



TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK LABORATUVAR KILAVUZU

**TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI**

İzmir, 2022

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Yayın No: 26

Bu eserin, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Yönetim Kurulu'nun 27.09.2022 tarih ve 2022-33 sayılı toplantısında alınan 10. kararı uyarınca, elektronik kitap olarak yayımlanmasına karar verilmiştir.

Her hakkı saklıdır.

© İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Yayınları
2022

Sertifika No: 46629

Laboratuvar Sorumluları:

Prof. Dr. İbrahim PİRİM
Prof. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA
Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ
Doç. Dr. Melek PEHLİVAN

ISBN: 978-605-70737-5-4

Tıbbi biyoloji ve genetik laboratuvar kılavuzu/ Laboratuvar Sorumluları: İbrahim Pirim, Tülay Kılıçaslan Ayna, Mustafa Soyöz, Melek Pehlivan. – İzmir – İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, 2022.

Çevrimiçi (70 sayfa: şekil; 26 cm. -- (İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi; Yayın No: 26).

ISBN: 978-605-70737-5-4

Tıbbi biyoloji – Rehberler 2. Genetik – Rehberler.

I. Pirim, İbrahim -- II. Ayna, Tülay Kılıçaslan – III. Soyöz, Mustafa – IV. Pehlivan, Melek.

Adres : İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Rektörlüğü, Balatçık Yerleşkesi, 35620 Çiğli
İzmir, Türkiye

Telefon : +90 232 329 3535 / 1255

E-posta : ykb@ikc.edu.tr

Belge-geçer : +90 232 386 0888

Web : ykb.ikc.edu.tr

Eserin hukuki ve etik sorumluluğu yazarlara aittir. Tüm hakları saklıdır. Bu kitabın yayın hakkı İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'ne aittir. İzinsiz kopyalanamaz ve çoğaltılamaz.

ÖĞRENCİ BİLGİ SAYFASI

Öđrencinin:

Adı-Soyadı:

Numarası:

Bölümü:

Diğer Bilgiler:

İçindekiler

ÖĞRENCİ BİLGİ SAYFASI.....	2
LAB.1- MİKROSKOP ÇEŞİTLERİNİN TANITIMI ve IŞIK MİKROSKOBUNUN KULLANILMASI	4
BÖLÜM 1 SORULAR.....	10
LAB 2. İNSAN HÜCRE PREPARATLARININ HAZIRLANMASI ve İNCELENMESİ....	12
BÖLÜM 2 SORULAR.....	17
LAB.3- MİTOZ BÖLÜNMENİN İNCELENMESİ	19
BÖLÜM 3 SORULAR	23
LAB 4- MAYOZ BÖLÜNMENİN İNCELENMESİ.....	25
BÖLÜM 4 SORULAR	31
LAB.5- DNA İZOLASYONU	33
BÖLÜM 5 SORULAR	37
LAB.6- POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) ve AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ	39
LAB.6.1 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)	39
BÖLÜM 6.1 SORULAR.....	45
LAB.6.2 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ	47
BÖLÜM 6.2 ÇALIŞMA SAYFASI.....	55
LAB 7-DNA DİZİ ANALİZİ	57
LAB.8-KARYOTİP ANALİZİ.....	64
BÖLÜM 8 SORULAR	67
LAB.9-KALITIM KALIPLARI ve PEDİGRİ ANALİZİ.....	69
BÖLÜM 9 SORULAR	71

LAB.1- MİKROSKOP ÇEŞİTLERİNİN TANITIMI ve IŞIK MİKROSKOBUNUN KULLANILMASI

MİKROSKOP: Gözle görülemeyecek kadar küçük olan cisimleri objektif ve oküler adı verilen mercekler sistemiyle büyüterek, materyalin görüntüsünü düzgün bir biçimde göze yansıtan optik bir alettir. Gözümüz 0.1 mm'den küçük olan cisimleri ayırt edemez.

