
MOLEKÜLER BİYOLOJİ LABORATUVARI

FÖYÜ

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER
BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

2025-2026 BAHAR

Dersin Sorumluları

Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Öğr. Gör. Dr. Munise YURTSEVER

Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR

Laboratuvar Yürütücüleri

Arş. Gör. Dr. Emrah BERTAN

Arş. Gör. Senanur DOKUZ

Arş. Gör. Hasan Hüseyin GÜLERCAN

HAFTALIK KONULAR

Hafta	Konular	Ön Hazırlık
1	Moleküler Biyoloji Laboratuvar Donanımının Tanıtılması, , Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
2	DNA İzolasyonu ve DNA'nın Kalitatif, Kantitatif Değerlendirilmesi	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
3	Agaroz Jelden Pürifikasyon ve Jelde Kontrol	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
4	Restriksiyon Endonükleaz Kesimi, Ligasyon, Transformasyon	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
5	Plazmid DNA İzolasyonu	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
6	Total RNA İzolasyonu, RNA'nın Kalitatif, Kantitatif Değerlendirilmesi	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
7	cDNA Sentezi ve qPCR	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
8	Ara Sınav 1	
9	Bitkiden Total Protein İzolasyonu	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
10	Protein çözeltilisinin konsantre edilmesi, saflaştırma ve miktar tayini	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
11	SDS-PAGE	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
12	Western Blotlama-1	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
13	Western Blotlama-2	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
14	Telafi Deneyleri	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
15	Telafi Deneyleri	YTÜ MBG Moleküler Biyoloji Laboratuvar föyü
16	Final	

2025-2026 Bahar Yarıyılı Moleküler Biyoloji Laboratuvarı Deneyleri Not Katkı Dağılımı

Hafta	Tarih	Konular	Hazırlanacak Rapor No	Rapor notunun ders notuna katkısı
1	24.02.2026 (Grup 1) 27.02.2026 (Grup 2-3)	Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme DNA İzolasyonu ve DNA'nın Kalitatif, Kantitatif Değerlendirilmesi	1	% 4
2	03.03.206 (Grup 1) 06.03.2026 (Grup 2-3)	Jelden Pürifikasyon ve Jelde Kontrol	2	% 4
3	10.03.2026 (Grup 1) 13.03.2026 (Grup 2-3)	Restriksiyon Endonükleaz Kesimi, Ligasyon, Transformasyon	3	% 4
4	16-20 Mart	RAMAZAN BAYRAMI		
5	24.03.2026 (Grup 1) 27.03.2026 (Grup 2-3)	Plazmid DNA İzolasyonu	4	% 4
6	31.03.2026 (Grup 1) 03.04.2026 (Grup 2-3)	Total RNA İzolasyonu	5	% 4
7	07.04.2026 (Grup 1) 10.04.2026 (Grup 2-3)	cDNA Sentezi ve qPCR	6	% 4
8	13-18 Nisan	Ara Sınav 1		% 20
9	21.04.2026 (Grup 1) 24.04.2025 (Grup 2-3)	Bitkiden Total Protein İzolasyonu	7	% 4
10	1 Mayıs	TATİL		
11	05.05.2026 (Grup 1) 08.05.2026 (Grup 2-3)	Protein Çözeltilisinin Konsantre Edilmesi, Saflaştırma ve Miktar Tayini	8	% 4
12	12.05.2026 (Grup 1) 15.05.2026 (Grup 2-3)	SDS-PAGE	9	% 4
13	19 Mayıs	TATİL		
14		KURBAN BAYRAMI		
15	02.06.2026 (Grup 1) 05.06.2026 (Grup 2-3)	Western Blotlama	10	% 4
16	8-12 Haziran	TELAFİ DENEYLERİ		

LABORATUVARDA ÇALIŞMA KURALLARI

Çalışmalarınızı etkili ve başarılı bir şekilde yürütebilmek için laboratuvarda çalışma kurallarını bilmeniz, laboratuvar araçlarını tanımanız ve onları en verimli şekilde kullanmanız, bunun için gerekli beceriyi kazanmanız gerekmektedir.

Laboratuvar çalışmalarında uyulması gereken başlıca kuralları şöyle sıralayabiliriz:

1. Laboratuvara gelmeden önce yapacağınız deneyle ilgili teorik ve pratik bilgileri okuyunuz. Böylece deney saatinin tümünü deney yapmaya ayırabilirsiniz.
2. Mutlaka laboratuvar önlüğü giyiniz. Saçlarınız uzun ise toplamalısınız.
3. Laboratuvar araçlarını kullanırken düşürmemeye ve çarpmamaya dikkat ediniz. Malzemeleri kullandıktan sonra kirli bir şekilde kurumalarına izin vermeden deterjan ile iyice yıkayınız.
4. Çalışmanın sonunda çalışma alanını temizleyiniz.
5. Kullandığınız araç-gereçleri yerlerine koyunuz.
6. Steril metod gerektiren deneylerde çalışırken bulaşmalardan sakınınız ve gerekli önlemleri alınız.
7. Bistüri ve jilet gibi kesici aletleri kullanırken dikkatli olunuz.
8. Atıklarınızı kurallar doğrultusunda doğru kaplara doğru şekillerde atınız.
9. Laboratuvarda bir şey yiyip içmeyiniz ve bulundurmayınız.
10. Çalışmalardan sonra ellerinizi sabunla yıkayınız.
11. Amonyak, eter, kloroform, alkol vs. gibi zehirli ve uçucu maddeleri kullanırken kapların ağzını hemen kapatınız.
12. İçinde kimyasal bulunan kaplara yüzünüzü yaklaştırmayınız.
13. Çalışmalarınızda tutumlu olunuz, ekonomik davranınız. Kırıp dökme ve israftan kaçınınız.
14. Tehlikeli maddeleri lavaboya dökmeyiniz.
15. Bir laboratuvar defteri tutunuz. Deney sırasında yaptığınız işlemleri, elde ettiğiniz verileri bu deftere kaydediniz. Deneylerin sırasını, başlığını, amacını, gereçlerini, gözlem ve ölçmelerini, yorumunu, varılan sonuç ve genellemeleri yazınız. Gerekli durumlarda bulgularınızı çizim ve tabloya dönüştürünüz.

ÖRNEK RAPOR KAPAĞI TASARIMI

	YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ MBG2132 MOLEKÜLER BİYOLOJİ 1 LABORATUVARI SONUÇ RAPORU 2024-2025 BAHAR DÖNEMİ	
---	---	---

Western Blotting

DENEY SORUMLUSU Öğretim Üyesi:

DENEY SORUMLUSU Araştırma Görevlisi:

RAPOR TESLİM TARİHİ:

DENEY GRUBU:

Öğrencinin Adı – Soyadı	Öğrencinin Numarası	Öğrencinin İmzası

Laboratuvar Raporu Değerlendirme Şeması

Rapor Kısmı	Değerlendirme Puanı
Kapak Tasarımı	10
Yazım Kurallarına Uygunluğu	10
Giriş	10
Materyal-Metod	10
Deney Verileri ve Çizim	20
Sonuç ve Tartışma	30
Kaynakça	10
Toplam	100

Dönem Sonu Not Değerlendirme Dağılımı

Laboratuvar Raporu	% 40 (Her bir rapor %4)
Ara sınav	%20
Final	%40

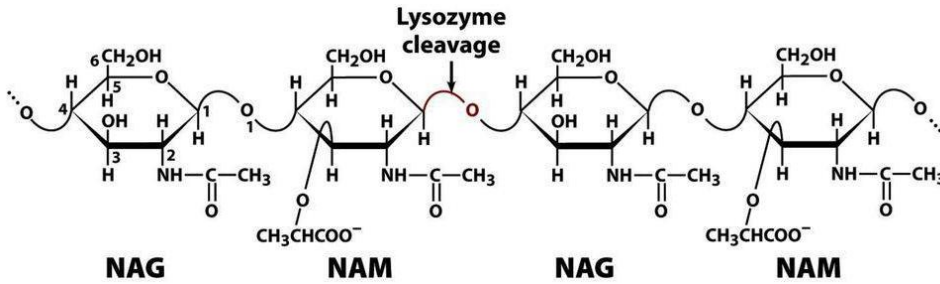
DENEY 1

DNA İZOLASYONU VE DNA'NIN KALİTATİF, KANTİTATİF DEĞERLENDİRİLMESİ

Genomik DNA izolasyonu; PCR, qPCR, restriksiyon enzimleriyle kesim, dizileme, DNA parmak izi analizi, genomik DNA kütüphanelerinin hazırlanması, RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), "Southern blotting", DNA-protein etkileşimlerinin incelenmesi çalışmalarının ilk basamağı durumundadır. Saflaştırma işleminde uygulanacak olan protokol belirlenirken, DNA'nın kullanılacağı uygulamanın hangi miktarda ve saflıkta DNA gerektirdiği bilinmelidir. Ayrıca bazı *Escherichia coli* suşları (HB101) DNA ile birlikte saflaştırılabilecek yüksek molekül ağırlıklı karbonhidratlar içerdiğinden, kullanılacak suşun genotipi incelenerek bu materyalleri elimine edebilecek özellikte protokollerin seçilmesi gerekmektedir.

DNA izolasyonunda amaç total DNA'nın RNA ve proteinlerden ayrılarak elde edilmesi olup, izolasyon işlemi hücrelerin parçalanması, proteinlerin ve diğer kontaminantların uzaklaştırılması ve DNA'nın presipite edilmesi (çöktürülmesi) olmak üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır.

Bakteri DNA' sı kromozomal veya ekstrakromozomal DNA oluşuna göre farklı yöntemlerle izole edilir. Kromozomal DNA'nın izolasyonundaki ilk basamak bakteri ve hücre duvarının zayıflatılmasıdır. Bu dondurup çözme gibi fiziksel bir yolla yapılabildiği gibi bakteri hücre duvarını parçalayan lizozim kullanılmasıyla da yapılabilir. 37°C sıcaklıkta, uygun besiyerinde büyütülen bakteriler belirli bir optik yoğunluğa (logaritmik fazın sonları) ulaştıklarında düşük hızda santrifüjleme yapılarak çöktürülür. Hücre bütünlüğünün fiziksel (sonikasyon, sıvı azot kullanılarak ezme, vb.) ya da kimyasal yöntemler (enzim, EDTA, deterjan) kullanılarak bozulmasıyla hücre özütü hazırlanır. Bakteriden DNA izolasyonunda genellikle SDS ve proteinaz K içeren lizis solüsyonu kullanılarak kimyasal yöntemlerle parçalama tercih edilmektedir. Peptidoglikan tabakanın daha kalın olduğu Gram (+) bakterilerde lizis solüsyonu içerisine lizozim enzimi de eklenmektedir. Bakteri hücre duvarı polisakariti N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) şekerlerinden oluşur. Lizozim enzimi NAM ve NAG arasındaki 1-4 glikozidik bağı parçalar (Şekil 1).



Şekil 1. Lizozim enziminin hücre duvarına etkisi

Elde edilen hücre özütünden DNA'nın saflaştırılmasında organik özütleme ya da iyon değiştirme kromatografisi uygulanmaktadır. Organik solventler olan fenol ve kloroform proteinlerin denatüre olarak ara fazda kalmasıyla üst fazdaki DNA'dan uzaklaşmasını sağlamaktadır. Anyon değiştirme kromatografisinde ise silika jel partikülleri kullanılarak hazırlanmış kolonlara tuz konsantrasyonu yüksek tampon aracılığıyla DNA'nın bağlanması ardından, protein, lipid veya diğer metabolitler yıkama ile uzaklaştırılmaktadır. Sulu çözelti içinde bulunan DNA tuz varlığında (amonyum asetat, sodyum asetat, lityum klorür ya da sodyum klorür) alkol (absolut etanol ya da isopropanol) kullanılarak presipite edilir. %70 etanolle yapılan yıkama sonrasında tuzlar uzaklaştırılır ve izole edilen DNA TE tamponu içinde çözülerek uzun süre stabil olarak saklanır.

Materyal

E. coli DH5 α suşu, Luria Bertani (LB) besiyeri pH 7, Tris-EDTA tamponu (TE) pH 8.0, %10 sodyum dodesil sülfat (SDS), Proteinaz K (20 mgml⁻¹), Fenol/kloroform (1:1), 3M sodyum asetat, pH 5.2, izopropanol, %70 etanol, 1.5 ml örnek tüpü, santrifüj, termal blok, pipetler.

Metot

1. 5 ml LB besiyerine tek koloniden ekim yapılır ve 200 rpm hızda 37°C'de bir gece boyunca üretilir.
2. Bir gecelik 5 ml bakteri kültürünün 1.5ml'si 10.000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.
3. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 500 μ l TE tamponunda süspanse edilir.
4. Süspansiyona 50 μ l SDS ve 25 μ l proteinaz K eklenir, birkaç defa alt üst edilerek karıştırılır ve 55°C'de 20 dakika bekletilir.
5. Karışıma 575 μ l fenol/kloroform (1:1) eklenir, homojen hale gelinceye kadar nazikçe alt üst edilerek karıştırılır.
6. 10 dakika 10.000 rpm hızda santrifüjlenir.
7. 500 μ l üst faz dikkatlice temiz bir tüpe aktarılır ve üzerine 500 μ l fenol/kloroform (1:1) eklenir.
8. Homojen hale gelinceye kadar nazikçe alt üst edilerek karıştırılır ve 10 dakika 10.000 rpm hızda santrifüjlenir.
9. 500 μ l üst faz dikkatlice temiz bir tüpe aktarılır, üzerine 50 μ l sodyum asetat eklenir ve nazikçe karıştırılır.
10. 330 μ l izopropanol eklenir, tüp alt üst edilerek yavaş şekilde karıştırılırken DNA'nın iplikçikler şeklinde çökelediği görülebilir.
11. 10 dakika 14.000 rpm hızda santrifüjleme ile DNA'nın çöktürülmesi sağlanır.

12. Çökelti üzerine 100 µl %70 etanol eklenerek DNA yıkanır ve pipet ucu ile DNA'ya dokunmadan alkolün uzaklaştırılması sağlanır.
13. Tüpün ağzı 10-15 dakika oda sıcaklığında açık bırakılarak alkolün tamamen uçurulması sağlanır.
14. Çökelti üzerine 50-100 µl TE tamponu eklenir ve parmakla yavaşça vurularak DNA'nın çözünmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C'da uzun süre saklanabilir (2,5).

AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ

Genel tanımı ile **elektroforez**; çözünmüş haldeki makromoleküllerin elektriksel alan yardımı ile iki farklı kutup arasında elektrik yüklerinin kütlelerine oranına bağlı olarak göç etmelerine ve buna bağlı olarak birbirlerinden ayrılmasına dayanan bir yöntemdir. Proteinler, peptidler, nükleik asitler gibi makromoleküller çözeltide anyon veya katyon olarak bulunurlar. Net yüke bağlı olarak, uygulanan elektriksel alan sayesinde anoda ya da katoda doğru hareket ederler. Elektroforezde kullanılacak destek ortamı agaroz jel olursa buna agaroz jel elektroforezi adı verilir. *Agar agar* isimli bir algden izole edilen bir polisakkarittir. Agaroz ısıtılınca suda çözünüp, soğutulunca jelleşen bir polimerdir. Agarozun farklı konsantrasyonlarda hazırlanmasıyla farklı büyüklükte gözenekler elde edilir ve böylece ayrılması istenen molekül kolayca ayrılır.

Agaroz jel nükleik asitlerin tanımı, ayrıştırılması ve saflaştırılmasında yaygın şekilde kullanılmaktadır.

Agaroz jelde DNA'nın hareketini etkileyen faktörler;

- DNA'nın molekül büyüklüğü,
- Agaroz konsantrasyonu,
- DNA'nın konformasyonu,
- Uygulanan voltaj,
- Sıcaklık,
- Tampon'dur.

Materyal

Elektroforez tankı, Agaroz, 5XTBE tamponu pH:8.0, Etidyum Bromid, DNA örneği, Erlenmayer, Mikropipetler, Marker DNA.

Agaroz Jelin Hazırlanması (Şekil 2)

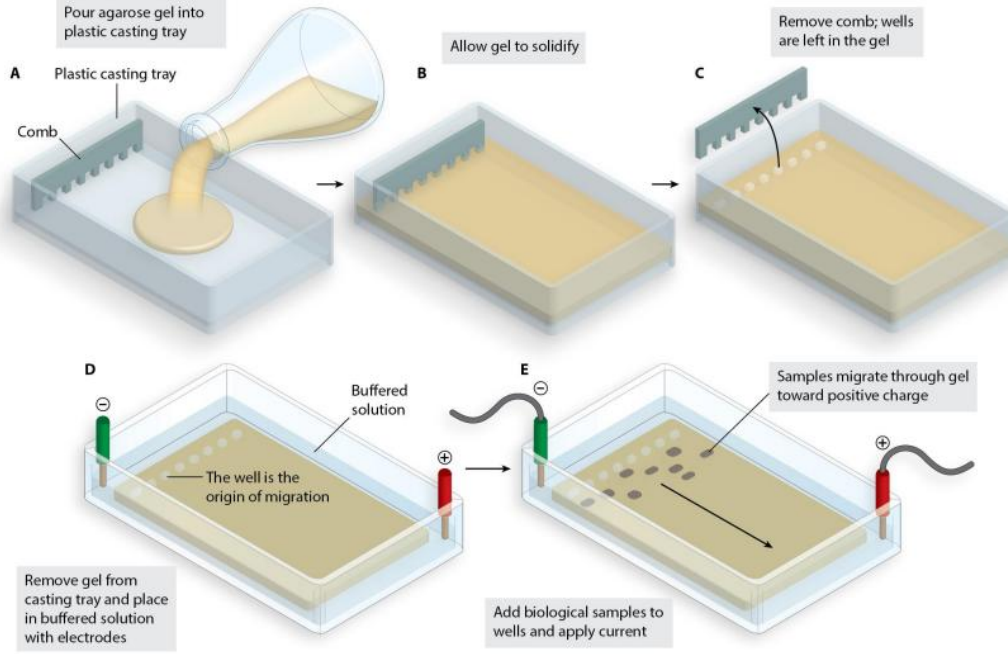
50 ml %1'lik agaroz jel hazırlamak için;

100 ml 1 gram agaroz varsa

50 ml X gram

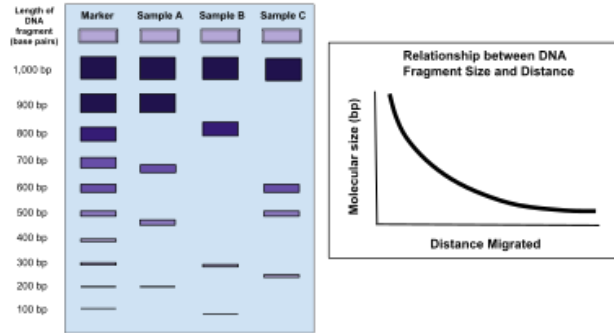
X=0,5 gram agaroz tartılır.

50 ml TBE tamponu içerisinde ısıtılarak çözülür. Tam olarak eridikten sonra 40-45 dereceye kadar soğutulur. 2,5 mikrolitre EtBr eklenir. Jel kasete dökülür. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir.



Şekil 2. Agaroz Jelin Hazırlanması

Sonuçların Yorumlanması



Şekil 3. Sonuçların Yorumlanması

DNA'nın Kantitatif Analizi

Nükleik Asit ve Proteinlerin Saflık Ölçümü Nükleik Asit (DNA, RNA) örnekleri 260nm, Proteinler 280 nm dalga boylarında maksimum absorbansa sahiptir. Bu iki dalga boyunda elde edilen absorbanların oranı bize 'saflık' derecesini verir. Benzer şekilde 230nm dalga boyunda elde edilen absorbanlar 'kontaminasyon' olarak kabul edilir. Nükleik Asitler için saflık değerini 260/230 oranı verir. Beklenen saflık değeri; DNA ölçümleri için: ~ 1,8, RNA ölçümleri için: ~ 2,0 kabul edilir.

260/230 Oranı Düşük ise: Numune veya ekstraksiyon prosedüründeki bir hatayı gösterir. 230 nm'de nükleik asit kontaminasyonu vardır. Örnek: Eğer dsDNA için ölçüm yapılıyorsa RNA kontaminasyonu bulunabilir.

Düşük 260/230 Oranının Sebepleri:

- Karbonhidrat taşınması (genellikle bitkilerde görülür)
- Ekstraksiyon aşamasında 'Fenol' atığı
- 'Guanidin' atığı (genellikle kolon bazlı kitlerde bulunur)
- Çöktürme için kullanılan 'Glikojen'

260/280 Oranı Düşük ise: Protein veya fenol kontaminasyonu olduğunu gösterir.

Materyal

NanoDrop cihazı, DNA örneği (saflaştırılmış), Saf su (Blanking için)

Metot

Cihazın Hazırlanması:

- NanoDrop cihazını açın ve yazılımını çalıştırın.
- Yazılımda dsDNA (double stranded DNA) modunu seçin.

Boş Ölçüm (Blanking):

- Cihazın ölçüm platformuna 1 µL saf su damlatın.
- Kolonu kapatın ve "Blank" butonuna tıklayın. Bu adım, cihazın sıfırlanması için gereklidir.

DNA Numunesinin Ölçümü:

- Blanking işleminden sonra platformu saf su ile temizleyin.
- 1 µL DNA örneğinizi cihazın platformuna damlatın.
- Kolonu kapatın ve "Measure" butonuna tıklayın.

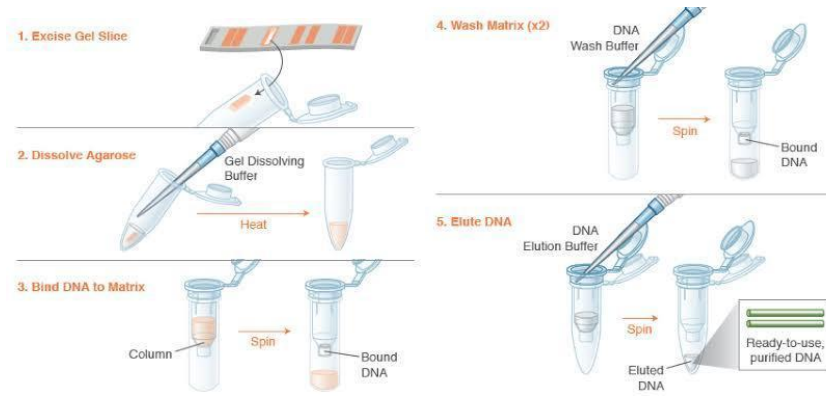
Sonuçların Yorumlanması:

- Konsantrasyon (ng/µL): DNA konsantrasyonunu doğrudan gösterir.
- Saflık Oranları (260/280 ve 260/230):
 - 260/280 oranı: ~1.8 → Saf DNA kabul edilir.
 - 260/230 oranı: 2.0-2.2 aralığında olmalıdır.

DENEY 2

JELDEN PÜRİFİKASYON VE JELDE KONTROL

DNA, agaroz jelde yürütüldükten sonra geri kazanılmak istenebilir. Bu durumda uygulanması gereken belli protokoller vardır. Bunlardan bir tanesi fenol kloroform ile muameledir. Fenol ekstraksiyonu genellikle DNA ve RNA içeren solüsyonlardan protein ve restriksiyon enzimlerinin uzaklaştırılması için kullanılır. Fenol ve kloroform, proteinlerin sekonder yapısını parçalayarak onların denatüre olmasını ve solüsyonda çökmesini sağlarlar. Fenol ekstraksiyonu esnasında bu çökelen proteinler bir araya toplanarak sıvı ve organik fazlar arasında toplanırlar. Bu çözücülerin her biri tek başına bu fonksiyonu yerine getirme yeteneğine sahip olsa da ikisi birlikte proteinleri solüsyondan daha etkili bir şekilde uzaklaştırırlar. DNA pürifikasyonunda, fenolün pH'sı 7.0 ve üzerinde olmalıdır. pH 7.0'nin altında olursa DNA denatüre olur ve proteinlerle birlikte iki faz arasında yer alır [1]. Günümüzde DNA'nın agaroz jelden pürifikasyonu kitler sayesinde kolay ve hızlı biçimde gerçekleştirilebilmektedir. Bu işlem için ticari birçok ürün piyasada bulunabilmektedir. Jelden pürifikasyon temel birkaç basamaktan oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Jelden DNA pürifikasyonunda temel adımlar

Materyal

Elektroforez tankı, Agaroz, 5XTBE tamponu pH:8.0, Etidyum Bromid, DNA örneği, Erlenmayer, Mikropipetler, Marker DNA, Jelden pürifikasyon kit (Solüsyon II (yıkama solüsyonu), Solüsyon IV, Solüsyon III).

Metot

1. Agaroz jelden istenilen DNA bandı kesilir.
2. Jel bandının ağırlığı belirlenir. Jelin ağırlığının 3 katı kadar Solüsyon II(yıkama solüsyonu) eklenir. 60 °C'de jel tamamen eriyinceye kadar bekletilir.

3. Jel tamamen eridikten sonra üzerine 15-20 µl Solüsyon IV eklenir. Karışım 10 saniye alt-üst edilir, tamamen homojenize olması sağlanır. Homojenize olan karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
4. 4.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
5. Süpernatant atılır. Pellet üzerine 1000 µl Solüsyon III eklenir. Hafif vortekslenerek pelletin tamamen çözülmesi sağlanır.
6. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
7. Süpernatant atılır ve pellet oda sıcaklığında kurutulur.
8. Tekrar santrifüjleme, süpernatantı atıp pelleti çözündürme aşaması yapıldıktan sonra DNA bir sonraki aşama için hazır hale gelir.
9. -20 °C'de saklanır.

Jelde Kontrol

Jelden saflaştırılan DNA'nın tekrardan jele yüklenerek kontrolünün yapılmasıdır.

Materyal

Elektroforez tankı, Agaroz, 5XTBE tamponu pH:8.0, Etidyum Bromid, Saflaştırılmış DNA örneği, Erlenmayer, Mikropipetler, Marker DNA

Metot

50 ml %1'lik agaroz jel hazırlamak için;

100 ml 1 gram agaroz varsa

50 ml X gram

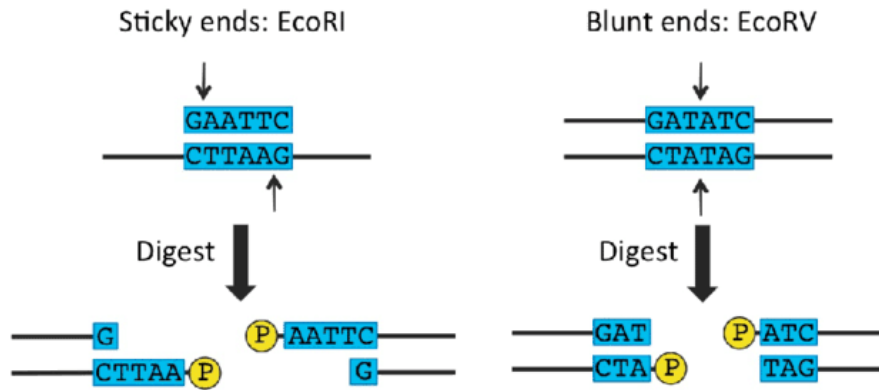
X=0,5 gram agaroz tartılır.

50 ml TBE tamponu içerisinde ısıtılarak çözündürülür. Tam olarak eridikten sonra 40-45 dereceye kadar soğutulur. 2,5 mikrolitre EtBr eklenir. Jel kasete dökülür. Hava kabarcığı olmamasına dikkat edilmelidir.

DENEY 3

RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ KESİMİ, LİGASYON, TRANSFORMASYON

Restriksiyon endonükleazlar, spesifik DNA dizilerini tanıyan ve bu bölgelerden DNA moleküllerini kesen enzimlerdir. Doğada, bakteriler tarafından viral DNA'yı parçalamak için üretilirler. Moleküler biyoloji alanında, DNA manipülasyonunda yaygın olarak kullanılırlar. Restriksiyon enzimleri, plazmid veya genomik DNA'dan istenilen segmentlerin izole edilmesini sağlar ve genetik mühendislik çalışmalarının temelini oluşturur.



Şekil 1. Küt ve yapışkan uçlu çift zincirli DNA

Materyal

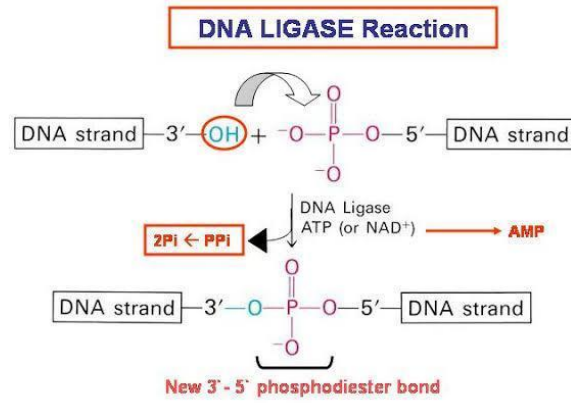
Metot

- Plazmid DNA'yı uygun restriksiyon tamponu ile karıştırın.
- Restriksiyon endonükleaz ekleyin ve 37°C'de 1 saat inkübe edin.
- Enzimatik reaksiyonu durdurmak için ısı inaktivasyonu uygulayın (enzime bağlı olarak).

