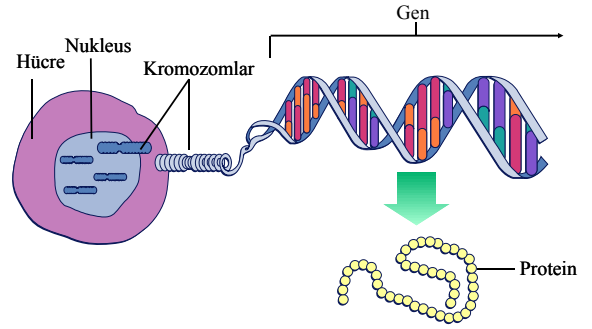


## Temel Genetik Kavramlar – DNA izolasyon yöntemleri

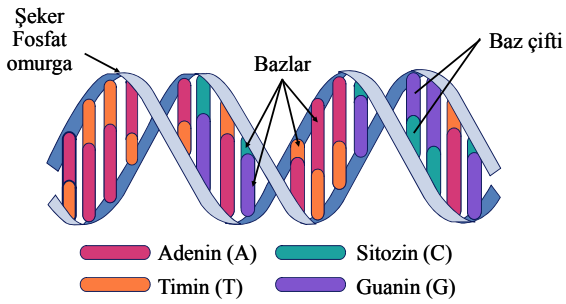
Prof.Dr.Uğur ÖZBEK



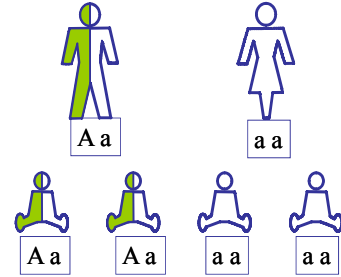
## Kromozom, DNA ve Gen



## DNA çift sarmalı



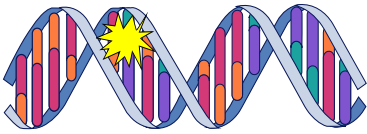
## Allel Segregasyonu



Alleller: Aynı genin farklı formlarıdır (A a)

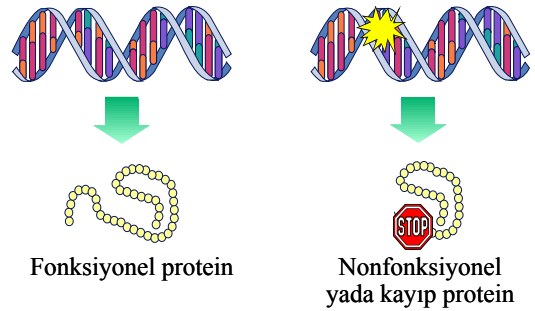
## Hastalık yapan mutasyonlar

**Mutasyon** normal baz dizisindeki değişikliklerdir



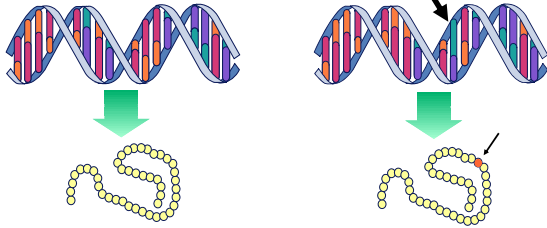
Protein fonksiyonunu değiştiren DNA dizi değişiklikleri olarak adlandırılır

## Hastalık yapan mutasyonlar protein fonksiyonunu bozar



## Polimorfizm

Protein fonksiyonunu deęiřtirmeyen  
DNA dizi deęiřiklikleridir

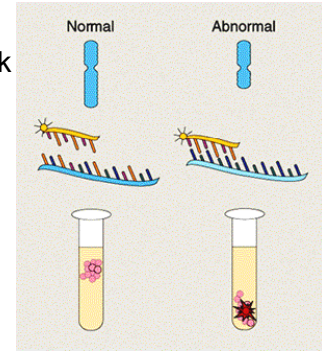


Fonksiyonel protein

Fonksiyonel protein

## Üç çeřit genetik test mevcut

- Sitogenetik
- DNA/RNA
- Metabolik



## DNA tiplendirmesi Akış şeması

- DNA İzolasyonu
  - FTA Kartı
  - Chelex
  - Kolonlu sistemler
  - Organik izolasyon.
- DNA Miktar tayini
  - Direkt
  - Direkt, blot sistemi ile
  - Real Time PCR
- PCR Amplifikasyonu
- DNA dizileme yada tiplendirme
- Analiz ve yorumlama



Figure 6.1. Flowchart for forensic DNA typing.

