

TIBBİ BİYOLOJİ LABORATUVAR KILAVUZU

PROF.DR. TUBA EDGÜNLÜ
DOÇ.DR. ESİN SAKALLI ÇETİN
DOÇ.DR. TURAN DEMİRCAN



ÇALIŞMA II: MİKROSKOBUN KULLANILMASI VE PREPERAT HAZIRLANMASI

Pratik/Laboratuvar Amaçları: Mikroskopun kısımlarının öğrenilmesi, Mikroskopun kullanılmasının öğrenilmesi, Doğrudan preparat hazırlanmasının öğrenilmesi, Mikroskopta net bir görüntü elde edilmesi, Mikroskopun temizliğinin öğrenilmesi

Araç ve gereçler: Gazete kağıdı, şişe mantarı, lam, lamel, bistüri, jilet, 2 adet gözlük bezi (biri mikroskop temizliği diğeri lam-lamel temizliği için), ıslak mendil

MİKROSKOBUN KULLANILMASI

1. En küçük büyütme objektifi (5x) döner tablayı çevirerek yuvasına getiriniz.
2. Preparatı tablaya yerleştiriniz (lamel daima üstte olmalıdır), her iki taraftan maşa ile tutturunuz.
3. Işık kaynağını açınız ve preparatı şaryo ile öne-arkaya yada sağa-sola hareket ettirerek incelenecek cismin tablanın ortasına gelen ışığın üzerine gelmesini sağlayınız.
4. Tablayı makrovida yardımı ile en yukarıya kaldırınız.
5. Gözünüz okülerde, makrovida ile yavaş yavaş tablayı görüntüyü bulana kadar aşağıya indiriniz.
6. Görüntüyü netleştirmek için mikrovida ile ince ayar yapınız.
7. Işık ayarını diyaframla yapınız
8. Görüntüyü büyötmek için objektifi sırasıyla 10X ve 40x'e getiriniz. Bu aşamalarda makrovida ile kesinlikle oynatılmamalıdır (görüntünün yeri sabit) yalnızca mikrovida ile netlik ayarı, diyaframla ışık ayarı ve şaryo ile preparat hareket ettirilebilir.

DOĞRUDAN PREPERAT HAZIRLANMASI VE İNCELENMESİ

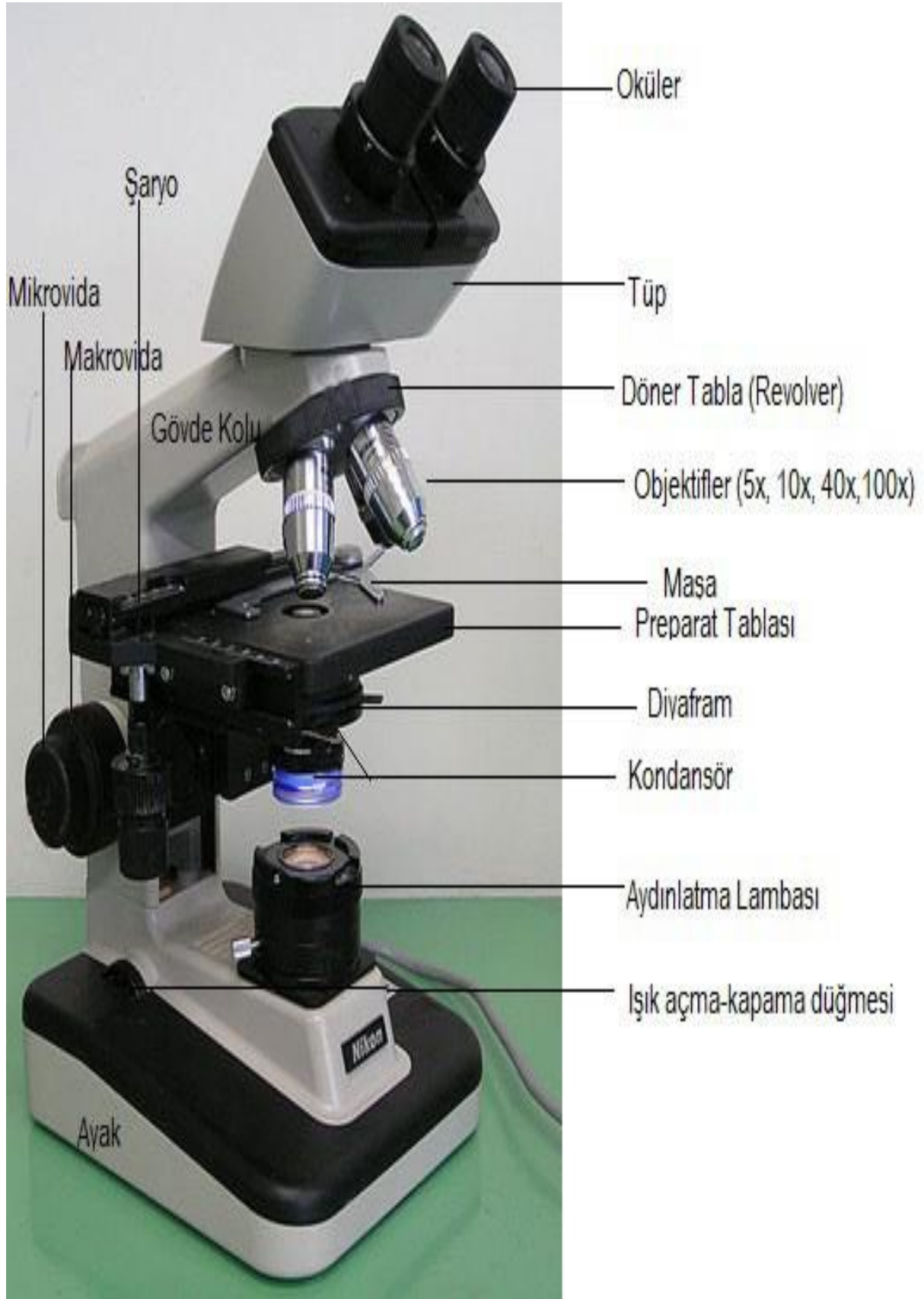
1. Lam ve lamel gözlük bezi ile temizlenir.
2. İncelenecek madde bir kesit ise, kesitin çok ince alınmasına ve lam üzerine konulduğunda katlanmamasına, bir yayma preparat ise, materyalin lamelin altında iyice yayılmış olmasına dikkat ediniz.
3. Lamı düzgün bir yüzey üzerine bırakınız, üstüne pastör pipeti ile bir damla su damlatınız.
4. İnceleyeceğiniz materyali su damlası içine bırakınız ve damla içinde yayarak düzgün bir yüzey oluşturunuz.

