

DNA İzolasyonu

Saflaştırılmak istenen DNA ya genomik DNA'dır ya da genomik olmayan mtDNA, chlDNA, plasmid DNAsıdır. DNA izolasyon kitleri, genomik ve genomik olmayan DNA izole etmemizi sağlayan standartlaştırılmış paketlerdir. Çeşitli amaçlar için tasarlanmış olan DNA izolasyon kitleri bulunmaktadır. Bazı tip izolasyon kitleri, agaroz jellerinden ve PCR reaksiyonu sonrası istenilen DNA'yı ayırtmamıza olanak sağlamaktadır. Bu tip izolasyon kitleri, DNA'nın bağlanmasına olanak sağlayan platformlardan oluşur (membran, kolon). DNA izolasyon kitleri deney aşamalarını kısaltmakla birlikte, daha etkili bir şekilde DNA izolasyonu yapabilmemizi sağlayan araçlardır. Büyük parçalar halinde izole edilmek istenen DNA moleküllerini dikkatli bir şekilde işlemek gerekmektedir. Büyük parçalar kırılmaya ve zarar görmeye, küçük parçalardan daha çok meyilli olduklarından dolayı. Büyük DNA parçalarını izole ederken farklı metotlar uygulamak gerekmektedir.

Alkaline-SDS Plasmid Minipreleri

Miniprep'ler bakteri kültüründen plasmid DNA'sı izole etmenizi sağlar.

Materyaller :

- 37 derecede muhafaza edilen, bir gece çoğalmaya bırakılmış 5 ml'lik bakteri kültürü.
- Steril mikfuj tüpleri
- Buz
- Solüsyon 1 (25mM Tris-HCl, PH 8.0, 50 ml glikoz çözeltisi, 10 mM EDTA) [Buzda bekletilmesi önerilir]
- Solüsyon 2 (0.2 N NaOH, %1'lik SDS çözeltisi) [Solüsyon 2'nin oda sıcaklığında ve deney öncesi taze olarak hazırlanması önerilir]
- Solüsyon 3 (5M potasyum asetat) {Buzda bekletilmesi önerilir}
 - 120 ml potasyum asetat + 23 ml asetik asit + 57 ml su)
- TE tampon solüsyonu
- %70'lik ve %100'lük etanol
- RNase A (DNase'siz) [2 mg/ml'lik parçalar halinde -20'de saklanması önerilir, hazırlamış olduğunuz RNase'i kullandıktan sonra -20 derecede saklamak koşulu ile, başka deneyleriniz için kullanabilirsiniz]

Prosedür:

1. 1.5 ml'lik bakteri kültür örneği, mikrofuj tüplerine konulur
2. 2 dakika 10000g kuvvetiyle merkezkaç kuvvetine (santrifuj) maruz bırakılır.
Çökeltinin üstünde kalan kısım (supernatant) atılır.
3. Pellet, 100 µl solüsyon 1 ile yıkandıktan sonra, 2 dakika düşük hızda vorteks yapılır.
4. Örnekleri 5 dakika oda sıcaklığında, solüsyon 1'de bekletmek, bakteri hücre zarının çözünmesi için önerilen süredir.
5. 200 µl solüsyon 2 eklendikten sonra, tüpler ters çevrilerek karıştırılır (vorteks yapmak DNA'ya zarar verebilir)
6. Tüpler 5 dakika buzda bekletilir
7. 150 µl solüsyon 3 eklendikten sonra, tüpler ters çevrilerek 20 saniye kadar karıştırılır.
8. 5 dakika buzda bekletilir
9. Tüpler, 12000g'de 5 dakikalık merkezkaç kuvvetine maruz bırakılır
10. DNA'yı içeren supernatant pipet ile alınıp, başka bir tübe aktarılır
11. 5 µl 2mg/ml'lik RNase solüsyonu supernatanta eklenir ve 37 derecede 5 dakika bekletilir.
12. 450 µl'lik fenol-kloroform çözeltisi eklendikten sonra RNase A'yı uzaklaştırmak için aşağıdaki işlemler uygulanır
13. 1 ml soğuk %100'lük etanol eklenir ve -80 derecede 20 dakika çökmesi beklenir
14. Supernatant çekilir
15. Pellet %70'lik etanol ile yıkanır ve kuruması için vakum altında 5 dakika bekletilir
16. Pellet tekrardan 25 µl'lik TE tampon çözeltisi ile çözülür

Deney sonucu, elde edilen malzemedan, 2-4 µl jel yürütülerek incelenmek için ayrılır, geri kalan malzemenin -20 derecede saklanması önerilir.

DNA Örneklerinin Fenol ile Ekstraksiyonu

Fenol ekstraksiyonu DNA ve RNA örnekleri için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemin amacı, izolasyonla beraber gelebilecek protein kontaminasyonundan kurtulmaktır. Fenol ve su birbiriyle karıştırıldığında, farklı fazlar oluştururlar. Sıvı çözeltideki DNA, fenol ile karıştırıldığında, proteinler fenol kısmına geçer ve saf DNA'yı içeren sıvı çözelti faz farkı kullanılarak ayrıştırılır.