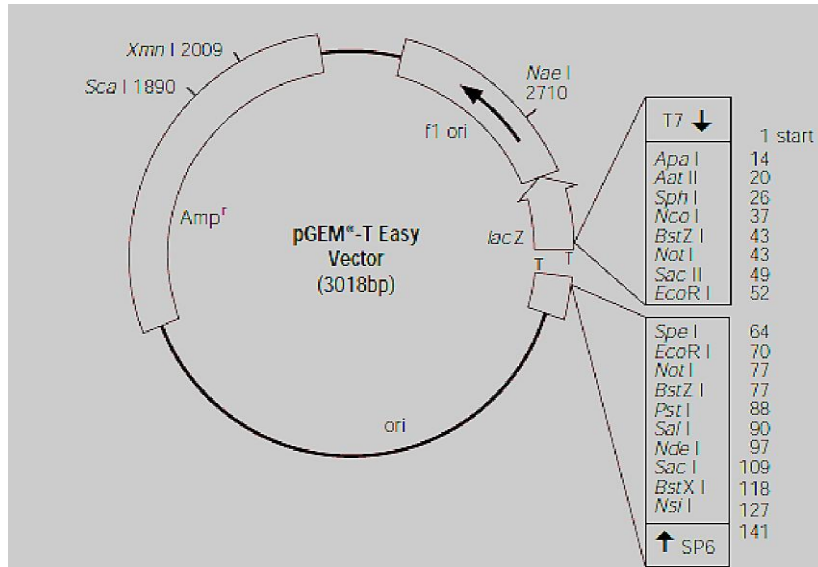
LİGASYON VE TRANSFORMASYON

➤ LİGASYON

İlgilenilen DNA parçasının *E. coli*'de çok sayıda kopyasını elde etmek için plazmit vektörleri kullanılır (Şekil 1). Bu amaçla geliştirilmiş çok sayıda plazmit vardır. Bu plazmitler ORI (Replikasyon Başlatma bölgesi), Çoklu Klonlama Bölgesi, Marker Gen (antibiyotik direnç geni gibi) içerirler. Bazıları Reporter Gen de (lacZ geni gibi) içerir. DNA parçasının vektöre ligasyonu için DNA ligaz enzimi kullanılır. DNA ligaz, DNA zincirinin ucundaki 3'OH ile 5'PO₄ arasında fosfodiester bağı oluşumunu katalizler (Şekil 2).



Şekil 2. DNA ligaz ile iki zincirin bağlanması reaksiyonu



Şekil 3. Vektör haritası

Bir ligasyon reaksiyonu için küt veya yapışkan uçlu çift zincirli DNA (Şekil 1.), DNA ligaz ve ATP içeren bir tampon gereklidir. T4 DNA ligaz küt uçları birleştirebildiği için genelde tercih edilen enzimdir [2]. Tampon içerisinde ATP dışında reaksiyonu optimize edecek Tris-HCL, MgCl, DTT gibi maddeler bulunur [3]. Ligasyon için 50 ng vektör kullanılır. Kullanılacak insert miktarı 1:3, 1:1, 3:1 gibi Insert: Vektör Molar Oranlarına göre hesaplanır (Eşitlik 1).

$$\frac{\text{Vektörün ng'ı} \times \text{Insertün kb büyüklüğü}}{\text{Vektörün kb büyüklüğü}} \times \text{Insert: Vektör Molar Oranı} = \text{Insertün ng'ı} \quad \text{[Eşitlik 1]}$$

Materyal

Vektör, PCR ürünü, Lisgasyon tamponu, deiyonize su, mikrosantrifüj tüpü.

Metot

1. Vektörü kısa süre santrifüj ediniz.
2. Aşağıda listelenenleri 0,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne ekleyiniz.

2X Rapid Ligation Buffer'ı kullanmadan önce vokteksleyiniz.

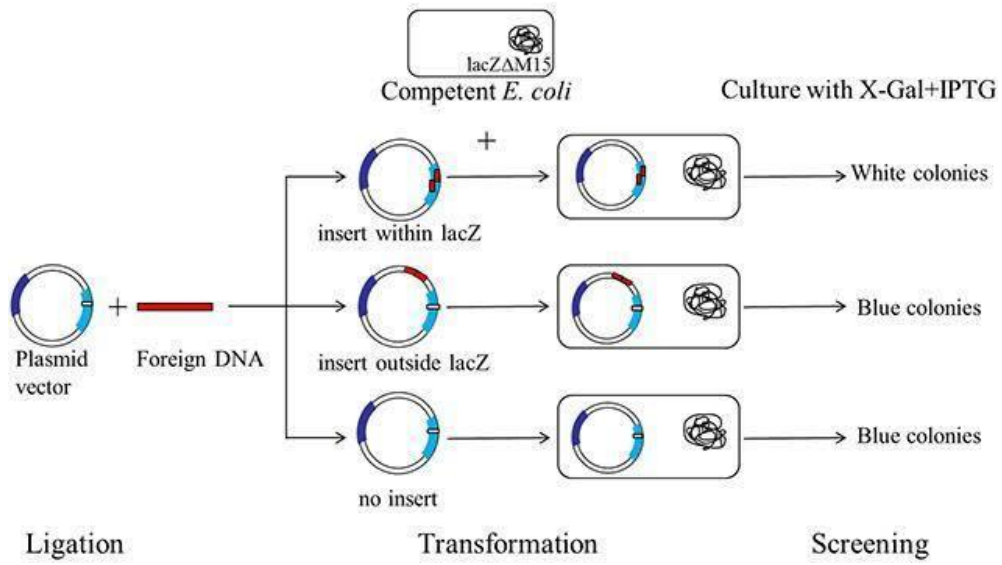
Vektör (50ng)	1 µL
PCR Ürünü	 µL
2X Ligasyon Tamponu	5 µL
T4 DNA Ligaz	1 µL
Deiyonize Su ile 10 µL'ye hacime tamamlayınız	

3. Reaksiyonu pipetleme ile karıştırıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe ediniz.

➤ **TRANSFORMASYON**

Transformasyon rekombinant vektörün kompetent hücrelerinin içerine aktarılması işlemidir. Transformasyon için çoğunlukla 2 yöntem kullanılır. Bunlar ısı şoku ve elektroporasyon yöntemleridir [4]. Isı şoku yönteminde, CaCl_2 ile muamele edilerek hazırlanan kimyasal kompetent hücrelere 42 °C'de kısa süreli ısı şoku verilir [5]. Elektroporasyon da ise elektrokompotent olarak hazırlanan hücreler kısa süreli elektrik akımı verilir. Her iki yöntemde de bakteri hücre duvarının yabancı DNA geçirgenliği arttırılmış olur. Bu sayede vektörün hücre içine alınması mümkün olur.

Transformasyondan sonra hücreler vektörün taşıdığı antibiyotik direnç genine göre antibiyotikli besi yeri içeren petrilere ekilir. Antibiyotikli besi yerinde sadece plazmit içeren hücreler hayatta kalıp koloni oluşturabilir. Plazmit içeren hücrelerden hangilerinin rekombinant plazmit içerdiğinin belirlenmesi için mavi beyaz tarama yönteminden yararlanılabilir (Bunun için uygun vektör seçilmiş olmalıdır). Mavi beyaz taramada besi yeri hazırlanırken antibiyotik dışında X-gal ve IPTG eklenir. Vektöre eklenen yabancı DNA lacZ geninin içine ekleneceği için genin dizini bozulur. Bu nedenle rekombinant vektör içeren hücreler x-gali kullanamaz ve beyaz koloniler oluşturur. Yabancı DNA almadan birleşen plazmitler ise x-gali kullanıp mavi renkli ürün meydana getirir ve mavi koloniler oluşturur (Şekil 4).



Şekil 4. Mavi- beyaz koloni seçimi

Materyal

DH5α *E. coli*, SOC besiyeri, LB-agar, X-gal, Ampisilin, IPTG.

Metot

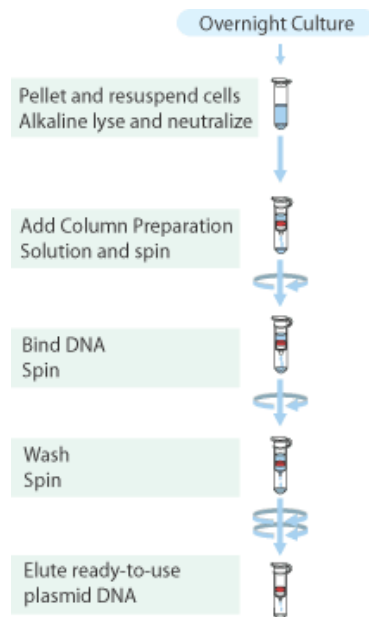
1. 50 µL DH5α *E. coli* hücresi ile 5 µL ligasyonu 0,5mL'lik mikrosantrifüj tüpünde karıştırınız.
2. 20 dk buz üzerinde bekletiniz.
3. 1,5 dk 42 °C'de bekletiniz.
4. 1-2 dk kadar buz üzerinde bekletiniz.
5. 15 mL'lik falcon tüplere 950 µL SOC besiyeri koyarak transformasyon solüsyonun üzerine ekleyiniz.
6. 37 °C'de 220 rpm hızda 45 dk inkübe ediniz.
7. Sıvı kültürden 100 µL alarak önceden hazırlanmış 100 µg/ml ampisilin, 30 µg/ml x-gal ve 0,5 mM IPTG eklenmiş LB-agar içeren petrilere yayınız.

DENEY 4

PLAZMİD DNA İZOLASYONU

Plazmid DNA'ları bakteri ve maya hücrelerinde bulunan genellikle halkasal (nadiren doğrusal), çift zincirli ve bağımsız olarak replike olabilmeye özelliğine sahip ekstrakromozomal DNA'lar olup, rekombinant DNA teknolojisi çalışmalarında taşıyıcı (vektör) olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Plazmid DNA izolasyonunda dikkat edilmesi gereken, genomik DNA ve RNA kontaminasyonu olmaksızın DNA'nın elde edilmesidir.

Plazmid DNA'sının izolasyonunda alkali lizis, kaynatma, CsCl-EtBr gradient gibi yöntemler kullanılmaktadır. İzole edilecek plazmidin büyüklüğüne, kullanılan *E. coli* suşunun genotipine ve işlem sonrasında hangi uygulamada kullanılacağına bağlı olarak uygun yöntem seçilmektedir. Modifiye edilmiş alkali lizis yöntemine dayalı ticari kitler kullanılarak fenol, kloroform, CsCl gibi toksik kimyasallara ihtiyaç duyulmaksızın daha basit, hızlı ve verimli bir şekilde plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilebilmektedir. Tek bir koloniden başlatılan ve gece boyunca büyütülen sıvı kültür logaritmik fazın sonlarına geldiğinde santrifüjleme ile çöktürülür, RNaz içeren TE tamponunda süspansiyon edilen bakterilerin alkali SDS çözeltisinde parçalanması ve genomik DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Nötralizasyon tamponu eklenir ve santrifüjleme ile kromozomal DNA çöktürülür. Süpernatant silika jel bazlı spin kolonuna uygulanır ve plazmid DNA'sı seçici olarak adsorbe olur. Kolonun yıkanmasıyla proteinler, tuzlar, nükleotidler ve 40 birimden küçük oligomerler uzaklaştırılır ve son aşamada plazmid DNA'sının kolondan elüsyonu sağlanır (Şekil-1). İzole edilen plazmidler dizileme, PCR, transformasyon, restriksiyon endonukleazlarıyla kesim, "site-directed" mutagenез, rekombinant protein üretimi çalışmalarında kullanılmaktadır.



Şekil 1. Ticari kit kullanılarak yapılan plazmid DNA izolasyonu

Materyal

İlgilendiğimiz geni içeren rekombinant plazmidi taşıyan *Escherichia coli* DH5α suşu, “BioBasic Inc. EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps Kit”, 1.5 ml örnek tüpü, %70 etanol, mikropipetler.

Metot

1. 100 µgml⁻¹ Ampisilin içeren 5 ml LB besiyerinde, 37°C sıcaklık ve 150 rpm hızda bir gece boyunca üretilen kültürdeki hücreler 12.000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edilerek toplanır ve süpernatant tamamen uzaklaştırılır.
2. Pellet üzerine 100µl Solüsyon I (RNaz içeren) eklenerek, iyice karıştırılır ve 1 dakika bekletilir.
3. Karışımın üzerine 200µl Solüsyon II eklenir, tüp 4-6 kez nazikçe alt üst edilerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir. Genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için vorteksle karıştırma yapılmaz.
4. 350µl Solüsyon III eklenir ve yavaşça karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir.
5. 12.000 rpm hızda 5 dakika santrifüjleme yapılır.
6. Süpernatant EZ-10 kolonuna transfer edilir ve 10.000 rpm hızda 2 dakika santrifüjleme yapılır.
7. Kolonun altındaki toplama tüpünde yer alan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolona 750µl Yıkama Solüsyonu (%100 etanol içeren) eklenerek 10.000 rpm hızda 2 dakika santrifüjleme yapılır.
8. 7. basamak tekrarlanır.
9. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kolondan yıkama solüsyonundaki etanolü tamamen uzaklaştırmak için 10.000 rpm hızda 1 dakika ek santrifüjleme yapılır.
10. Kolon temiz bir 1.5ml'lik tüpe transfer edilir. Kolonun merkezine 50µl Elüsyon Tamponu (2.0 mM Tris-HCl pH 8.0~8.5.) eklendikten sonra 2 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 10.000 rpm hızda 2 dakika santrifüjleme yapılarak plazmid DNA'sının kolondan ayrılması sağlanır.
 - Elüsyon tamponunun kolonun tam merkezine yüklenmesi oldukça önemlidir. Özellikle 10 kB'dan büyük plazmid DNA'larının saflaştırılmasında, elüsyon tamponu eklendikten sonra kolonun 37°C-50°C'de bekletilmesi verimi artırabilmektedir. Ayrıca elüsyon tamponunun sıcaklığının 55°C-80°C'ye getirilmesi de verimi artırmaktadır.
11. Saflaştırılan DNA -20°C'de uzun süre saklanabilir (3).

DENEY 5

TOTAL RNA İZOLASYONU

Total RNA izolasyonu, hücresel RNA'nın saflaştırılması amacıyla kullanılan temel bir moleküler biyoloji yöntemidir. RNA, gen ekspresyonu analizlerinde, cDNA sentezinde ve RT-qPCR gibi tekniklerde yaygın olarak kullanılır. Hücre veya doku örneklerinden RNA izolasyonu, yüksek verimli ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için saf ve bütünlüğü bozulmamış RNA elde etmeyi gerektirir.

Bu protokolde, TRIzol reaktifi bazlı fenol-kloroform ekstraksiyonu yöntemi kullanılmaktadır. TRIzol, hücre membranını ve nükleus yapısını parçalayarak protein, DNA ve RNA'nın ayrışmasını sağlar. İzolasyon işlemi sırasında TRIzol'ün lizis etkisiyle hücresel bileşenler serbest hale gelir ve kloroform ile faz ayrımı sağlanır. Bu aşamada RNA, sulu fazda çözünürken, DNA ve protein organik fazda kalır.