5. İnceleme materyali sıvı ise, damlalıkla bir damlasını lam üzerine bırakınız. Damlanın lamdan taşmamasına ve lamın altını ıslatmamasına dikkat ediniz.
6. Lamelin iki yan kenarını baş ve işaret parmaklarınızla tutarak, bir kenarı 45 derecelik açı yapacak şekilde su damlasının kenarına yerleştiriniz ve yavaş yavaş kapatınız. Suyun lamelin üstüne çıkmamasına ve lam ile lamel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat ediniz. Hava kabarcıkları kalmışsa tırnağınızın ucu ile ya da kaleminizin arkası ile lamele hafif hafif vurarak kabarcıkların dışarı çıkmasını sağlayınız.
7. Preparatı mikroskop tablasına koyunuz ve görüntü bulmaya başlayınız.

MİKROSKOPTA İNCELEME

Kesilmiş gazete harflerinden birini lam üzerine damlatılan su üzerine bırakınız. Harfî çeşitli büyütmelemlerle karşılaştırmalı olarak inceleyiniz. Farklı büyütmelemlerde, aynı harfin mikroskobun görüntü alanında ne kadar yer tuttuğuna özellikle dikkat ediniz. Şişe mantarından jilet veya bistüri ile ince bir kesit alınız. Yukarıda açıklandığı şekilde hazırladığınız preparatı çeşitli büyütmelemlerle inceleyiniz.

MİKROSKOP KISIMLARI



Şekil 1: Işık Mikroskobu Kısımları

Genel olarak mikroskop iki büyük kısma ayrılarak incelenir: optik kısım ve bu optik kısmı üzerinde taşıyan mekanik kısımlardan oluşur;

OPTİK KISIMLAR

Oküler: Mikroskobun göz ile bakılan ve tüp içine konulan yakınsak bir mercekten ibaret kısımdır. İki tanedir (binoküler mikroskop). Farklı büyütmelere sahiptir (5x, 10x, 20x).

Objektifler: Dönen bir tabla üzerine yerleştirilmiş birden fazla ve incelen obje tarafında bulunan mercek sistemidir. Büyütme gücü 5x, 10x, 40x, 100x şeklinde üzerinde yazılıdır.

$$* \text{Mikroskobun Büyütme Gücü} = \text{Oküler büyütmesi} \times \text{Objektif büyütmesi}$$

Kondansör: Tablanın altında bulunur, ışık kaynağından gelen ışığı bir noktada yoğunlaştırarak ışığı preparata yönelten mercek kısımdır.

Diyafram: Işık kaynağından gelen ışık miktarını azaltıp çoğaltır.

MEKANİK KISIMLAR

Tüp: Alt ucunda objektiflerin, üst kısmında okülerin bulunduğu mikroskobun hareketli parçasıdır.

Kol: Mikroskobun bir yerden bir yere taşınması sırasında tutulan kısımdır.

Ayak: Mikroskobun üzerine oturduğu kısımdır.

