

DENEY NO: 5

GSTP1 (Ala114Val) KESİM ÜRÜNÜNÜN İNCELENMESİ

A) Genel Bilgiler

Genetik polimorfizmlerin birçoğunun belirlenmesinde, **kesim bölgesi uzunluk polimorfizmi**; İngilizce adıyla restriction fragment length polymorphism (**RFLP**) analizi kullanılmaktadır. Bu teknikte, PCR ürünü, kesim enzimi aracılığı ile kesilir. Kesim enzimleri çift sarmal DNA'nın spesifik bir dizilimini (genellikle dört ya da altı baz çiftlik) tanır ve keser. Bu bölge, **kesim bölgesi** olarak adlandırılır. İlgilenilen DNA bölgesinin dizilimine göre kesim sonucunda kesilen veya kesilmeyen DNA ürünü ortaya çıkacaktır.

B) Deneyde Kullanılan Çözeltiler, Malzemeler ve Cihazlar:

Kesim için:

- 1) PCR ürünü
- 2) Kesim enzimi
- 3) Reaksiyon tamponu
- 4) Isıtıcı blok
- 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

C) Deneyin Yapılışı:

Reaksiyon tamponu, PCR ürünü ve Alw26I kesim enzimini içeren reaksiyon ortamı PCR tüpünde hazırlanır ve ısıtıcı bloğa konur. Isıtıcı blok, 37°C sıcaklığa ayarlanır ve 5 dakika sonunda oluşan kesim ürünleri, agaroz 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 DNA kesim 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 DNA kesim ürünlerine ait bantların fotoğrafı çekilir. Daha sonra bantlar, DNA markır ile karşılaştırılarak kullanılan örneklerin hangi genotipe sahip oldukları belirlenir.