Elde edilen sulu fazdaki RNA, izopropanol ile çöktürülür ve ardından etanol ile yıkanarak safsızlıklardan arındırılır. İzolasyonun başarısı, RNA bütünlüğünün korunmasına ve DNaz gibi kontaminantların minimum seviyede tutulmasına bağlıdır. Saflaştırılan RNA, moleküler biyoloji analizlerinde kullanılmadan önce kalite kontrolünden geçirilmelidir.

Total RNA izolasyonu sırasında kontaminasyonun önlenmesi için RNaz içermeyen sarf malzemeleri kullanılmalı ve RNA bozunmasını önlemek amacıyla tüm adımlar dikkatlice gerçekleştirilmelidir.

Materyal

TRIzol, kloroform, izopropanol, %75 etanol, RNaz içermeyen su.

Metot

Homojenizasyon

1. Her 50-100 mg doku örneği için 1 ml TRIzol ekleyin.
 - Doku homojenizasyonundan hemen sonra örneği direkt kullanın ya da kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edin.
2. Bitki dokusundan elde edilen homojenatlarda bulunan çözülmeyen kısımların uzaklaştırılması için 12000 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulayın.
3. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant RNA içerir. Süpernatantı yeni tüpe aktarın.

Faz ayrımı

1. Süpernatantı 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edin.
2. 1 ml TRIzol için 200 µl kloroform ekleyin.

3. 15 saniye karıştırın ve oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edin.
4. 12000 x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulayın.
5. Santrifüjün ardından en altta fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz bir üst sulu faz oluşur. RNA üst sıvı fazda bulunur. Üst sıvı fazı pipetle alarak yeni tüpe aktarın. Bu aşamada pipetin diğer fazlara gelmemesine dikkat edin. Elde edilen üst faz RNA izolasyonunda kullanılır.

RNA'nın çöktürülmesi

1. Her 1 ml örnek için 500 µl % 100 izopropanolu sıvı faza ekleyin ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletin.
2. 12000 xg'de 4°C'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulayın. Santrifüjden önce görünür olmayan RNA, santrifüjün ardından jel benzeri bir pellet oluşturur. Bu adımdan sonra yıkama aşamasını uygulayın.

Yıkama

1. Süpernatanı uzaklaştırın ve RNA pelletini muhaza edin.
2. Pelleti başlangıçtaki her 1 ml örnek için 1 ml %75 etanol ile yıkayın.
 - Bu aşamada örnekler en az 1 yıl süre ile -20 °C'de ve 1 hafta +4 °C'de saklanabilir.
3. Örneği vorteksledikten sonra 7500 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edin. Süpernatanı uzaklaştırın.
4. 5-10 dakika pelletin kurumasını bekleyin. Pellet çözünürlüğünü kaybedebileceğinden tamamen kurumasına izin vermeyin.

RNA'nın çözündürülmesi

1. RNA pelletini RNaz içermeyen suda çözündürün ve 55-60°C sıcaklıkta 5-10 dakika inkübe edin.
2. Elde edilen RNA örneği sonraki uygulamalar için kullanılır ya da -80°C'de muhafaza edilebilir.

RNA'nın Kalitatif Analizi: Agaro- Formaldehit Jel Elektroforezi

RNA, elektroforezle ayrılmasını engelleyen ikincil hatta üçüncül yapılar oluşturmaya meyillidir. Farklı RNA molekülleri arasındaki benzer kısımlardaki baz çiftlerinin bağ yapması sonucu RNA molekülleri farklı noktalara göç eder ve sürüntü şeklinde bir görüntü oluşur. Bu nedenle RNA elektroforezi denatüre edici koşullar altında yapılmalıdır. RNA'nın elektroforezden önce ısıtılarak denatüre edilmesi yeterli değildir. Denatüre olan RNA kolayca tekrar ikincil yapılar oluşturabilir.

Başarılı bir RNA elektroforezi iki aşamada gerçekleştirilir. İlk olarak RNA elektroforez öncesi ısı ile denatüre edilir. İkinci olarak elektroforezi sırasında RNA'nın denatüre kalmasını sağlayacak şartlar oluşturulur. RNA jellerinde en çok kullanılan denatüre edici ajanlar formaldehit, formamid, glioksal, DMSO'dur. Her birinde denatüre RNA lineer olarak moleküler ağırlığına bağlı olarak ilerler. Formaldehit kullanımı örneklerin geri kazanımı için uygundur.

RNA jellerinde tampon olarak MOPS kullanılır. MOPS iyonik kuvveti çok düşüktür. MOPS formaldehitte reaksiyona girmediği için tercih edilir.

Materyal

RNA örnekleri, DEPC'li su, Agaroz, 5X MOPS, 1X MOPS, Formaldehit, Formamid, EtBr.

Metot

% 1'lik Formaldehit Jeli Hazırlanması

- Tüm elektroforez aparatları DEPC'li su ile yıkanarak temizlenir.
- 7 ml formaldehit ısınması için 60 °C'deki etüve koyulur.

Agaroz	0,4 gram
5X MOPS	10 ml
DEPC'li su	25 ml

- Yukarıdaki bileşenler mikrodalgada eritilir ve 60 °C'ye soğutulur.
- Önceden 60 °C'ye ısıtılan formaldehit karışıma eklenir.
- Hazırlanan jel, jel tepsisine dökülür ve polimerize olması beklenir.
- Elektroforez sırasında tank tamponu olarak 1X MOPS kullanılır

Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması

RNA örneği	x	RNA+ DEPC'li su= 4,5 µl
DEPC'li su	4,5 - x	
5X MOPS	2 µl	
Formaldehit	3,5 µl	

Formamid	10 µl
EtBr	0,5 µl

- Yukarıda belirtilen bileşenler 0,5 ml'lik ependorf tüplerinde karıştırılır.
- 15 dk 55 °C'de bekletilir.
- RNA örnekleri yüklemeden önce 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılır ve jel kuyucuklarına yüklenir.
- RNA'lar jelde 60 V'da 90 dakika yürütülür.

RNA'nın Kantitatif Analizi: NanoDrop Ölçümü

Materyal

NanoDrop cihazı, RNA örneği, RNaz içermeyen saf su

Metot

Cihaz Hazırlığı:

- NanoDrop cihazını açın ve yazılımını başlatın.
- "RNA" modunu seçin.

Blanking:

- Platforma 1 µl RNaz içermeyen saf su damlatın.
- Kolonu kapatın ve "Blank" butonuna tıklayın.

RNA Ölçümü:

- Platformu saf su ile temizleyin ve kurulayın.
- 1 µl RNA örneğini platforma damlatın.
- Kolonu kapatın ve "Measure" butonuna basın.

Sonuçların Yorumlanması:

- Konsantrasyon (ng/µl) ve saflık oranları (260/280, 260/230) ekranda görüntülenecektir.

Saflık Değerlendirmesi: 260/280 oranının 1.8-2.0 aralığında olması saf RNA'yı gösterir. 260/230 oranı ise 2.0-2.2 aralığında olmalıdır.

Dikkat Edilmesi Gerekenler:

- Her ölçümden sonra platformu RNaz içermeyen su ile temizleyin.
- Ölçümde kullanılan RNA örnekleri kontaminasyondan korunmalıdır.

DENEY 6

“REVERSE” TRANSKRİPTAZ – PCR (İLK ZİNCİR cDNA SENTEZİ)

cDNA ‘nın sentezi Moleküler Biyoloji araştırmalarının önemli bir kısmını oluşturur. Hem tek iplikli hem de çift iplikli formlarda kullanılan cDNA yapısal farklılıklar olmasına rağmen genomik DNA’nın *in vitro* koşullarda karşılığıdır. cDNA, *in vitro* koşullarda kalıp materyal olarak RNA kullanılarak bir seferde tek zincir sentezlenen reaksiyon sonucunda ortaya çıkan enzimatik bir üründür. cDNA sentezinde yüksek kalitede RNA ihtiyacı söz konusudur. Genellikle rutin uygulamalarda bir mikrogramdan daha az RNA’ ya ihtiyaç duyulurken en son geliştirilen tekniklerin çoğunda başlangıç materyali olarak 100 ng’ dan daha az RNA kullanılabilir.

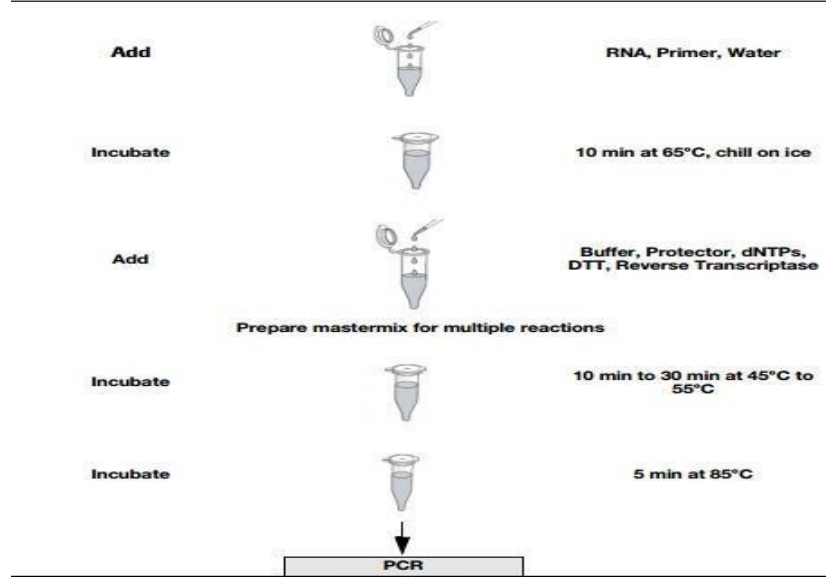
RNA - PCR olarak da adlandırılan “Reverse” Transkriptaz – PCR (RT – PCR) iki aşamalı olup RNA’ dan tamamlayıcı DNA sentezi (ters transkripsiyon) ve tamamlayıcı DNA’ nın standart PCR yoluyla çoğaltılması aşamalarını kapsar (Şekil-1). RT-PCR tek aşamalı bir reaksiyonla da gerçekleştirilebilir. *T. thermophilus* DNA polimerazı gibi bazı polimerazlar mangana varlığında hem RNA hem de DNA kalıp ipliklerini kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüpte tek aşamada yapılabilir.

RT – PCR, mRNA veya viral RNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen analitiği çalışmalarında oldukça duyarlı bir yöntemdir. Bu yöntem az sayıda hücreden aynı anda fazla miktarda RNA’nın analizini de mümkün kılmaktadır. Ayrıca RNA PCR yöntemiyle hücresel bir RNA örneğindeki tüm mRNA’lardan PCR yoluyla cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında da kullanılır.

cDNA sentezinde kullanılacak çeşitli kaynaklardan izole edilmiş ters transkriptaz enzimleri vardır. Bunlara ek olarak “avian myeloblastosis virüs” (AMV) ve “Moloney murine leukemia virüs” (MMLV) revers transkriptazları örnek olarak verilebilir.

Analiz tipine bağlı olarak, cDNA sentezi “Random hexamer” primer ya da Anchored-oligo (dT)18 primer ile gerçekleştirilebilir. Anchored-Oligo(dT)18 primer total RNA Molekülünde poly(A)⁺ kısmına spesifik olduğundan dolayı ters transkripsiyondan elde edilen cDNA miktarı “random hexamer” ile elde edilen miktardan daha az olmakla birlikte, Anchored-Oligo(dT)18 primer yeni mRNA sentezi amacıyla RT- PCR reaksiyonu yürütüldüğü zaman tavsiye edilir.

Prosedür



Şekil 1. cDNA sentez prosedürü

Metot

1. Kullanmadan önce dondurulmuş olan reaktifler tamamen çözündürülür. Uygulamaya başlamadan önce reaktif maddeler santrifüjlenir. Reaksiyon kurulumu sırasında tüm reaktifler buz üzerinde tutulur.
2. Buz üzerinde steril, nükleazsız, ince çeperli PCR tüpüne aşağıda listelenen maddeler eklenerek 20 µl reaksiyon için kalıp-primer karışımı hazırlanır.

Kalıp-Primer Karışımı (1 reaksiyon için)

Komponent	Hacim	Final konsantrasyon
Total RNA	2 µl	100 ng
Anchored-oligo(dT)18 primer	1 µl	2.5 µM
Su (PCR-grade)	8.4 µl	
Toplam Hacim	11.4 µl	

3. Reaksiyon buz üzerinde 65 °C’de 10 dk inkübe edilir. Daha sonra buz üzerinde soğutulur.
4. Yukarıdaki işlemleri gerçekleştirdikten sonra diğer komponentler ilave edilir.

Bileşen	Hacim	Son konsantrasyon
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction buffer,5x conc.	4 µl	1x (8mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor	0,5 µl	20U
Deoxynucleotide Mix, 10mM	2 µl	1mM
DTT	1 µl	5mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µl	10U
Toplam Hacim	20 µl	

- Pipetaj yapılarak içerik iyice karıştırılır.

5. 55 °C’de 30 dakika inkübe edilir.

6. Reaksiyon 85 °C’de 5 dk bekletilerek “Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase” enziminin inaktif hale getirilmesi sağlanır.

7. Bu aşamada reaksiyon tüpü + 2 - +8 °C ya da uzun periyot için -15 , - 25 °C ‘de muhafaza edilebilir.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE PRİMER TASARIMI

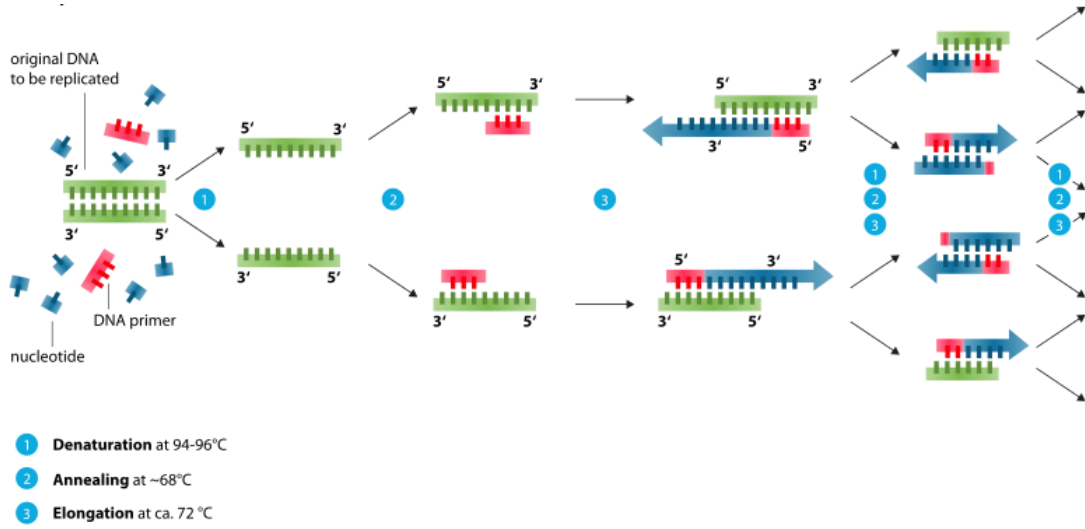
In vitro koşullarda DNA çoğaltılmasının başlıca amaçları; özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, böyle bir DNA parçasının moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde etmek üzere gen aktarımının yapılmasıdır. PCR, istenilen genin ya da DNA parçasının primerlerin yönlendirmesiyle enzimatik olarak çok sayıda kopyasının oluşturulması için kullanılan enzimatik bir reaksiyondur.