Tabla: Preparatın yerleştirildiği kısımdır.

Maşa: Preparatın tabla üzerinde tutulmasına yarayan düzenektir.

Şaryo: Tabla üzerine yerleşmiştir, tablanın yan tarafında bulunan iki vida yardımı ile preparatın tabla üzerinde sağa-sola ve öne-arkaya kolayca hareketini sağlayan düzeneklerdir.

Makrovida: Preparat tablasını aşağı yukarı hareket ettirerek incelen cisim ile objektif arasında uzaklığı ayarlar.

Mikrovida: Tablayı mikron seviyesinde aşağı yukarı hareket ettirerek görüntünün netleşmesini sağlar

ÇALIŞMA III: HAYVAN VE BİTKİ HÜCRESİNİN MİKROSKOPTA İNCELENMESİ

Pratik/Laboratuvar Amaçları: Hayvan ve bitki hücrelerinin incelenmesi

Araç ve gereçler: Soğan, Patates, , küt uçlu kürdan , lam, lamel, bistüri, jilet, 2 adet gözlük bezi (biri mikroskop temizliği diğeri lam-lamel temizliği için), Islak mendil

DİL/YANAK EPİTEL HÜCRELERİNİN İNCELENMESİ

Laboratuvarında incelenebilecek canlı hayvansal hücreye en iyi örnek dil/yanak epitel hücresidir. Küt uçlu bir kürdan ile dilden ya da yanaktan hafifçe bastırarak örnek alınır. Kürdan, lam üzerine önceden hazır edilen su içine batırılır ve karıştırılır. Lamel kapatılır ve önce küçük, sonra büyük objektiflerde incelenir. Dil hücreleri şeffaf olduğundan, incelerken diyaframı kısmen kapatmak gerekir.



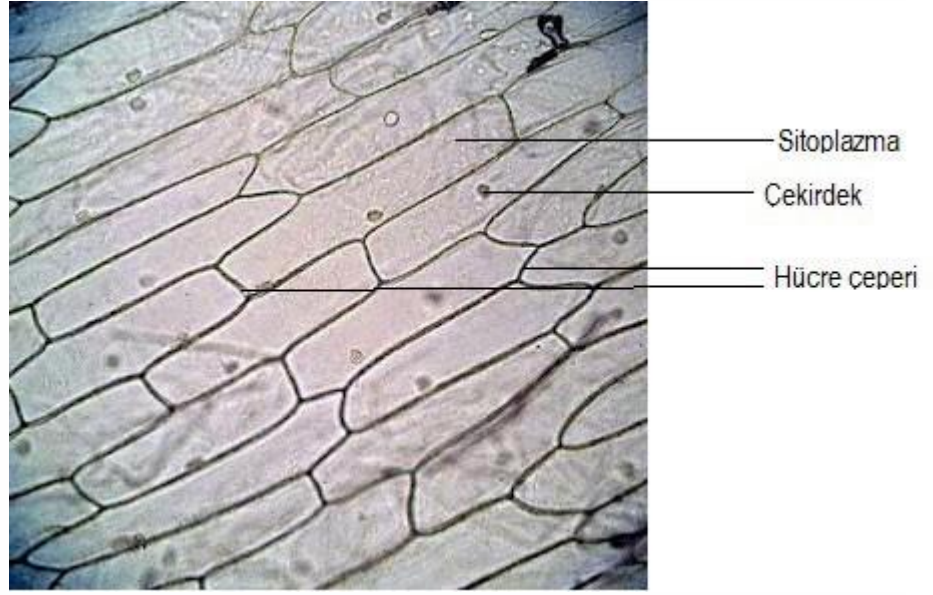
Şekil 2. Dil / Yanak Epitel Hücreleri

BİTKİSEL HÜCRELERİN İNCELENMESİ

Bitkisel hücrelerin hayvansal hücrelerden en belirgin farkı, hücre zarının üstünde ayrıca selüloz bir çeperin bulunmasıdır. Bu çeper hücreye şekil verir, desteklik sağlar ancak seçici geçirgenlik özelliği yoktur. Vakuol bu hücreler için tipiktir, sentrozom yoktur.

SOĞAN ZARI HÜCRELERİNİN İNCELENMESİ

Kuru soğanın etli kısımlarından biri alınır, dışı doğru katlanıp kırılarak, kırılan yerden ince bir zar tabakası sıyrılır. Zardan küçük bir parça kesilerek temiz bir lam üzerine konur. Zarda katlanma varsa düzeltip, üzerine bir damla su damlatıp, lamel kapatılarak mikroskopta incelenir.



Şekil 3. Soğan Zarı Hücreleri

PATATES HÜCRELERİNİN İNCELENMESİ

Patates parçalarından jilet veya bistüri ile çok ince kesit alınır. Bir damla su ile preparat hazırlanır. Kesitin en ince yeri bulunarak buradaki hücreler 40X objektifle incelenir.



