

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPTİK OKUYUCULU OTOMATİK DNA
BOYU YORUMCUSU ÖN TASARIMI
ÇALIŞMALARI

Erkan MOZİOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İ.Yavuz SEZEN

GEBZE
2005

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OPTİK OKUYUCULU OTOMATİK DNA
BOYU YORUMCUSU ÖN TASARIMI
ÇALIŞMALARI

Erkan MOZİOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2005

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, jel elektroforezi ile birbirinden ayrılan moleküllerin optik bir okuyucu aracılığı ile doğrudan izlenebileceği bir aygıtın geliştirilmesiydi. Bu hedefle, floresans uyarıcı ışık kaynağı olarak parlak mavi LED' lerle görünür hale getirilmiş jel elektroforezi ile ayrılmış molekülleri kendiliğinden saptayabilen basit bir cihazın tasarımı gerçekleştirildi. Piyasadan çok rahatlıkla ve ucuza elde edilebilecek ışık yayan diyot (LED), ısı-direnç (LDR) ve özel olarak geliştirilmiş sinyal çevirici ve yine özel olarak tasarlanmış bir bilgisayar programı ile çalışır bir sistem kuruldu. Cihazın çalışabilirliği, 100bp DNA Ladder (Promega) ve θ X174 HindIII (Promega) molekül ağırlık standartlarının optik okuyucularla, dışarıdan bir müdahale yapılmaksızın algılanması ve bu verilerin bir bilgisayar ekranında çizge halinde görüntülenmesi ile gösterilmiştir.

SUMMARY

The purpose of this study was to develop an instrument that enables to follow directly the molecules separated by gel electrophoresis, by using an optical reader. To reach this aim, using a blue LED as a fluorescence activating light source, we have designed a simple device that enables to visualize the molecules separated by electrophoresis,. A system was set up by integrating an inexpensive light emitting diode (LED) and a light dependent resistor (LDR) that can be purchased easily from the market, a custom design analog digital converter and a software developed specially for this purpose. The instrument was shown to be functional by running molecular weight standards, 100bp DNA Ladder (Promega) and λ X174 HindIII (Promega), automatically reading the separated molecular bands by the optical sensor and producing graphic sketch of the obtained data on the computer screen.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar danışman olarak gösterdiği her türlü değerli bilgi ve önerilerinden dolayı Sayın Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN' e,

Araştırma konumun seçilmesi, uygulanması ve tez yazım aşamasındaki eşsiz katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Tanıl KOCAGÖZ' e,

Tez çalışmasında kullandığımız bilgisayar programının yazılımından dolayı Sayın Dr. Doruk ENGİN' e,

Çalışmamda gerekli olan teknik katkılarından dolayı Sayın Emin Ali ÖZGEDİK' e ve İlhami ASLAN' a,

Tezde sergilenmek üzere gerekli fotoğraf çekimlerinin yapılmasında makinesiyle beraber önemli katkılarından ötürü Sayın Fatih KUTLUATA' ya,

Bazı makaleleri edinmemdeki yardımlarından ötürü Sayın Ahmet Ceyhun GÖREN' e ve Gökhan BİLSEL' e,

Maddi desteklerinden ötürü KOSGEB' e,

Tez çalışmamın tamamını gerçekleştirebilmemde sağladıkları olanaklardan ve katkılarından dolayı Salubris A.Ş' nin yetkililerine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL YAKLAŞIMLAR	3
2.1.DNA Molekülleri'nin İncelenmesi	3
2.2.DNA' nın Yapısı	4
2.3.DNA Molekülleri' nin Jel Elektroforezi İle Ayrılması	6
2.3.1.Agaroz Jel Elektroforezi	8
2.3.2.Poliakrilamid Jel Elektroforezi	13
2.3.2.1.Doğal-tutmayan Dereceli Poliakrilamid Jeller	16
2.3.2.2.SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi	16
2.3.2.3.İzo-elektrik Odaklama Yöntemi	17
2.3.2.4.İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi	17
2.3.3.Atımlı-alan Jel Elektroforezi	18
2.3.4.Jel Elektroforezlerinde DNA' nın Görüntülenmesi	20
2.4.DNA Molekülleri' nin Diğer Yöntemlerle Ayrılması	21
2.4.1.Kılcal Elektroforez	21
2.4.2.Dönüşümlü-alan Kılcal Elektroforezi	22
2.5.Işık Kaynakları	23
2.6.Renkler ve Dalga Boyları	24
2.7.Diyot	24
2.8.Işıl-dirençler	26
3.ARAÇ-GEREÇLER	27
3.1.Kullanılan Plastik ve Cam Borular	27

3.2.Kullanılan Kimyasallar	27
3.3.Kullanılan Işık Kaynakları, Işıl-diyotlar ve Işıl-dirençler	28
3.4.Diğer Araçlar	29
4.YÖNTEM	30
4.1.Sinyal Çeviricinin ve Bigisayar Programının Geliştirilmesi	30
4.2.Uygun Okuyucunun Seçilmesi	31
4.3.Uygun Işık Kaynağının Seçilmesi	33
4.4.Jelin Boru İçerisine Dökülmesi ve Elektroforez	34
4.5.Optik Okuyuculu Cihazın Ön Tasarımının Yapılması	38
4.6.LED ve Okuyucuların Uygun Konumda Yerleştirilmesi	40
4.7.Bulgular	42
5.TARTIŞMA	46
6.SONUÇ	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A °	Angstrom
EtBr	Etidyum bromür
LED	Işık saçan diyot (Light Emission Diode)
LDR	Işıl-direnç (Light Dependent Resistor)
mcd	Milikandila
PZT	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TBE	Tris Borik Asit EDTA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Nükleotidin genel yapısı.	5
2.2. Agarozun molekül yapısı.	8
2.3. Agaroz jel elektroforezinin temsili çizimi.	12
2.4. Akrilamidin molekül yapısı.	13
2.5. Poliakrilamidin yapısı.	14
2.6. İki boyutlu SDS poliakrilamid jel elektroforezi.	18
2.7. Atımlı-alan jel elektroforezi.	19
4.1. Okuyucu, sinyal çevirici ve bilgisayar arasındaki bağlantı.	30
4.2. Çizge (grafik) programının ekranda sunulması.	31
4.3. Işıl-direnç, sinyal çevirici ve bilgisayar arasındaki bağlantı.	32
4.4. Işıl-diyot, sinyal çevirici ve bilgisayar arasındaki bağlantı.	32
4.5. Okuyucu ve ışık kaynağının karşılıklı yerleştirilmesi.	42
4.6. Okuyucu ve ışık kaynağının farklı açılarda yerleştirilmesi.	41
4.7. Okuyucu ve ışık kaynağının en uygun şekilde yerleştirilmesi.	43
4.8. 100bp DNA Ladder (Promega)' ın, geliştirilen cihazla alınan görüntüsü.	44
4.9. 0X174 HindIII (Promega)' ün, geliştirilen cihazla alınan görüntüsü.	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1.Farklı agaroz derişimlerinin DNA parçalarını ayırma gücü.	9
2.2.Jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltiler.	11
2.3. Farklı akrilamid derişimlerinin DNA parçalarını ayırma gücü.	14
4.1.Poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar	35

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

<u>Fotoğraf</u>	<u>Sayfa</u>
4.1.LED’ ler, ısı-diyotlar ve ısı-dirençler.	31
4.2.100bp DNA Ladder (Promega)’ ın jel dolu borudaki görüntüsü.	37
4.3.ØX174 HindIII (Promega)’ ün jel dolu borudaki görüntüsü.	37
4.4.Boruda elektroforez için geliştirilen ilk aygıt.	38
4.5.Boruda elektroforez için geliştirilen ikinci aygıt.	39
4.6.Boruda elektroforez için geliştirilen üçüncü aygıt.	39
4.7.Boruda elektroforez için geliştirilen dördüncü(son) aygıt.	40

1.GİRİŞ

Dünyada her yıl 17 milyon kişi enfeksiyon hastalıkları nedeniyle ölmekte, bunun çoğunluğu bakteriyel enfeksiyonlara bağlı sağlık harcamaları her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon hastalıklarının en kısa zamanda doğru tanı ve tedavisi önem kazanmaktadır (Hasçelik, 2004).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaların tanımlanması ve mikrop-kıranlara (antimikrobiyal) duyarlılık testleri en az iki gün almakta, bu da klinikçileri pahalı ve birçok hasta için yan etkileri olan dirim-kıran (antibiyotik) tedavilerine zorlamaktadır. Bu amaçla son yıllarda, enfeksiyon hastalıklarının tanısı ve tedaviye yol gösterici olması açısından kısa zamanda sonuç verebilen moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir. Bu testler, önceki yıllarda yavaş üreyen, kültürü zor olan veya yapılamayan mikroorganizmaların tanısında kullanılırken bugün pekçok aşamayı kendiliğinden gerçekleştirebilen cihazların geliştirilmesiyle, mikrobiyoloji tanısında çok daha yaygın kullanım alanı bulmaya başlamıştır (Hasçelik, 2004).

Moleküler testlerde kullanılan yöntemler ve sistemler, ülkeler ve deneylikler arasında değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle moleküler testlerin standartlaşması ve kalite kontrolü önem kazanmaktadır. Gerek rutin gerekse araştırma laboratuvarlarında standartlaşma, testlerin yapılması ve değerlendirilmesinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Standartları iyi oturtulmamış çalışmalarda, gereksiz test tekrarı, iş gücü ve zaman kaybı, sonuçta maddi kayıp gözlenmektedir. Moleküler deneyliklerde standartlaşma, öncelikle, çalışılan deneyliklerin koşullarından başlamaktadır. Bunu, laboratuvarında kullanılan alet, gereç, kimyasallar, donanımlar ve kullanılan yöntemler izlemektedir (Hasçelik, 2004).

Bu nedenle, standartlaşmanın temelinde, el yordamıyla gerçekleştirilen çalışmalardan ziyade cihazların kullanımına bağlı, standartları belirlenmiş ve insan müdahalesi ile değişmeyen sistemlerin kullanıma girmesi bir zorunluluk gibi görünmektedir. Jel elektroforezi, makromoleküllerin, çeşitli özelliklerine göre ayrılarak incelenmesini sağlayan önemli bir moleküler araştırma ve tanı aracıdır. Ancak tanı laboratuvarlarında günlük kullanımı oldukça zahmetlidir ve deneyim gerektirir. Bu bağlamda, bu tez çalışması ile jel elektroforez işlemini kendiliğinden

yapan, ayrıştırılan molekülleri bir çizge (grafik) halinde bilgisayara kaydedebilen, hatta uygun bir program geliştirildiğinde bunları kendiliğinden yorumlayabilecek bir aygıtın geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2.KURAMSAL YAKLAŞIMLAR

2.1.DNA Molekülleri' nin İncelenmesi

DNA moleküllerinin, büyüklüklerine göre ayrılarak incelenmesi, biyoteknoloji ve tıp alanında birçok uygulamada önemlidir: Genomların ardışıklandırılmasında (sequencing), hastalık etkenlerinin tanısında, hastalıkların tanısında kullanılan pek çok kalıtsal deneyler (Ashton ve ark., 2003) ve restriksiyon haritalamasında vs. (Szeberenyi ve ark., 2002). Nükleik asitlerin öz-yapısının belirlenebilmesinde en temel yol, onun büyüklüğünün belirlenmesidir. Bu amaçla, önce polimeraz zincirleme tepkimesi, ardından restriksiyon enzim kesimi ve nihayetinde de DNA parça analizleri yapılmaktadır. Parça analizi, DNA parçalarının elektroforezi ile gerçekleştirilmektedir (Stephenson ve ark., 2003).

Bir molekülü, diğerlerinden ayırıp saflaştırmak için molekül büyüklüğü, belli bir çözgendeki çözünürlüğü, net elektrik yükü ve bazı maddelere özgül olarak bağlanma ilgisi gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerden yararlanılır. İşte elektroforez, bu yöntemlerden -molekül büyüklüğüne dayanan saflaştırma yöntemlerinden- biridir. DNA' nın, elektroforez ile analizinin temeli, bu molekülün elektriksel alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır (Çelebi, 1989). DNA' nın elektroforezi, moleküler biyoloji alanında yürütülen hemen hemen her araştırmada gerekli bir adımdır (Magnusdottir ve ark., 1999). Burada, DNA, bir jel üzerinde (agaroz veya poliakrilamid jel) ve bir hat üzerinde, belli bir elektriksel alanda yürütülüp ayrılır ve molekül ağırlığı bilinen standartlarla kıyaslanarak onun büyüklüğü belirlenmeye çalışılır (Stephenson ve ark., 2003). Jel elektroforezinde molekülün göç hızı, molekülün büyüklüğüne, yapısına, ayırıcı ortam olarak kullanılan maddenin derişimine, iyon kuvvetine ve uygulanan akıma bağlıdır (Çelebi, 1989). Bu işlemin ardından jel boyanır ve standart DNA molekülleri ile incelenen DNA molekülleri bantlar halinde görünür hale getirilir. Standartlarla karşılaştırma sonucunda farklı mesafelerde göç etmiş DNA parçalarının molekül büyüklükleri belirlenir (Stephenson ve ark., 2003). DNA moleküllerinin elektroforezini daha iyi anlayabilmek için DNA' nın yapısından, ayırma ortamlarının ve elektriksel alanın özelliklerinden bahsetmek doğru olacaktır.

2.2.DNA' nın Yapısı

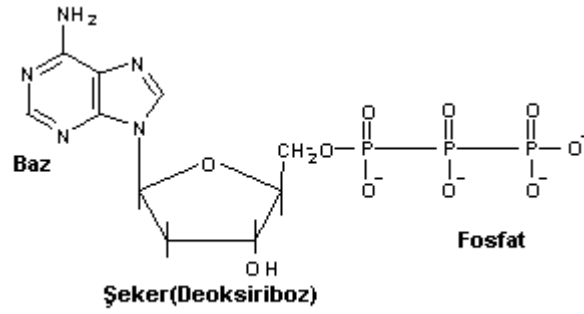
DNA, fosfodiester bağı ile bağılı şeker ve fosfat birimlerinin oluşturduğu iki ana omurga ve bu omurgayı birbirine bağlayan bazlardan oluşan moleküldür (Gözükara, 2001).

Şeker: Beşli bir furan halkası içeren ve 2 nolu karbona bağılı hidroksil(-OH) grubundaki oksijenini kaybetmiş (deoksiriboz) birimlerdir. DNA'nın yapısında bulunan şekerler, 3-OH ve 5-fosfat grupları ile tepkir. Bazlar ise, şekerlerin 1 numaralı karbon atomu gruplarına bağlanmaktadır (Gözükara, 2001).

Bazlar: DNA' nın yapısında başlıca iki tür baz yer alır: Purinler ve primidinler. Primidinler, yapılarında iki azot bulunan ve altıgen bir halkaya sahip bileşiklerdir. Purinler ise altıgen primidin halkası ve buna bağılı beşli bir imidazol halkasından oluşurlar (Gözükara, 2001).

Nükleozit: Bir purin veya primidin bazının deoksiriboz şekerinin 1.ci karbonuna bağlanması ile oluşurlar. Bunlara deoksirinükleozit de denir. Şeker molekülü ve bazlar arasındaki bu bağa β -N-glikozidik bağı adı verilir (Gözükara, 2001).

Nükleotit: Nükleozitlerin fosfat esterleri olarak tanımlanırlar. Fosfat gruplarının şeker moleküllerinin hidroksil grupları ile yaptığı ester bağları ile meydana gelirler (Gözükara, 2001).



Şekil: 2.1. Nükleotidin genel yapısı.

Nükleotit yapısında bulunan purin ve pirimidin bazları mor-ötesi (u.v) ışınlardan 260nm' dekilere kuvvetle emerler. Bu özellik, onların nicel(kantitatif) tayinlerine imkan verir (Gözükara, 2001).

Polinükleotid: Nükleotidlerin, fosfodiester bağı ile birbirlerine bağlanarak meydana getirdikleri yapılardır. Nükleik asitler (DNA ve RNA) polinükleotidlerden oluşmaktadır (Gözükara, 2001).

Şu halde, bu bilgiler ışığında DNA' nın, deoksiribonükleotitlerin, polimerleşmesi ile meydana geldiği anlaşılmaktadır. Bir nükleotitteki şekerin 5' karbonuna bağlı fosfat grubunun hidroksili ile diğer nükleotitteki şekerin 3' hidroksil grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur. Böylece bir şeker ile bir fosfatın, dönüşümlü olarak devam etmesi ve arada fosfodiester bağının bulunması ile nükleik asitlerin ana omurgası meydana gelmektedir (Gözükara, 2001).

DNA' nın ana omurgasını oluşturan gruplardan biri olan fosfat grupları, pH 7,0 civarında asidiktir ve eksi yüklüdür (Gözükara, 2001).