DNA'nın çoğaltımı için mikrosantrifüj tüpü gerekli tüm bileşenleri içermelidir. Bunlar: Kalıp olarak kullanılacak DNA, dört çeşit nükleotid karışımı (dNTP' ler), oligonükleotid primerler, tampon çözelti ve DNA polimerazdır. Bu laboratuvarlarda termostabil *Thermus aquaticus* kaynaklı olan *Taq* polimeraz enzimi kullanılacaktır.

PCR farklı sıcaklık döngüleriyle gerçekleşir. 94 °C - 96 °C arasındaki sıcaklıkta çift sarmal yapıdaki DNA zincirleri birbirinden ayrılır. Daha sonra primerlerin ilgili DNA bölgesine bağlanabilmesi için bu sıcaklık 68 °C arasında bir seviyeye indirilir. Kalıp DNA'nın tam bir kopyasının yapımının tamamlanabilmesi için sıcaklık, polimeraz enziminin en iyi aktivite göstereceği 72 °C'ye yükseltilir. Bu üç farklı sıcaklık seviyesi bir "döngü" oluşturur. Her döngüde tüp içindeki hedef DNA kopya sayısı iki katına çıkar. Yeni sentezlenmiş olan DNA parçaları da sonraki döngülerde kalıp olarak kullanılacaktır. Döngü sayısı 30-35 arasında olabilmektedir.

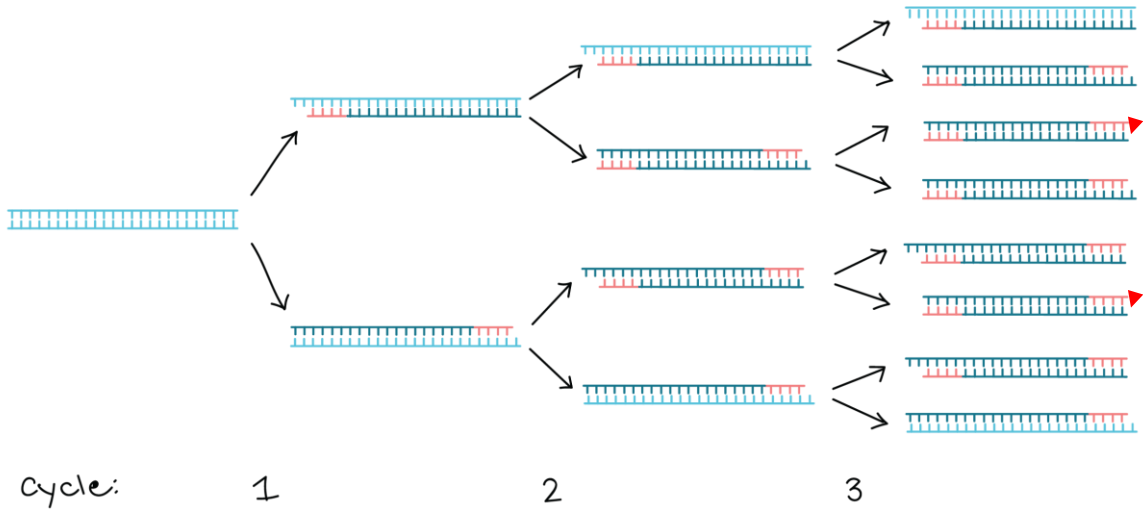
PCR birbiri ardına tekrarlanan üç basamaktan oluşur (Şekil 1) ve bunların tamamı bir döngüyü oluşturur:

- 1- Denatürasyon (Denaturation) (94-96 °C): Çoğaltılacak DNA segmentindeki zincirler birbirinden ayrılır bunlar yeni sentezlenecek DNA için kalıp işlevi görür.
- 2- Bağlanma (Annealing) (68 °C): DNA' nın ayrılmış zincirlerine primerlerin hidrojen bağları yardımıyla bağlandığı basamaktır.
- 3- Uzama (Extension) (72 °C): Termostabil DNA polimeraz, primerlere bağlanarak 3' uçlarına, kalıp DNA' ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yapar.



Şekil 1. PCR' in bir döngüsü

Molekül sayısı üssel (exponential) olarak artar. Klasik bir PCR' da döngü sayısı 25-30 arasındadır. Daha fazlası, özellikle 40 döngü ve üzerinde istenmeyen ürün artışı meydana gelir ve enzim kısıtlaması görülür. Döngüler sonundaki molekül sayısı 2^n formülü ile bulunur (n: döngü sayısı). PCR' da asıl istenen fragment 3. Döngü sonunda elde edilir (Şekil 2).



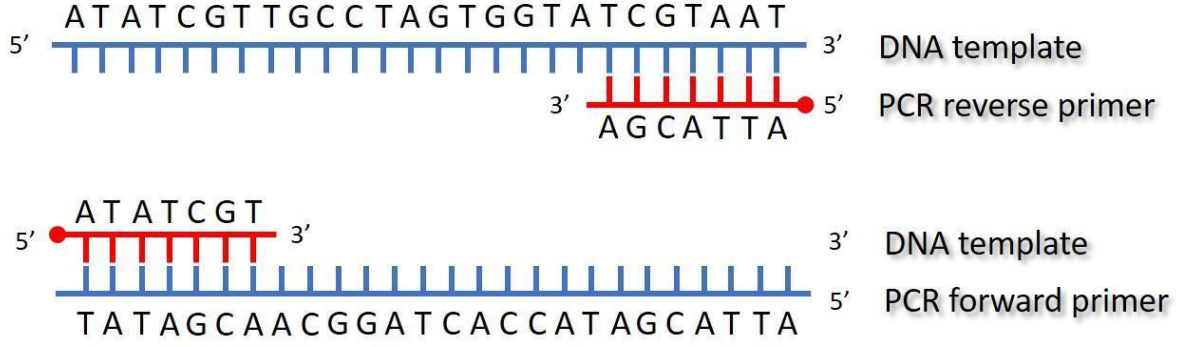
Şekil 2. PCR' da asıl istenen fragment

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) klonlama, tanı, kalıtım, çeşitlilik çalışmaları, filogeni, genetik parmak izi, bulaşıcı hastalık analizleri gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmakta olan bir tekniktir.

Başarılı bir PCR için bileşenlerin optimize edilmiş konsantrasyonları kullanılmalıdır. PCR bileşenlerinden olan oligonükleotid primerlerin tasarımı en önemli parametrelerden biridir.

Primer Tasarımı

Primerlerin tasarımında uzunluk, erime sıcaklığı (T_m), özgülük, G/C oranı gibi dikkat edilmesi gereken başlıca unsurlar vardır. Hedef DNA bölgesine özgül olarak ve istenilen verimde üretilmesinde primerlerin tasarımı oldukça önemli bir yer tutar. Hedef DNA bölgesinin ileri ve geri yönünde olmak üzere iki primer tasarlanır (Şekil 4).



Şekil 4. İleri ve geri yönlü iki primer

Primer uzunluğunun artması PCR sırasında bağlanma veriminin azalmasına, buna bağlı olarak PCR veriminin düşmesine neden olur. Uygun bağlanma sıcaklığı da göz önünde bulundurularak 17-30 nükleotid uzunluğundaki primerlerin tasarımı yapılabilir.

Primerlerin bağlanma ve erime sıcaklığı arasında önemli bir denge vardır. Primerler tasarlanırken 50 °C'lık bir bağlanma sıcaklığının altına inilmemelidir. Ayrıca, bağlanma sıcaklığı erime sıcaklığının 5 °C altında olmalıdır. Bu uygulanan genel bir kural olarak kaşıma çıkısa da, yapılan çalışmaya en uygun PCR koşulu, yapılacak optimizasyonla belirlenir.

PCR verimini etkileyen önemli unsurlardan biri de primer çiftlerinin erime sıcaklıklarıdır. İleri ve geri yönlü oligonükleotid primerlerin her ikisinin de erime sıcaklıkları benzer olmalıdır. Uygun erime sıcaklığına sahip olmayan primerler özgül olmayan bağlanmalara neden olurlar. PCR koşulları da tasarlanan primerlerin erime sıcaklığına bağlı olarak belirlenmelidir. Primer tasarımı ve erime sıcaklı hesaplamaları için çeşitli programlar var olsa da, primer içeriğindeki A,T,C,G bazlarının sayısına göre $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü ile yaklaşık bir değere ulaşılabilir.

Dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta da primerlerin tamamlayıcı diziler taşımasıdır. Primer kendi içinde 3 nükleotid uzunluğundan daha fazla homoloji içermemelidir. Bu şekilde bir homoloji saç tokası olarak isimlendirilen çift zincirli yapıların oluşumuna ve bu da primerin ilgili DNA bölgesine bağlanmasında soruna yol açabilir.

Primer dizisinin çoklu G ve çoklu C bazlarını içermeleri özgül olmayan bağlanmalara yol açabilir. Primerin toplam baz içeriğinde GC oranı %45-%55 aralığında olmalıdır. Çoklu A ve çoklu T bazları içeriği

ise primerlerin hedef DNA bölgesine bağlanmasında gevşemeye neden olabilir. Benzer şekilde çoklu pirimidin ve çoklu purin uzantıları da PCR verimini ve özgüllüğünü olumsuz yönde etkiler. Bunların yanında primerlerin 3' ucuna C ya da CG bazlarının eklenmesinin etkinliği artırdığı belirtilmiştir.

Primer tasarımı için mevcut olan OLIGO7 gibi bilgisayar programları ile Primer3 ve GeneFisher2 gibi web temelli uygulamalar da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Materyal

10X Tampon Solüsyonu, dNTP Karışımı, İleri ve geri primerler, *Taq* Polimeraz, Steril Distile Su, Mikrosantrifüj tüpü, Farklı hacim aralıklarındaki mikropipetler, Steril mikropipet uçları, Mikrosantrifüj, Buz kutusu, PCR cihazı

Metot

Tablo 1'de belirtilen PCR bileşenlerini kullanarak PCR reaksiyonu kurunuz. PCR bileşenlerini buz üzerinde çözdükten sonra, kullanana kadar buz içinde muhafaza ediniz. Size verilen bileşenlerin konsantrasyon ve ünite değerlerini tablodaki ilgili alana kaydettikten sonra, kullanmanız gereken hacim miktarlarını yazınız. Negatif kontrol örneğine kalıp DNA eklemeyiniz. PCR cihazında Tablo 2'de yer alan döngü, süre ve sıcaklıkları ayarlayarak, tüpleri yerleştiriniz ve reaksiyonu başlatınız.

Tablo 1: 25 µl hacimde PCR reaksiyonu kurma listesi

İçerik	Son Konsantrasyon	Kullanılacak Hacim (µl)	Kontrol kutucuğu
10X Tampon Solüsyonu	1X		☐
25 mM MgCl ₂	2 mM		☐
dNTP Karışımı (..... mM)	0.2 mM		☐
İleri Primer (..... µM)	0.4 µM		☐
Geri Primer (.....µM)	0.4 µM		☐
Taq Polimeraz (....U/µl)	1.25 ünite		☐
Steril Distile Su	–		☐
Kalıp DNA (.....µg/µl)	10 ng/µl		☐
Toplam Hacim	–	25 µl	

Tablo 2: PCR Koşulları

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	1 dakika	30
Bağlanma (Annealing)	50-65 °C	1 dakika	30
Uzama (Extension)	72 °C	1 dakika	30
Son uzama (Final Extension)	72 °C	10 dakika	1
Soğutma	4 °C	∞	1

REAL TIME PCR (GERÇEK ZAMANLI PCR)

“Real-time PCR” teknolojisi DNA’nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tek bir tüpte tespit edebilen son yıllarda popüler olmuş bir yöntemdir. “PCR” çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemi olması dolayısıyla “Kantitatif Gerçek Zamanlı – PCR (RT-PCR)”, “Floresan Kantitatif RT-PCR” gibi farklı adlarla da isimlendirilmektedir.

Kullanım Alanları:

- Mikrobiyoloji/ Enfeksiyon hastalıkları
- Genetik
- İmmünoloji
- Kanser/ Onkoloji
- Farmakoloji
- Adli bilimler

Özgül Olmayan Belirleme Sistemi SYBR Green I

Spesifik olmayan çift zincirli DNA’nın çoğaltımında “SYBR Green I” yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA’ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak “real-time” PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. “SYBR Green I” en fazla kullanılan boya çeşitidir ve 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA’nın küçük olduğuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6’sını kaybeder.

Özgül Belirleme Sistemi

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise bu bölgenin saptanmasında floresan işaretli prob kullanılır. Bu tekniklerin başında “TaqMan” prob, “Molecular beacon”, “Light-up” prob, hibridizasyon prob ve “Scorpion” primer gibi floresan işaretli prob kullanılarak yapılanlardır.

TaqMan® Probe Yöntemi

“TaqMan probe” yöntemi “Double-Dye Oligonucleotide”, “dual labeled probe” veya “5' nuclease probe” olarak da adlandırılmaktadır. “TaqMan probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksiflo- resin= 6-F AM) ve 3' ucunda “quencher” (6- karboksitetrametil-rodamin= TAMRA). 3' uçtaki basılayıcı TAMRA boyası bulunur.

5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında "Taq Man" problemler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder.

"TaqMan probe" yönteminde mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere de ulaşılabilirdiğinden araştırmacılar için avantaj sağlar. Bu yöntem standart bir protokolü ve kolay bir dizaynı ve çok az bir optimizasyonla gerçekleştiği için hem allelik diskriminasyon hem de ekspresyon profilinin çıkartılmasında kolaylıkla kullanılır.