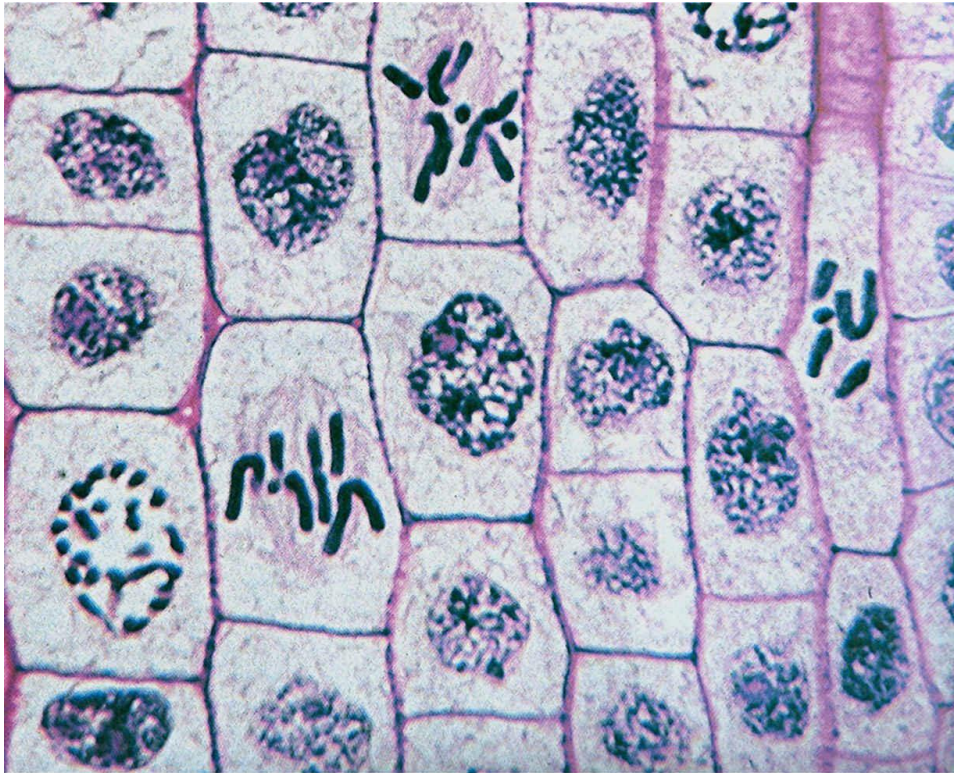
Şekil 4. Patates Yumrusu Hücreleri

ÇALIŞMA IV: MİTOZ DENEYİ

Pratik/Laboratuvar Amaçları: Soğan bitkisinin çimlendirilmiş kök uçlarında mitozun gözlenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, beher, petri kabı, asetik asit, karmen boyası, filtre, pastör pipeti, kurutma kağıdı, soğan, pens, bistüri, bünzen beki

Aseto-karmen boyası hazırlayınız. Bunun için 100 ml %50 asetik asit ve 2 gr karmen boyasını beherin içerisinde yavaş yavaş ısıtarak 30 dk kaynatınız. İyice çalkalayınız ve soğuduktan sonra filtreden geçiriniz. 4-5 gün süre ile suda çimlendirdiğiniz soğan köklerinin ucundan 5-6 mm' lik parçalar keserek petri kabında toplayınız. Üstlerini örtecek şekilde aseto-karmen boyası koyunuz. Petri kabını bir maşa yardımıyla tutarak alevde yaklaşık 5 dk ısıtınız. Isıtılmış kök uçlarını soğuduktan sonra temiz bir pens yardımıyla lamın üzerine alınız. Üzerine 1-2 damla aseto-karmen boyası damlatılıp lameli kapatınız. Lameli sıkıca bastırarak kök uçlarının lam ve lamel arasında ezilmesini sağlayınız. Görüntü alanını X4/X5 objektifte bularak, sırasıyla X10, X40 ve X100 objektiflerde inceleyiniz. Mitozun evrelerini gözleyip X100 objektifte çiziminizi yapınız.



