

## Agarose ve Akrilamid Jellerde Nükleik asitlerin Gözlenmesi

Elektroforez, Moleküler Biyoloji ve Biyokimya deneylerinde sıklıkla kullanılan, makro molekülleri ayırtmamızı ve bazı durumlarda saflaştırmamızı sağlayan bir tekniktir. Elektroforez tekniği, protein ve nükleik asitlerin, büyüklüklerindeki, yüklerindeki ve biçimlerindeki farklılıklar göz önüne alınarak oluşturulmuştur. Yüklü moleküller elektrik alanına maruz bırakıldıklarında, yüklerinin özelliklerine göre pozitif veya negatif kutuplara doğru, yer değiştirme eğilimindedirler. Proteinler, net (+) veya net (-) yüklerine sahiptirler, nükleik asitler, sahip oldukları fosfat gruplarından dolayı eksi yüklüdürler ve elektrik alanına maruz bırakıldıklarında (+)kutup'a (anod) doğru yer değiştirirler.

Protein ve nükleik asitlerin yer değiştirdiği sabit platformları matriksler veya jeller oluşturur. Yürütülmek istenen örneğin çeşidine göre bu platformlarında çeşitleri vardır. Jel hazırlandıktan sonra ve örnekler jellerin içinde bulunan özel bölmelere yerleştirildikten sonra, elektroforez çözeltisinin içine aktarılır, bu çözelti, PH değerinin sabit kalmasını ve içerdiği iyonlarla, elektrik akımının düzgün bir şekilde iletilmesini sağlar.

Jeller, agaroz veya poliakrilamid kullanılarak hazırlanabilir ve farklı amaçlar için kullanılır.

**Agaroz:** Esas itibariyle deniz yosunundan üretilmiş bir çeşit polisakkarittir. Genellikle %0.5-2' lik konsantrasyonlarda kullanılır. Kullanım amacı genelde DNA ve RNA moleküllerini ayırtmak ve moleküler ağırlıklarını tespit etmektir. Konsantrasyon oranı artırıldıkça, jel daha katı bir kıvam kazanır, kırılmaşır ve daha küçük moleküllerin ayırtılmasında kullanılabilir. Yapılan çalışmaya göre kullanılacak olan agaroz'un konsantrasyonu belirlenir. Bu jel'in hazırlanması oldukça kolaydır.

1. Agaroz tozu ile ilgili çözelti belli oranlarda karıştırılır
2. Toz ısı ile çözelti içinde eritilir
3. Jel kalıplara dökülür ve soğumaya bırakılır

Bu jel türü insanlar için toksik özellik göstermez ve ayırtma skalası geniştir. Konsantrasyonuna bağlı olarak, 200-50000 bp'lik DNA'yı ayırtmamıza olanak sağlar.

**Poliakrilamit:** Akrlamit polimerlerinden oluşur. Akrlamit polimerlerinin uzunluğu, hazırlanan konsantrasyon değerine göre değişmektedir. Genellikle %2.5-20'lik konsantrasyon oranında hazırlanır. Poliakrilamit jellerinin hazırlanması agaroz'a göre biraz daha zaman alıcı bir işlemdir çünkü serbest oksijen, polimerleşme reaksiyonunu engellemektedir. Aynı zamanda akrilamit insanlar için zararlı, toksik bir kimyasaldır, bundan dolayı deney aşamalarında dikkatli olunmalıdır. İlgili işlemler yapılırken, maske ve eldiven giyilmesi zorunludur. Poliakrilamit jelleri, agaroz'a göre daha az ayrıştırıcı özellik gösterir ancak ayrıştırma güçleri(resolving power) daha yüksektir. DNA için konuşmak gerekirse, 500 bp'den küçük DNA molekülleri poliakrilamit jeller ile ayrıştırılabilir. Bu jel türleri, sıklıkla protein ayrıştırılması ve karakterizasyonu deneylerinde kullanılır (PAGE, SDS-PAGE)

### **Ethidyum Bromide Boyanması**

EtBr, nükleik asitlerin jellerde gözlenmesini sağlayan flüoresan özellik gösteren boyama maddesidir. EtBr molekülleri DNA bazlarının arasındaki boşluklara yerleşerek, DNA moleküllerinin gözlenmesine olanak verir. Flüoresan özelliği gösteren boyalar, düşük dalga boylarını emip, yüksek dalga boylarını yayma özelliği gösterirler. EtBr 'ün maksimum UV absorpsiyonu 300-360 nm'dir. 590 nm'de emilen enerjiyi sarı/turuncu renkte ışıtır.