1953 yılında Cambridge Üniversitesi' nde çalışan Amerikalı kalıtmacı James Watson ve İngiliz fizikçi Francis Crick, röntgen ışını çalışmaları sonucunda DNA' nın üç boyutlu yapısına dair bir model önerdiler. Çift zincirden meydana gelen DNA' nın bir eksen doğrultusunda, sağ el çift sarmalı meydana getirdiğini anladılar. DNA' nın bu iki sarmalı birbirine zıt yönlü olarak devam etmektedir. Yani zincirlerden

birinin 3' ucu ve diğ erinin 5' ucu aynı tarafta bulunmaktadır. DNA' nın iki zinciri bir eksen boyunca çift sarmal meydana getirmektedir. Karşı karşıya duran bazlardan biri purin ise diğ eri mutlaka pirimidin olmalıdır. DNA yapısındaki adenin daima iki hidrojen bağı ile timine, guanin ise daima üç hidrojen bağı ile sitozine bağlanmaktadır (Gözükara, 2001).

DNA çift sarmalını başlıca iki kuvvet bir arada tutmaktadır. Bunlardan birincisi, birbirinin tamamlayıcısı olan bazlar arasındaki hidrojen bağları, ikincisi ise sarmalın içinde kalan korunmuş kısım ile sarmalın dışında kalan kısım arasındaki su-sevmez etkileşimdir. Çift sarmalın kararlı bir durumda kalmasına bu etkileşimin büyük katkısı olmaktadır. Çift sarmalın omurgasını teşkil eden kısımda bulunan fosfat grupları pH 7,0' de eksi yüklüdür ve bu nedenle de bu pH' da DNA molekülü kuvvetli asidiktir (Gözükara, 2001).

DNA ana omurgasında bulunan fosfat gruplarının pH 4,0' teki pK değerleri gayet düşüktür. Bu değ erin üstündeki herhangi bir pH' da tamamen iyonlaşır. Bu nedenle, DNA asidik özelliğ e sahip bir moleküldür. Çift sarmallı DNA molekülünde yapıyı bir arada tutan hidrojen bağları pH 4,0 ile 11,0 arasında oldukça kararlı bir yapıda bulunmaktadır. Bu pH sınırları aşıldığında çift sarmallı yapıdaki DNA molekülü daha kararsız hale gelmekte ve çift sarmallı yapıdaki baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları kopmakta ve çift sarmal açılmaktadır (Gözükara, 2001).

2.3.DNA Moleküllerinin Jel Elektroforezi İle Ayrılması

Geleneksel olarak, DNA parçaları, jel elektroforezi gibi büyüklüğ e-bağı ayırma yöntemleri ile değ erlendirilirler. Katı bir polimer ortam (örneğin agaroz veya poliakrilamid) ve durgun (statik) elektrik alanı kullanılarak uygulanan geleneksel jel elektroforezi, günümüz moleküler biyoloji ve biyokimya deneyliklerinde hazır kullanım alanlarına sahiptir (Ferris ve ark., 2004). Çalışmanın amacına göre, ayırmak isteyeceğiniz DNA büyüklüğ ü de farklı olabilmektedir. Örneğin, polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT) ürünleri ile çalışılıyorsa kullanılan DNA, genellikle 100-2000bp arasında değ işirken restriksiyon haritalamalarında kullanılan DNA, onlarca kilobaz çifti olabilmektedir. Genlerin araştırılmasında megabaz çifti düzeyinde

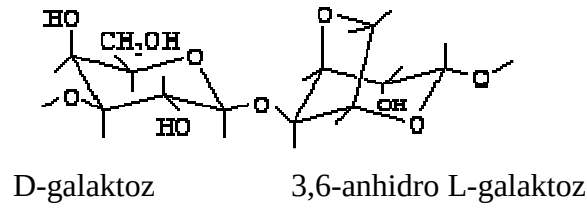
DNA' ya gereksinim duyulabilmektedir. 20kbç' den daha büyük çift zincirli DNA' lar, aynı yönde devamlı olan jel elektroforezleriyle (constant field gel electrophoresis) ayıramaz; zincirler, elektriksel alanın yönergesiyle yönelirler ve göç, DNA' nın büyüklüğünden bağımsız hale gelir. Atımlı alan jel elektroforezi (PFGE) ile ise düzenli aralıklarla elektriksel alanda yön değişimi meydana getirilerek megabaz çifti (Mbç) büyüklüğündeki DNA' ların ayırımına izin verilir. Bu denli büyük DNA moleküllerinin ayırımı çok daha küçük bir alanda ve fakat uzun bir zaman diliminde (Mbç DNA için birkaç günde) gerçekleşebilmektedir (Magnusdottir ve ark., 1999; McDonnell ve ark., 1977; Lumpkin ve ark., 1985; Slater ve ark., 1985; Slater ve ark., 1986; Duke ve ark., 1992; Duke ve ark., 1994; Semenov ve ark., 1995).

Jel elektroforezinde kullanılan destekleyici madde, mekanik etkiyi engellemek ve molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılır. Bu ayırma ortamı, nişasta, poliakrilamid, agaroz veya agaroz-akrilamid karışımı olabilir. Poliakrilamid jeller, genellikle, küçük DNA parçaları (5-500 baz çifti) ve RNA moleküllerinin ayırımında kullanılır. Bu tür jeller, ayırım güçleri çok fazla olduğundan, boyut bakımından birbirine çok yakın DNA parçalarının analizleri için daha uygundur (Temizkan ve ark., 1999). Agaroz jeller, poliakrilamidlere nazaran daha düşük bir ayırma gücüne sahip olmasına karşın farklı derişimlerde hazırlanan jeller sayesinde farklı büyüklükteki DNA parçalarını ayırmada (200-50.000bç) kullanılabilmektedir. Ayrıca, aynı yönde uygulanan devamlı bir elektrik alanında, poliakrilamid jeller dikey konumda, agaroz jeller ise genellikle yatay konumda kullanılmaktadır. 20kb' dan daha büyük DNA' lar, atımlı-alan jel elektroforezi (pulsed-field gel electrophoresis) yoluyla ayrılabilirler. Bu tarz elektroforezde, elektrik akımı, düzenli olarak değiştirilir (Sambrook, 1989).

Bu aşamada, bu tür jel elektroforezlerinden kısaca söz edilecektir.

2.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, temel yapısı Şekil 2.2.' de verildiği gibi, doğrusal bir polisakkarittir ve deniz yosunu özütüdür. Agaroz, sıcak suda çözünür ve soğuma sırasında hidrojen bağları ile polimerleşme olur ve jel meydana gelir. Bu oluşum geri dönüşümlüdür (Sambrook ve ark., 1989). Dolayısıyla bu özelliğinden yararlanılarak kalıplara da dökülebilir. Jel, kalıba dökülür ve jelin donmasının ardından önceden yerleştirilmiş ve kuyucuk açılmasına yarayan taraklar çıkartılarak tankın içi jelin yüzeyini kaplayacak ölçüde tampon çözelti ile kaplanır. DNA örneği, uygun bir yükleme tamponu ile karıştırılır ve agarozda açılan kuyucuklara yüklenir. Karşılaştırma yapılması bakımından bir de ağırlıkları bilinen standart moleküller yüklenir. Elektrik kabloları bağlanarak gerilim uygulanır ve yüklemede kullanılan boyanın en uç noktaya ulaşmasına kadar bunun uygulanmasına devam edilir(<http://a32.lehman.cuny.edu>).



Şekil: 2.2. Agarozun molekül yapısı (Temizkan ve ark., 1999).

Ticari ürün olarak agaroz, diğer polisakkaritler, tuzlar, ve proteinlerle karışıktır, yani tümüyle saf değildir. Bu karışıklığın oranı, üreticiden üreticiye, üretimden üretime değişebilmektedir. Bu farklılıklar, hem DNA' nın göçünü hem de DNA' nın geri kazanılmasındaki enzim etkinliklerini etkileyebilir. Ancak bazı üreticiler, bu sayılan olumsuzlukları engelleyecek daha saf agarozları piyasaya sürmektedirler. Bazıları ise, kimyasal yapısı değiştirilmiş agarozlar geliştirmiştir ki bunlar düşük sıcaklıklarda eriyebilirler ve 10-500bp' lik çok küçük DNA parçalarının analizinde kullanılabilirler.

Agaroz jellerde, polimerleşme sırasında moleküller arasında meydana gelen gözeneklerin çapı, agaroz derişimi ile ilgilidir. Öyleki, küçük DNA parçaları için

yüksek, büyük DNA parçaları için düşük agaroz derişimi kullanılarak DNA' nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanır. Agaroz derişimi ile bu jellerin DNA parçalarını ayırma gücü arasındaki ilişkiyi gösteren bilgi Çizelge 2.1' de verilmiştir.

Çizelge 2.1.Farklı agaroz derişimlerinin DNA parçalarını ayırma gücü (Sambrook ve ark., 1989).

Agaroz Derişimi (% ağırlık/ hacim)	Doğrusal DNA Molekülü (kilobaz)
0,3	5,0-60,0
0,6	1,0-20,0
0,7	0,8-10,0
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

DNA' nın jelde görünür hale gelebilmesinde genellikle, etidyum bromür (EtBr) kullanılır. Bu boya, DNA çift zinciri arasına girerek 300-360 nm dalga boyundaki ışığı soğurup florasan etki göstermesiyle olur. Bu etki DNA derişimine bağılı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir. EtBr derişimi, genellikle, 0,1-0,5µg/ ml oranında kullanılmaktadır (Sambrook ve ark., 1989).

DNA' nın agaroz jellerdeki göçünü etkileyen birçok farklı unsur vardır:

- Uygulanan gerilim. Düşük gerilimli elektrik akımında, doğrusal DNA parçalarının göç oranı, uygulanan gerilim ile uyumludur. Bununla beraber, elektrik alanının gücü arttırıldığında, yüksek molekül ağırlığına sahip DNA parçalarının göçü, farklı oranlarda artar. Agaroz jellerdeki ayırımın etkili olması, gerilimin arttırılmasıyla düşer. 2 kilobazdan daha büyük DNA parçalarının en yüksek çözünürlükte ayrılmasını sağlamak için agaroz jeller, 5V/ cm' den daha düşük bir gerilimde yürütülmelidir (Sambrook ve ark., 1989).

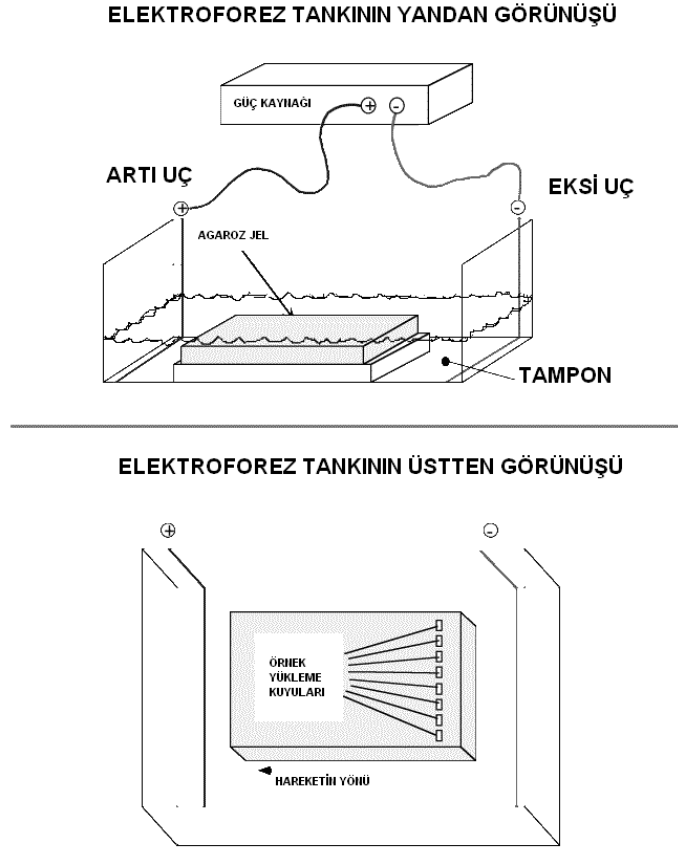
- Elektrik alanının yönü. 50-100kb' dan daha büyük DNA molekülleri, devamlı bir elektrik alanında, agaroz jeller üzerinde göç edebilirler. Eğer elektrik alanının yönü değiştirilecek olursa, DNA moleküllerinin yönü de değiştirilir. Çok büyük DNA moleküllerinin, yeni elektrik alanına uyum sağlaması daha uzun süreceğinden bunların ayırımında atımlı-alan jel elektroforezi kullanılır (Sambrook ve ark., 1989).
- Bileşenler ve sıcaklık. Poliakrilamid jellerin aksine (Allet ve ark., 1973) agaroz jellerde, DNA' nın elektroforezlik davranışı hem DNA' nın baz bileşenlerinden (Thomas ve ark., 1975) hem de DNA' nın yürütüldüğü jelin sıcaklığından önemli ölçüde etkilenmez. Yani, agaroz jellerde, farklı boylardaki DNA parçalarının elektroforezdeki göçü, görece, 4°C-30°C arasında değişmez. Genelde, agaroz jeller, oda ısısında yürütülür. Bununla beraber, %5' ten daha az agaroz içeren jeller ve düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jeller daha dayanıksızdır ve bu nedenle daha dayanıklı oldukları 4°C' ta yürütülmeleri önerilir (Sambrook ve ark., 1989).
- Araya giren boyaların varlığı. Örneğin etidyum bromür, DNA' nın baz çiftleri arasına girerek DNA molekülünü daha yoğun hale getirir ve onun jeldeki göçünü yaklaşık %15 oranında azaltır (Sambrook ve ark., 1989).
- Elektroforezde kullanılan tamponların bileşenleri. DNA' nın elektroforezlik göçü, kullanılan tamponun iyon gücünden ve bileşiminden etkilenir. Tamponun iyon gücü ne kadar düşerse elektriksel iletim o oranda azalır ve DNA çok yavaş ilerler. Aksine, yüksek iyon gücünde, elektriksel hareket çok etkili hale gelir ve önemli oranda ısı açığa çıkar. Bu da jelin erimesi veya DNA' nın doğal yapısının bozulmasına (denatürasyon) neden olur. Elektroforezde kullanılan birkaç çeşit tampon vardır: EDTA ile Tris-asetat (TAE), Tris-borat (TBE) veya Tris-fosfattır. Bunlardan TBE, diğer ikisine göre daha yüksek tamponlama yeteneğindedir. Doğal yapısı bozulmuş, tek zincirli DNA' ların elektroforezinde en yaygın olarak kullanılan tampon 50mM NaOH, 1mM EDTA' dır (Sambrook ve ark., 1989). Bu tamponların bileşenlerini gösterir özet bilgi Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Çizelge 2.2..Jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltiler (Sambrook ve ark., 1989).

Tampon	Çalışma Çözeltisi	Derişik Çözelti(litre başına)
Tris-asetat (TAE)	1 birim= 0,04 M Tris-asetat; 0,001 M EDTA	50 birim= 242g Tris-base 57,1 ml glasiyal asetik asit 100 ml 0,5M EDTA(pH=8,0)
Tris-fosfat	1 birim= 0,09 M Tris-fosfat; 0,002 M EDTA	10 birim= 108g Tris-base 15,5ml %85' lik fosforik asit 40ml 0,5M EDTA (pH=8,0)
Tris-borat (TBE)	0,5 birim= 0,045MTris-borat; 0,001 EDTA	5 birim= 54g Tris-base 27,5g borik asit 20ml 0,5M EDTA (pH=8,0)
Bazik Tampon	1 birim= 50mN NaOH 1mM EDTA	1 birim= 5ml 10N NaOH 2ml 0,5M EDTA (pH=8,0)

- Jele yüklenen DNA miktarı önemlidir. Fazla miktarda DNA yüklenmesi sonucunda yanlış değerlendirmelere neden olunmaktadır. Örneğin, fazla DNA yüklenirse keskin bant yerine yaygın bir görünüm meydana gelmektedir (Sambrook ve ark., 1989).

Agaroz jel elektroforezinin boyut ve model itibariyle pek çok türü vardır. En yaygın kullanılanı, Walter Schaffner tarafından geliştirilen yatay kalıp (slab) jellerdir (Sambrook ve ark., 1989). Bu tür jellerle yapılan elektroforezin temel çalışma ilkesini gösterir bilgi Şekil 2.3.' te verilmiştir.



Şekil 2.3. Agaroz jel elektroforezinin temsili çizimi.

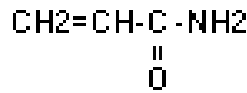
Örneklerin jele yüklenmesi amacıyla, jel henüz polimerleşmeden, yerleştirilen taraklar yardımıyla kuyular açılmaktadır. Taraklarda bulunan birden çok uç, o kadar çok kuyunun oluşmasına ve bir o kadar da örneğin yüklenebilmesine olanak vermektedir (Sambrook ve ark., 1989).

Küçük miktarlardaki DNA' ların çok daha hızlı bir şekilde analizinin yapılabilmesine imkan veren minik-jeller de bulunmaktadır. Bu tür jeller ile, normale göre çok daha az DNA, jel ve malzeme (tampon vs.) kullanılmaktadır. Bütün bu sayılanlar sayesinde ve daha hızlı sonuç alınabiliyor olması bakımından hem zamandan ve hem de paradan artırım sağlanabilmektedir. Bunlar, ancak 3kb' dan küçük DNA' ların ayrımı için uygundur. Daha büyük DNA parçalarının, yüksek gerilim ve jelin kısalığı nedeniyle çözünürlükleri daha zayıftır (Sambrook ve ark., 1989).