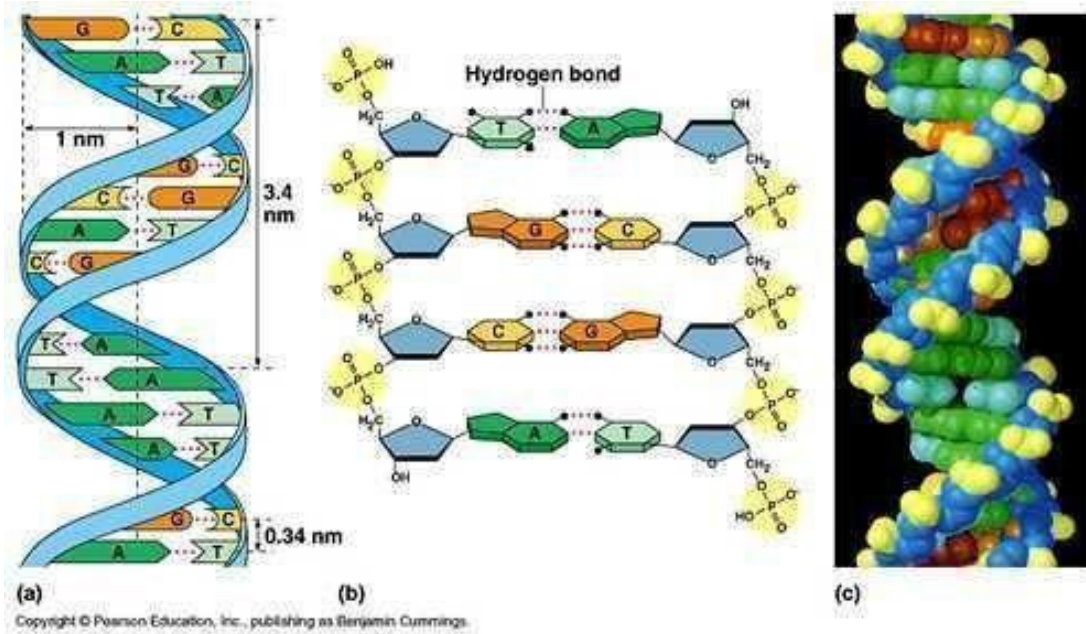
Şekil 5. Soğan kök ucu hücrelerinin mitozun farklı safhalarındaki mikroskopik görünümü

ÇALIŞMA V: DNA İZOLASYONU

DNA

Canlıların en temel özelliği, kendilerini çoğaltabilme yetenekleridir. Tüm organizmalar, kendi yapı ve işlevlerini belirleyecek genetik bilgiyi ebeveynlerinden kalıtırlar. DNA (Deoksiribonükleik asit) bazı virüsler hariç tüm organizmalarda, genetik bilgiyi taşıyan moleküldür. DNA, 5 karbonlu şeker, bir fosfat grubu ve organik bir bazın (pürin veya pirimidin) oluşturduğu nükleotidlerden meydana gelir. Şeker ve fosfat arasındaki fosfodiester bağı ile nükleotidler birbirine 5'→3' yönünde bağlanırlar. Birbirine zıt yöndeki iki iplik nükleotidlerdeki bazların karşılıklı gelerek hidrojen bağı oluşturmasıyla birbirine bağlanır. Böylece dışta şeker-fosfat omurgası, içte hidrojen bağı ile birbirine bağlanan bazlar bulunur. Bazların bağlanması özgün olup daima bir pürin bir pirimidinle eşleşir (Pürinler, Adenin (A) ve Guanin (G); Pirimidinler ise, Timin (T) ve sitozin (C) bazlarıdır) (Şekil 6).

DNA, hücre içersinde serbest halde bulunmaz. Belli bir organizasyonu vardır. DNA' nın çok büyük bir kısmı çekirdekte, bir miktarı ise mitokondri ve bitkilerde kloroplastta bulunur. DNA molekülleri çekirdekte de serbest halde bulunmazlar. Histon olan ve olmayan proteinlerle organize olmuştur.



Şekil 6: DNA'nın moleküler yapısının şematik gösterimi

Bazı kimyasal maddeler ve enzimler ile canlı hücrelere ait hücre zarı veya canlı hücre duvarının yıkılıp DNA'nın ortaya çıkarılmasına '**DNA izolasyonu**' denir. Moleküler çalışmalarda öncelikle DNA' nın saf olarak, proteinlerden arındırılmış bir şekilde, elde edilmesi esastır. Farklı izolasyon yöntemleri olsa da genellikle 3 temel basamak bulunmaktadır.

SPİN KOLON YÖNTEMİ İLE DNA İZOLASYONU

1. Steril santrifüj tüpü içerisine 20µl **Proteinaz K** ve 200 µl **EDTA**'lı tüpte saklanan periferik kan 400 µl **lysis buffer** eklenerek vortekslenir.
2. Örnekler 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır.
3. İnkübasyonu tamamlanan örneklerin üzerine 200 µl (%96-100) etanol eklenir. Güçlü bir şekilde vortekslenir.
4. Hazırlanan karışım 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş kolona aktarılır ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj edilir, toplama tüpü atılarak kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilir.
5. Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer I pipetlenir ve 8000 rpm'de 1dk santrifüj edilir. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak kolon tekrar yerleştirilir.
6. Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer II pipetlenir ve maksimum hızda 10000 rpm de 1 dk santrifüj edilir, toplama tüpü atılarak kolon 1,5 ml'lik steril saklama tüpüne yerleştirilir.
7. Kolon üzerine 1500 µl Elution Buffer pipetlendi. 2 dk oda ısısında bekletildikten sonra 10000 rpm'de 1dk santrifüj edilir,

Kolon atılır ve elde edilen DNA +4 °C'de saklanır.

