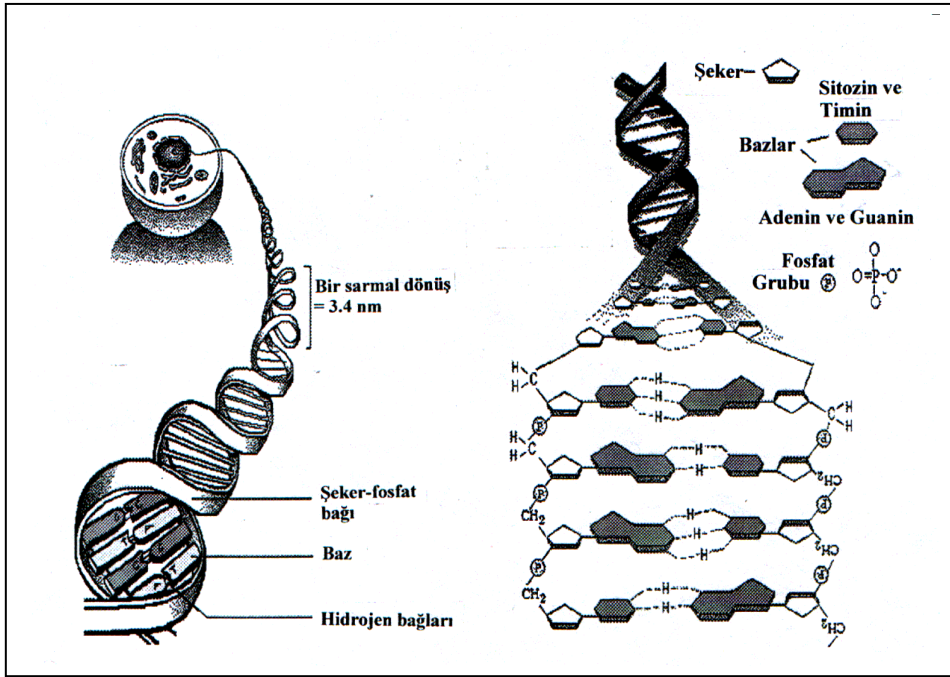


DENEY NO: 2

BİYOLOJİK MATERYALDEN DNA MOLEKÜLÜNÜN İZOLASYONU VE GÜNÜMÜZDEKİ KULLANIM ALANLARI

A) Genel Bilgi:

Canlıların tüm özellikleri, kuşaktan kuşağa “gen” adı verilen genetik maddelerle taşınmaktadır. **Genler**, kromozomların üzerinde lokalize bir ya da bir dizi nükleotidden oluşan parçacıklardır. Bir nükleik asit bazı, bir fosfat molekülü ve bir pentoz şekerin biraraya gelmesiyle oluşan yapıya **nükleotid** adı verilir. Nükleotidler ise birleşerek, DNA ve RNA adı verilen nükleik asitleri oluştururlar. Hücrelerdeki bütün biyolojik olayları (genetik, fizyolojik, biyokimyasal vb) yöneten, genetik bilgileri taşıyarak bunların nesilden nesile aktarılmasında önemli fonksiyonu bulunan molekül, deoksiribonükleik asit yani DNA molekülüdür.



DNA'nın Elde Edilebileceği Kaynaklar: Kan, doku (karaciğer, dalak vs), kemik, saç teli (kıl kökü), yanak epiteli, arkeolojik örnekler, embriyo(amniyotik sıvı), postmortem doku, idrar, mumya.