#### **1. Agoroz jelde nükleik asit boyanması**

Jel hazırlandıktan sonra, kalıplara dökülmeden önce 0.5-1 µg/mL EtBr, hazırlanan sıvı haldeki jele eklenir. Jel örneklerin yürütülmesinden sonra UV ışığı altında incelenir.

#### **2. Poliakrilamit jelde nükleik asit boyanması**

Seyreltilmiş EtBr ( 10 – 50 ng/ml suda veya seyreltik Na<sub>2</sub>EDTA solüsyonunda), hazırlanmış sıvı haldeki poliakrilamit çözeltisine uygulanır ve 1-2 saat bekletilir.

#### **3. Gümüş Boyanması**

Gümüş boyanması, DNA için, EtBr boyanma metodundan daha çok duyarlılığa sahiptir. Gümüş boyanması, gümüş katyonlarının, nükleik asitler tarafından katı gümüş haline indirgenmesiyle gerçekleşir. İndirgenmiş gümüş granülleri, DNA bantları etrafında birikir ve “yalancı görüntü” (latent image) oluşturur. Bu yalancı görüntünün görünebilir hale gelmesi için, jel gümüş katyonlarını ve indirgeme ajanları içeren solüsyona batırılır. DNA bantları etrafında birikmiş gümüş granülleri, sonraki

indirgenme reaksiyonunu tetikler ve mevcut gümüş katyonlarının, solüsyonda tortu halinde çökmesine neden olur. Ortaya çıkan görüntüde DNA bantları koyu kahverengi veya koyu siyah halde görülür. Gümüş katyonlarının indirgenmesi işlemi pH değerinin değiştirilmesi ile son bulur. Nükleik asitlerin gümüş katyonlarını nasıl indirgediği tam olarak bilinmemektedir.

Gümüş boyama metodunun devamında genellikle, aşağıdaki 2 metottan biri kullanılır:

- 1) **Jel emdirilmesi için diammin veya gümüş amonyak uygulanması, ve görüntü oluşumu için, formaldehit uygulanması.** Bilindiği kadarıyla, daimine alkalin metodu daha az duyarlıdır ancak kalın ve yoğun jeller için daha uygun olduğu gözlenmiştir.
- 2) Asidik metotlar ise, hızlı bir metot olmasına rağmen, ince jeller için uygundur. Gümüş boyama metodu sıklıkla proteinlerin boyanması için kullanılır. Proteinlerin boyanması için kullanılan yöntemde, gümüş nitrat jelle emdirilir ve formaldehit indirgemeci ajan olarak kullanılır.

### **Nükleik Asit Sabitlemesi:**

Sabitleme adımı, yürütülen nükleik asitlerin, jelde buldukları yerde kalmasını sağlayan ve istenmeyen kimyasalları (üre, tampon çözelti) uzaklaştırmamızı sağlayan bir adımdır.

**Gümüş emdirilmesi:** Gümüş iyonları jelle uygulanır.

**Görüntü oluşturulması:** Genel olarak, gümüş ile boyama yöntemlerinde, görüntü oluşturma aşamasında pH değerleri ile optimize edilir, bu işlem çözünmez gümüş tuzları oluşturulmasına olanak verir. Görüntü oluşturulması, düşük sıcaklıklarda (8-12°C), tiosülfat varlığında, formaldehitin indirgemeci ajan olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Sodyum Tiosülfat, serbest gümüş iyonu konsantrasyonunu düşürerek, indirgenme reaksiyonunun kinetiğini azaltır, böylelikle jel etrafındaki redoks potansiyelini artırır.

