

**DENEY NO: 4**

## **GSTP1 (Ala114Val) TEK NÜKLEOTİD POLİMORFİZMİNİN (SNP) SAPTANMASI**

### **A) Deneyde Kullanılan Çözeltiler, Malzemeler ve Cihazlar**

#### **PCR için:**

- 1) PCR ana karışımı: PCR tamponu, MgCl<sub>2</sub>, nükleotid karışımı, Taq polimeraz enzimi.
- 2) Primerler: Çoğaltılacak gen bölgesine spesifik olacak şekilde sentezlenir.
- 3) DNA çözeltisi
- 4) Thermal Cyclers
- 5) Mikropipet
- 6) Santrifüj
- 7) PCR tüpleri

#### **Jel için:**

- 1) Elektroforez Tankı
- 2) Agaroz jel
- 3) Elektroforez tamponu (TBE)
- 4) DNA markır
- 5) Elektroforez güç kaynağı
- 6) Jel görüntüleme sistemi

### **B) Deneyin Yapılışı**

Polimeraz zincir reaksiyonu: PCR ana karışımına primerler ve DNA çözeltisi ilave edildikten sonra thermal cyclers (sıcaklık döngü) cihazı, 95°C' de 2 dakikalık ilk denatürasyonu takiben 40 PCR döngüsü erime (94°C 30 saniye), yapışma (59°C 30 saniye) ve sentez (72°C 30 saniye) olacak şekilde programlanır. Program süresinde PCR ürünlerinin uygulanacağı jel hazırlanır. Süre sonunda PCR ürünleri jele uygulanır.

- 1) Jelin hazırlanması: 40ml tampon çözeltide %1.5 olacak şekilde agaroz hesaplanarak tartılır. Tartılan miktar, bir erlen içerisinde konan 40ml TBE tamponuna ilave edilip karıştırılır. Daha sonra ısı uygulaması ile agarozun jelleşmesi sağlanır. Berrak hale gelen agaroz jeli, kalıba dökülür ve üzerine PCR ürünlerinin uygulanacağı kuyucukların oluşmasını sağlayacak olan tarak yerleştirilir. Jel donduktan sonra tanka tampon çözelti doldurulur.
- 2) Elektroforez: PCR ürünlerinin jele uygulamasının ardından tankın kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanır. 65 dakika 100V elektrik uygulandıktan sonra jel zedelenmeden dikkatlice tanktan çıkarılır.
- 3) Nükleik asit jel boyası ile PCR ürünlerinin görünür hale getirilmesi: Tanktan çıkarılan jel, 1/10000 oranında seyreltilmiş SYBR Green nükleik asit jel boyası içeren bir kaptaki düşük hızdaki çalkalayıcı yardımıyla, 30 dakika inkübe edilerek jeldeki PCR ürünlerine ait bantların UV ışığında görünür hale gelmesi sağlanır.
- 4) Jel görüntüleme: İnkübasyon süresi sonunda jel dikkatlice UV tablaya yerleştirilir ve UV ışıkta görünür hale gelen PCR ürünlerine ait bantların fotoğrafı çekilir. Daha sonra bantlar, DNA markır ile karşılaştırılarak istenen gen bölgesinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı anlaşılır.
- 5) İstenen gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra, mutasyon bölgesine özel DNA kesim enzimi ile muamele edilir.