

HAFTA VII

Plazmid üretimi ve saflaştırılması 2
Plazmid DNAsının restriksiyon endonükleaz ile kesimi
insert varlığının Agaroz Jel Elektroforezi yöntemi ile
kontrolü

Plazmid DNA: Restriksiyon Enzim Kesimi

- Restriksiyon enzimleri DNAyı belirli bölgelerden kesme yetisine sahiptir. Araştırmacılara birçok bölge dizisi tanıma imkanı sunan yüzlerde farklı restriksiyon enzimi bulunmaktadır.
- Restriksiyon enzim kesimi diagnostik amaçlı kullanılabildiği gibi moleküler klonlama tekniklerinde genellikle kullanılan bir yöntemdir. Diagnostik amaçlı kullanımı, bakteriye transforme edilen plazmidin doğruluğunu tayin etmekte büyük önem taşır ki bu tekniğe diagnostik digest denir.

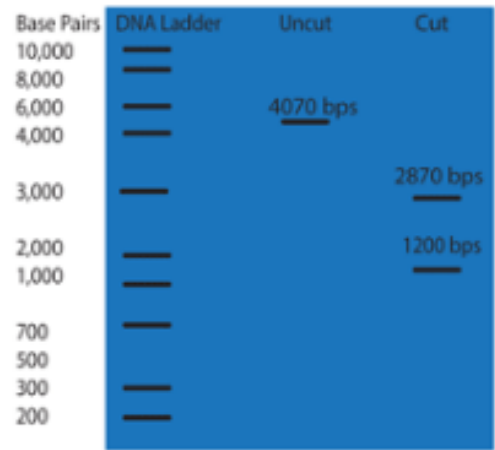
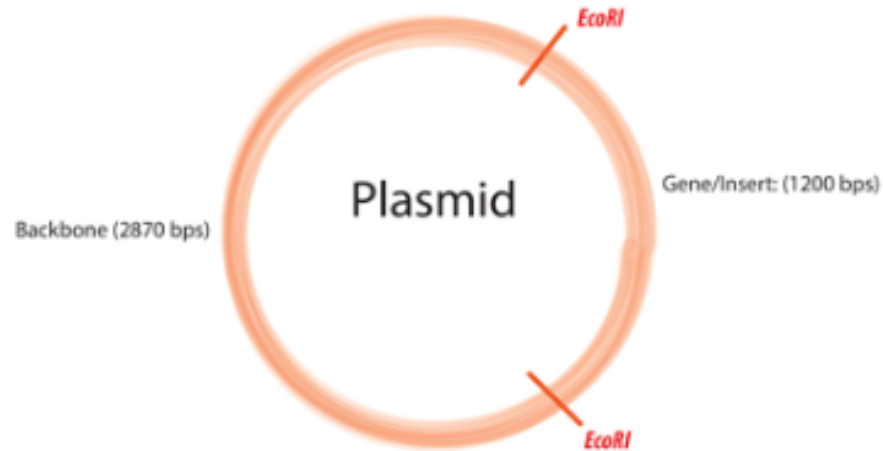
Diagnostik Restriksiyon Enzim Kesimi

- İlgili plazmidi kesebilme özelliğine sahip restriksiyon enzimi seçilir. Seçim işleminin kolaylaştırılması amacıyla internet üzerinde bulunan hazır sekans analiz platformları kullanılabilir.
- Seçilen enzime uygun reaksiyon tamponu seçilir. Aynı anda iki enzimle kesim yapılacak ise iki enzimin de en yüksek performans gösterdiği tampon seçilmelidir. Bu amaçla yine internet sitelerinde kullanıma hazır platformlar bulunmaktadır. NEB: Double digest finder tool güvenilir platformlardan birine örnek verilebilir.
- 1,5 ml tüp içerisinde enzim üretici firma protokolüne uygun olarak karışım oluşturulur:
 - DNA
 - Restriksiyon Enzimi/Enzimleri
 - Tampon
 - BSA (Eğer üretici tarafından öneriliyorsa)
 - dH₂O ile total hacim tamamlanır.
- Diagnostik kesim için genellikle 500 ng DNA, moleküler klonlama için ise 1 µg DNA yeterli olacaktır.
- Total hacim uygulamaya bağlı olarak genellikle 10-50 µl arasında değişir. Son hacim genellikle kesilecek DNA miktarına bağlı olarak hesaplanır.