Materyaller:

Dirençli plastik tüpler

TE ile doyurulmuş fenol:kloroform:isoamil alkol (25:24:1)

Kloroform : isoamil alkol (24:1)

Pipet ve pipet uçları

Prosedür:

1. DNA örneği ile aynı hacimde fenol-kloroform solüsyonu eklenir (1.5 ml'lik mikrofüj tüpleri için, toplam hacmin 500 µl'yi aşmaması önerilir
2. 20 saniye vorteks yapılır
3. Oda sıcaklığında, fazların ayrılması için yüksek hızla santrifüj yapılır.
4. Pipet kullanılarak, üstteki sıvı kısım, daha aşağıdaki yoğun kısma dikkat edilerek alınır ve yeni bir tüpe aktarılır.
5. Alınan kısma aynı hacimde kloroform eklenir ve 2.,3. ve 4. Adımlar tekrarlanır.
6. Hazır olan örnekler için tüpler işaretlenir

DNA'nın Etanol kullanılarak Çökeltilmesi

DNA çökeltmesi işlemi, prosedür steplerinde, örneğimizin içine karışmış olan kloroform'u ayırtmamızı ve örneğimizi yoğunlaştırmamızı sağlar.

Prosedür:

1. Maksimum 450 µl'lik DNA örneğimize, 1 /10 hacim oranında, pH 4.8'de 3 M'lık Na-asetat eklenir ve ters çevrilerek yavaşça karıştırılır.
2. Toplam hacmin iki katı %95'lik veya %100'lük etanol eklenir ve karıştırılır
3. Karıştırılan örnekler, soğuk ortamda çökeltilmeye bırakılır. [-20 °C' ta tüm gece (overnight), -70 °C' ta 30 dakika veya kuru buzda 5 dakika]
4. 4 °C' ta 12000 rpm'de 15-30 dakika sentrifüj yapılır
5. Supernatant ayrıştırılır
6. Pellet %70'lik etanol ile yıkanır
7. Örnek kurutulur

8. DNA, pH 8.0 TE tampon çözeltisi ile karıştırılır (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA). DNA'nın solüsyona karışmadığı durumlarda, TE eklenmesine devam edilir.

Nükleik Asik Konsantrasyonu ve Saflığının UV spektroskopisi ile Belirlenmesi

1. Spektrometre açılır
2. UV lambasının işlemiden 20 dakika önce ısıtılması önerilir.
3. Kullanılacak örnek su veya tampon çözeltide olan DNA veya RNA olabilir, bu tür örneklerde, DNA veya RNA nasıl bir çözelti içindeyse, kullanacağımız referans (blank) örnek, ilgili materyalin bulunduğu çözelti olmalıdır. Bir başka deyişle, analiz edilecek DNA su içindeyse, referans su olmalıdır.
4. Kuartz küvetlere (UV dalga boyunda ışık kullanılacağı için bu dalga boyunu geçirmeyen cam küvetler kullanılamaz), örnek ve referans eklenir ve spektrometreye yerleştirilir
5. Dalga boyu 260 nm'ye ayarlanır
6. Eğer spektrometrede sadece bir defalık ölçüm yapılabiliyorsa, ilk önce referans kullanılarak ölçüm yapılır ve spektrometre referans olarak ayarlanır. Sonraki adımlarda, örneklerin olduğu küvetler spektrometreye yerleştirilir
7. O.D (optical density) değerleri okunur
8. Dalga boyu 280 nm'ye ayarlanır, blank için aynı işlemler uygulanır. Değerler 280 nm'de işleme tabi tutulur
9. Aşağıdaki bilgiler göz önünde bulundurularak konsantrasyon değerleri hesaplanır.

1 A_{260} çift sarmallı DNA birimi = $50\mu\text{g}$ 'dır ($50\mu\text{g/ml}$ 260 nm 'de 1 birimlik O.D'ye sahiptir)

1 A_{260} tek zincirli DNA = $37\mu\text{g}$

1 A_{260} tek zincirli RNA = $40\mu\text{g}$

$$\text{DNA konsantrasyonu}(\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{260}) \times (\text{dilüsyon faktörü}) \times \frac{(50 \mu\text{g DNA/ml})}{1 \text{ OD}_{260} \text{ birim}}$$

10. Çökeltmeden sonra toplam ürün miktarı hesaplanır

$$\text{Miktar} = (\text{DNA konsantrasyonu } \mu\text{g/ml}) \times (\text{toplam hacim(ml)})$$

11. Örneklerin saflığı, spektrometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılmasından hesaplanır. 260/280 oranı, örneklerin saflığı ile ilgili tahmini bir karşılaştırma olanağı sunar. Saf bir şekilde çökelttiğimiz DNA örneklerinin 260/280 oranı yaklaşık 1.8'dir, RNA içi aynı oran 2.0'dır.