1. Hücrenin parçalanması ve DNA' nın açığa çıkması
2. DNA' nın proteinlerden ayrılması ve çözünür duruma gelmesi
3. Protein, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması

Öğrenci laboratuvarlarında uygulanabilecek kısa ve kolay metotlar ile DNA' nın eldesi mümkündür. Özellikle fazla araç ve gerece gerek duyulmadan yapılan bu yöntemde muz, soğan, bezelye gibi kolayca elde edilebilecek materyallerden biri kullanılabilir. Hayvansal hücreden DNA elde edilmesi isteniyorsa materyal olarak tavuk ciğeri, dana timus bezi, et ve yumurta (tavuk veya balık) kullanılabilir.

MUZDAN DNA İZOLASYONU

Amaç: DNA'nın tuzda çöktürme yöntemiyle muzdan eldesi ve gözlenmesi

Araç ve gereçler: Beher (250 ml), beher (50 ml), mezur (100 ml), falkon tüp (15 ml), ependorf tüp, blender veya porselen havan, filtre veya gazlı bez, pastör pipeti, muz, deterjan, tuz, alkol (%96)

Yöntem:

Bir adet muz 125 ml su ile iyice eziniz ve bulamaç haline getiriniz.

50 ml beher içine;

2 çay kaşığı deterjan

1 çay kaşığı tuz

20 ml su koyunuz ve yavaşça köpürtmeden karıştırınız.

1. Deterjan karışımının üzerine 4 çay kaşığı muz bulamacı koyup 5-10 dk yavaşça, köpürtmeden karıştırınız.
2. Bu karışımı 50 ml' lik behere, filtreden ya da gazlı bezden geçirerek süzünüz.
3. Falkon tüpe soğuk 10 ml alkol (%96) koyunuz.
4. Alkolün üzerine süzdüğünüz sıvıdan 5 ml ilave ediniz.
5. 2-3 dk çalkalamadan bekleyiniz.
6. Beyaz bulut şeklinde DNA' yı gözleyiniz.
7. Ependorf tüpe yaklaşık 0.5-1 ml alkol koyunuz.
8. Falkon tüpdeki DNA' dan kürdan yardımıyla bir miktar alıp ependorf tüpdeki alkolün içine bırakınız.

Heparinli enjektöre 2ml kadar kan alınır. Daha sonra bek alevi yanında içinde 5ml besiyeri bulunan tüpe, enjektördeki kandan 5 damla ve 3 damlada fitohemaglutinin damlatılır. Tüp hafifçe sallanır ve 37 °C'lik etüvde 72 saat tutulur. Bu sürenin bitiminden son 1.5 saat önce 5 damla kolşisin damlatılır. Süre sonunda tüp 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatantı atılır. Üzerine yaklaşık 12ml hipotonik solüsyon eklenir, 13 dakika bekletilir. Tekrar tüp 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatantı atılır. Üzeri 5ml'ye fiksatifle (Metanol/ Asetik asit 3:1) tamamlanır ve tekrar 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenip süpernatantı atılır. Bu işlem çökelti beyazlaşınca kadar tekrarlanır. Çökelti lamalar üzerine yayılıp kurutulduktan sonra %5'lik Giemsa boyasıyla boyanır ve incelemeye alınır.

ÇALIŞMA VI: KARYOTİP ANALİZİ

Pratik/Laboratuvar Amaçları: Kromozomların büyüklüğü, boyutu ve sayısının tespit edilmesi



Şekil 7: Human Male G-bands

KARYOTİP ANALİZİ VE İDİOGRAM ÇİZİLMESİ

Bilindiği gibi bir insan hücresine ait ve Denver klasifikasyonuna göre, sıralanmış kromozom tablosuna karyotip denir. İnsanda karyotip 23 çift kromozomdan oluşmuştur. Bunların 22 çifti otozom ve 1 çifti de gonozomdur. Genel olarak otozomlar birbirinin homoloğu olan ikişer kromozomdan gonozomlar dışında bir çift homolog X kromozomundan, erkekte ise biri X diğeri Y olan iki heterolog kromozomdan oluşur. İnsandaki bu 46 kromozom en büyükten en küçüğe doğru dizilerek 8 grupta toplanır; bunlar A, B, C, D, E, F, G ve eşey kromozomlarıdır.

Kromozomlar sentromerlerinin durumuna göre de ayrılır.

1. Metasentrik : Sentromer ortada ve iki kol hemen hemen birbirine eşit boydadır.
2. Submetasentrik : Kol boyları birbirinden farklı olup sentromer ortada değildir.
3. Akrosentrik : Sentromer kromozomun bir ucuna, diğerinden çok daha yakındır.