Tek zincirli DNA' ların incelenmesinde kullanılan bazik agaroz jeller de bulunmaktadır. Bunlar, daha özel amaçlar için kullanılmaktadır. Bu tür jellerde, ortamın bazik hale gelmesini sağlayan NaOH, polisakkaritlerin yıkımına neden olacağından agaroz, önce, yüksüz (nötral), tamponlanmış çözeltide (genellikle suda) çözülür. NaOH, daha sonra eklenir. NaOH, çift zincirli DNA' nın açılmasına neden olur; kullanım amaçları da budur. Bazik jeller, birim gerilim (voltaj) uygulandığında yüksüz (nötral) jellere göre daha fazla akım iletirler ve çalışma sırasında ısınırlar. Bu amaçla, diğerinin aksine, bazik agaroz jellerde, çalışmalar, daha düşük gerilimde (0,25V/cm) gerçekleştirilmektedir (Sambrook ve ark., 1989).

2.3.2.Poliakrilamid Jel Elektroforezi

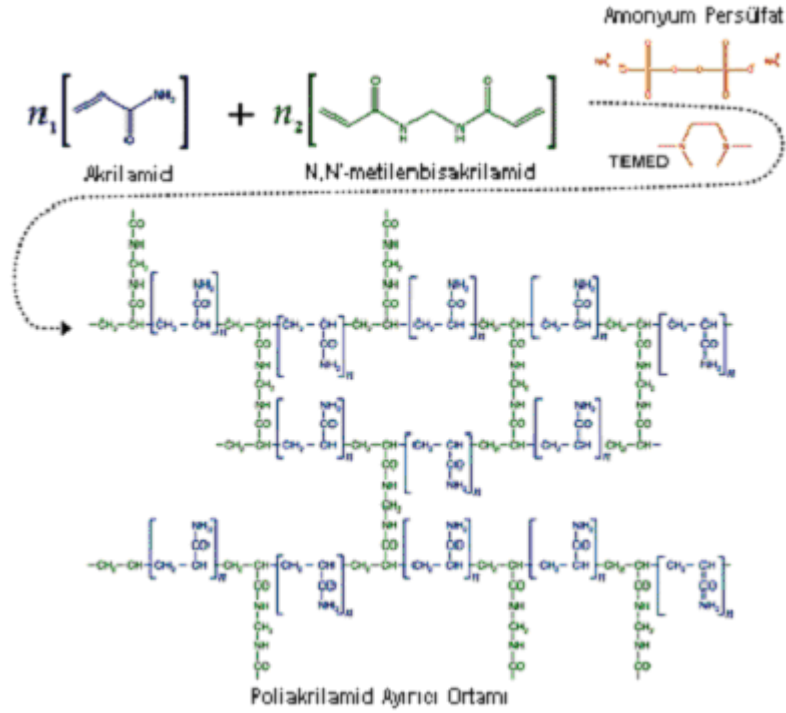
Akrilamid' in molekül yapısı, Şekil 2.4.' te verildiği gibidir.



Şekil 2.4. Akrilamidin molekül yapısı.

Akrilamidler polimerleşerek uzun zincirler oluşturma özelliğine sahiptir. N,N'-metilen bisakrilamid de polimerleşmede görev alır. Bu kimyasal, jelin çapraz bağlarının oluşmasına ve böylelikle jelde zincirlerin uzunluğuna ve çapraz bağlanma derecesine bağlı olarak gelişen gözenekliliğin ortaya çıkmasına yardım eder. Amonyum per sülfat ve TEMED (N',N',N',N'-tetrametiletilediamin) katalizör olarak çalışır. Bunların varlığında, akrilamid birimlerinin zincirleme tepkimesi ile polimerleşme meydana gelir. TEMED, amonyum per sülfattan serbest köklerin (radikallerin) oluşumunu katalizler. Bu serbest kökler (radikaller) sayesinde de akrilamid ve bisakrilamidlerin polimerleşmesi başlar. TEMED, uygun pH olmaksızın iş göremeyeceğinden polimerleşme düşük pH' da gerçekleşmez. Zincirlerin uzunluğu, akrilamid derişimi ile belirlenir. Her 29 akrilamidte bir çapraz bağlanmayı sağlayan ara molekül devreye girer (Sambrook ve ark., 1989). Jelde oluşan gözeneklerin boyutları, kullanılan akrilamid miktarı ile ters ilişkilidir. Örneğin: %7' lik poliakrilamid jeli %12' lik poliakrilamid jellere göre daha büyük

gözenekler oluştururlar. Düşük derişimli akrilamid içeren jeller, büyük moleküllerinin ayımında; yüksek derişimli olanlar ise küçük moleküllerinin ayımında kullanılır (<http://piercenet.com>).



Şekil 2.5.Poliakrilamidin yapısı (<http://nationaldiagnostics.com>).

Farklı akrilamid derişimleri ile hazırlanan poliakrilamid jellerin DNA' yı ayırma oranlarını gösterir bilgi Çizelge 2.3.' te verilmiştir.

Çizelge 2.3.Farklı akrilamid derişimlerinin DNA parçalarını ayırma gücü (Sambrook ve ark., 1989).

Akrilamid(%Ağırlık/hacim)	Ayrılabilen baz çifti oranı
3,5	1000-2000
5,0	80-500
8,0	60-400
12,0	40-200
15,0	25-150
20,0	6-100

Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve yürütülmesi, agaroz jellere göre daha zahmetlidir. Onlar, iki cam arasına dökülür. Bunun için, iki cam arasına, boşluk sağlayacak araçlar yerleştirilir. Böylesi bir düzenlemeyle, akrilamid çözeltisinin büyük kısmı, havayla temastan korunmuş olur. Çünkü oksijen, polimerleşmeyi engeller. Poliakrilamid jeller, gereksinim duyulan ayırma mesafesine bağlı olarak 10-100cm boyunda olabilirler. Ayrıca, bu jeller, agaroz jellerden farklı olarak dikey konumda kullanılırlar. Agaroz jellere göre poliakrilamid jellerin 3 temel kazanımı vardır:

- Yüksek ayırma gücü sayesinde 1-500bp arasındaki küçük DNA parçalarını bile ayırabilir.
- Agaroz jellere göre daha fazla DNA yüklenebilir ($1 \times 1 \text{ cm}^2$ kuyucuğa $10 \mu\text{g}$ DNA) ve çözünürlükte herhangi bir kayıp yaşanmaz.
- Poliakrilamid jellerden geri kazanılan DNA, oldukça saftır ve pek çok amaç için kullanılabilir (Sambrook ve ark., 1989).

Temel olarak iki tip poliakrilamid jel kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi, çift zincirli DNA'ların ayrımı ve saflaştırılması amacıyla kullanılan doğal-tutan (nondenaturing) poliakrilamid jellerdir. Bunlar, elektrik akımına bağlı olarak üretilen ısıyla küçük DNA parçalarının bozulmasını (denatürasyonunu) önlemek amacıyla düşük gerilimde ($1-8 \text{ V/cm}$) ve 1 birimlik TBE' de yürütülürler. Çift zincirli DNA'lar, doğal-tutan poliakrilamid jellerde, büyüklüklerinin $\log_{10}$ değerine ters orantılı bir hızda hareket ederler. Ayrıca onların elektroforezlik göçü, baz özellikleri ve dizilimi ile de etkilenir. Öyleki, aynı boydaki DNA'ların göçlerinde, bu özelliklerinden yola çıkarak, %10 oranında farklılık görülebilmektedir. Bu etkinin, DNA'lardaki özgül ardışımaların, birbiri üzerine katlanarak meydana getirdiği yapılar nedeniyle olduğuna inanılmaktadır. DNA'ların ayrımında kullanılan ikinci tür poliakrilamid jeller ise doğal-tutmayan (denaturing) poliakrilamid jellerdir ki bunlar tek zincirli DNA'ların ayrımında ve saflaştırılmasında kullanılırlar. Bu jeller, üre ve bazen de formamid gibi kimyasalların varlığında polimerleşir ve bunlar nükleik asitlerin baz kısımlarını baskırlar. Böylece, doğal yapısı bozulmuş (denatüre olmuş) DNA'lar, bu jeller üzerinde, baz özelliklerinden ve dizilimlerinden, neredeyse bağımsız olarak göç ederler (Sambrook ve ark., 1989).

2.3.2.1.Doğal-tutmayan Dereceli Poliakrilamid Jeller (Denaturing Gradient Poliakrilamid Jeller)

Bu tür jeller, DNA parçalarının, denatüre edici formamid, üre gibi kimyasalların artan derişimlerini içeren poliakrilamid jellerde ayrılması temeline dayanır. Bu kimyasalların, belirli derişimlerinde, DNA' nın bir bölgesi (domain) bozulur (denatürasyon) ve kısmen tek zincirli olan parçaların göç oranı önemli oranda azalır. Farklı parçalar, derişimin farklılığı dolayısıyla farklı olarak bozulduğundan, boyut olarak aynı olan iki parça birbirinden farklı ayrılabilir. Doğal yapıyı bozma derecesi ne kadar birbirine yakın ise DNA parçalarının ayrımı da o kadar başarılı olur. Öyle ki, baz düzeyinde bile ayırım yapma olanağı doğabilir (Sambrook ve ark., 1989).

Poliakrilamid jel elektroforezi, birçok molekül içeren örneklerden proteinlerin veya tek tip örnekteki farklı tip proteinlerin ayrılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır (<http://piercenet.com>).

Bu amaçla, poliakrilamid jellerle geliştirilen birçok inceleme yöntemi vardır:

2.3.2.2.SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Proteinlerin, analitik elektroforezlerinin hemen hemen tamamı, poliakrilamid jellerde gerçekleştirilir. Bu süreç, onların, polipeptid alt ünitelerine göre ayırma ve kümeleşmesini en aza indirmeye şeklindedir. Bu yöntem, en fazla olarak, güçlü ve yüklü olmayan bir deterjan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) varlığında uygulanır. Bu kimyasal, proteinlerin yüklenmesinden önce indirgen olarak kullanılır. Yapısı bozulmuş (denatüre olmuş) polipeptidler, SDS' ye bağlanarak eksi yüklü hale geçerler. Bağlanan SDS miktarı, polipeptid molekül ağırlığıyla -hemen hemen daima- orantılı ve onun ardışıklarından bağımsız olduğundan SDS-polipeptid bileşikleri, polipeptidin büyüklüğü ile doğru orantılı olarak poliakrilamid jel üzerinde göç eder. Ağırlığı bilinen standart moleküllerle karşılaştırmalı olarak yapılan çalışma ile polipeptid zincirinin büyüklüğünü belirlemek mümkün olabilmektedir. Pek çok olayda SDS poliakrilamid jel elektroforezi, devamlı-olmayan (discontinuous) tampon

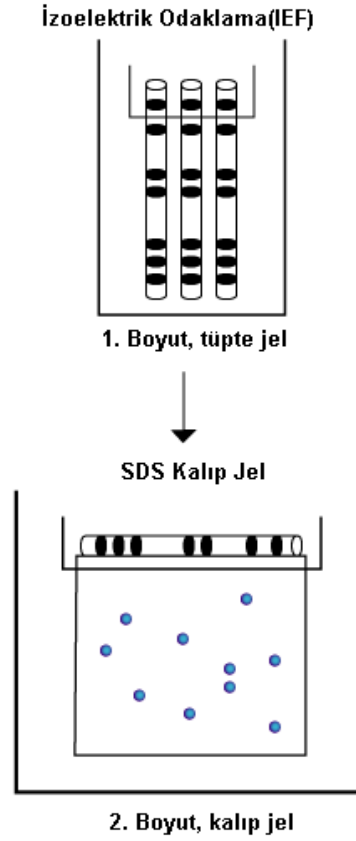
sistemleri ile yürütülür. Bunlar, jele konulan tampondan farklı bir iyon gücüne ve farklı bir pH' ya sahiptir. Elektrik akımı uygulandığında, bu bağlı moleküller (SDS-poliipeptid bileşiği) birlikte hareket eder. Devamlı-olmayan tampon sistemlerinin, örnekteki bileşiklerinin tümünü, küçük hacimler şeklinde yoğunlaştırabilme yeteneği SDS poliakrilamid jellerin çözünürlüğünü artırır (Sambrook ve ark., 1989).

2.3.2.3.İzo-elektrik Odaklama Yöntemi

İzo-elektrik odaklama adı verilen yöntemde de yine poliakrilamid jeller kullanılmaktadır. Bu yöntem, proteinlerin, yüklerine ve net yüklerinin sıfır olduğu pH' ya göre ayrılmasında kullanılır. Bu pH, proteinlere özgüdür ve onların öz-yapısını belirler. İzo-elektrik odaklamada, jelin bir tarafında asit diğer tarafında bazik tampon kullanılarak pH derecelendirmesi yapılır. Bir protein örneği jele yüklendiğinde, derecelendirmenin asit tarafında artı-uç ve baz tarafında eksi-uç olacak şekilde yerleştirilir. Yüzeyindeki net artı yüklerle proteinler, eksi-uca göç edecektir. Eksi yüklü olanlar ise artı-uca göç eder. Protein, pH derecelendirmesi üzerinde, net yükünün sıfır olduğu bir noktaya ulaştığında hareket edemez. Protein molekülleri bu noktada odaklanır ve jelde bant olarak gözlenir (<http://piercenet.com>).

2.3.2.4.İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid Jel Elektroforezi daha ayrıntılı bir inceleme yapılabilmesi için iki boyutlu olarak da uygulanabilir. Bu yöntemde önce pH derecelendirmesi yapılmış bir poliakrilamid jel üzerinde proteinler, farklı pH' lardaki özelliklerine göre ayrılır. Daha sonra ayrılmış proteinleri içeren jel yan çevrilir ve SDS poliakrilamid jele yaslanır. Bu kez de proteinler kütlelerine göre ayrılırlar (<http://piercenet.com>).



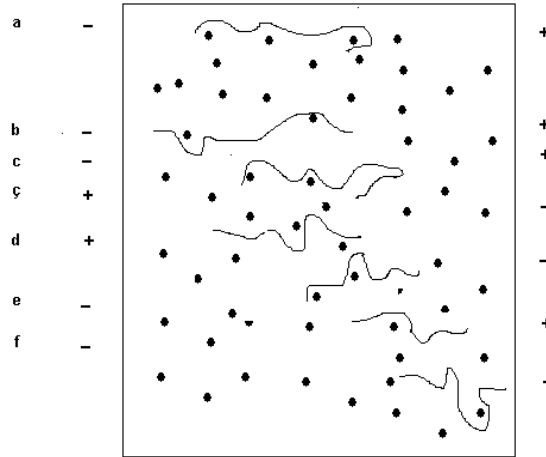
Şekil 2.6.İki boyutlu SDS poliakrilamid jel elektroforezi (<http://piercenet.com>).

2.3.3 Atımlı-alan (pulsed-field) Jel Elektroforezi

20kb ve üzerindeki doğrusal DNA parçalarının, geleneksel agaroz jel elektroforezi ile ayrılması olanaklı değildir. Çünkü bu denli büyük DNA' lar, agaroz jel üzerinde aynı oranda göç ederler. Böylesi büyük parçalar, elektrik alanında, düzenli aralıklarla meydana getirilen değişikliklerle ayrılabilirler. Parçaların tümü, jel üzerinde aynı hızda ilerler fakat, elektrik alanı değiştirildiğinde, onlar, yeni doğrultuda yeniden yönelmek zorundadırlar. Bu iş, daha büyük parçalar için daha uzun sürmektedir. Bütün bu etkilemeler sonunda, büyük DNA moleküllerinin, görece küçük bir jel içerisinde birbirinden ayrılması sağlanır (Leonard ve ark., 1994).

Bu tekniğin, uygulamada birkaç farklı kullanımı bulunmaktadır. En basiti olan, alan-değiştirmeli (field inversion) jel elektroforezi, geleneksel gel elektroforez tanklarında uygulanır. Burada yapılan, artı ve eksi kutupların yönünü (180°' lik açı

ile) değiştirmektedir. Daha güçlü bir teknik ise, elektrodların farklı açılarla yerleştirilmesiyle uygulanmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılanı, elektrodların 120' şer derecelik açılarla yerleştirilmesi ile oluşturulmuştur. Elektrik alanı yönü uygun aralık ve süreler ile değiştirilerek DNA moleküllerinin, düz bir hat üzerinde göç etmesi sağlanır (Leonard ve ark., 1994).



Şekil 2.7. Atımlı alan jel elektroforezi. Elektrik alanının yönü abecelik sırayla değiştirilmektedir (Leonard, 1994).