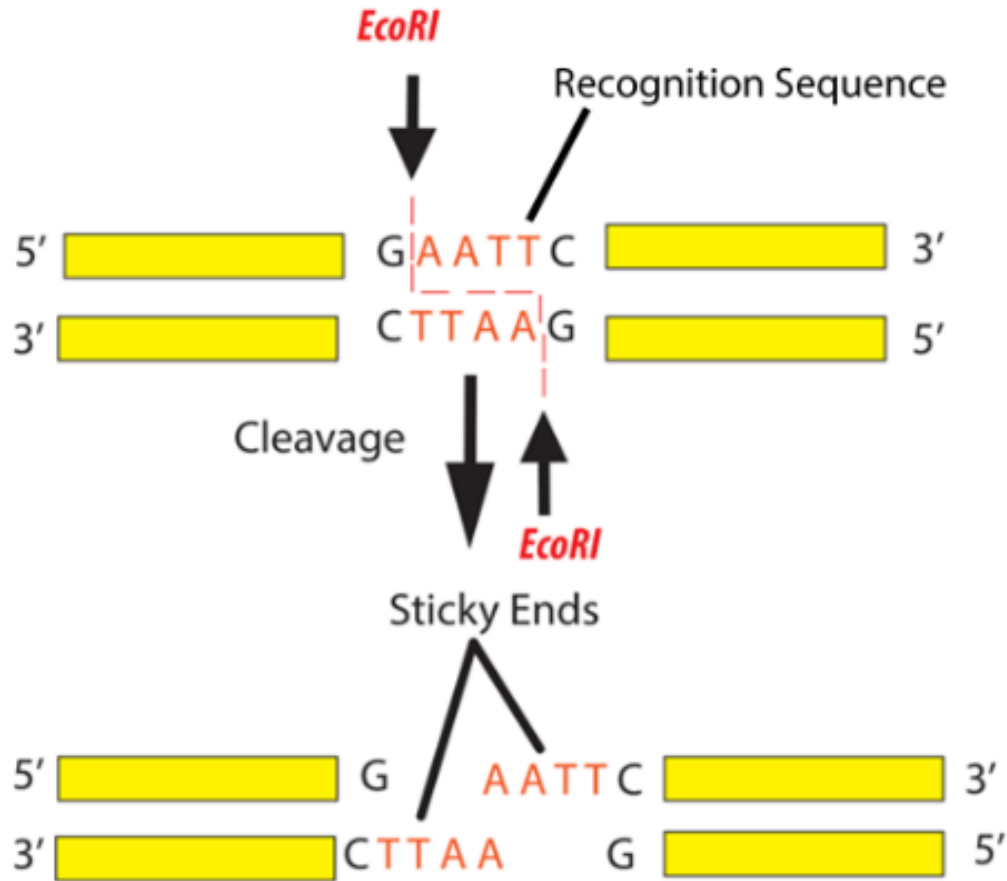
Diagnostik Restriksiyon Enzim Kesimi

- Reaktifler tüpe eklendikten sonra yavaşça karıştırılır.
- Tüp kullanılan enzim için belirtilen uygun sıcaklıkta 1 saat inkübe edilir. Bu aşamada her zaman üretici firma protokolüne uyulmalıdır.
- Uygulanan tekniğe ve kullanılan DNA miktarına bağlı olarak inkübasyon zamanı 45 dakika ile overnight arasında değişebilir. Diagnostik kesim için 1-2 saat arası genellikle yeterlidir. Klonlama amacıyla 1 µg'dan fazla DNA kesilecek ise en az 4 saat kesim tavsiye edilir.
- Kesilen DNA bir başka uygulamada kullanılacaksa enzim inaktivasyonu yapılmalıdır. Enzim inaktivasyonu, enzime bağlı olarak değişse de DNA örneğinin genellikle 70/85°C de 15 dakika inkübe edilmesi yeterlidir.
- Kesim sonucunun görüntülenebilmesi için kesim örnekleri agaroz jelde yürütülür.

Diagnostik Restriksiyon Enzim Kesimi



Diagnostik Restriksiyon Enzim Kesimi



Diagnostik Restriksiyon Enzim Kesimi

- Jel Elektroforez sonucunda enzim kesiminin başarısız olduğu tespit edilmesi halinde aşağıdaki ihtimaller gözden geçirilmelidir.
 - Enzimin metilasyon sensitif olup olmadığından emin olunmalıdır. Plasmidler Dam veya Dcm metilasyon pozitif stainlerde büyürler ve belirli restriksiyon bölgelerinden kesime dirençli olabilirler.
 - Bazen enzimler benzer ama birebir aynı olmayan bölgeleri kesebilirler. Bu durum Star Aktivitesinden kaynaklanır ve yüksek gliserol konsantrasyonu dahil birçok nedenden kaynaklanabilir. Enzimler Star aktivitesi yönünden iyi incelenmelidir.
 - Eğer diagnostik amaçlı çok sayıda plazmid kesimi yapılacaksa, DNA yı koymadan kullanılacak reaktiflerden master miks hazırlamak mantıklı olacaktır. Tüplere alikotlanan uygun miktarda DNA nın üzerine master miks porsiyonlar halinde aktarılır. Bu basamak hem zamandan tasarruf sağlayacak hem de kimyasalların eksik ya da yanlış konulmasının önüne geçilecektir.