### **Metilen Mavisi Boyanması**

Metilen ve oksitleşme ürünleri (Azures A, B and C, Toluidine blue O, vb.) tiazin boyaları olarak adlandırılır. Bu boyalar toksik olmayan ve nükleik asit boyama işlemlerinde sıklıkla kullanılan boyalardır. Metilen Mavisi'nin tam olarak hangi mekanizma ile çalıştığı

bilinmemektedir. EtBr gibi DNA bazları arasına yerleştigi düşünülmemektedir, bunun yerine DNA'daki – yüklü fosfat gruplarına iyonik bağ ile bağlandığı düşünülmemektedir. Bu özelliği ile Metilen boyanması, DNA ve tek zincirli RNA boyama işlemleri için kullanılmaktadır. Metilen mavisi, EtBr ile karşılaştırıldığında daha az duyarlılığa sahiptir, bundan dolayı Metilen mavisi ile boyanan örneğin EtBr yöntemine kıyasla biraz daha fazla olması gerekmektedir (Boyama işlemi için 2-3 kat fazla DNA kullanılması önerilir)

### **Prosedür:**

#### **Agaroz Jel Hazırlanması ( 1% w/v)**

- 0.4 gr agaroz tartılır ve 40 ml 1X'lik TAE tampon çözeltisinde dökülür
- Hazırlanan karışım ısıtılır.
- Jel'in biraz soğuması beklendikten sonra (50-60 °C) ve taraklar kalıba yerleştirildikten sonra kalıba dökülür.
- Nükleik asit örnekleri, 6X yükleme tamponu ile karıştırılır (örnek: tampon çözelti, 1:5), örneklerle birlikte, nükleik asit uzunluk referans cetveli (ladder), jele yüklenir
- Hazırlanmış olan jel elektroforez tankına aktarılır, ve jeli kapatacak şekilde, 1X'lik TAE tampon çözeltisi eklenir
- 90 Voltluk bir akımla 1 saat çalıştırılır

#### **Poliakrilamid jel hazırlanması (%10 w/v)**

- Gerekli cam düzenek hazırlanır
- TBE içerisinde hazırlanmış 1X 10% (w/v) stok jel karışımından 49.5 ml ölçülür.
- %10 (w/v)'luk APS solüsyonundan 0.5 ml eklenir
- Jel solüsyonundan 5 ml alınır, 15 µL TEMED ile karıştırılır ve cam düzeneğin en alt kısmına dökülür
- Düzeneğin tabanına dökülen solüsyon katılaştıktan sonra, 45 µL TEMED geri kalan jel solüsyonuna aktarılır ve geri kalan jel solüsyonu düzeneğin içine boşaltılır
- 300 Voltta 2 saat yürütülür

## EtBr Boyanması

- Hazırlanmış olan jeller 1 µg/mL EtBr solüsyonunda 30 dakika bekletilir. Bu işlemden sonra, jeller UV ışığı altında incelenir

## Metilen Mavisi Boyanması

- Hazırlanan jeller, %0.02 (w/v) metilen mavisi solüsyonuna batırılır ve çalkalayıcıda 1 saat bekletilir.
- Boyanmış jel 0.1X'lik TAE solüsyonu ile birkaç kez yıkanır

## Gümüş Nitrat Boyanması:

Adım	Kullanılacak solüsyon	İnkübasyon zamanı
Sabitleme (iki kere)	600 mL 10%(v/v) EtOH 3 mL 98%(v/v) Asetik asit	Çalkalayıcıda 3-4 dakika
Gümüş emdirilmesi	500 mL 1%(w/v) AgNO <sub>3</sub>	Çalkalayıcıda 20 dakika
Görüntü oluşumu	300 mL 1.5%(w/v) NaOH 1.2 mL 35 %(v/v) formaldehit	Çalkalayıcıda 30 dakika

## Referanslar:

- [http://nationaldiagnostics.com/article\\_info.php/articles\\_id/71](http://nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/71)
- Promega Notes Magazine Number 45, 1994, p.13, "Staining Nucleic Acids with Silver: An Alternative to Radioisotopic and Fluorescent Labeling".
- <http://plantpath.unl.edu/llane/text/fluorescence.html>
- <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels/principles.html>
- <http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/lazo/met1.html>