Atımlı-alan jel elektroforezi, bütün genom DNA' sını, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile keserek DNA parçalarının, boyutlarına göre ayrılmasında ve daha sonra da bakterilerin, DNA parmakizi çalışmalarıyla köken düzeyinde tanımlanmasında, salgınların epidemiyolojik araştırmasında kullanılır. Bu yöntem, genel olarak bakteri tanısında rutin olarak kullanılıyor olmakla beraber, bir takım sınırlılıklara sahiptir. Öyle ki, bu yöntemin uygulanabilmesi için, görece, büyük miktarlarda DNA' ya gereksinim vardır (>200ng DNA veya yaklaşık 10^7 bakteri hücresi veya bant başına 1 ng DNA). Bu kadar fazla DNA elde etmek için bakteri örneklerinin kültüre alınması zorunludur. Burada da kültür sonuçları için yaklaşık 48 saat veya daha fazla bir zamana gereksinim olduğu veya bazı bakterilerin ise kültüre alınamamaları akla gelmektedir. Atımlı-alan jel elektroforezi ile sonucun alınması da oldukça yavaş olmaktadır (jel başına 20 saatten uzun). Bakterilerin restriksiyon parça incelemelerinin bu yöntem ile hızlı olarak analizi, hazırlık ve analiz sürelerinin

toplam süresinin uzunluğu nedeniyle (yaklaşık 40 saatten fazla) mümkün görünmemektedir (Ferris ve ark., 2004).

2.3.2. Jel Elektroforezlerinde DNA' nın Görüntülenmesi

Jel üzerindeki DNA' nın boyanmasında, geleneksel olarak kullanılagelen, floresan ışımaya veren ve DNA' daki bazlar arasına giren etidyum bromür (EtBr) kullanılmaktadır. 254nm dalga boyundaki mor-ötesi ışınlar, DNA tarafından soğurulur ve EtBr ile yansıtılır. 302-366nm dalga boyları arasındaki mor-ötesi ışınlarını ise EtBr tek başına soğurmaktadır. Her iki olayda da enerji, 590nm dalga boyunda kırmızı-portakal rengi ışık olarak salınır. EtBr, hem tek zincirli hem de çift zincirli nükleik asitlerin saptanmasında kullanılabilir. Ancak, boyanın tek zincirli nükleik asitlere bağlanma ilgisi, çift zincirliye göre daha düşüktür ve görece floresans vermesi daha zayıftır. EtBr, genellikle, 10mg/ml' lik çözeltiler halinde hazırlanır ve koyu renkli şişelerde oda sıcaklığında saklanır. EtBr çoğunlukla, jelin içerisine uygulanır ve elektroforez tamponuyla son derişim 0,5µg/ ml olacak şekilde kullanılır. Boya doğrusal çift zincirli DNA' lara bağlandığında, onun jeldeki hareketini %15 azaltır. İstenirse jel EtBr içermeyen de yürütülebilir ve daha sonra su veya tampon ile hazırlanmış bir EtBr çözeltisine katılır. Bu çözeltide, 30-45 dakika bekletilmesi ve sonra incelenmesi gereklidir. Daha sonra, boyanın jelden uzaklaştırılması genellikle gerekli değilken 10ng' dan daha küçük DNA' ların saptanmasında, jelin zemin-ışınması nedeniyle, EtBr' in jelden uzaklaştırılması gerekli olabilmektedir. Bu işlem EtBr ile boyanmış jelin suda veya 1mM magnezyum klorür içerisinde yaklaşık 20 dakika bekletilmesiyle yapılır (Sambrook ve ark., 1989).

Jelin, mor ötesi ışınlarla maruz bırakılması ile EtBr-DNA bileşkesinin oluşturduğu floresans çok belirgin olarak ortaya çıkmakta bu şekilde DNA' nın yeri saptanabilmektedir. Ticari olarak DNA görüntüleme amacı ile üretilen mor-ötesi ışık kaynakları 302nm' dir. DNA' nın en iyi görüntülendiği dalga boyu 302nm-254nm' dir (Sambrook ve ark., 1989).

Nükleik asitlerin, çok çeşitli analitik ve tanı uygulamalarında, SYBR Green I gibi floresan boyalar da kuvvetle önemli hale gelmektedir (Zipper ve ark., 2004;

Vitzthum ve ark., 2002). Onunla ilk tanışmanın olduğu 1990' lardan itibaren jellerde, sıvılarda ve floresans görüntüleme tekniklerinde nükleik asitlerin saptanmasında SYBR Green I' in kullanımı başarıyla uygulanmıştır (Zipper ve ark., 2004; Schneeberger ve ark., 1995; Jin ve ark., 1996; Kiltie ve ark., 1997; Diggle ve ark., 2003; Vitzthum ve ark., 1999; Rengarajan ve ark., 2002; Iwabuchi ve ark., 1997).

Jellerin, mor-ötesi ışınlar altında incelenmesi, bu ışınların cilde ve göze verdiği hasarlar nedeniyle sıkıntılı olmaktadır. Bu amaçla geliştirilmiş jel belgeleme sistemleri bulunmaktadır. Bunlar temel ilkesi, jelin yerleştirildiği ve mor-ötesi ışınların verildiği küçük dolap benzeri bir karanlık alan; mor-ötesi ışınlar yayan lambalar; mor-ötesi ışınları süzen bir süzgece sahip kamera ve bu kameranın bağlı bulunduğu bir bilgisayar ekranından ibarettir. Bantlar, bu kapalı sistem içerisinde, kamerayla görüntülenmekte ve bu görüntü bilgisayar ekranına yansıtılmaktadır. Bu sayede, çalışanların mor-ötesi ışınlarla, doğrudan çalışmasının önüne geçilmektedir.

2.4.DNA Molekülleri' nin Diğer Yöntemlerle Ayrılması

DNA parça boyu analizlerinde, jel temelli ayırma yöntemlerinin sınırlılıkları kılcal (capillary) veya mikro-kanal elektroforezleri gibi yeni yöntemlerin gelişmesine yol açmış (Ferris ve ark., 2004; Figeys, 1995; Fister, 1998; Gao, 1998; Haab, 1997; Haab, 1999; Han, 2000; Han, 2002; Lindberg, 1997) ve bunların kullanımı temel bir eğilim haline gelmiştir. Çünkü bunlar, örnek hacmini, ayırım süresini ve inceleme başına maliyetleri önemli oranda azaltabilmektedir. DNA' nın inceleme sistemleri, PZT (polimeraz zincirleme tepkimesi), ayırım ve saptama gibi süreçlerle bütünleşik hale getirilmiştir. 2001' den bu yana, kullanılagelen mikro-ölçekli araçlara ilişkin en dikkat çekici ilerleme mikro-kanal elektroforezleri için enjektör tasarımları, stratejileri ve yeni ayırma yöntemlerine ilişkin yaşanmıştır (Ashton ve ark., 2003).

2.4.1.Kılcal Elektroforez

Kılcal elektroforez, ilk kez 1990' larda piyasa sunulmuş analitik yöntemlerden biridir. Bu yöntemin kullanımı, bazı değişkenliklere (parametrelere) ilişkin soruları da beraberinde getirmektedir. Bunlar, iyon hareketleri, elektrik alanı, pH, pKa, ısı ve

tamponlama yeteneği gibi elektroforezlik göçü etkileyebilecek değişkenlerdir. Kılcal elektroforezlerde, elektroforez, tamponla doldurulmuş kılcal bir boruda gerçekleştirilmektedir. Silikadan yapılmış bu kılcallar, yüksek elektrik direnci ve çok yüksek elektrik alanı uygulamalarına (100V-500V/cm), yalnızca çok küçük ısı oluşumuyla, izin verir. Daha da önemlisi yüksek yüzey alanı sayesinde, üretilmiş ısının etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına yardım eder. Kuvvetli bir elektrik alanının kullanımı, iyi ve kısa sürede analiz şansı ve iyi bir çözünürlük olanağı sunar. Kılcal elektroforezler, pek çok ayırma işlemleri (mekanizmaları) ve seçicilikleri, asgari örnek hacmi ile sonuç alabilme yeteneği (1-10nl), nicel analiz ve kendiliğinden değerlendirebilme yeteneği ile oldukça kazanımlıdır. Kılcal elektroforezler bu nedenle, gözde ayırma teknikleri haline gelmektedir. Silika kılcalların uçları, tamponların bulunduğu kapların içerisinde yer alır. Kapların içeriği, kılcalların içerisindeki ile aynıdır. Bu tampon ayrıca, kılcallar ve yüksek gerilimli güç kaynağı arasındaki elektrik bağlantısını da sağlar. Örnek, kılcalların içerisine, artı-uç kabı, örnek kabı yer değiştirilerek ve bir dış basınç (hidrodinamik enjeksiyon) uygulanarak yüklenir. Tampon, kaplardaki yerini aldıktan sonra elektrik akımı uygulanır ve ayırma başlar (Lagane ve ark., 2000).

2.4.2.Dönüşümlü-alan Kılcal Elektroforezi (Field Inversion Capillary Electrophoresis)

Atımlı alan, kılcal elektroforeze de uygulanabilir. Bu işlem, alanın ters çevrilmesi şeklinde gerçekleştirilir. Bu tür elektroforez yöntemlerine, dönüşümlü-alan kılcal elektroforezi (Field Inversion Capillary Electrophoresis) denir. Bu yöntem ilk defa Heiger ve arkadaşları tarafından, kılcal elektroforezlerde, büyüklüğe dayalı ayrılabilirliği arttırmak için bir yol olarak öne sürüldü (Magnusdottir ve ark., 1999; Sudor ve ark., 1997; Heiger ve ark., 1990).

Kılcal elektroforezin geliştirildiği ilk dönemlerde, ayırım, çapraz bağlar oluşturan jellerde gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ancak doldurulmasına ilişkin teknik zorluklar nedeniyle bu tür jellerin yerini yeni polimerler almıştır (Magnusdottir ve ark., 1999; Hjerten ve ark., 1987; Swerdlow ve ark., 1990).

Son araştırmalar, kılcal elektroforezlerde, çok daha yaygın bir ifade ile mikro-kanallarda gerçekleştirilen elektroforezlerde, DNA' nın ayırımında kullanılacak yeni polimerlerin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Ancak, bütün uygulamalar için en iyi olabilecek tek bir evrensel ayırma ortamından söz edebilmek zor görünmektedir. Büyük boyutlardaki DNA parçalarının, tek bir baz farklılığını bile ayırt edebilecek yetenekte yani başarılı ardışım analizi yapılabilcek ayırma ortamları gereklidir. Pek çok araştırma grubu, elektro-ozmotik akışı ve DNA-kılcal duvar etkileşimini azaltabilecek çalışmalar yapmaktadır. Düşük yoğunluklu ortamların daha kolay dolduruluyor ve bunun için daha küçük basına gereksinim duyuluyor olması nedeniyle kılcallarda(daha genel olarak mikro-kanallarda) kazanımlı olmaktadır (Barbier ve ark., 2003).

Kılcal elektroforezlerde saptama, mor-ötesi veya görünür dalga boyundaki ışınların doğrudan veya dolaylı olarak soğurulması esasına dayanır. Ticari olarak mevcut cihazlara, genellikle, yüksek verimlilikle çalışan sıvı kromatografisini (HPLC) kılcal elektroforeze uyarlayan sistemlerle donatılmıştır. Bunlar tipik olarak, bir döteryum veya tungsten lamba, bir renk-seçer (monochromatic) ve bir ışık-çoğaltıcı tüpten (photomultiplier tube) oluşmaktadır. Bunlar daha sonra, temelde basit bir sistemle çalışan bileşke sistemlere dönüştürülür. Kılcal elektroforezlerde, ışık soğurumuna dayalı saptama yöntemleri, parlak mavi-yeşil ışık saçan diyotlar (LED) ile de gerçekleştirilebilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, kuvvetli ışık yayan diyotların kullanılması halinde ışığı odaklayacak unsurlara gerek olmadığı ve bu nedenle LED' lerin kullanımının, pek çok diğer ışık-ölçer (fotometrik) cihazlarda, saptayıcılarda ve algılayıcılarda (analitik kimya uygulamaları gibi) daha basit bir seçenek olarak düşünülebileceği bildirilmektedir. Kılcal elektroforezde LED' lerin kullanımına ilişkin yayınlar sınırlı olmakla beraber, LED ve ışı-diyotlarla ilgili çalışmalar bildirilmiş ve fakat bunlarla yapılmış elektroforez çalışmalarına ait sonuçlar verilmemiştir (Butler ve ark., 1997).

2.5.İşık Kaynakları

Atomlar, zgn enerjideki ışığı yansıtır veya soğururlar. Işık yayma, ya uyarılarak ya da kendiliğinden başarılır. Bazı kimyasallar, kimyasal-ışınım

yardımıyla, görünür radyasyon yayarlar. Örneğin ateş böcekleri bu tür işleyiş ile ateş saçarlar. Belirli maddeler ise, daha enerjili ışınlar maruz bırakıldığında ışık verirler ki buna floresans adı verilir (<http://en.wikipedia.org/wiki/LED>).

2.6.Renkler ve Dalga Boyları

İnsan gözüyle algılanan farklı ışınlar, beynimizce renk olarak değerlendirilir. Bu renkler, kırmızı (en uzun dalga boyu ve en düşük frekans), mor (en kısa dalga boyu ve en yüksek frekans) arasındadır. Diğer frekanslara göre, göre turuncu, sarı, yeşil, mavi ve geleneksel olarak insan gözüyle algılanabilirken elektromanyetik tayfın insan gözü dışında algılanan kısımları kısa dalga boylu ve yüksek frekanslı mor-ötesi; uzun dalga boylu ve düşük frekansta kızıl-ötesi olarak adlandırılır. İnsanlar, kızıl-ötesini göremeseler de ona yakın daha kısa dalga boylu, daha yüksek frekanslı ve daha yüksek enerjili ışınları, derideki almaçlar sayesinde, ısı olarak algılayabilirler. Mor-ötesi radyasyon da insanlarca doğrudan algılanamaz. Ancak bu tür ışınlar aşırı derecede maruz kalındığında, güneş yanığı ve deri kanseri gibi olumsuzluklara, maruz kalma süresinin değerine göre nispeten daha az olduğu durumlarda ise D-vitamini eksikliğine bağlı olarak ruhsal baskıya neden olabilir. Bununla beraber, mor-ötesi ışınlar, görünür ışığa göre daha yüksek frekansa sahip olduğundan, maddelerin, çok kolay bir şekilde floresans vermesine yol açabilir (<http://en.wikipedia.org/wiki/LED>).

2.7.Diyot

Diyot, elektronik bir vana gibi işlev görür. Yüklerin, belirli bir yandaki taşınımını sınırlandırarak, elektriğin bir yönde akmasını sağlar. İlk diyotlar, vakumlu tüpteki (ampul gibi) araçlardı. Yassı veya uzun görünümlü diyotlar, 1904’ te John Ambrose Fleming tarafından, Edison’ un gözlemlerini temel alarak icat edilmiştir. Ampuller gibi, vakumlu tüplerde yer alan diyotlar, akımı geçiren ve bu sırada da ısınan telciklere (flamentlere) sahipti: Isınmış bu yapıdan, elektronlar, vakumun içerisine yayılıp artı-uç olan metal zemine doğru çekilir; metal zemin ısıtılmadığı için eksikler(elektronlar), bu artı-uçlu zemin eksi yapılsa bile telciklere geri akmaz (<http://en.wikipedia.org/wiki/LED>).

Pek çok diyot, yarı iletken p-n bağlantısı temeline dayanır. P-n diyotta, akım p-bölgesinden (artı-uç) n-bölgesine (eksi-uç) akabilir ancak bu ters yönde olmaz. Diyot ters bağlandığında, yükler, merkeze çekilir ve tüketilmiş bir bölge oluşturulur (<http://en.wikipedia.org/wiki/LED>). Bir p-n bağlantısının uçları dışarıdan kısa devre edildiğinde bir akım geçmez. Ancak, bağlantıya, yarı-iletkenin atomlarından elektron koparmaya yetecek büyüklükte bir ışık düşürülürse bir akım oluşturulabilir. Bu olaydan yararlanmak amacıyla geliştirilen diyotlara ısı-diyot (fotodiyot) denir. İletim yönünde kutuplanmış bir p-n bağlantısında, yayınımla karşı tarafa geçen bir taşıyıcının orada çoğunlukta bulunan karşı cinsten bir taşıyıcı ile birleşmesi sırasında bir enerji açığa çıkar. Bu enerji, ısı yahut elektromanyetik radyasyon olabilir. Meydana gelen ışıma, genellikle görünür bölge veya civarındadır. Bu nedenle, ışığın dışarı çıkmasına olanaklı kılacak şekilde kılıflanmış diyotlara ışık saçan diyot (Light Emitting Diode) anlamında kısaca LED denilmektedir (Leblebici). LED'lerin ışık yayan tabakası organik bileşenlerden yapılmışsa bunlar organik LED (OLED) olarak bilinirler. Işık yayan molekül, bir kristalin içindeki veya polimerin içindeki küçük bir organik molekül de olabilir. Polimer, esnek yapılı olabilir. Bu tür LED'lere ise kısaca FLED denilmektedir. Pek çok LED, 30-60 miliwatt elektrik gücünden daha fazla olmayan bir güçle çalışmak üzere tasarlanmıştır. 1 watt elektrik ile devamlı olarak çalışabilen LED'ler 1999' larda piyasaya çıkmıştır. 2002' de watt başına 18-22 lumen değerinde ışık saçabilen 5 watt' lık LED' ler geliştirilmiştir. 2005 yılı itibarıyla de 10 watt ile çalışabilen ve watt başına 60 lumen ışık verebilen LED' lerin geliştirilmesi tasarlanmıştır. Bunlar, 50 wattlık normal ampuller kadar çok ışık üretecek ve genel aydınlanma gereksinimleri için LED' lerin kullanımı mümkün olabilecektir. Bugün, organik LED' ler, organik-olmayan(kristal) LED' lere göre daha düşük etkinliğe sahiptir. En etkili olanları bile, %10 etkinlikle çalışmaktadır. Onların, organik-olmayan LED' lerden daha ucuza mal olması nedeniyle çok sayıda ve belirli bir düzen içinde dizilmiş olarak tarama amaçlı kullanılırlar (<http://en.wikipedia.org/wiki/LED>).