DNA'nın Kullanım Alanları:

- 1) Enzimlerdeki mevcut mutasyon ve polimorfizm saptanarak, kansere yatkınlığa yol açan mutasyonların ve kişilerin kansere duyarlılıklarının araştırılması (Asetilasyon polimorfizmi ve meme kanseri ilişkisi vb)
- 2) Populasyon genetiği alanında; otoimmün bozukluklar, yüksek tansiyon, koroner kalp yetmezliği gibi çok sayıda gene bağlı hastalıkların mekanizmalarının anlaşılması ve klinik öncesi teşhisi
- 3) Populasyon epidemiyolojisinde; kişiler arasında alkol, ilaç gibi çevresel farklılıklara karşı duyarlılık ve sebep olan genlerin bilinmesi, dağılımı
- 4) Belli hastalıkların teşhisinde (gut hastalığı vb)
- 5) Kalıtsal hastalıkların doğum öncesi tanısında (fetusta antitripsin eksikliği vb)
- 6) Genetik danışmanlıkta (hastalıkların soy ağacının takibi vb)
- 7) Adli tıp alanına giren olaylarda, babalık davalarında ya da cinayet vakalarında şüphelilerin kimliklerinin tespiti
- 8) Çeşitli mikrobiyolojik çalışmalarda (toksin, bakterilerin ve bunların alt tiplerinin, gıda, su ve yiyeceklerde bulunan mikroorganizmaların tanısında vb)

B) Deneyde Kullanılan Çözeltiler, Malzemeler ve Cihazlar

DNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün cihaz, malzeme ve çözeltiler steril olmalıdır.

Çözeltiler:

- **Çekirdek Eritici Tampon (ÇET) çözeltisi (pH: 8.2):** (Oda sıcaklığında saklanmalı) (10 mM Tris-HCl, 0.4 M NaCl, 2 mM Na₂EDTA, distile su ile 100 mL'ye tamamlanır)
- **SDS (Sodyum dodesil sülfat) çözeltisi (pH: 7.2):** (Oda sıcaklığında saklanmalı) (%10 SDS hazırlanıp distile su ile 10mL'ye tamamlanır)
- **NaCl çözeltisi:** (Oda sıcaklığında saklanmalı) (6 M NaCl hazırlanıp distile su ile 50 mL'ye tamamlanır)
- **Proteinaz K:** (-20°C'de saklanmalı)
- **İzopropanol:** (Oda sıcaklığında saklanmalı)

Malzeme ve Cihazlar:

- Mikropipet
- 15 mL'lik plastik tüpler (Falkon tüpü)
- Santrifüj
- Etüv
- Mavi ve sarı mikropipet uçları
- Vorteks

C) Deneyin Yapılışı

- 1) 100 mg karaciğer dokusu, 5 mL çekirdek eritici tampon çözeltisi ile buz banyosu içinde homojenize edilir.
- 2) Bu homojenat, 15 mL'lik kapaklı plastik tüplere alınır ve üzerine 0.5 mL SDS çözeltisi ile 0.1 mL Proteinaz K ilave edilir.
- 3) 55°C'de 1 saat etüvde inkübe edilir.
- 4) İnkübasyondan sonra, 10 dakika buz banyosunda bekletilir ve 2mL 6M NaCl çözeltisi ilave edilir.
- 5) Çözelti vorteks yardımı ile iyice karıştırılır.
- 6) Karıştırdıktan sonra 10 dakika yüksek devirde santrifüj işlemi yapılır.
- 7) Santrifüjden sonra dikkatli bir şekilde üstteki sıvı kısım (süpernatant) başka bir plastik tüpe alınır. Çökmüş olan kısmın alınmamasına dikkat edilmelidir.
- 8) Eşit hacimde izopropanol ilave edilir ve tüp hafifçe alt üst edilerek DNA'nın görünür hale gelmesi sağlanır.

PCR Tekniği

Moleküler biyoloji alanında en fazla tercih edilen tekniklerden biridir. PCR (**Polymerase chain reaction=Polimeraz zincir reaksiyonu**) tekniği, Kary Mullis tarafından tasarlanarak 1987 yılında bu ismi almıştır. PCR, spesifik bir DNA'nın primerler vasıtasıyla her iki yönlü olarak tekrarlanmasıyla *in vitro* olarak çoğaltılmasıdır. Bunun nedenleri; özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılabilmesi ve gen mühendisliğinin amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde etmek üzere gen aktarımı için kullanılmasıdır.

Mekanizması: Her bir PCR döngüsü 3 aşamadan meydana gelir. Bunlar:

- 1) İplikçiklerin birbirinden ayrılması (Denaturation)
- 2) Primerlerin yapışması (Primer annealing)
- 3) Sentez aşamalarıdır.