## DNA Metodolojisi

- Fiziksel olarak ayrılmış çalışma alanları oluşturulmalı-Sterilizasyon
  - DNA izolasyonu
  - PCR hazırlanması
  - PCR sonrası çalışmalar
  - PCR UV lambalı bir laminar flow altında gerçeşleştirilmeli

## DNA Metodolojisi

- Cihazlar
  - Pipetler- P20, P200, P1000
  - Blok ısıtıcı
  - Vorteks
  - Santrifüj
  - PCR cihazı
  - Elektroferez ve güç kaynaęı
  - Bilgisayar

## DNA İzolasyon Protokolü #1

- FTA Kartı
  - Kartın üzerine emdirme
  - Lökositler kartın üzerinde parçalanır ve DNA kağıtıda kalır.
  - DNA analizi için küçük bir parça koparılır
  - Yıkama
  - Analiz.



## FTA Protokolü

### FTA BLOOD PROTOCOL OVERVIEW



**Sample Application**  
Apply whole blood, bone marrow or buffy coat to the FTA Card. Allow to dry completely.



**TE<sup>+</sup> Rinses**  
Wash twice with TE<sup>+</sup> buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) and discard used buffer after each wash.



**Disk Removal**  
Punch a disk out of the sample on the FTA Card.



**Drying Step**  
Dry disk in PCR tube.



**FTA Purification Reagent Washes**  
Place the disk in PCR tube and wash three times with FTA Purification Reagent. Discard used reagent after each wash.



**Direct to PCR**  
Add PCR master mix directly to the disk and amplify.

## DNA İzolasyon Protokolü #2

### • Chelex

- Kan örneği %5 Chelex içinde 56°C de 30 dk inkübe edilir.
- 8 dk kaynatılır.
- Santrifüj ile inhibitörler ve hücre kalıntıları ayrılır



## DNA İzolasyon Protokolü #3

### • Kolon İzolasyonu

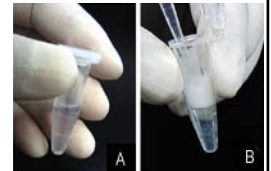
- Hücre parçalanır ve proteinler enzimle sindirilir
  - Fiziksel, ısı, deterjan
  - Proteinaz K
- DNA, silika membrana santrifüjle bağlanır
- %70 lik etanolle santrifüjle edilir.
- DNA, su yada TAE (Tris-Acetate - EDTA) ile elüe edilir



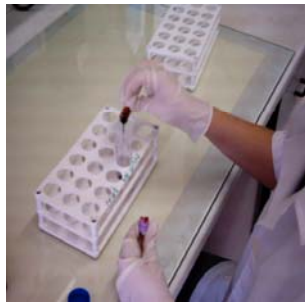
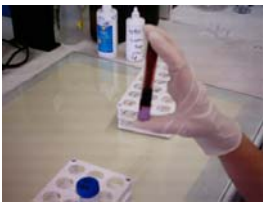
## DNA İzolasyon Protokolü #4

### • Organik İzolasyon

- Hücre parçalanır ve proteinler enzimle sindirilir
  - Fiziksel, ısı, deterjan
  - Proteinaz K
- Organik izolasyon.
  - Fenol-kloroform
- Üst faz santrifüjle uzaklaştırılır
- DNA çöktürülür.
  - Etanol yada isopropanol
- DNA peleti eldesi için santrifüjasyon.
- Su yada TE ile DNA elüe edilir



## Kan Örneği 50ml'lik Falcon Tüpe Aktarılır

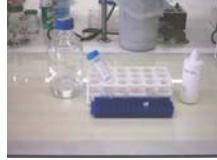


## Kan Falcona Aktarıldıktan Sonra Tüpler Peroksitle Silinmelidir.



## Lysis- Eritrosit Parçalanması

- Gelen Örnek Miktarının 3 Katı Oranında Lysis Buffer Eklenir.
- Lysis :  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $\text{KHCO}_3$  ve EDTA Kullanılarak Hazırlanır.
- +4 Derecede 20-30dk Bekletilir.
- 1500rpm de 10dk santrifüj edilir.



- Süpernatant Atılır
- Beyaz Hücreler Resüspanse Edilir
- Üzerlerine 10-20ml Lysis Eklenir.
- 1500rpm de 10dk santrifüj edilir.
- Tekrar Süpernatant Uzaklaştırılıp Hücreler Resüspanse Edilir.