Birçok dalga boyunda ışık yayan LED bulunmaktadır: Beyaz, mor-ötesi, kızıl-ötesi, mor, mavi, yeşil, beyaz, pembe, kırmızı LED' ler. Geleneksel aydınlatma yöntemlerinde kullanılan renk süzgeçleri olmaksızın istenen renkte ışık yayma yeteneğinde olmaları; LED' lerin paketlenme özelliği sayesinde ışığı odaklayabilmeleri; koruyucu yerleşimleri sayesinde kırılmaya dayanıklı olmaları;

floresan ampullere göre 2 kat, en iyi akkor ampulden ise 20 kat daha uzun ömürlü olması; akkor ampullere göre daha az ısı vermeleri; küçük araç-gereçlerin yapımında, küçük hacimleri nedeniyle rahat kullanılabilir olmaları nedeniyle LED' ler birçok alanda kullanılmaktadır. LED' ler, havaalanı, tren istasyonları gibi yerlerde bilgilendirme levhalarında olmak üzere; cihazların açma-kapama ışıkları olarak; uzaktan kumandalarda kızıl-ötesi LED' ler olarak; trafik sinyallerindeki göstergeler olarak; hesap ve ölçüm cihazlarındaki göstergeler olarak; bilgisayar farelerindeki hareketli algılayıcılar olarak çok geniş kullanım alanına sahiptirler (<http://en.wikipedia.org/wiki/LED>).

2.8.İşıl-dirençler (LDR)

En yaygın kullanılan ışık algılayıcılarıdır. LDR, temelde bir dirençtir ve ışığın şiddetinin değişmesi ile onların da direnci değişir. Bunlar, yüksek direnç özellikli yarı-iletkenlerden yapılırlar ve ısı-ışık-göze (fotosel) olarak da bilinirler. LDR' ler, bir ışık kaynağı ile çalışıldığında, temel olarak şöyle bir işlev gösterirler: LDR üzerine düşürülen bir ışık demeti, LDR' nin önüne bir engelin girmesi ile değişir. Örneğin, ışık kaynağı olarak kullanılan ampul, bu sayede açılabilir veya kapatılabilir (<http://patdhai.media.mit.edu:8080>).

3. ARAÇ-GEREÇ

3.1.Kullanılan Plastik ve Cam Borular

Boru Türü	Dış Çapı (mm)	İç Çapı (mm)
Cam Boru	7,95	4,88
Cam Boru	6,15	3,62
Cam Boru	4,31	2,45
Plastik Boru	4,49	2,40
Plastik Boru	3,85	3,08

3.2.Kullanılan Kimyasallar

Kimyasalın Adı	Kimyasalın Markası
Agaroz	GIBCO BRL, USA
NuSieve GTG Agarose	FMC BioProducts, USA
Akrilamid	GIBCO BRL, USA
Bis-akrilamid	GIBCO BRL, USA
TEMED	Amresco, Ohio
APS	Bio-Rad
Etidyum Bromid	SIGMA, USA
NaOH	MERCK, Germany
İzopropil Alkol	BİRPA, Türkiye
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	MERCK, Germany
Asetik asit	MERCK, Germany
Borik asit	MERCK, Germany
EDTA	MERCK, Germany

3.3.Kullanılan Işık Kaynakları, Işıl-diyotlar ve Işıl-dirençler

Işık Kaynağının Türü	Markası/ Modeli
5mm çapında ve 10.000mcd gücünde mavi LED (LCB 12 WD)	SunLED Corporation
5mm çapında ve 10.000mcd gücünde yeşil LED	SunLED Corporation
5mm çapında ve 10.000mcd gücünde mor-ötesi (L-2523 UVC) LED	SunLED Corporation
3mm çapında ve 30.000mcd gücünde mavi (LCB 11 WD) LED	SunLED Corporation
6W gücünde BlackLight (FT-6W T5 BLB)	Landlite
Işıl-dirençler	Büyük kalıp ve küçük kalıp.
Işıl-diyot	BPW-34

3.4.Diğer Araç-Gereçler

Araç-Gerecin Adı	Markası
Elektroforez Tankları	Owl Scientific, Inc
Güç kaynağı (Lightning Volt OSP 2502)	Owl Scientific, Inc
Güç kaynağı (Techware PS 4010-2)	SIGMA-ALDRICH
Transilluminator	U.V.P
Kamera	SANYO
Kamera Lensi	Computer TV Zoomtens
Jel Belgeleme Sistemi Programı	GelDoc, Molargen
Bilgisayar	Casper
9 V Pil(LongLife)	Varta
Adaptör(Power:8V)	Lexus
Sinyal Dönüştürücü	Innova
Plastik Enjektör	(TİBSET)
Pastör Pipeti	-
Parafilm	-

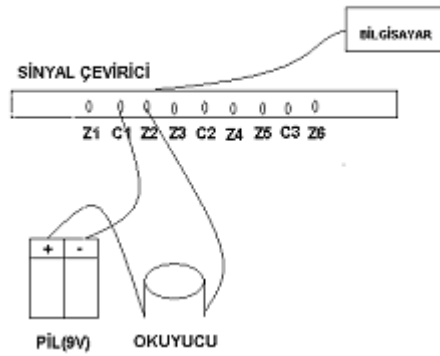
4.YÖNTEM

4.1.Sinyal Çeviricinin ve Bilgisayar Programının Geliştirilmesi

Sinyal çevirici, sistem bilgisini toplayan bir tür işlemci gibi davranan “*ephrom*”; elektriği depolayan 35V’ luk bir adet “*kondansatör*”; elektriğin gerilimini düşüren 2 adet “*trafo*”; sigorta; diyot, akü ve 3 bacaklı “*transistör*” den oluşmaktadır.

Bu devreden, 8 tane kanal çıkmaktadır. Bunlar, Z1, C1, Z2, Z3, C2, Z4, Z5, C3, Z6 şeklinde adlandırılmıştır. C’ ler (–) kutbu, Z’ ler ise okuyucuların bağlanabileceği kanal çıkışlarını temsil etmektedir. Yani, bu cihaz, 6 ayrı okuyucudan gelen veriyi değerlendirebilecek şekilde tasarlanmıştır.

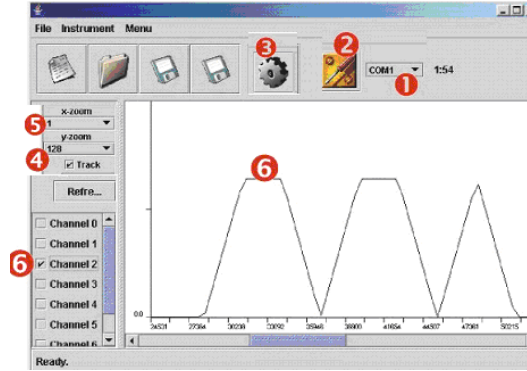
Okuyucu ve cihaz arasındaki bağlantıyı gösteren çizim Şekil 4.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.1.Okuyucu, sinyal çevirici ve bilgisayar arasındaki bağlantı.

Java temelli bilgisayar programı, özel olarak Dr. Doruk Engin tarafından bu çalışma için yazılmıştır. Bu programın çalışma ilkesi şöyledir: Program, okuyucudan (ışıl-direnç veya ışıl-diyot) aldığı elektriksel bilgiyi (gerilimdeki değişim) sayısal veriye dönüştürmekte ve bunu bir çizge (grafik) olarak bilgisayar ekranına yansıtmaktadır. Bu programın, çalışma sırasında, bilgisayar ekranında sunulan görüntü Şekil 4.2.’ de verilmiştir. Bu resimde, ekrandaki genel görüntüyü, resim

üzerindeki numaralar ise programın çalışması için sırayla yapılması gereken ayarları göstermektedir.

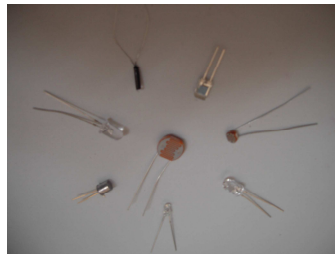


Şekil 4.2.Çizge (grafik) programının ekranda sunulması.

4.2.Uygun Okuyucunun Seçilmesi

Uygun okuyucunun seçilmesi sırasında ilk denemeler, mor-ötesi ışınlar veren U.V.P Transilluminator' de gerçekleştirildi. Çalışmalar, kalıp jel üzerine yüklenmiş, SYBR Green I (FMC BioProducts) ile boyanmış DNA bantları üzerinde yapıldı. Bu denemeyle amaç, okuyucu çeşitlerinin, bantlı alan ile bantsız alan arasındaki ayrımı yapıp yapamadığını; eğer bu ayrım yapılabiliriyorsa bunun duyarlılığının ne olduğunu belirlemeye yönelik oldu.

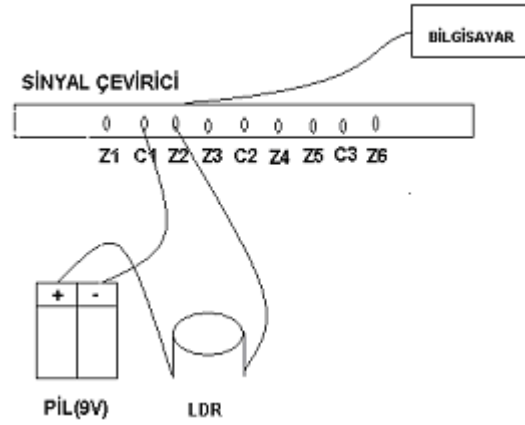
Bu amaçla, piyasadan LDR (küçük ve büyük kalıp) ve ısl-diyot (BPW 34) edinildi. Bunlar Fotoğraf 4.1.' de verilmiştir.



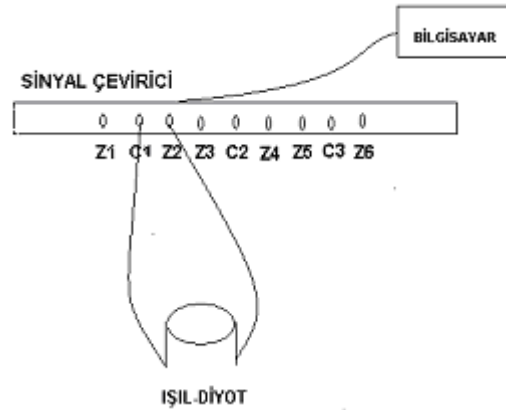
Fotoğraf 4.1.LED' ler, ısl-diyotlar ve ısl-dirençler.

%1,2' lik agaroz jel hazırlandı. Jelin içine 0,5µg/ml olacak şekilde EtBr eklendi. Jel, geleneksel şekilde yatık olarak Owl Scientific, Inc.' ten edinilen tanklara döküldü. 100bp DNA Ladder (Promega) kullanılarak bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan jel kuyucuklarına 10µl yüklendi. Daha sonra bunlar, 100V' ta 50mA ile 40' yürütüldü. Jel, bantların yürüdüğü hat boyunca kesildi (bir boruda yürütülmüş gibi) ve daha sonra U.V.P Transilluminator' de mor-ötesi ışınların varlığında incelendi.

Kabaca yapılan bu değerlendirmenin ardından, okuyucu olarak kullanılmak üzere edinilen LDR ve ısıl-diyotlarla çalışmalara başlandı. İlk olarak bunların, uygun şekilde bağlanması gerekiyordu. Bu bağlantılar, Şekil 4.3. ve 4.4.' te gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Işıl-direnç, sinyal çevirici ve bilgisayar arasındaki bağlantı.



Şekil 4.4. Işıl-diyot, sinyal çevirici ve bilgisayar arasındaki bağlantı.

İlk olarak, beyaz floresan ışığıyla yapılan normal oda aydınlatmasında, karanlıkta ve de mor-ötesi lambalar karşısında, okuyucuların nasıl davrandığı saptandı. Buradaki amaç, okuyucuların algılayabildiği en alt ve en üst düzey ışık miktarını belirlemektir. Bu aralıkta ve olabildiğince alt sınıra yakın bir değerde çalışmaların yapılması planlandı.

Bu çalışmalar sonucunda, ışık kaynağıyla okuyucuların, doğrudan bakıştırılması durumunda zemin ışımasının, en üst düzeyde algılandığı gözlemlendi. Bu nedenle ışığın, okuyucu ile 90° lik bir açı yapacak şekilde yerleştirilmesi kararlaştırıldı. Bu amaçla, geniş bir yüzeyde yayılmış bulunan mor-ötesi lambaların üzeri, üzerinde yaklaşık 2mm çapında bir delik bulunan metal bir plaka ile kapatıldı. Jel, bu delikten ışık alacak şekilde yerleştirildi. Böylece, bandın üzerine tek bir noktadan ışık verilmesi mümkün oldu. Bu çalışmalarda, iki ayrı deneme gerçekleştirildi: İlkinde, okuyucu sabit tutuldu ve DNA biçemlerinin bulunduğu ve bulunmadığı bölgeler, okuyucunun önünden geçirildi. Yani jel hareket ettirildi. İkincisinde, jel sabit tutuldu ve okuyucu, jelin üzerindeki DNA biçemlerinin bulunduğu ve bulunmadığı bölgeler üzerinde hareket ettirildi. Ayrıca, zemin-ışımasının daha da azaltılabilmesi ve bu sayede daha sağlıklı okumayla en doğru okuyucunun seçilebilmesi için jel belgeleme sisteminin kamerasında (SANYO) kullanılan ışık süzgeci (Computer TV Zoomtens) denendi. Bu süzgeç, ışık-jel-süzgeç ve okuyucu sıralamasında üst üste yerleştirildi. Yani yine okuyucu ile ışık kaynağı doğrudan bakıştırıldı fakat bu kez, ilk denemelerden farklı olarak, ışık süzgeci sayesinde zemin ışımasının en aza indirildiği görüldü.

Bütün bu denemelerden sonra ısı-dirençler ve ısı-diyotlar ile uygun bir düzlemde yerleştirilmiş ve kapalı bir sistem içerisinde sabitlenmiş bir düzeneikle, çalışmaların sürdürülmesine karar verildi.

4.3.Uygun Işık Kaynağının Seçilmesi

Floraslan lambadan alınan ışık, küçük bir delikten geçirilerek jele ulaştırıldı. DNA biçemlerinin bulunduğu alan ile boş alan arasındaki ayırım net olarak

yapılamadı. Özellikle ışık kaynağının, florasan karakterli olması da düzensiz verilerin elde edilmesine yol açtı.

Daha güçlü, odaklanabilen ve en önemlisi de belirli dalga boyunda düzenli ışınlar verebilecek ışık kaynaklarının kullanılması gerekiyordu. Bu amaçla, LED' lerin denenmesine karar verildi ve farklı dalga boyundaki LED' ler piyasadan edinildi. Bunların bir kısmı 5mm çapında olup mavi, yeşil, mor-ötesi dalga boyunda ve onbin milikandila(mcd) değerinde ışınlar saçarken bir kısmı ise 3mm çapında, mavi dalga boyunda ve otuzbin mcd değerinde ışınlar saçmaktaydı. Bunlardan, 5mm' lik olan yeşil ve mor-ötesi LED' ler ile bant biçimleri (pattern) çıplak gözle çok net görülebilenken bunların, okuyucular ile algılanmasında başarısız olundu. Mavi dalga boyunda ışınlar yayan 5mm' lik LED' lerle de benzer şekilde, biçimler çıplak gözle ayırt edilebildi ancak okuyucu, büyük bant biçimleri dışındakileri ayırt edemedi. Bunun üzerine, yaklaşık 15°' lik açıyla ışığını odaklayan ve 30.000mcd gücünde ışık veren mavi LED' ler denendi. Bu çalışmayla bant biçimlerinin, okuyucu tarafından saptanabilmesi mümkün oldu. Bu çalışmalar sonucunda deneye, 30.000mcd gücünde 3mm çapında mavi dalga boyunda ışınlar veren LED' lerle (SunLED Corporation) devam edilmesi kararlaştırıldı.

4.4.Jelin Boru İçerisine Dökülmesi ve Elektroforez

Jel elektroforezin boruda gerçekleştirilmesi için 10cm boylarında ve değişik çaplarda(dış çapı 7,95, iç çapı 4,88mm; dış çapı 6,15, iç çapı 3,62mm; dış çapı 4,01, iç çapı 2,45mm olan cam borular ile dış çapı 4,49, iç çapı 2,40mm ve dış çapı 3,85, iç çapı 3,08mm olan plastik) borular kullanıldı. Bunların içine %1-1,2' lik agaroz, nuSive agaroz ve %5-6-8' lik poliakrilamid jeller dolduruldu ve elektroforezler bu jellerde gerçekleştirildi.