PCR tekniği, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotit primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Bu primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta (92-96°C) denatüre edildikten (denaturation aşaması) sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendine tamamlayıcı bölgelere hibridlenirler. Hibridlenme olayı, 37-65°C arasında yürür (primerlerin yapışması aşaması). Daha sonra, DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dNTP (deoksinükleotid trifosfat) varlığında primerin uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenir (sentez aşaması). PCR'da DNA olarak, genomik veya plazmid DNA parçası kalıp olarak kullanılır. PCR için ön işlem olarak, DNA izolasyonu yapılmalıdır.

PCR'ın Temel Bileşenleri:

- 1) DNA molekülü
- 2) DNA polimeraz enzimi
- 3) Primerler
- 4) dNTP karışımı
- 5) Reaksiyon tamponudur.

PCR Tekniđinin Avantajları

- 1) Çok küçük genomik DNA parçaları kullanılarak istenen miktarda yeni DNA oluşturulabilir.
- 2) Çok hızlı bir tekniktir. Örneđin, Southern blot tekniği ile 5-10 µg DNA kullanılarak 6-7 günde DNA analizi yapılabilirken, PCR ile 1 ng DNA, birkaç saatte çoğaltılabilir.
- 3) Spesifik DNA dizileri seçilip, istenmeyen dizilerin ortaya çıkması önenebilir.
- 4) DNA'nın saflaştırılması gerekmediğinden, harcanan zaman ve emek nükleik asitlerle yapılan çalışmalardan daha az olmakta ve hücretsiz klonlama olarak da adlandırılmaktadır (Çađlayan, 1991; Arda, 1994).

PCR Tekniđinin Dezavantajları

- 1) Taq DNA polimeraz enzimi 2×10^{-4} oranında hata payı bulundurur.
- 2) Amplifiye edilmek istenen DNA parçasının her iki ucu için de spesifik proba ve primere ihtiyaç duyulur.
- 3) Çoğaltılan DNA dizileri doğru çoğalmayıp, diziye yanlış nükleotitler katılabilir.
- 4) Primerlerin yanlış bağlanması ve genişlemesi sonucu ya da primer-dimerlerinin oluşması nedeniyle nonspesifik ürünlerin elde edilmesi, istenen ürünün elde edilmemesi veya çok az elde edilmesi görülebilir
- 5) Kontaminasyon riski vardır.
- 6) Çok ucuz bir yöntem olmadığı için, rutin analizlerde kullanılamamaktadır (Çađlayan,1991; Arda, 1994).

PCR Tekniđinin Uygulama Alanları

PCR, moleküler ve genetik alanlarında, genetik araştırmanın ilerlemesinde; moleküler biyoloji alanında, DNA sekanslarının hızla çıkarılmasında, insan gen haritalarının geliştirilmesinde, gen aktivite çalışmalarında katkı sağlamaktadır. Genetik alanında ise, iyi bilinen hastalıklarda mutasyonların doğrudan DNA dizilim analizi ile tanınmasını ve bazı genetik hastalıkların genel populasyonda taranmasını sağlamaktadır (Çađlayan, 1991, Arda, 1994, Başaran, 1996).

PCR'in başlıca kullanım alanları şunlardır:

- Gen delesyonlarının belirlenmesi
- Spesifik nokta mutasyonlarının belirlenmesi
- Enzim veya spesifik DNA sekanslarının gen haritalarının oluşturulması
- Populasyonda genetik polimorfizm gösteren enzimlerin genotip dağılımı saptanarak, kişilerin hastalıklara ve kansere duyarlılıklarının araştırılması
- Populasyon epidemiyolojisi
- Hastalıkların klinik teşhisi
- Hastalıklara neden olan genetik etkenlerin araştırılması
- Aile soy ağacının çıkarılması
- Genetik danışmanlık
- Adli tıp vakaları
- Mikrobiyolojik çalışmalar
- Temel biyolojik çalışmalar