56°C sıcak su banyosunda gece boyu bekletilir



## İZOLASYON ÖNCESİ

- DNA oldukça stabil bir moleküldür. Ancak nükleazlardan korunmalıdır
- DNA çalışmaları için ayrı bir oda oluşturulmalıdır (temiz oda-PCR ürünü yok)
- DNaz içermeyen tüpler, falconlar ve filtrelili pipet uçları kullanılmalıdır.
- Pipet setleri ayrılmalıdır.
- Tüm solusyonlar gerektirdiği şekilde sterilize edilmeli (otoklav ya da filtre)

## DNA ile Çalışırken...

- DNA izolasyonunda kullanılacak materyalin ya taze olması ya da sıvı nitrojende hızla dondurulduktan sonra  $-70\text{C}^\circ$  de bekletilmiş olması gerekmektedir.
- $+4\text{C}^\circ$  de 7 gün ya da  $-20\text{C}^\circ$  de 1 ay bekleyen örneklerde %10-15 ürün kaybı olduğu bildirilmiştir.
- DNA izole edilecek örneklerin EDTA içeren tüplerde toplanması gerekmektedir (PCR'ı inhibe etmeyen tek koagulant)

## SAKLAMA

- Genomik DNA  $+4\text{C}^\circ$  de saklanmalı,  $-20\text{C}^\circ$  de saklanması kırılmalara sebep olabilir.
- Plazmid DNA'sı ya da diğer küçük DNA molekülleri kısa süreli olarak  $+4\text{C}^\circ$  de saklanabilir. Uzun süre saklanacaksa aliquotlar halinde  $-20\text{C}^\circ$  de saklanmalıdır.
- Modifiye edilmiş DNA  $+4\text{C}^\circ$  de saklanmalıdır.

## MANİPÜLASYON

- Deney hazırlanırken DNA tercihan buz üzerinde tutulmalıdır.
- Etanol presipitasyonundan sonra genomik DNA'nın çok fazla kurutulmasından sakınılmalı, oda ısısında kuruması sağlanmalı.

## ÇÖZÜLME

- Tris içeren tamponlarda çözülmeli. Suda çözdürülen DNA acid hidrolizlerin hedefi olduğu için tercih edilmemeli.
- Çözülmesine yardımcı olmak amacıyla tüp hafifçe tersyüz edilebilir ya da çeperlerden küçük darbeler verilebilir.
- Alternatif olarak +4C °de bir gece beklemesi sağlanabilir.
- Genomik DNA vortekslenmemeli
- DNA 10 dakika 65C °de çözdürülerek DNAzların inhibe edilmesi sağlanabilir.

## KALİTE VE MİKTAR KONTROLÜ

- DNA miktar ve kalite kontrolü için spektrofotometrik ya da florometrik ölçüm kullanılır.
- Ölçümden önce +4C °ten çıkarılan örnek 37C °de 30 dakika ya da 60C °da 3 dakika bekletilerek, tüm DNA'nın resuspansne edilmesi sağlanmalı.
- Eğer gerekli ise cihaz 30dakika önceden açılarak lambanın ısıtılması sağlanmalıdır.
- DNA ölçümleri kuartz küvetler ile yapılmalıdır.

## SPEKTROFOTOMETRİ

- 1U  $A_{260}$  dsDNA = 50µg/ml  $dH_2O$
- 260 nm nükleik asitler ve 280nm proteinler
- $OD_{260}/OD_{280}$  örnek temizliğini gösterir (1.8 ideal oran)
  - OD <1.8 protein kontaminasyonu
  - OD >1.8 nükleik asit kontaminasyonu
  - $A_{260} \times 50$  x sulandırma katsayısı = DNA miktarı (µg/ml)

## Görüntüleme

- İncelen mutasyonun çeşidine göre görüntüler üzerinde yorum yapılır
- Her jelde mutlaka referans olarak kullanılan moleküler uzunluk standardı, pozitif kontrol ve negatif kontrol olmalıdır.
- Negatif kontrolde herhangi bir bandın olması kontaminasyonu gösterir
- Pozitif kontrolde ise mutlaka beklenen bandın bulunması gerekir.

## AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

- Agaroz agar adı verilen bir tür deniz yosunundan elde edilir.
- Agaroz granüllerini (bir şeker türü), tampon içinde ısı yardımıyla çözülerek jel tankı içinde donması sağlanır.
- Donduğunda polisakaritlerden oluşmuş gözenekli bir yapı verir.

## Solgun bantlar

- Ethidium bromid DNA'dan ayrılabilir
- Jel tekrar ethidium bromid ile boyanabilir
- PCR örneği tekrardan jele yüklenebilir
- Jel kısa sürede fotoğraflanmalı, difüzyon görüntü kalitesini bozar
- Bantlar net olmalı ve yoruma açık olmamalı

### **Non-spesifik bantlar**

- Beklenin dışında ilave bantlar görülmemeli
- PCR optimizasyonu yapılmalı ve PCR tekrarlanmalı
- Başlangıç DNA'sı temiz ve optimum miktarda olmalı
- MgCl miktarı ve birleşme ısısı değiştirilmeli

### **Kontaminasyon**

- DNA izolasyonu ve PCR esnasında olabilir
- Bütün solusyon ve malzemelerin sterilitesi gözden geçirilmeli
- Tüpten tüpe bulaşma önlenmeli
- PCR sonrası tüpler sadece elektroforez bölümünde açılmalı ve aynı odada çöpe atılmalı