%1 veya %1,2 agaroz jeller, yeterli miktarda agarozun tartılıp uygun miktar 1 birimlik TAE(Tris Asetikasit EDTA) ve bazı çalışmalarda 0,5 birim TBE (Tris-Borik asit EDTA) içerisinde, mikrodalga fırında eritilerek çözülmesiyle elde edildi. Jel katılaşmadan, cam borulara döküldü.

NuSieve agaroz (FMC BioProducts)' dan %3 ve agaroz (GIBCO BRL)' dan %1 olacak şekilde agaroz tartılıp uygun miktar 1 birimlik TAE (Tris-Asetikasit EDTA) ve bazı çalışmalarda 0,5 birim TBE (Tris-Borik asit EDTA) içerisinde, mikrodalga fırında eritilerek çözüldü. Jel katılaşmadan, cam borulara döküldü.

0,5M EDTA' nın hazırlanması için, 186,1 gram disodyumetilendiamintetraasetat.2H₂O' dan (MERCK) 800ml damıtık suya karıştırıldı ve bu çözelti mıkmatıslı karıştırıcı üzerine kondu. pH 8,08 olarak ayarlanana kadar NaOH (MERCK) çökeleği kullanıldı. Otoklavlandı (121°C' ta 15dakika).

TAE, 242g Tris Base (MERCK), 57,1ml asetik asit ve 100ml pH' sı 8,0 olan 0,5M EDTA (MERCK) kullanılarak 50 birimlik derişik halde hazırlandı. Bu çözeltinin son pH' sı 8,11' di. 1 birimlik olan çözelti, bu derişik çözeltiden 1/50 oranında damıtık su ile seyreltilerek elde edildi.

TBE, 54g Tris Base (MERCK), 27,5g borik asit (MERCK), 20ml pH' sı 8,0 olan 0,5M EDTA (MERCK) kullanılarak 5 birimlik derişik halde hazırlandı. Bu çözeltinin son pH' sı 8,47' idi. 1 birimlik olan çözelti, bu derişik çözeltiden 1/5; 0,5 birimlik olan ise 1/10 oranında damıtık su ile seyreltilerek elde edildi.

%5-6-8' lik poliakrilamid, Çizelge 4.1.' de yer alan malzemelerden yine burada belirtilen miktarlarda katılarak hazırlandı.

Çizelge 4.1.Poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar.

Malzeme	%5	%6	%8
H ₂ O	6,27 ml	5,3 ml	6,4 ml
Akrilamid (%30)	1,66 ml	2,1 ml	3,2 ml
5 Birimlik TBE	2 ml	2,5 ml	2,4 ml
%10 APS	0,07 ml	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	0,0037 ml	0,008 ml	0,01 ml

%30' luk akrilamidin hazırlanması için 29 gram akrilamid (GIBCO BRL) ve 1 gram bis-akrilamid (N, N'-methylenbisacrylamide)(GIBCO BRL)) toplamda 60ml olacak şekilde damıtık suda çözüldü. Kimyasalın çözünmesi için 37°C' a kadar ısıtıldı. Erime tamamlandıktan sonra hacim yine damıtık su ile 100ml' ye tamamlandı.

%10' luk Amonyum Per Sülfat (BioRAD), ağırlıkça %10 olacak şekilde hazırlandı. N,N,N',N'-tetramethylenediamine ($C_6H_{16}N_2$) = TEMED (Amresco) kullanıldı.

Bunların doldurulmasında, 5mm' lik plastik enjektörler ve pastör pipetleri kullanıldı. Jelin, sıvı haldeyken akıp gitmesini önlemek için borular dipten parafilm ile kapatıldı. Jel doldurulduktan sonra cam borular dikey konumda yerleştirildi ve üzerlerine izopropil alkol konuldu. İzopropil alkol, jelin üst yüzeyinin düzleştirilmesi ve akrilamidlerin polimerleşmesi için gerekiyordu. Cam boru içerisine dökülen jeller, hazırlandığı tampon içerisinde, oda sıcaklığında bekletildi ve kullanılacağı zaman tamponun içinden alındı.

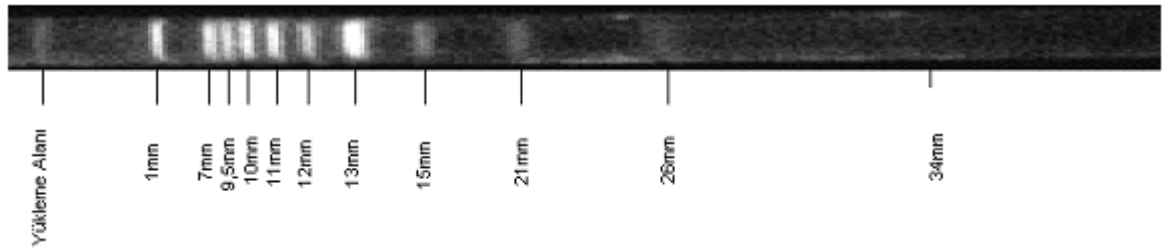
Jeller döküldükten sonra değişik ağırlıklara sahip standart DNA molekülleri (100bp DNA Ladder[Promega]; 0X174 HindIII [Promega]) için elektroforez denemeleri gerçekleştirildi.

Bazı çalışmalarda etidyum bromür (SIGMA) 0,5µg/ml olacak şekilde ve bazılarında ise SYBR Green I (FMC BioProducts) 0,1µl/ ml olacak şekilde jelle eklendi. Ancak bu çalışmalarda bantlar net olarak ayırt edilemedi. Bu nedenle, SYBR Green I (FMC BioProducts) ve DNA, yükleme öncesinde karıştırılarak çalışıldı. Bu karışım, 10µl DNA, 5µl H₂O, 5µl 6X-Orange Loading Buffer (Promega), 0,5 µl SYBR Green-I (FMC BioProducts) ile hazırlandı.

Jele, bu hazırlanan DNA-boya karışımından 10µl yüklenerek (0,025ng DNA) agaroz ve NuSieve için değişik gerilim uygulamaları denendi. Ancak, akım, 500mA gibi yüksek bir değere ayarlansa bile jel üzerinde okunan değer 00mA' den yukarı çıkmadı. Moleküllerin ayrımı bu yolla yapılamadı. Poliakrilamid jel ile de aynı çalışmalar gerçekleştirildi. 500V' luk gerilim uygulaması, jelin ısınmasına yol açtı.

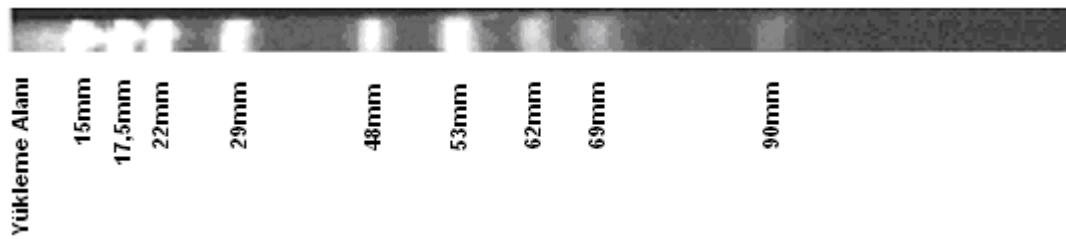
Denemeler bu nedenle bu gerilim değerinin altında gerçekleştirildi. En güzel sonuç, 150V-200V/ 500mA ile elde edildi. Bu gerilimin üstündeki değerlerde, küçük bantların ayırt edilemediği gözlemlendi.

%5' lik poliakrilamid jel dolu, 4,88mm iç çapa sahip cam boruda, 1 birimlik TBE çözeltisinde, 200V gerilim, okunan 003mA akım ve 001W güç ile 100bp DNA Ladder (Promega)' ın bant biçemlerinin 20 dakika sonunda kaydettiği ilerleme sonuçları Fotoğraf 4.2.' te verilmiştir.



Fotoğraf 4.2.100bp DNA Ladder (Promega)' ın jel dolu borudaki görüntüsü.

%6' lık poliakrilamid jel dolu, 4,88mm iç çapa sahip cam boruda, 1 birimlik TBE çözeltisinde, 150V gerilim, okunan 002mA akım ve 000W güç ile θ X174 HindIII (Promega)' ün bant biçemlerinin 90 dakika sonunda kaydettiği ilerleme sonuçları Fotoğraf 4.3.' te verilmiştir.



Fotoğraf 4.3. θ X174 HindIII (Promega)' ün jel dolu borudaki görüntüsü.

4.5. Optik Okuyucu Jel Elektroforez Sisteminin Ön Tasarımının Yapılması

İlk tasarım olarak, plastik 500ml' lik su şişelerinin altları kullanıldı. Bir altlık, üst tampon kabı diğer altlık ise alt tampon kabı olarak düşünüldü ve her iki kaba da platin elektrodlar yerleştirildi. Üste konacak olan kabın ortası, borunun yerleştirileceği büyüklükte delindi. Bu ilk aygıt, Fotoğraf 4.4.' te verilmiştir.



Fotoğraf 4.4. Boruda elektroforez için geliştirilen ilk aygıt.

Daha sonra, daha düzgün olması ve boruların daha kolay yerleştirilebilmesini sağlamak amacıyla yeni bir ilkel elektroforez aygıtı yapıldı. Bu, Fotoğraf 4.5.' da verilmiştir.



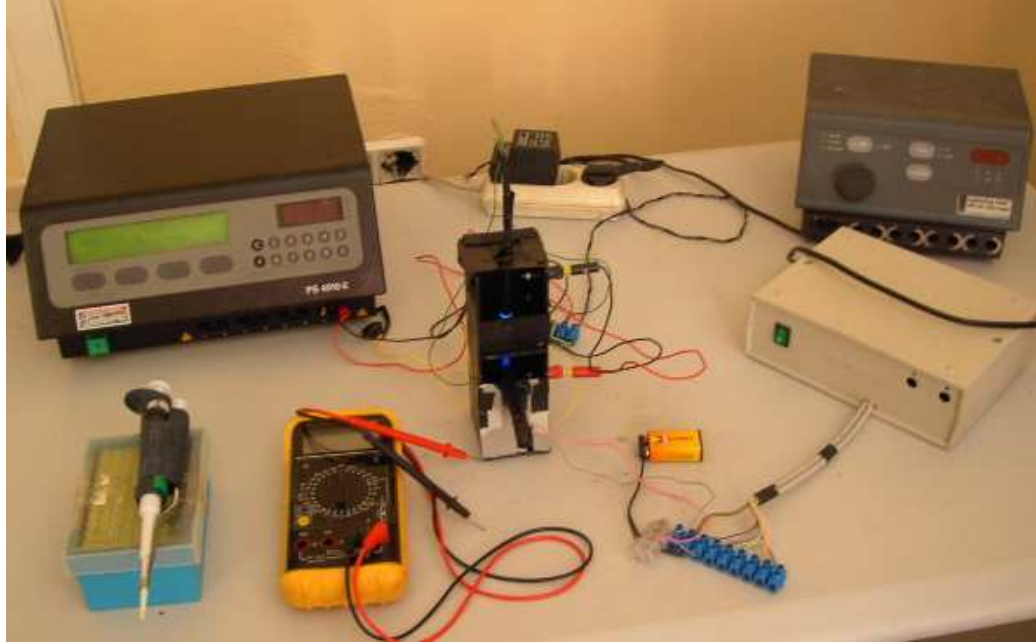
Fotoğraf 4.5.Boruda elektroforez için geliştirilen ikinci aygıt.

Bu çalışmalardan verimli sonuçlar elde edildikçe, eksikleri giderilmiş daha sabit yapılanmaları olan elektroforez aygıtları yapıldı. Bu seyrde geliştirilen üçüncü elektroforez aygıtı Fotoğraf 4.6.' de verilmiştir.



Fotoğraf 4.6.Boruda elektroforez için geliştirilen üçüncü aygıt.

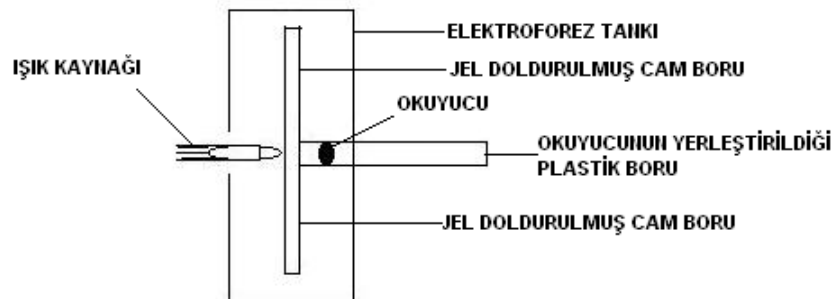
En son şekillenmiş elektroforez aygıtı ise, Fotoğraf 4.7.' de verilmiştir



Fotoğraf 4.7.Boruda elektroforez için geliştirilen dördüncü (son) aygıt.

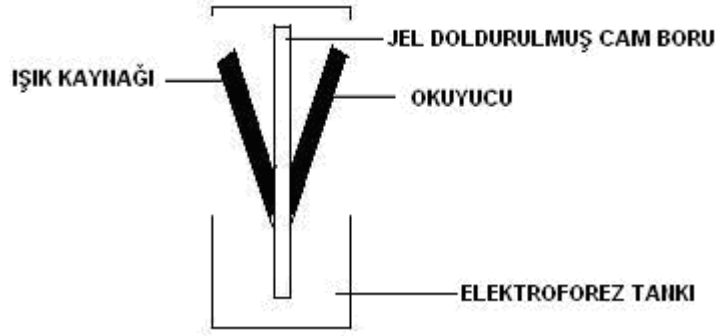
4.6.LED ve Okuyucuların Uygun Konumda Yerleştirilmesi

Okuyucu olarak ısıl-dirençlerle (büyük ve küçük kalıp) ve ısıl-diyotlarla; ışık kaynağı olarak da LED' lerle yapılan ön çalışmalardan sonra bunların elektroforez sistemi içerisinde uygun konumda yerleştirilmesi çalışmaları yapıldı. Bu amaçla ilk olarak LED ve okuyucuların karşılıklı olarak yerleştirilmesi düşünüldü. Bu yerleşimi gösteren çizim, Şekil 4.5.' te verilmiştir.



Şekil 4.5.Okuyucu ve ışık kaynağının karşılıklı yerleştirilmesi.

İkinci olarak jelden doğabilecek gereksiz yansımaların önlenmesi amacıyla LED ve okuyucunun farklı konumlarda yerleştirilmesine çalışıldı. Bu yerleşimi gösteren çizim, Şekil 4.6.' te verilmiştir.



Şekil 4.6.Okuyucu ve ışık kaynağının farklı açılarda yerleştirilmesi.

Bu her iki düzenekle yaptığımız çalışmalarda LDR, zemin ışımasını daima en-üst düzeyde aldığı için, bu tür bir düzenekle, önünden geçen bant biçemlerini algılamada LDR kullanılarak başarılı olunamadı. Ancak bu düzenek kullanılarak ısıldiyot karakterindeki okuyucular ile yapılan denemeler LDR' ye göre daha başarılı oldu. Işıl-diyotlarla yapılan çalışmalarda, karşılıklı yerleştirilen LED ve okuyucu ile düzensiz dalgalanmalara rastlanmasa da çok düşük okuma düzeyi elde edildi. Seri ve birbirine 90°' lik açılarla yerleştirilmiş 3 ısıldiyot ile, elektriksel sinyalin arttırılabileceği düşünüldü. Yapılan bu çalışmayla, bantların geçişlerini belirli oranlarda yakalayabilmek mümkün oldu. Ancak, burada elde edilen sonuç, net bir ayırım yapılmasını kolaylaştıracak kadar büyük olmadı.

Üçüncü denemede, LED' ler cam borunun tam tepesinden, ışınlarını jelin tam içine doğru verecek şekilde yerleştirildi. Bu yolla, jelin çok daha az parladığı saptandı. LED' ten gelen ışığın, kayıp olmaksızın daha yoğun bir şekilde jele ulaştırılabilmesi için LED, dıştan siyah elektrik bandıyla kaplanan bir cam borunun içerisine sabitlendi. Böylece, LED' in tamponun içerisine daldırılması ile doğabilecek bozulma vb. sorunların ortadan kaldırılması da olanaklı hale geldi. Bu düzenekle yapılan çalışmalar sonunda ısıldiyotların geriliminde, bütün DNA

bantlarının geçişi boyunca herhangi bir değişim saptanmadı. Ancak, önemli oranda değişen direnç değişiminin bilgisayar ekranında atımlar halinde saptanabiliyor olması dolayısıyla, okuyucu olarak LDR' lerin kullanılması ve çalışmaya bu noktadan itibaren LDR ile devam edilmesi kararlaştırıldı.

