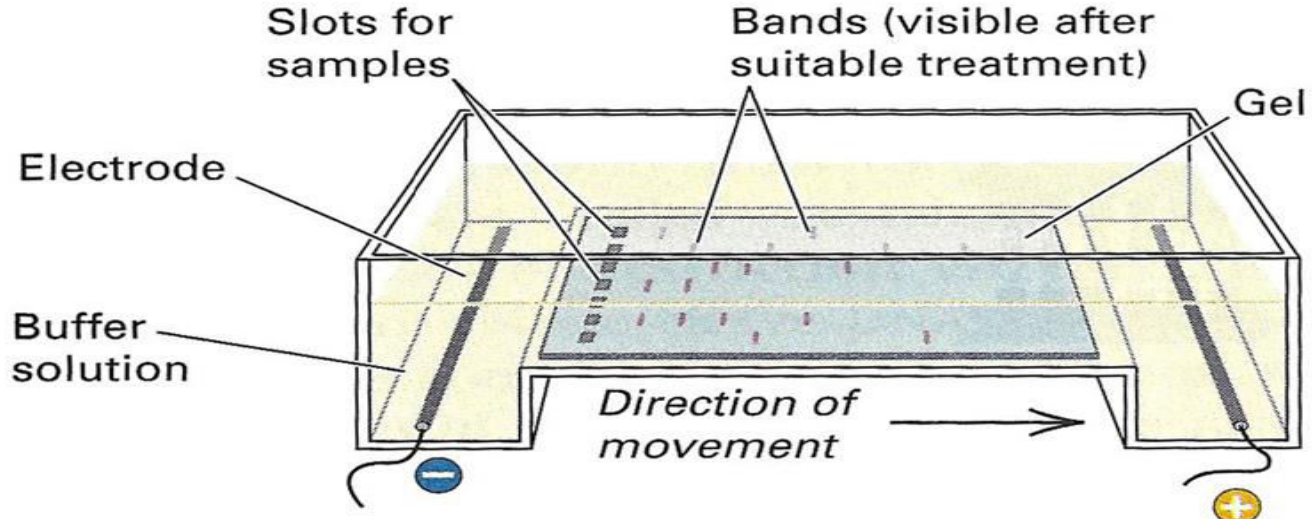


13. HAFTA

- ELEKTROFORETİK TEKNİKLER
- PLAZMİD DNA İZOLASYONU (UYGULAMA)

- **Jel elektroforezi**, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir inceleme yöntemidir.
- Yöntemin avantajı; basit ve hızlı olmasının yanında diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan nükleik asit parçacıklarının ayrılmasını sağlamasıdır.
- En çok kullanılan jel elektroforezi yöntemleri agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid. Nükleik asitler için genellikle agaroz jel, proteinler için ise poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmaktadır.
- SDS poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) hemen tüm protein tiplerinin analizinde uygulanabilmektedir.
- Elektroforetik analiz elektriksel bir alanda, ortamda çözünmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Bu göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, ortamın yoğunluğuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir. Kullanılan molekülün jel üzerindeki yerini belirlemek için ortamda UV ışığı altında floresan etki gösteren etidyum bromür (EB) veya benzeri bir ışığıcı maddenin bulunması gerekmektedir.

Agarose gel electrophoresis of DNA



PLAZMİD DNA İZOLASYONU

- Moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalarda, bakteri hücrelerinden izole edilebilen **kromozomal DNA, plazmid DNA ve faj DNA'sı** olmak üzere üç farklı DNA'dan yararlanılabilmektedir. Bu DNA örneklerinden kromozomal DNA her zaman bakteri hücrelerinde bulunurken, plazmid DNA ise ekstrakromozomal bir yapı olduğu için tüm bakteri hücrelerinde bulunmayabilir.
- Bakterilerde DNA çift zincirli ve tek bir halka şeklindedir. Kromozomal DNA olarak adlandırılan yapıda bakterinin genetik materyali bulunmaktadır. Ayrıca birçok bakteride kromozomal DNA'nın dışında genetik bilgi taşıyan plazmid DNA da bulunmaktadır. Hücre DNA'sı, kromozomal DNA, bilindiği üzere canlılık faaliyetlerini düzenlerken; plazmid DNA ise birçok farklı özelliği kodlayabilen ekstrakromozomal halkasal DNA'dır. Plazmidler, kromozomal DNA'dan bağımsız olarak kendilerini kopyalayabilirler ve bakteriler tarafından doğal olarak oluşturulabilirler. Bakteriler dışında Archaea ve bazı ökaryotik canlılarda da plazmidlere rastlanılmaktadır. Plazmidler bazı genleri kodlayabilir ve bir hücreden başka bir hücreye aktarılabilirler.
- Bazı plazmidler seks faktörü olarak adlandırılıp taşıdıkları genlerin ürünleri, bakterinin bir diğer bakteriyle gen alış verişi yapmasını ve bazı genlerin aktarılmasını sağlarken, bazı tip plazmidler de bakteriyosin adı verilen faktörleri kodlarlar ve savunma mekanizmasında rol alırlar. Plazmidler boyut olarak 1-200 kilobaz çifti (kbp) kadar nükleik asit baz dizisine sahip olup kromozomal DNA'ya nispeten küçük boyutludur.

- DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen üç aşama bulunmaktadır:
- **1) Hücrenin parçalanması.**
- **2) Denatürasyon ya da proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür hale getirlmesi**
- **3) DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer moleküllerden ayrılması.**
- **Bu deneyde ampisilin dirençlilik geni taşıyan bir plazmid izole edilecektir!**