Size verilen preparatları inceleyerek buradaki kromozomları gruplandırınız ve preparatta gördüğünüz herhangi bir değişiklik var ise nedenini tartışınız; her gruba ait örnek bir kromozom çizerek bir tanesinin kısımlarını isimlendiriniz.



ÇALIŞMA VI: POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU PCR (PZR)

PCR METODU UYGULAMA

DNA hücrelerde doğal olarak replikasyon ile çoğalır. PCR ile istenilen DNA dizilerinin replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde in-vitro olarak gerçekleştirilir. Yöntemin esası, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotid (primer) dizilerinin hedef DNA zincirine bağlanması (annealing), zincirin uzaması (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır (Şekil 8).

Standart bir PCR ortamını şu bileşenler oluşturur:

- **Kalıp DNA:** PCR'da genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir.
- **Enzim (Taq DNA polimeraz):** DNA polimeraz enzimleri, kalıp zincire komplementer bir DNA zinciri oluşturmak üzere, orijinal kalıp zincirdeki baz dizisini kullanarak deoksiribonükleotid trifosfatların da yardımıyla uzun polinükleotid zincirinin sentezini katalizleyen enzimlerdir. PCR'da en sık *Thermus aquaticus*'dan saflaştırılan ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz kullanılır.
- **Primerler:** Oligonükleotidler ticari olarak primer sentezi yapan laboratuvarlardan elde edilebilen, çoğaltılmak istenen hedef diziye göre tasarlanan nükleotid zincirleridir. Primerler sentezlenecek bölgenin 3' ve 5' uçlarına komplementer olacak şekilde sentezlenir.
- **Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP → dATP, dGTP, dCTP, dTTP):** Taq Polimeraz kalıp zincire komplementer zincir oluştururken PCR ortamındaki bu nükleotitleri kullanır.
- **Uygun pH ve iyon koşullarını (Mg²⁺) sağlayan PCR tamponu:** Mg²⁺ iyonları dNTP'ler ile çözülebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler, primer-kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle MgCl₂'ün PCR'ın özgülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır.

PCR ORTAMI

Distile Su.....	12 µl
10XPCR Buffer.....	5 µl
dNTP Mix (2mM).....	5 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse.....	1 µl
MgCl ₂ (25 mM).....	1-2 µl
Taq DNA Polimeraz (2-5 Unit/µl)	0.5 µl
Genomik DNA.....	3 µl

PCR ŞARTLARI

1-İlk Denatürasyon 1 Döngü

2-Denatürasyon

3-Primer bağlanması (Annealing)

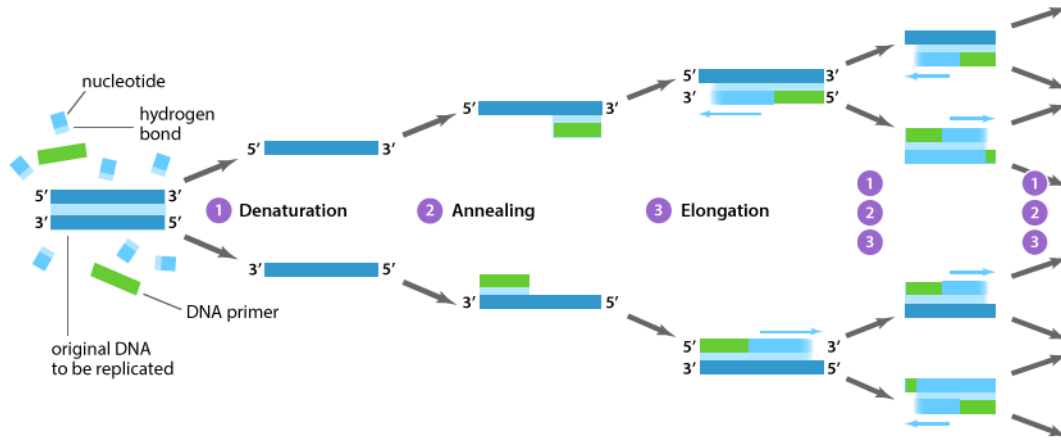
4-Primer uzaması (Extension)

5-Son Primer uzaması 1 Döngü

2,3 ve 4. Kademeler 25-35 Döngü

ÖRNEK PCR ŞARTI

96°C→	2 dakika	1 Döngü
96°C→	30 saniye	25-35 Döngü
58°C→	30 saniye	
72°C→	60 saniye	
72°C→	7 dakika	1 Döngü



Şekil 8. PCR aşamaları

3- AGAROS JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE NÜKLEİK ASİT ANALİZİ