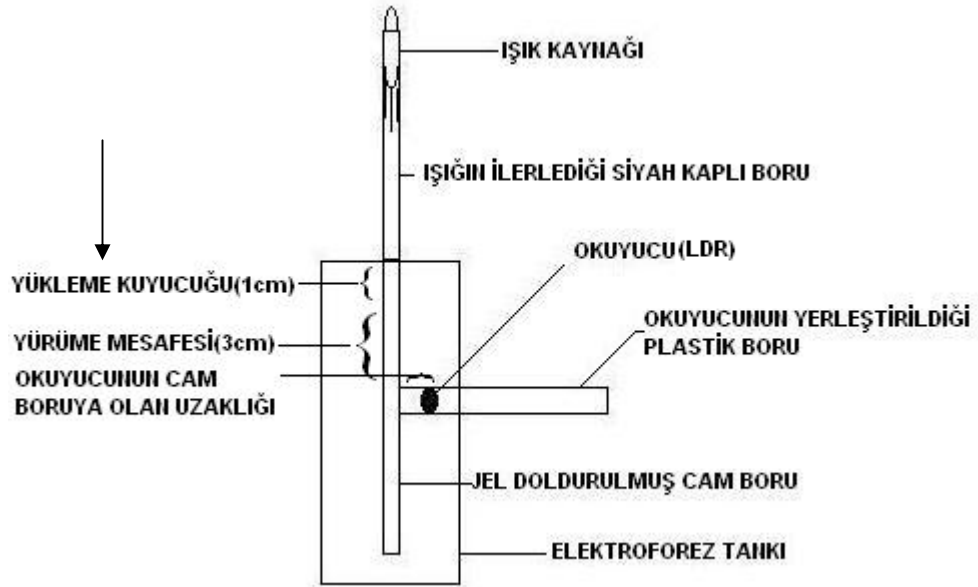
Arka-zemin ışımasını en aza indirmek ve okuyucunun en alt ve st değerler arasında ve alt sınıra yakın bir değerde çalışabilmesini mümkün kılabilmek amacıyla okuyucunun, ışık kaynağına ve jel boruya yakınlığında uygun mesafenin yakalanmasına zen gösterildi. Bu amaçla, LED ve LDR' nin birbirlerine olan uzaklıkları; jel ile LDR arasındaki uzaklığın en uygun hale getirilmesine çalışıldı.

Gereksiz parlamaların önüne geçmek için okuyucunun tüm çıplaklığı ile jele bakması yerine belli bir aralıktan jele bakmasının bantların doğru olarak saptanabilmesinde önemli olduğu düşünüldü. Bu amaçla, okuyucu, siyaha boyanan bir plastik borunun içerisine yerleştirildi ve bu borunun, jele bakan kısmı kapatıldı. Bu kapatılan kısımdan daha sonra yaklaşık 2,5mm genişliğinde bir yarık açıldı. ışık kaynağı, en üstte sabit tutularak, LDR' nin bu boru içerisinde ileri geri hareket ettirilmesiyle, saptamanın en uygun yapıldığı mesafeye LDR' nin yerleştirilmesine çalışıldı.

4.7.Bulgular

Okuyucu olarak kullandığımız ışıl-diyot ve ışıl-dirençler ile yapılan çalışmalar sonucunda, bazı ışıl-diyotların, ışığı ancak karşıdan aldığında uyarılabildiği, fakat bu şekilde bile küçük DNA moleküllerinin (soluk bantlar halinde beliren) ayrımını net olarak yapamadığı ve bazı ışıl-diyot türlerinin ise ısıyla etkilenererek düzensizliklere yol açtığı saptanmıştır. Ayrıca, zemin ışımasını engellemek için ışık kaynağının borunun üstünden veya altından verilmesi halinde ise ışıl-diyotların uyarılamadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, ışıl-diyotlarla yapılan çalışmalarda, belirsiz, düzensiz izgeler elde edilmiş olup bu çalışma kapsamında, bu okuyucularla bir sistem kurulamamıştır.

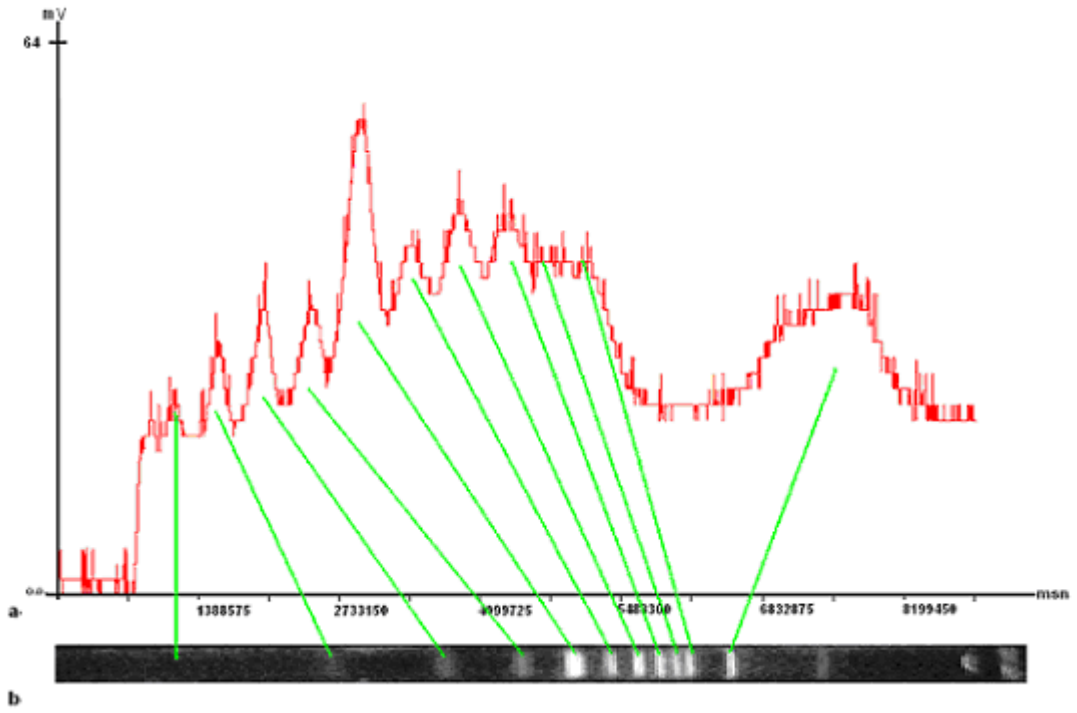
Işıl-dirençler ile yapılan çalışmalarda ise, ısı-diyotlardan farklı olarak ışık yoğunluğu daha iyi ölçülebilmiş ve bu sayede daha düzenli bir çizge elde etmek mümkün olmuştur. Ancak, ısı-diyotların aksine ısı-dirençler, fazla duyarlı olduğu için zemin ısımasından aşırı düzeyde etkilenmiş ve ışığın karşıdan verilmesi halinde bantların ayırt edilmesinde başarısız olunmuştur. Bu nedenle, zemin ısımasının az olmasının, sistemin duyarlılığı açısından çok önemli olduğu anlaşılmıştır. Bunun sağlanabilmesi için ışık kaynağı, ışınlarını tepeden ve cam borudaki jelin içine doğrudan verebilecek şekilde yerleştirilmiştir. Agaroz yerine poliakrilamid jellerin kullanılması da zemin ısımasını en aza indirmiş, ayrıca DNA' ların iyi bir şekilde görüntülenebilmesini olanaklı kılmıştır. Bunun yanı sıra, okuyucunun, ışığı -2mm gibi- belli bir aralıktan ve -5mm gibi- belli bir mesafe geriden alacak şekilde karanlık bir sistem içerisine yerleştirilmesi ve ışık kaynağına -yaklaşık 4cm gibi- uygun uzaklıkta konumlandırılması doğru ve etkili algılamanın yapılması için çok önemli olmuştur. Bu yerleşimi götüren çizim, Şekil 4.7.' da verilmiştir.



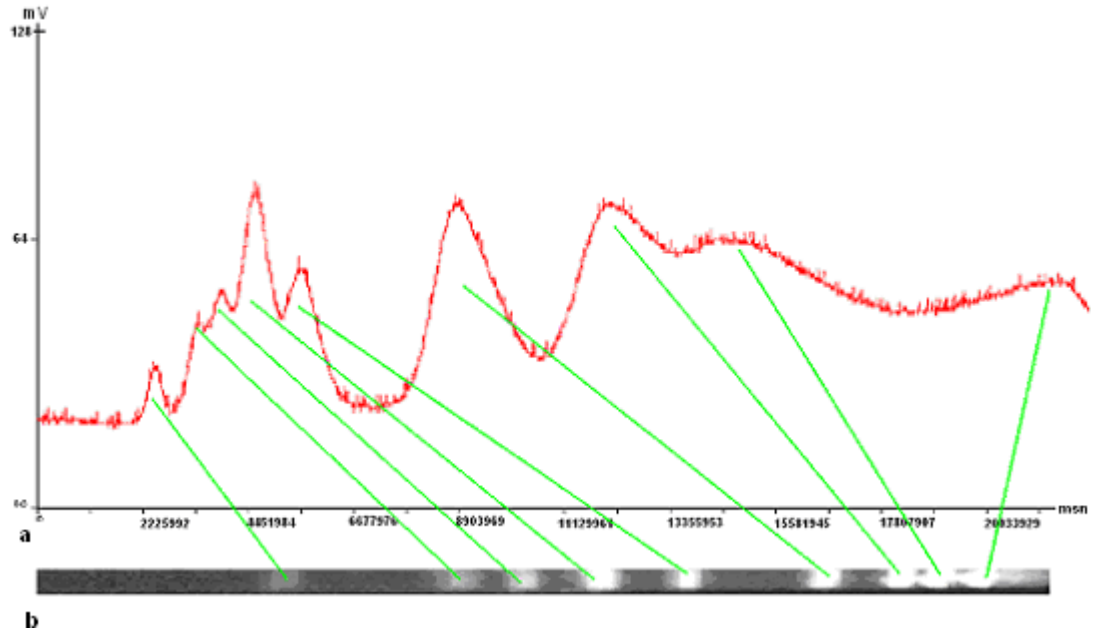
Şekil 4.7.Okuyucu ve ışık kaynağının en uygun şekilde yerleştirilmesi.

Elektroforez işleminin, yüklemenin ardından tümüyle karanlık bir alanda gerçekleştirilmesi de algılamanın sağlıklı yapılabilmesinde önemli oldu. Bu amaçla, elektroforez cihazı, çalışma sırasında dıştan ışık almayacak şekilde, siyah bir kutu içerisine yerleştirildi. 0X174 HindIII (Promega) ve 100bp DNA Ladder (Promega)

ile yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen çizgeler, Şekil 4.8. ve 4.9' da verilmiştir. Şekil 4.8., 100bp DNA Ladder (Promega)' la yapılan çalışmayı içermektedir. Bu şeklin a-bölümü, geliştirilen cihazın saptadığı çizgeyi, b-bölümünde ise boru içerisindeki jelde yürüyen DNA moleküllerinin Gel-Doc (Molargen) resmini göstermektedir. Bu sonuç, %5' lik poliakrilamid jelde 2 saat 15 dakikada elde edilmiştir. Soldan sağa doğru bantlar, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, (900-1000), 1500bp' dir. Şekil 4.9., 0X174 HindIII (Promega)' le yapılan çalışmayı içermektedir. Bu şeklin a-bölümü, geliştirilen cihazın saptadığı çizgeyi, b-bölümünde ise boru içerisindeki jelde yürüyen DNA moleküllerinin Gel-Doc (Molargen) resmini göstermektedir. Bu sonuç, %6' lık poliakrilamid jelde 380 dakikada elde edilmiştir. Soldan sağa doğru bantlar, 118, 194, 234, (281-271), 310, 603, 872, 1078, 1353bp' dir.



Şekil 4.8.100bp DNA Ladder (Promega)' ın, geliştirilen cihazda alınan resmi.



Şekil 4.9.0X174 HindIII (Promega)' ün, geliştirilen cihazda alınan resmi.

5.TARTIŞMA

Dirimbilimdeki (biyolojideki) pek çok deney çalışması, DNA moleküllerinin, tekdüze (homojen) olmayan çözeltiler içerisinde, büyüklüklerine göre ayrılmasını gerektirir. Bu değerlendirme, yaygın olarak, jel elektroforezleri ile gerçekleştirilir. Bu yöntemler, DNA moleküllerinin büyüklükleri ile ters orantılı olarak göç etmesi esasına dayanır. Jel elektroforezleri, oldukça etkili olmasına karşın onların hala bazı olumsuzlukları vardır. Bunlardan birkaçı şöyle sıralanabilir: Büyük DNA moleküllerinin ayırımında başarısız olunması; zahmetli ve zaman alıcı olması (Chou ve ark., 1999).

Yüksek ayırma gücü, kolay miktar hesabı, kısa çözümleme süresi, çok az hacimde örnek kullanılabilmesi ve sonuçları kendiliğinden değerlendirebilme yeteneği gibi kazanımlara sahip kılcal elektroforez yöntemleri (Yılmaz ve ark., 1999) ise oldukça pahalı sistemlerdir ve bu nedenle de günlük laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanıma olanağı bulamamaktadır. Bu çalışma ile DNA moleküllerinin ayırımında, daha kolayca uygulanabilen ve değerlendirmeyi kendiliğinden yapabilen ve de düşük maliyetle edinilebilecek bir cihaz geliştirilmiştir.

DNA' nın incelenmesinde (özellikle DNA ardışıklamada) yaygın olarak kullanılan ve iyi bilinen jel elektroforezleri, sonuçların değerlendirilmesinde otomatik süreçleri kullanan kılcal elektroforezlere göre daha başarısız bulunmaktadır (Mitchelson ve ark., 2001). Jel elektroforezinde de benzer şekilde, sonuçların değerlendirilmesi ve standart ayırma ortamlarının kullanılması ile hem maliyetler azalabilir ve hem de sonuçların daha sağlıklı ve kolay değerlendirilebilmesi mümkün olabilir. Bu anlamda, bu çalışma ile bilgisayar programı sayesinde, sonuçları dışarıdan müdahale olmaksızın değerlendirebilecek bir elektroforez sisteminin geliştirilmesine gayret edilmiştir. Kanserojen olan etidyum bromür yerine DNA moleküllerinin floresans vermesinde SYBR Green I boyasının kullanılması da iş güvenliği açısından önemli yararlar sağlamaktadır.

DNA parmakizi çalışmalarında çizge temelli veriler, geleneksel bant temelli yöntemlerle elde edilenden daha kullanışlıdır ve daha bilgilendiricidir (Ferris ve ark., 2004). Bu çalışma için özel olarak yazılan bilgisayar programı sayesinde, elektriksel verilerin, sayısal veriler halinde bilgisayar ekranında çizge olarak sunulabilmesi, geleneksel elektroforez yöntemlerine nazaran daha kullanışlı ve bilgi verici olabilir. Bu yöntem, bant biçemlerinin (pattern), hem kendiliğinden hem de daha duyarlı bir şekilde değerlendirilebilmesini sağlayabilir. Bu amaçla programa biçem yorumlayıcı bir kısmın eklenmesi uygun olabilir.

Kılcal elektroforezde kullanılan ve ışık-ölçerli (fotometrik) saptayıcıların tasarımıındaki zorluklar, ışığın 100µm' den daha küçük kılcallardan etkili bir şekilde geçirilmesinde ortaya çıkmaktadır. Işğın, değeriinden bir şey kaybetmeden, okuyucuya kadar ulaşabilmesi için odaklanması gerekebilmekte bunun için de düzeneğ'e ek olarak lenslerin yerleştirilmesi kaçınılmaz olmaktadır. Bu ek bileşen, cihazın taşınabilirliği gibi bazı sorunları da beraberinde getirmektedir. Ayrıca, ışık kaynağının uzun süre değışmeden kalması da önemlidir. Bu nedenle de kılcal elektroforezlerde, parlak LED' lerin, ışıldiyotlarla beraber, odaklanmaya gerek kalmadan etkin bir şekilde kullanılabileceğı gösterilmiştir (Butler ve ark., 1997). Bu çalışmada da LED' lerin (5V, 105mW, 468nm) jel elektroforez sistemleri için bir ışık kaynağı olabileceğı gösterilmiştir. Ayrıca, okuyucu olarak ışıldiyot yerine ışıldirençlerin kullanılması, bu tür bir saptayıcıya, herhangi başka bir elektroforez sisteminde rastlanmamış olması da bu çalışmanın özgünlüğünü ortaya koyması bakımından önemlidir. LED ve LDR' nin jel elektroforez sistemlerinde, uygun bir düzenekte bir araya getirilmesinin, yukarıda bahsedilen zorlukların aşılması konusunda, bir katkı sağlayabileceğı düşünülmektedir.

Kılcal elektroforez, yüksek çözme gücü ve az örnekle çalışabilmeye imkan vermesi bakımından DNA moleküllerinin ayırımında önemli bir yöntemdir (Odate ve ark., 1998). Bu çalışma ile yaklaşık 0,025ng DNA moleküllerinin ayırt edilebilmesi mümkün olablmıştır. Daha küçük miktarlardaki DNA moleküllerinin saptanmasında başarılı olunamamıştır. Sinyal yükseltici elektronik donanımlar eklenerek ve/ veya lazer gibi daha güçlü ışık kaynakları ile bu sistemde daha az DNA örneğinin bile saptanabilme olanağı elde edilebilir.