Bileşen adı	20 µl reak.	Son kons.
qPCR SybrMaster	10 µl	1x
İleri Primer (10 µM)	0.6 µl	300 nM
Geri Primer (10 µM)	0.6 µl	300 nM
Kalıp DNA	x µl	-
PCR H ₂ O	20 µl'ye su ile tamamla	-

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu ve polimeraz aktivasyonu	95 °C	2 dk	1x
Denatürasyon	95 °C	15 sn	35-45x
Bağlanma ve Uzama	60-65 °C	1 dk (Amplikon boyutuna göre belirlenir)	35-45x

DENEY 7

BİTKİDEN TOTAL PROTEİN İZOLASYONU

Bir doku ve hücre grubundan proteinleri izole ederken yapılması gereken bazı işlemler vardır. İlk olarak çalışacağımız proteinin en fazla bulunduğu doku seçilir. İlgilenilen proteinin bozunmasını engelleyecek tampon çözeltiler kullanılarak doku ve hücreler homojenize edilir. İlgilenilen biyolojik molekül grubunun izolasyonu amacıyla gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri parçalama (lisis) ve ayırma (saflaştırma) aşamalarından oluşur. Hücre membranının ve nükleus membranının parçalanması gerekir. Daha sonra bu homojenat belirli hızlarda santrifügasyona tabi tutularak hücre parçalarından arındırılır. Böylece elde edilen protein karışımı süpernatantta bulunur. Önemli bazı noktalar;

- Ekstrakte edilecek protein membrana bağlı veya sitoplazmik bir proteinse önce hücre çeperi aşılmalıdır. Aşırı ısınma önlenmelidir.
- Parçalama sırasında ortaya çıkacak proteazların etkisinden korunmalıdır.
- Önemli olan istenilen proteinin hemen tamamının sıvı faza (supernatant) geçmesidir.

Not: PMSF (fenilmetilsülfonil florür) serin proteaz inhibitörü olarak işlev görür. Suda çok az çözüldüğünden aseton veya etanol' de hazırlanır. Hızla hidrolize olduğundan hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır.

Materyal

Özütleme tamponu (0.2 M Tris pH 8.2, 1mM PMSF), porselen havan, gazlı bez, santrifüj cihazı, 50 mL tüpler, mikropipetler ve pipet uçları, sıvı azot, bitki doku örnekleri.

Metot

1. Mikrosantrifüj tüplerinizi etiketleyin.
2. Tüm solüsyon ve gerekli malzemeleri hazırlayın: Özütleme tamponu (0.2 M Tris pH 8.2, 1mM PMSF), Porselen havan, gazlı bez, santrifüj, mikrosantrifüj tüpleri, 50 mL tüp, mikropipetler, sıvı azot.
3. Bitki doku örneklerini -80 °C dondurucudan alarak soğuk ortamda üzerlerinde yazılı olarak bulunan ağırlıklarını kontrol ediniz.
4. Dokuları havana yerleştirerek üzerine sıvı azot ekleyiniz.
5. Dokuları havanda ezmeye başlayınız.
6. Ezilen doku örneğinin üzerine gram başına 2 ml özütleme tamponu ekleyiniz.
7. Havandaki ezilmiş doku örneğini gazlı bezden geçirerek 50 ml hacmindeki tüplere aktarınız.
8. Elde edilen doku örneğinden 1 ml alarak mikrosantrifüj tüpüne ekleyerek, bu tüpü buz üzerinde muhafaza ediniz.
9. + 4 °C 'de 4000xg'de 10 dakika santrifüjleyiniz.

10. Süpernatant ve pelleti ayrı tüpler içinde -20 °C de muhafaza ediniz.

DENEY 8

PROTEİN ÇÖZELTİSİNİN KONSANTRE EDİLMESİ, SAFLAŞTIRMA VE MİKTAR TAYİNİ

Protein çözeltisinin konsantre edilmesi, suyun ve diğer küçük moleküllerin uzaklaştırılarak çözelti hacminin azalması ve protein derişiminin artması ile gerçekleştirilir. Proteinin saflaştırılması işlemlerinde küçük hacimle çalışmak yararlıdır. Konsantre edilen örnekler sayesinde daha az kimyasal madde kullanımı, kolon kromatografisinde kolona yükleme kolaylığı, dolgu maddesine spesifik olmayan tutunmalar sonucunda oluşan protein kayıplarının azaltılması sağlanabilmektedir. Bu amaçla aşağıda adı geçen uygulamalardan yararlanılmaktadır.

- Proteinlerin girişine uygun olmayan porları bulunan kuru polimer ile işlem
- Büyük moleküllerin geçişine izin vermeyen yarı geçirgen bir zar aracılığıyla küçük moleküllerin uzaklaştırılması (ultrafiltrasyon, diyaliz)
- Suyun vakumda uzaklaştırılması (liyofilizasyon)
- Çeşitli kimyasal etkenler aracılığıyla proteinlerin çöktürülmesi (TCA, organik çözücüler, tuzla çöktürme)

Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Tuzla çöktürme (salting-out), çözeltinin tuz konsantrasyonunu artırarak proteinin çözünürlüğünün değişmesi ve bunun sonucunda denatüre olmadan çökmesine dayalı bir yöntemdir. Proteinlerin konsantre edilmesi ve saflaştırılmasında geniş çapta kullanılmaktadır. Ortama eklenen nötral tuz proteinlerin yüzeyinde bulunan hidrofilik amino asitlerin yan gruplarının suyla etkileşimini bozarak, proteinlerin bir araya gelip kümeleşmelerine ve çözeltiden ayrılıp çökmelerine yol açar. Çöktürme işleminde genellikle çözünürlüğü yüksek, ortam pH'sını fazla etkilemeyen, çözeltide fazla ısınmaya yol açmayan, ucuz ve etkin bir tuz olan amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$ kullanılır.

Proteinler farklı tuz konsantrasyonlarında çöktürülerek birbirlerinden ve ortamdaki diğer maddelerden ayrılabilirler. Yüzeyinde hidrofilik alanları daha fazla olan proteinlerin çöktürülmesi için daha fazla tuz kullanılırken, hidrofilik alanları az olan proteinler daha çabuk çöktürülebilmektedir (1).

Çözeltinin istenilen doygunluğa ulaşması için ortama eklenmesi gereken tuz miktarı aşağıdaki tablodan kolaylıkla bulunabilir.

Materyal

Erlen, manyetik karıştırıcı, buz dolu kap, protein çözeltisi, amonyum sülfat.

Metot

1. Belirli hacimdeki protein çözeltisini içeren erlen, manyetik karıştırıcı üzerindeki buz dolu kabın içerisine yerleştirilir
2. Çözeltiye eklenecek amonyum sülfat miktarı tablodan bulunur ve sürekli karıştırılarak yavaşça ortama eklenir. (Çözeltinin köpürmemesine dikkat edilmelidir).
3. Tuz ilavesi bittikten sonra 10-60 dk. Karıştırmaya devam edilir.
4. 9000 xg'de 10 dakika santrifüjlenerek üst sıvı ayrılır.
5. Çökelti uygun tampon (örneğin 50 mM sodyum fosfat, pH 7.3) içerisinde çözülür.
6. Ortamdaki tuzun diyaliz ya da ultrafiltrasyon ile uzaklaştırılması sağlanır.

Ultrafiltrasyon

Su ve diğer küçük moleküllerin santrifüjleme ya da yüksek basınç uygulamasıyla yarı geçirgen bir membrandan geçmeye zorlandığı bu yöntem protein çözeltilerinin konsantre edilmesinde kullanılmaktadır.

Membranlara özgü bir değer olan NMWC ("Nominal molecular weight cut off") değeri membrandan geçemeyen globular bir proteinin molekül ağırlığına eşdeğerdir. Kullanılacak sistemin NMWC değeri konsantre edilecek proteinin büyüklüğüne göre seçilir. Kullanılan membranın por çapı en az hedef molekül büyüklüğünün % 20'si kadar olmalıdır. Por çapı çok küçük olduğunda, işlem süresi uzar ve membrandan geçiş için daha yüksek kuvvete gereksinim duyulacaktır. Çözelti hacmi 15 ml ve altında ise ultrafiltrasyon tüpleri, daha yüksek hacimlerde ise basınç hücreleri kullanılır (2).

Materyal

Santrifüj, uygun tampon (örneğin 50 mM sodyum fosfat, pH 7.3), ultrafiltrasyon tüpü.

Yöntem

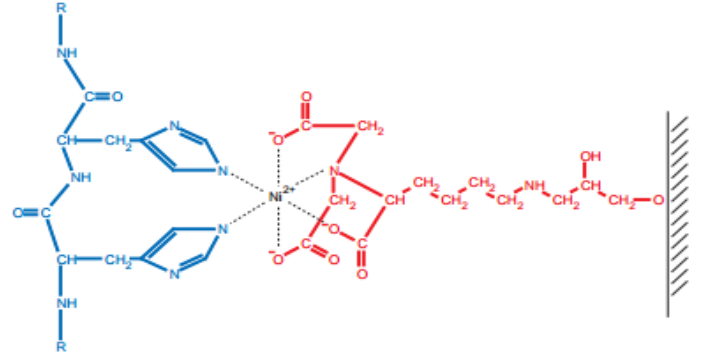
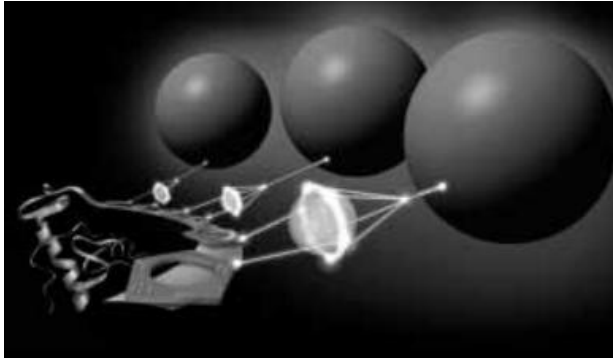
1. Örnek ultrafiltrasyon tüpünün üst bölümüne doldurulur
2. Tüp 5000 xg'de birkaç dakika santrifüjlenir.
3. Alt bölme çıkarılarak ultrafiltrat atılır.
4. Konsantre edilen örnek istenilen hacime ulaşınca kadar aynı işlem tekrarlanır.

Rekombinant Proteinlerin Afinite Özelliklerinden Yararlanarak Saflaştırılması

Proteinler büyüklük ve şekil, toplam yük, kullanılan durağan faz ile bağlanma kapasitesi gibi farklı özelliklerine dayalı olarak farklı kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilirler. Bu yöntemlerden birisi olan, afinite (ilgi) kromatografisi, kolon dolgu maddesine kovalent olarak bağlanmış ve saflaştırılacak proteine özel ilgi göstererek seçici bir ayırım sağlayan, ligand adı verilen küçük moleküllerin kullanımıyla gerçekleşir. Ligand önce immobilizasyon yöntemleri ile kolon matrisine bağlanır. Kromatografik ayırım sırasında hedef protein yüzeyindeki işlevsel bir bölge tarafından liganda spesifik

ve geri dönüşümlü olarak bağlanma gerçekleşir. Destek materyali olarak agaroz, selüloz, silika ve değişik organik polimerler kullanılabilir. Ligand ile bağlanan proteini ortamdan uzaklaştırmak için elüsyon tamponunun içeriği değiştirilir ve proteinin immobilize edilmiş liganda olan ilgisi azaltılır (1).

6xHis-kuyruğu taşıyan rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında destek materyali olarak sıklıkla kullanılan Ni-NTA Agaroz, agarozla kovalent olarak bağlanmış ve nikel iyonu taşıyan nitriloasetik asit (NTA) ligandından oluşmaktadır. NTA'nın dört dişli kelatlayıcı grubu nikel iyonundaki altı bölgeden dördüne bağlı durumdadır. Rekombinant proteindeki altı histidinden ikisinin dolgu materyalindeki nikel kuvvetli bir şekilde bağlanma özelliğinden yararlanarak diğer proteinlerden ayrılması sağlanır (Şekil-1). Ni-NTA agaroz oldukça stabil olup, batch, kolon ya da FPLC sistemlerinde kullanıma uygundur. Bu dolgu materyali kullanılarak 1 ml dolgu maddesine 5-10 mg 6xHis-kuyruklu protein bağlanabilmektedir.



Şekil 1. Ni-NTA matriks ile 6xHis-kuyruğu taşıyan protein arasındaki etkileşim

Bu deneyde, rekombinant proteinin N ucunda bulunan histidin kuyruğu sayesinde saflaştırılması sağlanacaktır. İlk aşamada hedef proteinin polihistidin kuyruğunun immobilize Ni^{+2} iyonlarına düşük konsantrasyonda imidazol içeren tampon varlığında bağlanması gerçekleşir. Kolona bağlanmayan proteinler yıkama aşamasında uzaklaştırılır. Uygun koşullarda rezine bağlanan proteinin elusyonu, histidinle rekabet eden imidazolün artan konsantrasyonda uygulanarak histidinle yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir.

Materyal

Zymo Research His-Spin Protein Miniprep kit, His-Afinite Jeli, Zymo-Spin Kolon, santrifüj, protein, Bağlanma Tamponu, resine bağlanmayan proteinler, Yıkama Tamponu, temiz örnek tüpleri, toplama tüpü, Elüsyon Tamponu.

Metot

1. Zymo Research His-Spin Protein Miniprep kit kullanılarak saflaştırma işlemi yapılacaktır. Vortekslenerek süspanse edilen 250 µl His- Afinite Jeli Zymo-Spin Kolona aktarılır ve 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjlenir.
2. 150 µl protein 150 µl Bağlanma Tamponu ile birleştirilerek kolona uygulanır ve iki dakika boyunca bağlanma sağlandıktan sonra resine bağlanmayan proteinlerin kolondan ayrılması amacıyla 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjleme yapılır.
3. Santrifüj sonunda resinden ayrılan sıvı temiz bir örnek tüpüne alınır.
4. Kolona 250 µl Yıkama Tamponu eklenerek 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjleme yapılarak zayıf bağlanan proteinlerin kolondan uzaklaştırılması sağlanır.
5. Yıkama işleminin bir kez daha tekrarlanır.
6. Toplama tüpündeki sıvılar her aşamada temiz örnek tüplerine alınır.
7. Kolon yeni bir tüpe yerleştirildikten sonra 100 µl Elüsyon Tamponu kolona eklenir ve 13.000 x g'de 5-10 sn santrifüjleme yapılarak resine bağlanan proteinin kolondan ayrılması sağlanır.
8. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanır.

Saflaştırılan protein spektrofotometrik ölçümlerle miktarı belirlendikten sonra SDS-PAGE ile analiz edilecektir.