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan, basit ve hızlı olduğu için tercih edilen yöntem agaroz jel elektroforezidir. Elektroforetik analizinin temeli, DNA' nın elektriksel bir alanda agaroz jel üzerindeki göçüne dayanır. Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*' dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agarozun, sıcak suda çözünerek soğutulduğu zaman polimerleşerek jel yapısı oluşturma özelliği vardır. Bu özelliğinden yararlanılarak bir tampon içinde, farklı konsantrasyonlarda agaroz ilave edilerek ve ısıtılarak jel hazırlanır. Soğumaya bırakılan jel polimerleşir ve böylece agarozun konsantrasyonuna göre farklı büyüklükte porlar oluşur. Ayrıca DNA' nın jelde görünür hale gelebilmesi için jel soğumaya bırakıldığında, jele etidyum bromür eklenmesi gerekir. Etidyum bromür, DNA bağları arasına girerek 300 veya 360 nm' de ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstererek DNA' yı jelde görünür hale getirme özelliğine sahiptir. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir. Etidyum bromür kanserojen bir madde olduğundan asla solunmamalıdır.

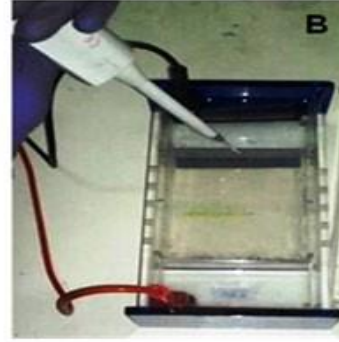
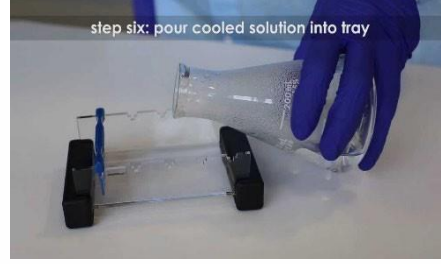
Elektroforez Yürütme Tamponu

10X TBE tamponundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE içerisine 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde ethidium bromide (EtBr) konularak hazırlanır.

% 3'lük Agaroz Jel Solüsyonu

140 ml 1X TBE tamponu içerisinde 4.2 gr agaroz (Agarose plus) mikrodalga fırında eritildikten sonra 0.5 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde EtBr eklenerek, hazırlanır.

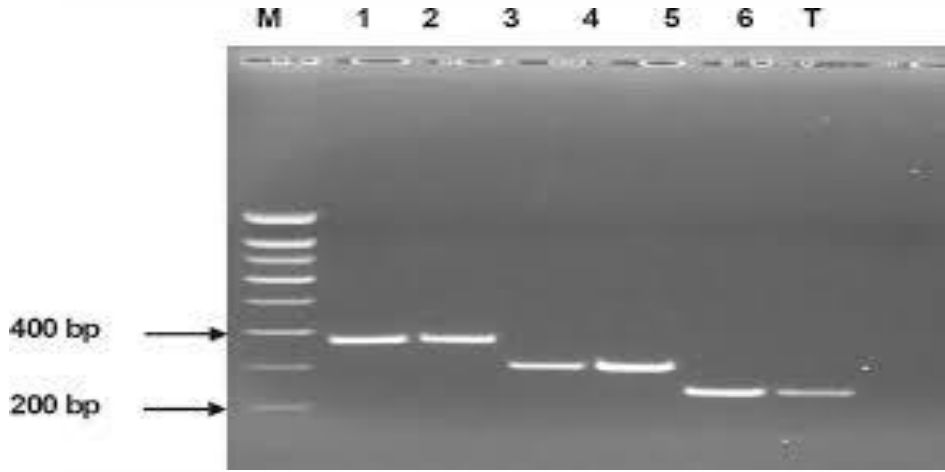
PCR-RFLP veya sadece PCR ürünleri jele yüklenerek 30-45 dakika civarında yürütülerek beklenen bantların görüntülenmesi sağlanır.



Şekil 9. Agaroz jel elektroforezi hazırlanması

4- RESTRİKSİYON PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM, RFLP)

DNA sarmalı üzerinde, özgül restriksiyon endonükleaz enzimleri (Restriction Endonuclease, RE) ile tanınan belli polimorfik bölgeler vardır. RE ile muamele edildiği zaman bu bölgeler kesilir ve farklı uzunlukta dizilerler oluşur. Bu dizilerler, RFLP olarak adlandırılır. Bu diziler, birçok hastalıkta kalıtsal marker olarak kullanılırlar. Eğer, DNA yapısında tek nükleotidlik bir değişim incelenmek isteniyorsa, o bölgeye spesifik bir RE kullanılır ve birbirinden farklı aleller tespit edilir. İnsersiyon ve delesyon sonucu oluşan polimorfizmler ise iki allele sahip oldukları için birçok enzimle tanımlanabilirler. Sonuçta elde edilen örneklerin jel görüntüleri UV transimilatör yardımıyla alınarak allel ve genotipler belirlenir.



Şekil 10. UV transimilatör ile jel görüntülenmesi