İki değerlikli artı yüklü elementler, DNA moleküllerinin yüksüzleştirilmesinde etkilidir ve bu nedenle de DNA' nın jel elektroforezindeki göçünü azaltıcı yönde etkili olur. Elektroforezde kullanılan TBE, sistemi kısmen yüksüzleştirir. Tris, borat ve EDTA' nın bu yük dengesi, tamponun molar derişimi, pH ve sıcaklık gibi birkaç etkene bağımlıdır (Li ve ark., 1998). Tamponların, DNA moleküllerinin göçünü etkileyen bu özelliği dikkate alındığında bu çalışmada yer alan tamponun, alt ve üst kaplar arasında, sürekli olarak dolandırılması gerekli olabilir. Zira, yüklü elementler, bir uçtan diğerine akabilir ve elektroforezin başındaki göç hızıyla ilerlemiş zamanlardaki göç hızı aynı olmayabilir.

Jellerin yapısı, sıcaklık, nem ve diğer çevresel etmenlere bağılı olarak değişebilir. Özellikle, aynı anda dökülmüş ve aynı çevresel koşullara maruz bırakılmış jellerle yapılan elektroforezde DNA moleküllerinin göçünün aynı oranda olması beklenir (Li ve ark., 1998). Bu bağlamda, bu çalışmayı temel alan ve ürüne dönüşen bir elektroforez sisteminde, aynı koşullarda hazırlanmış; aynı koşullarda saklanmış ve taşınmış jel ve tamponlarla standart laboratuvar çalışmaları gerçekleştirilebilecektir. Bu da moleküler mikrobiyolojik tanı gerçekleştiren laboratuvarlar arasındaki standartlaşmanın geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

Geleneksel yatay ve dikey jel elektroforezlerinde kullanılan tampon miktarı (150 ml), bu çalışmada kullanılandan (toplam 80ml) çok daha fazladır. Kullanılan jel miktarı da kalıp jellere göre çok daha azdır. Bir cam boruya yaklaşık 2,5ml jel gerekirken normal bir kalıp jel için- ki buna da en fazla 13 örnek yüklenebildiği düşünüldüğünde örnek başına yaklaşık- bu miktar 3ml' dir. Ancak kalıp jelde eğer tek bir örnek yüklenecekse, yine toplam miktar kadar yani 40ml gibi bir jel harcanması gerekecektir.

Agaroz jellerin poliakrilamid olanlara kıyasla daha fazla zemin ışıması vermesi nedeniyle ve iki kap arasına yerleştirildiğinde elektriksel akımın yeterince olmayışı (mA düzeyinde dahi ölçülemedi.) nedeniyle bu çalışmada kullanılamaması bu tür jellerin bu tür bir sistemde kullanımına ilişkin kısıtlılıklardandır. Bu çalışmada poliakrilamid jeller ile iyi sonuç alınmıştır. Başka polimerler denenerek bu cihaza uygun daha iyi ayırıcı sistemler geliştirilebilir. Cam borular içeirisine farklı

derişimlerde jel dökülebilmesinin mümkün olması, dereceli poliakrilamid jel elektroforez yöntemlerinin uygulanabilirliğine de katkı sağlayabilecektir.

Bu çalışmada elde edilen çizgelerin düzensiz titreşimlere sahip olması çözüm bekleyen bir sorundur. Bu sorun, sinyal çevirici kutuya gelen elektrik şehir şebekesindeki düzensiz iniş çıkışlardan kaynaklanıyor olabilir. Bu düzensizlikleri en aza indirecek gerilim düzenleyicilerin bu kutuya yerleştirilmesi bu soruna çözüm getirmede yarar sağlayabilir. Ayrıca, programlanabilir özel kartlarla, elektronik katkılar sağlanarak, bu başarısız titreşimler düzenli çizgiler halinde sunulabilir. Hatta, okuyucudan alınan elektriksel veriyi güçlendirerek bilgisayar verisi haline dönüştürecek bir elektronik donanım, ısı-diyotların ısı-dirençlerle elde edilenden belki de daha başarılı sonuçların elde edilmesine yardım edebilir.

Farklı mesafelerde yerleştirilebilecek okuyucularla, bir borudan aynı anda elde edilebilecek farklı çizgeleri, özel bir program ile birleştirerek değerlendirebilecek sistemlerin geliştirilmesi, jelin derişimini derecelendirmeyi gereksiz hale getirebilecektir.

Aynı anda altı kanaldan birden okuma yapabilecek bir elektroforez sisteminin bu ön tasarımı, birim zamanda daha çok elektroforez yapılmasını olanaklı kılabilceği için tanı laboratuvarlarına zaman bakımından önemli bir katkı sağlayabilecektir. Bu sayı istendiği takdirde arttırılabilir.

Jel elektroforezi, jel ve tampon çözeltilerin hazırlanması; EtBr gibi zararlı kimyasallarla güvenli çalışmaların yapılabilmesi için yetişmiş elemanın bulundurulması; sonuçların ancak bir uzman varlığında değerlendirilebilecek olması gibi zorluklar nedeniyle, tanı laboratuvarlarında günlük kullanıma girebilmiş değildir. Bu çalışma ile geliştirilen cihaz, hazır tampon ve jel ve EtBr' e göre daha zararsız boyaların kullanılabilecek olması; ayrıca kendiliğinden değerlendirme yapabilen sistemlerin hayata geçirilebilmesi ve üstelik de bunların kılcal elektroforez sistemlerine göre çok daha ucuza üretilebilecek olması nedeniyle moleküler mikrobiyolojik tanı yapan laboratuvarlara önemli bir katkı sağlaması beklenmektedir.

6.SONUÇ

Jel elektroforezinin geleneksel kullanımının zahmetli ve uzmanlık isteyen uygulamalarına; mikro-ölçekli elektroforez sistemlerinin kolay uygulanabilir ve otomatik değerlendirme yeteneğine karşın yüksek maliyetli oluşuna seçenek oluşturan, jel elektroforez temelli ve fakat kendiliğinden değerlendirme yapabilen, ucuza mal edilebilen bir cihazın ön-tasarımı gerçekleştirildi.

Işık kaynağı olarak LED' lerin okuyucu olarak da LDR' nin uygun düzenek içerisinde yerleştirilmesi ve bunlardan elde edilen elektroforez sonuçlarını göstermesi bakımından özgün bir çalışma gerçekleştirildi.

Bu cihazla gerçekleştirilecek elektroforezde kullanılan jel ve tampon çözeltiler gibi sarf malzemelerinin, belirli hazırlanma, taşınma ve saklanma koşulları ile standart hale getirilebilmesi ve böylece DNA moleküllerinin jel içerisindeki göçünü etkileyebilecek dış çevre etkenleri en aza indirilmektedir.

Geliştirilen bu sistem, aynı anda birçok kanaldan okuma alabilecek olması bakımından, özellikle tanı laboratuvarlarında birim zamanda daha fazla elektroforez yapılabilmesini sağlayabilecek ve böylece uygulayıcılarına büyük kolaylıklar sağlayabilecek bir sistemdir.

KAYNAKLAR

Yayınlar

1. Allet B. P, Jeppesen G. N, Katagiri K. J, Delius H. Mapping the DNA fragments produced by cleavage of λ DNA with endonuclease RI, *Nature*, 1973, 241, 120
2. Ashton R, Padala C, Kane R. S. Microfluidic separation of DNA, *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14, 497-504
3. Bai J, Liu Y. H, Lubman D. M, Siemieniak D. Matrix-assisted laser-desorption ionization mass-spectrometry of restriction enzyme-digested plasmid DNA using an active nafion substrate, *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, 1994, 8, 687-691
4. Barbier V, Viovy J-L. Advanced polymers for DNA separation, *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14, 51-57
5. Butler P. A. G, Mills B, Hauser P. C, Capillary Electrophoresis Detector Using a Light Emitting Diode and Optical Fibres, *Analyst*, 1997, 122, 949-953
6. Chou Hou-Pu, Charles S, Axel S, Stephen Q. A microfabricated device for sizing and sorting DNA molecules, *Applied Physical Sciences/ Biophysics*, 1999, 96 (1), 11-13
7. Chu B, Liang D. Copolymer solutions as separation media for DNA capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 2002, 966, 1-13
8. Çelebi G. Biyofizik, Cilt 1, 1. Baskı, Çağlayan Kitabevi, 1989, 57-65
9. Diggle C. P, Bentley J, Kiltie A. E. Development of a rapid small-scale DNA repair assay for use on clinical samples, *Nucleic Acids Research*, 2003, 31, e83

10. Doherty E, Berglund K, Buchholz B, Koukine I, Przybycien T, Tilton R, Baron A. Critical factors for high-performance physically adsorbed(dynamic) polymeric wall coatings for capillary electrophoresis of DNA, *Electrophoresis*, 2002, 23, 2766-2776
11. Duke T, Semenov A. N, Viovy J. *Phys. Rev. Lett.*, 1992, 69, 3260-3263
12. Duke T, Viovy J., Semenov A. N. *Biopolymers*, 1994, 34, 239-247
13. Ferris, M. M, Yan X, Habbersett R. C, Shou Y, Lemanski C. L, Jett J. H, Yoshida T. M, Marrone B. L, Performance Assesment of DNA Fragment Sizing by High-Sensitivity Flow Cytometry and Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (5), 1965-1976
14. Figeys D, Dovichi N. J. Multiple Separations of DNA sequencing fragments with a non-cross-linked polyacrylamide-filled capillary: capillary electrophoresis at 300V/ cm, *J. Chromotogr. A*, 1995, 717, 113-116
15. Fister J. C, Jacobson S. C, Davis L. M, Ramsey J. M. Counting single chromophore molecules for ultrasensitive analysis and separations on microchip devices, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 431-437
16. Gao Q. F, Yeung E. S. A matrix for DNA separation: genotyping and sequencing using poly(vinylpyrrolidone) solution in uncoated capillaries, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 1382-1388
17. Gözükar E. M. *Biyokimya I, Dördüncü Baskı, Nobel Tıp Kitabevi*, 2001, 290-310
18. Haab B. B, Mathies R. A. Optimization of single-molecule fluorescence burst detection of dsDNA: application to capillary electrophoresis separations of 100-1000 basepair fragments, *Appl. Spectrom.*, 1997, 51, 1579-1584

19. Haab B. B, Mathies R. A. Single-molecule detection of DNA separations in microfabricated capillary electrophoresis chips employing focused molecular streams, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 5137-5145
20. Han J. Y, Craighead H. G. Separation of long DNA molecules in a microfabricated entropic trap array, *Science*, 2000, 288, 1026-1029
21. Han J. Y, Craighead H. G. Characterization and optimization of an entropic trap for DNA separation, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 394-401
22. Hasçelik G. Ankara Mikrobiyoloji Derneği ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Program ve Bildiri Özet Kitabı, 28 Haziran-1 Temmuz 2004,. Türkiye’de Moleküler Testlerin Güncel Durumu, 31
23. Heiger D. N, Cohen A. S, Karger B. L. *J. Chromatogr.*, 1990, 516, 33-48
24. Hjerten S, Elenbring K, Kilar F, Liao J-L. *J. Chromatogr.*, 1987, 403, 47-61
25. Iwabuchi S, Muramatsu H, Chiba N, Kinjo Y, Murakami, Sakaguchi T, Yokoyama K, Tamiya E. Simultaneous detection of near-field topographic and fluorescence images of human chromosomes via scanning near-field optical/atomic-force microscopy (SNOAM), *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 1662-1663
26. Jin X, Dong F, Singer F. L. SYBR Green I nucleic acid gel stain provides a sensitive fluorescent method for detecting gel mobility shift products, *FASEB J.*, 1996, 10, A1128
27. Kiltie A. E, Ryan A. J. SYBR Green I staining of pulsed field agarose gels is a sensitive and inexpensive way of quantitating DNA double-strand breaks in mammalian cells, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25, 2945-2946

28. Lagane B, Treilhou M, Coudere F. Capillary electrophoresis: theory, teaching, approach, and separation of oligosaccharides using indirect UV detection, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2000, 28, 251-255
29. Leblebici D. Elektronik Elemanları, Seç Yayın Dağıtım, 75-80
30. Leonard D, Michael K, James B. Basic Methods in Molecular Biology, 2nd Edition, Appleton & Lange, 1994, 35-39
31. Li A. Z, Huang H, Re X, Qi L. J, Marx K. A. A Gel Electrophoresis Study of the Competitive Effects of Monovalent Counterion on the Extent of Divalent Counterions Binding to DNA, *Biophys J*, 1998, 74 (2), 964-973
32. Lindberg P, Righetti P. G, Gelfi C, Roeraade J. Electrophoresis of DNA sequencing fragments at elevated temperature in capillaries filled with poly(N-acryloylaminopropanol) gels, *Electrophoresis*, 1997, 18, 2909-2914
33. Lumpkin O. J, Dejardin P, Zimm B. H. Biopolymers, 1985, 24, 1573-1593
34. Magnusdottir S, Isambert H, Heller C, Viovy J-L. Electrohydrodynamically Induced Aggregation During Constant and Pulsed Field Capillary Electrophoresis of DNA, *Biopolymers*, 1999, 49, 385-401
35. McDonnell M. W, Simon M. N, Studier F. W. J. *Mol. Bio.*, 1977, 110, 119-146
36. Mitchelson K, Cheng J. Developments in capillary electrophoresis, *Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids*, 2001, 19 (8), 324
37. Odake T, Kitamori T, Sawada T. Ultrasensitive on-column detection of capillary electrophoresis using laser-induced capillary vibration method, *Analysis Magazine*, 1998, 26 (5), 41-44

38. Rengarajan K, Cristol S. M, Mehta M, Nickerson J, M. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores, *Mol. Vis.*, 2002, 8, 416-421
39. Sambrook J, Fritsch E. F, Maniatis T. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 1989, 6.2-6.62
40. Schneeberger C, Speiser P, Kury F, and Zeillinger R. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain, *PCR Methods Applications*, 1995, 4, 234-238
41. Schultz-Lockyear L, Colyer C, Fan Z, Roy K, Harrison D. Effects of injector geometry and sample matrix on injection and sample loading in integrated capillary electrophoresis devices, *Electrophoresis*, 1999, 20, 529-538
42. Semenov A. N, Duke T, Viovy J. *Phys. Rev. E.*, 1995, 51, 1520-1536
43. Slater G. W, Noolandi J. J. *Phys. Rev. Lett.*, 1985, 55, 1579-1582
44. Slater G. W, Noolandi J. *Biopolymers*, 1986, 25, 431-454
45. Stephenson F. H. *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology A guide to Mathematics in the Laboratory*, Applied Biosystems, Academic Press An imprint of Elsevier Science, 2003, 224-241
46. Swerdlow H, Gesteland R. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18, 1415-1419
47. Szeberenyi J. Problem-based Learning Restriction Mapping, *Biochemistry and Molecular Biology Education*,, 2002, 30 (4), 258-259
48. Temizkan G, Arda N. *Moleküler Biyoloji’ de Kullanılan Yöntemler*, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi Yayın No:1, 1999, 34-41

49. Thomas M., Davis R. W. Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with EcoRI restriction endonuclease, *J. Mol. Biol.*, 1975, 91, 315
50. Van Baar, B. L. M. Characterization of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ ionization and electrospray mass spectrometry, *FEMS Microbiol.*, 2000, 24, 193-219
51. Vitzthum F, Bernhagen J. SYBR Green I: an ultrasensitive fluorescent dye for double-stranded DNA quantification in solution and other applications, *Recent Res. Devel. Anal. Biochem.*, 2002, 2, 65-93
52. Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a Standard ultraviolet transilluminator gel imaging system, *Analytical Biochemistry*, 1999, 276, 59-64
53. Yılmaz S, Cengiz S. Capillary gel electrophoresis of PCR products of HLA DQA1. *Cerrahpaşa J Med*, 1999; 30 (3): 221-227
54. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic Acids Reseach*, 2004, 32 (12)

Genelağ (İnternet) Sayfaları

1. <http://a32.lehman.cuny.edu>
2. <http://en.wikipedia.org/wiki/LED>
3. <http://www.nationaldiagnostics.com>
4. <http://patdhai.media.mit.edu:8080>

5. <http://piercenet.com>
6. <http://silisyum.net/htm/diyotlar>
7. <http://sunLED.com>
8. <http://udt.com>

ÖZGEÇMİŞ

Erkan Mozioğlu, 1980 yılında İstanbul’ da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul’ da tamamladı. 19 Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nden 2002 yılında mezun oldu. Bağcılar Merkez Sağlık Ocağı Biyokimya Deneyliği, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü İmmünogenetik Deneyliği’ nde yetişmen olarak görev aldı. Bazı bilimsel toplantılarda; Deniz Bakteriyolojisi 2004, “*Türkçe Bilim Terimleri’ nin Oluşturulması, Geliştirilmesi Ve Yaşatılması Üzerine*”; 5. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu 2004, “*Tüberküloz Ön Tanısı Almıs Hastalardan Alınan Klinik Örneklerin Mikroskopi Ve Kultur Oncesi Islenmesinde, Dekontaminasyon Ve Konsantrasyon Kiti Mycoprosafe’ in Etkinliği*” başlıklı bildirileri sundu. Yabancı dil olarak İngilizce bilmektedir.