Bağlanma Tamponu: 50 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.7, 300 mM sodyum klorür, 10 mM imidazol, 0.03 % Triton X-100

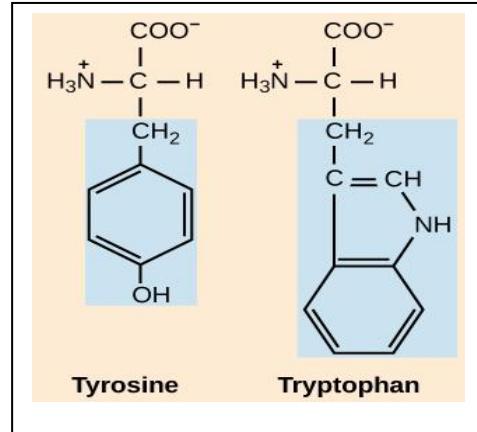
Yıkama Tamponu: 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.7, 300 mM sodium chloride, 50 mM imidazole, 0.03 % Triton X-100

Elüsyon Tamponu: 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.7, 300 mM sodium chloride, 250 mM imidazole

Jel matriks: Nikel yüklü agaroz (%30 w/v), 20 mM sodyum fosfat tamponu, pH 7.7, 100 mM sodyum klorür, 10 mM imidazol, etanol (%20 v/v)

A₂₈₀/A₂₆₀ ORANI (WARBURG – CHRISTIAN YÖNTEMİ) İLE PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Tirozindeki fenolik gruplar ve triptofandaki indolik gruplar nedeniyle proteinlerin 280 nm’de maksimum absorpsiyon göstermesinden yararlanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle örneklerdeki protein miktarı yaklaşık olarak ve hızlı bir şekilde tayin edilebilir. Duyarlılığı 0.05-2.0 mg/ml aralığı ile sınırlıdır. 260 nm’de maksimum absorpsiyon gösteren nükleik asitlerin 280 nm’de de absorpsiyon gösterebilmeleri nükleik asit artıkları ile kontamine durumdaki örneklerde hatalı



sonuçlar elde edilebilir. Bunu engellemek için Warburg ve Christian (1941) tarafından bir seri hata düzeltme faktörü (Tablo 1) geliştirilmiştir. Bu faktör genel olarak tüm proteinler için kullanılmakta ve bu yöntemde ortaya çıkabilecek hata payı indirgenebilmektedir. Kullanılan formül şu şekildedir: Protein konsantrasyonu (mg/ml) = Faktör x A₂₈₀

1981 yılında Schleif ve Wensink sadece 280 nm ve 260 nm’ de ölçülen absorbans değerlerinin kullanılmasıyla protein miktarının hesaplanabildiği formül geliştirmişlerdir.

Tablo 1. A₂₈₀/A₂₆₀ oranı için örnekteki nükleik asit yüzdesi ve düzeltme faktörlerinin yaklaşık değerleri. (ışık yolu: 1 cm)

A ₂₈₀ /A ₂₆₀ oranı	% Nükleik asit	Faktör
1.75	0.00	1.116
1.63	0.25	1.081
1.52	0.50	1.054
1.40	0.75	1.023
1.36	1.00	0.994
1.30	1.25	0.970
1.25	1.50	0.944
1.16	2.00	0.899
1.09	2.50	0.852
1.03	3.00	0.814
0.979	3.50	0.776
0.939	4.00	0.743
0.874	5.00	0.682
0.846	5.50	0.656

0.822	6.00	0.632
0.804	6.50	0.607
0.784	7.00	0.585
0.767	7.50	0.565
0.753	8.00	0.545
0.730	9.00	0.508
0.705	10.00	0.478
0.671	12.00	0.422
0.644	14.00	0.377
0.615	17.00	0.322
0.595	20.00	0.278

Yöntem

1. Tüm solüsyon ve gerekli malzemeleri hazırlayın: Kuvartz küvetler, özütlemeye tamponu, spektrofotometre, mikrosantrifüj tüpleri.
2. Protein örneğinizi mikrosantrifüj tüp içinde 1/5 oranında seyreltin.
3. Spektrofotometrenin dalgaboyunu 280 nm'ye ayarlayın.
4. Sadece tampon çözelti kullanarak bu dalga boyunda sıfır absorbansa kalibre edin.
5. Bu dalga boyunda protein örneğinizin absorbansını ölçün.
6. Spektrofotometrenin dalgaboyunu 260 nm'ye ayarlayın.
7. Sadece tampon çözelti kullanarak bu dalga boyunda sıfır absorbansa kalibre edin.
8. Bu dalga boyunda protein örneğinizin absorbansını ölçün.
9. Olası nükleik asit kontaminasyonu içeren örneklerde yaklaşık protein konsantrasyonunu hesaplamak için aşağıdaki formülü kullanın.

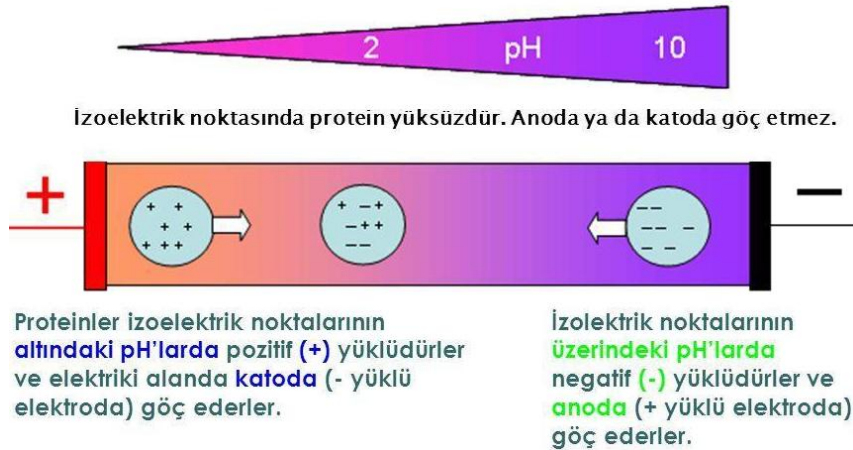
$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = 1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$$

POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (PAGE)

Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği tekniğe verilen isimdir. Yüklü moleküllerin elektriksel alanda ayrılmalarına dayanan elektroforez tekniği proteinlerin analizinde ve ayrılmasında da geniş çapta kullanılmaktadır. Moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır.

Protein elektroforezi ile proteinlerin molekül ağırlığının belirlenmesi, oligomerik ya da monomerik olma durumunun anlaşılması, miktar ya da saflıklarının belirlenebilmesi sağlanmaktadır. Ayrıca bu yöntemle doğal ya da rekombinant bir proteinin sentezlenip sentezlenmediği; sentezleniyorsa işlevsel olup olmadığı da anlaşılabilir.

Proteinler izoelektrik noktalarının üzerindeki pH değerlerinde (-) yüklüdürler ve elektriksel alanda anoda göç ederler; izoelektrik noktanın altındaki pH değerlerinde ise (+) yüklüdürler ve katoda göç ederler (Şekil 1). Moleküllerin bu jel matrisi ortamı içerisinde kat ettikleri mesafe molekülün net yükü ile doğru, molekül büyüklüğü ile de ters orantılıdır.



Şekil 1. Proteinlerin pH ve yük ilişkisi

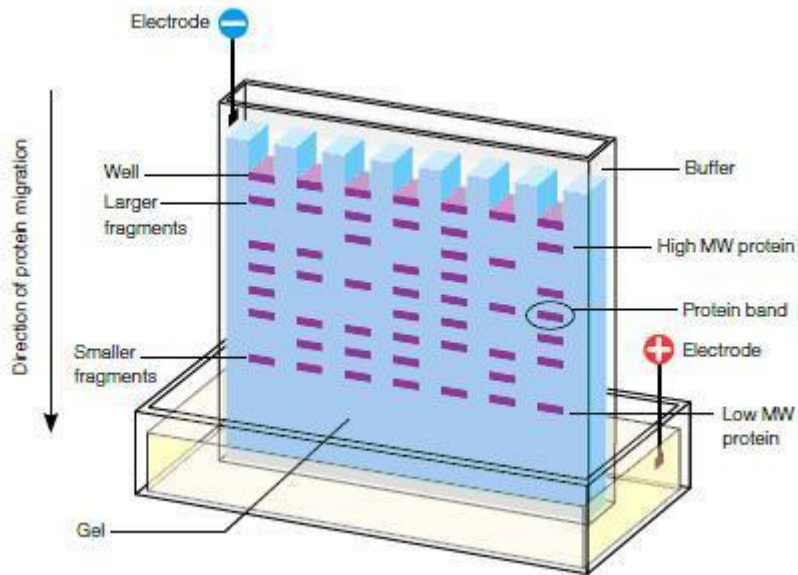
Proteinlerin elektroforetik ayrımında jel matriksi olarak nişasta, selüloz asetat, agaroz kullanılabiliyorsa da en iyi ayrışım poliakrilamid destek matriksi ile sağlanmaktadır. PAGE'de kullanılan poliakrilamid, akrilamid monomerlerinin akrilamid türevi olan çapraz bağlayıcı N-N'- metilen-bis-akrilamid (bis) yardımıyla kovalent olarak bağlanması sonucunda oluşan bir polimerdir. Çapraz bağlayıcı eklenmesiyle jelde polipeptidlerin geçeceği porlar oluşur. Amonyum persülfat (APS) polimerizasyon başlatıcı, N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin (TEMED) ise katalizör olarak kullanılmaktadır. Por büyüklüğü

jeldeki monomer yüzdesine bağı olarak belirlenir, total akrilamid %'si (w/v) arttıkça porlar küçülür. Tablo-1'de değışik oranlarda total akrilamid ile hazırlanan jellerde ayrımı gerçekleştirilebilecek polipeptid molekül ağırlığı verilmektedir.

Tablo 1. Çeşitli akrilamid konsantrasyonlarında ayrılabilir polipeptid molekül ağırlıkları

Akrilamid Konsantrasyonu (%)	Polipeptid Molekül Ağırlığı (kD)
15	12-43
10	16-68
7.5	36-94
5	57-212

Proteinler denatüre (SDS içeren) bir jelde molekül büyüklüğüne, doğal (native) bir jelde ise molekül biçimi, büyüklüğü ve yüküne göre ayrılırlar. Doğal koşullar altında yapılan elektroforezle çözünebilen proteinler biyolojik ve enzimatik aktivitelerini kaybetmeksizin ayrılırlar, ancak SDS-PAGE'de protein karışımı düşük molekül ağırlıklı tioller (2-merkaptotanol veya DTT) ve SDS varlığında ısıtılarak denatüre edildiğinden biyolojik aktivite ortadan kalkar.



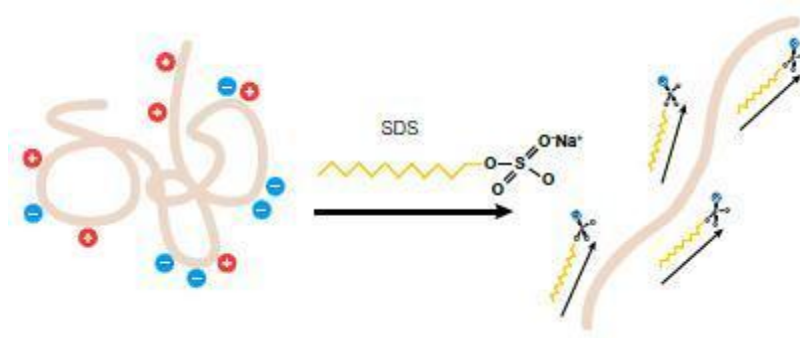
Şekil 2. Poliakrilamid jelde proteinlerin elektroforetik olarak ayrılması

Doğal Olmayan (Denatüre) Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Bir proteinin büyüklüğü ve alt birimlerinin niteliği SDS-PAGE ile belirlenebilir. Proteinler içerdikleri amino asitlere bağı olarak genellikle net bir artı veya eksi yüke sahiptir. Protein molekülünü içeren bir

çözeltiliye elektrik alan uygulandığında protein net yüküne, büyüklüğüne ve biçimine bağlı olarak belirli bir hızla hareket eder.

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) SDS polipeptidlerin ana iskeletini çevreleyerek denatürasyona yol açan anyonik bir deterjan olup, moleküllere negatif yük kazandırmakta ve böylece moleküllerin yalnızca molekül ağırlıklarına dayalı olarak ayrılması sağlanmaktadır (Şekil 3). SDS-PAGE ile molekül ağırlığı bilinmeyen protein karışımı, ağırlığı bilinen standart karışımla yan yana kuyulara yüklenerek gözlenen bantlar karşılaştırılmakta ve polipeptidin molekül ağırlığı belirlenebilmektedir.



Şekil 3. SDS' in protein yükü ve konformasyonu üzerindeki etkisi

Materyal

Jel kaseti, elektroforez aleti, kalın ve ince cam, etanol, yürütme sistemi, jel dökme bölmesi, %12 monomer karışımı, APS, pastör pipeti, iso-propanol çözeltisi, su, polimerizasyon, %5 monomer karışımı, yükleme jeli, plastik tarak.

Metot

Jellerin Hazırlanması

Jel elektroforezi 8x8.5cm boyutunda ve 1 mm kalınlığında bir jelin kullanılabildiği elektroforez aletinde gerçekleştirilecektir. Yöntemde açıklanan miktarlar kullanılan alete ve jel büyüklüğüne göre ayarlanmalıdır.

1. Jel kaseti kullanılan elektroforez aletinin tipine göre değişik tekniklerle hazırlanabilir. Kalın ve ince cam etanolle üzerinde toz kalmayacak şekilde temizlendikten sonra bir araya getirilir ve yürütme sisteminde sabitlendikten sonra sızdırmanın engellenmesini sağlayan jel dökme bölmesine yerleştirilir.
2. Bir örnek tüpü içerisinde % 12 monomer karışımı içeren **ayırma jeli** Tablo-2'deki içeriğe ve sıralamaya göre hazırlanır. (APS taze olarak hazırlanmalıdır).

3. Karışım pastör pipeti yardımıyla üstten 2-3 cm kalana dek camların arasına doldurulur.
4. Jel yüzeyini düzgünleştirmek için iso-propanol çözeltisi veya su eklenir.
5. Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından jelin üzerindeki sıvı uzaklaştırılır ve %5 monomer karışımı içeren yükleme jeli Tablo-2'deki içeriğe ve sıralamaya göre hazırlanır. Hafifçe karıştırıldıktan sonra pastör pipeti yardımıyla yükleme jeli üzerine dökülür.
6. Jelde kuyucuk oluşturmayı sağlayan plastik tarak yerleştirilir ve jelin polimerleşmesi beklenir.

Tablo 2. SDS-PAGE Jel Karışımları

	%12'lik Ayırma Jeli	%5'lik Yükleme Jeli
H₂O	3.29 ml	2,815 ml
Tris tamponu	1.5M pH 8.8 2.5 ml	0.5M pH 6.8 1,25 ml
%30 Akrilamid:Bis	4 ml	0.83 ml
%10 SDS	100 µl	50 µl
%10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl
TOPLAM	10 ml	5 ml

Örneklerin Hazırlanması

1. 4x yükleme tamponuna %30 oranında (v/v) 1 M DTT eklenir.
2. Örnekler 4x yükleme tamponu ile birleştirilir (3 örnek:1 tampon).
3. Karışım 4 dakika boyunca kaynar suda bekletilerek proteinler denatüre edilir.

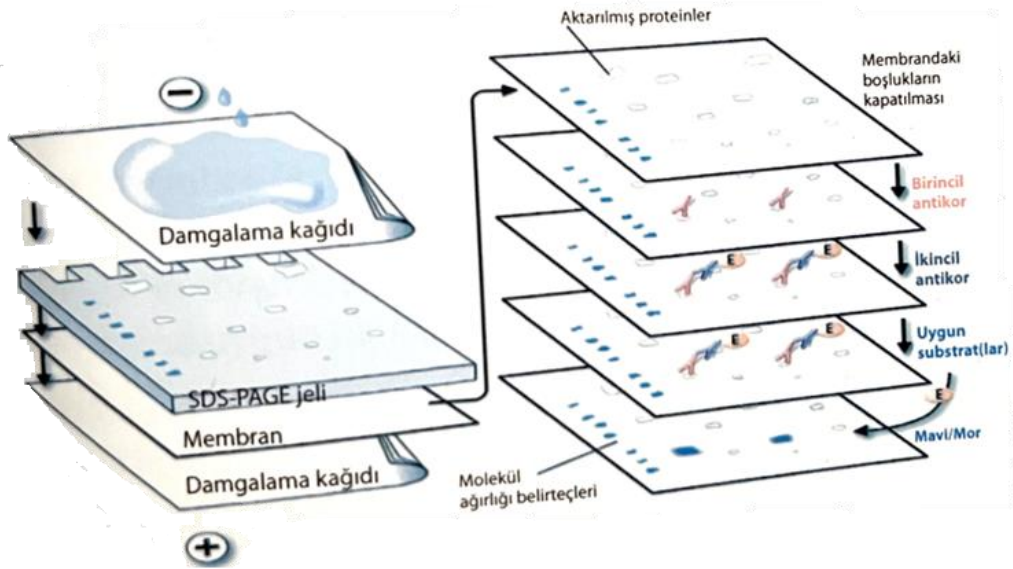
Örneklerin Jele Uygulanması ve Elektroforez

1. 10 x Yürütme Tamponu 10 kez sulandırılır ve jel kasetinin içine ve elektroforez tankına yeterli miktarda dökülür.
2. Tarak kuyucukları bozmayacak şekilde jelden çıkarılır ve ceplerdeki tuzlar ve polimerleşmemiş akrilamid kalıntılarını uzaklaştıracak şekilde tamponla yıkanır.
3. Örnekler ve standart protein karışımı kuyulara yüklenir.
4. Sistem güç kaynağına bağlanır ve 80 V akım uygulanır.
5. Örnekler yükleme jelinden çıkıp ayırma jeline geçtiklerinde 160V akım uygulanır.
6. Bromofenol mavisini jelin altına 0.5 cm kalana dek yürüdüktan sonra işlem durdurulur.

7. Yürütme sonrasında jel, cam plakalar arasından ayrılır ve boyama solüsyonu içerisine alınıp, 30 saniye mikrodalga fırında ısıtıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika çalkalanarak boyanır.
8. Boyama işlemi ardından jel boya çıkarma solüsyonuna alınır jel rengi açılana kadar çalkalama yapılarak proteine bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması sağlanır. Bu süre zarfında yıkama solüsyonu birkaç defa değiştirilir ve jel rengi tamamen açılınca, yıkama solüsyonu boşaltılarak saf su içerisine alınmıştır.

WESTERN BLOTLAMA

SDS-PAGE ile molekül ağırlığına, büyüklüğüne ve yüküne veya izoelektrik noktasına göre ayrılmış kompleks bir karışım içinde hedeflenen bir proteini ayırt edici bir şekilde saptamak için kullanılan en genel yöntem Western blotting (Western damgalama)'dır (Şekil 1). Bu duyarlı yöntem iki aşamadan oluşur: önce jel üzerindeki proteinler, boyama yapılmaksızın, daha kararlı ve sabit bir ortama (membran veya filtre üzerine) aktarılır; sonra da hedeflenen proteine özgü bir belirteç saptanır. Böylece yürütülmesi mümkün olmayan ya da güç olan analitik teknikler uygulanabilir. Saptamada en yaygın yol immünolojik belirteç kullanımıdır. Bu uygulamada protein kendisine özgü antikorla işleme sokulur. Antijen- antikor bağlantısının gerçekleştiği bölgeler antikordaki özel bir işaret aracılığıyla belirlenir. Bu tip saptamalar membran üzerinde yapılır.



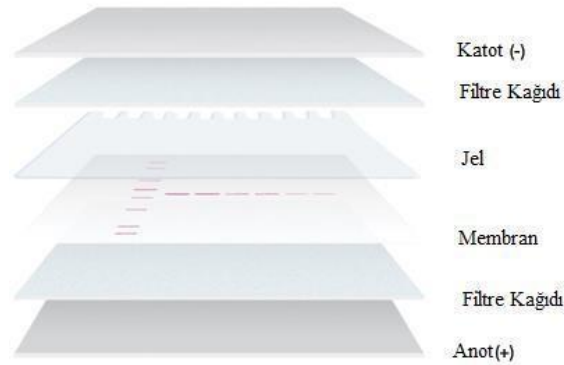
Şekil 1. Jeldeki proteinlerin membrana akatarılması ve dolaylı antikor tekniği ile saptanması

En yaygın kullanılan membran tipleri nitroselüloz ve PVDF (polivinilidin diflörür) membranlardır. PVDF membranlar kullanımdan önce ön işlem (95% etanol, izopropanol veya metanolde bekletme) geçirilmekle birlikte daha dayanıklıdır ve antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra yeniden kullanılabilir.

Yarı Kuru Damgalama

Bu sistemde elektrotlara değen tamponlarla ıslatılmış filtre kağıtları arasına yerleştirilmiş jel-membran paketi yatay durumda iken elektrik akımı geçirilir. Aktarım tamponu çok az (sadece elektroforez tamponundaki tuz ve deterjanlar uzaklaştırmak amacıyla jelin yıkanması ve filtre kağıtlar ile

nitroselüloz membranin ıslatılması için) kullanıldığından yarı kuru damgalama olarak adlandırılmıştır. Böylece daha az tampon ile hızlı ve etkin bir aktarım gerçekleştirilir (Şekil 2).



Şekil 2. Jeldeki proteinlerin membrana transferi için yerleşimi

Membrana aktarımdan sona hedeflenen protein immünolojik etkileşimlerle saptanacaksa, bu işleme geçmeden önce membrana aktarılmış proteinlerin bulunduğu yerler dışındaki boşlukların kapatılması gerekir. Çünkü hedeflenen proteine (antijene) özgü immünolojik ajan (antikor) da protein yapıdadır ve işlem sırasında antijen yerine membrandaki boşluklara bağlanabilir. Membran yüzeyindeki boşlukları kapatmak için membrana ve saptama yöntemine uygun bir kapatma ("blocking") ajanı kullanılır. Yağsız süt tozu bu amaçla yaygın olarak kullanılan bloklama ajanıdır. Yağsız süt tozu; ucuz ve kullanımı kolaydır. Ancak sinyal yoğunluğunun azalmasına neden olan biotin gibi maddeleri içerebilir.

Membrana aktarılmış proteinler alkalın fosfataz ("alkaline phosphatase", AP), yabancıturpu peroksidazı ("horseradish peroxidase", HRP) gibi enzimlerle, floresan moleküllerle (floroforlarla), radyoizotoplarla veya kolloidal altınla işaretlenmiş antikorlarla saptanabilir.

Materyal

Alet, jel, membran, aktarım tamponu, filtre kağıdı, elektrotlar, güç kaynağı, protein aktarımı, bloklama tamponu, immünglobulinler, bloklama çözeltisi, birincil antikor, yıkama tamponu, ikincil antikor, görüntüleme cihazı.

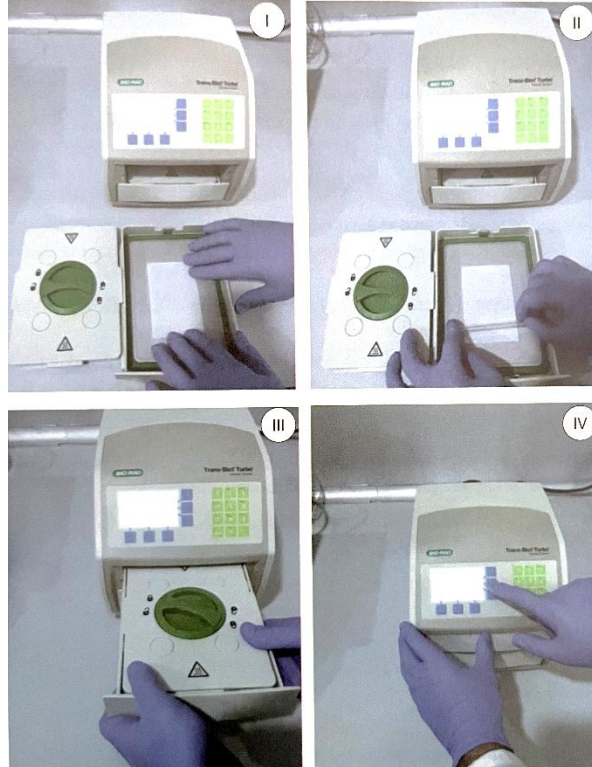
Metot

Jel Üzerindeki Proteinlerin Membrana Yarı Kuru Aktarım

- 1- Aletin içine yerleştirilecek her bir sandviçi hazırlamak üzere jel ve membran boyutundan daha büyük boyutta kesilmiş ve aktarım tamponuyla ıslatılmış altı filtre kağıdından üçü cihazın anot

plakası üzerine yerleştirildikten sonra sırasıyla membran, jel ve tamponla ıslatılan diğer üç filtre kağıdı hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat ederek yerleştirilir.

- 2- Daha sonra aletin katot plakası yerleştirilip, aletin kapağı kapatılır.
- 3- Elektrotlar güç kaynağına takıldıktan sonra 25 V'da 1.3 A'de 7 dakikada proteinlerin membrana aktarımı gerçekleştirilir (Şekil 3).



Şekil 3. Jel üzerindeki proteinlerin membrana yarı kuru aktarım aşamaları

İmmünojenik Saptama

- 1- Aktarım sonrası membran blokaj tamponunda 30 dakika bekletilerek immünglobulinlerin yanlılıkla bağlanabileceği bölgeler kapatılır.
- 2- Blokaj çözeltisi dökülür; membran, birincil antikor ile muamele edilir ve +4 °C' da gece boyu bekletilir.
- 3- Birincil antikorlu çözeltisi toplanır, membran 5'er dakikadan 5 kez yıkama tamponu ile yıkanır.
- 4- Yıkama işlemi sonrası ikincil antikorla 1 saat oda sıcaklığında muamele edilir.
- 5- İkincil antikorlu çözeltisi toplanır, membran 5'er dakikadan 5 kez yıkama tamponu ile yıkanır.
- 6- Belirleme aşamasına geçilir ve görüntüleme cihazında görüntü alınır.

KAYNAKLAR

1. Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample kit protokol (<http://lifescience.roche.com/shop/products/transcriptor-high-fidelity-cdna-synthesis-kit>)
2. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 2008 / Temizkan, G., Arda, N. (Ed.), 3.Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
3. Academic Press RNA Methodologies / Robert E. , Farrell Jr.
4. Molecular Cloning, Vol. 1, J. Sambrook, D.W. Russel, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
5. Section VIII: Separation of RNA in Agarose Gels,
6. http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_VIII_-_Separation_of_RNA_in_Agarose_Gels.pdf
7. Jacquie T. Keer, Lyndsey Birch, “Essential of Nucleic Acid Analysis. A Robust Approach”, The Royal Society of Chemistry, ISBN: 978-0-85404-367-5, 2008, 101-131.
8. Taq PCR Handbook, QIAGEN, Third Edition, 2010.
9. Maddalena Querci, Marco Jermini and Guy Van den Eede, User Manual, European Comission Training Course On The Analysis Of Food Samples For The Presence Of Genetically Modified Organisms , ISBN: 92-79-02242-3, 2006.
10. Leland J. Cseke Ara Kirakosyan Peter B. Kaufman Margaret V. Westfall, Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, Third Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011, 37.
11. <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/>
12. <http://www.oligo.net/>
13. “Real-Time PCR ve Uygulama Alanları”, Tuğba Günel, Kılıç Aydın. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 2(2): 43-45, 2009.
14. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR” Dr.Tuğba Günel QUANTITATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION “REAL-TIME PCR”: SCIENTIFIC LETTER
15. <https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/zpekmezci/130848/Gerçek%20Zamanlı%20PCR>.
16. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pmic.201300239>
17. <Url-1><http://www.ucl.ac.uk/~ucbcdab/enzpur/amso4.htm>
18. Qiagen The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis tagged proteins, Fifth edition, June 2003.<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/134/p2001i.pdf>
19. http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/protein-electrophoresis-methods#bn_page

20. Laemmli, U.K., (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *nature*, 227: 680-685.
21. <https://www.bio-rad.com/en-uk/sku/1704150-trans-blot-turbo-transfer-system?ID=1704150>
22. Sambrook, J., Russell, DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., A4.50, A8.9, Vol.1., Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.
23. Herzer, S., 2001, *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*, pp. 167-179, Gerstein, AS. (Ed), Wiley-Liss, Inc.
24. <http://bio.classes.ucsc.edu/bio105I/EXERCISES/PCR/handout.pdf>
25. https://www.elabprotocols.com/viewer/protocol.ashx?jsID_504=10&jsID_505=20&jsID_501=2&jsID_719=DH5a&jsID_502=2&jsID_720=DH5a&jsID_503=500&jsID_506=50&jsID_507=25&jsID_508=575&jsID_509=500&jsID_510=500&jsID_511=500&jsID_512=50&jsID_514=330&jsID_515=250&jsID_516=2&initpdf=true&id=18
26. Klug S.W., Cummings M. R., Charlotte A.S. (2006). *Genetik Kavramlar* (C. Öner, Çev.) İstanbul: Palme.
27. Westermeier, R. (1997). *Electrophoresis in Practise: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.
28. www.geocities.ws/eehakki/purifikasyon.doc
29. <http://www.genoks.com.tr/Eklenti/103,dna-esktraksiyon-kitleri.pdf?0>
30. *Molecular Biology Techniques*, LAB SESSION 5, 2012, DOI:10.1016/B978-0-12-385544-2.00005-3
31. Yoshino Y., Ishida M., Horii A., *Biotechnol Lett* (2007) 29:1557–1560.
32. http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/cloning/transformation/
33. BERGMANS H. E. N., VAN DIE I. M., HOEKSTRA W. P. M., *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, May 1981, p. 564-570.
34. <http://store.biobasic.com/resources/productinfo/Kit%20Brochure%20Complete%20-v17.pdf>
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/dna-and-rna-purification/plasmid-miniprep-kit.html>