Aydınlatma kaynağı esas alınarak yapılan sınıflandırmaya göre iki tip mikroskop vardır:

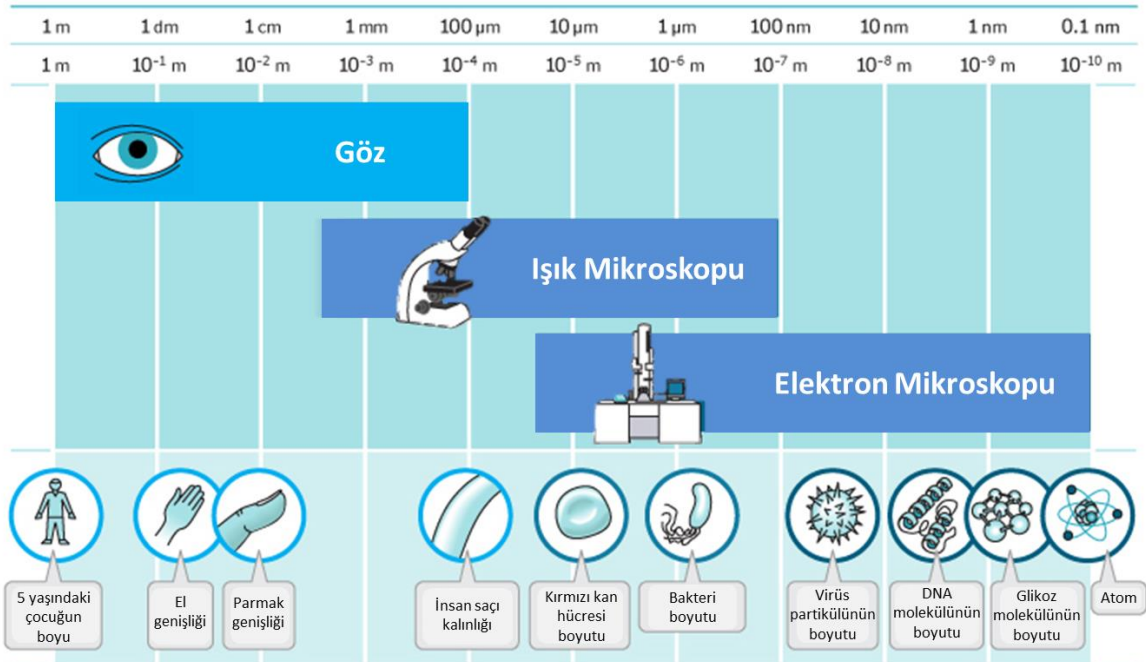
1. Işık Mikroskopları

- Basit ışık mikroskobu
- Faz kontrast mikroskobu
- Ultraviyole mikroskobu
- Fluoresan mikroskobu
- Karanlık saha mikroskobu
- Stereo mikroskop (dissection mikroskobu)

2. Elektron Mikroskopları

- TEM (Transmission Elektron Mikroskobu)
- SEM (Scanning Elektron Mikroskobu)

Mikroskoplar oküler adedine göre; monoküler, binoküler ve trinoküler olmak üzere üç tiptir. Mikroskopta incelenen cisimi büyütecek bir optik kısım ile bu optik kısmı taşıyan mekanik kısımlardan oluşur.



© Copyright. 2012. University of Waikato. All Rights Reserved.

Şekil 1.1 Mikroskopların ayırt etme gücüne göre sıralanması (<http://www.boruhealthmachine.org/the-resolving-power-of-a-microscope-is-a-function-of.html>)

Bu laboratuvar kapsamında da preparat incelemelerinde ışık mikroskobu kullanılacaktır.

IŞIK MİKROSKOBU

Mikroskobu oluşturan elemanlar:

Mikroskop mercek sistemlerinden oluşmuş optik bir alettir. Başlıca iki kısımdan oluşur: A) Mekanik kısım B) Optik kısım

A)Mekanik kısım: Optik kısma destek vazifesi görür. Başlıca şu parçalardan oluşur.

Mikroskop ayağı: At nalı şeklinde olup mikroskobun masa üzerinde sağlam bir şekilde durmasını sağlar.

Mikroskop kolu: Mikroskop bu koldan tutularak taşınır. Üst kısmında mikroskop tüpünü ve alt kısmında mikroskop tablasını taşır.

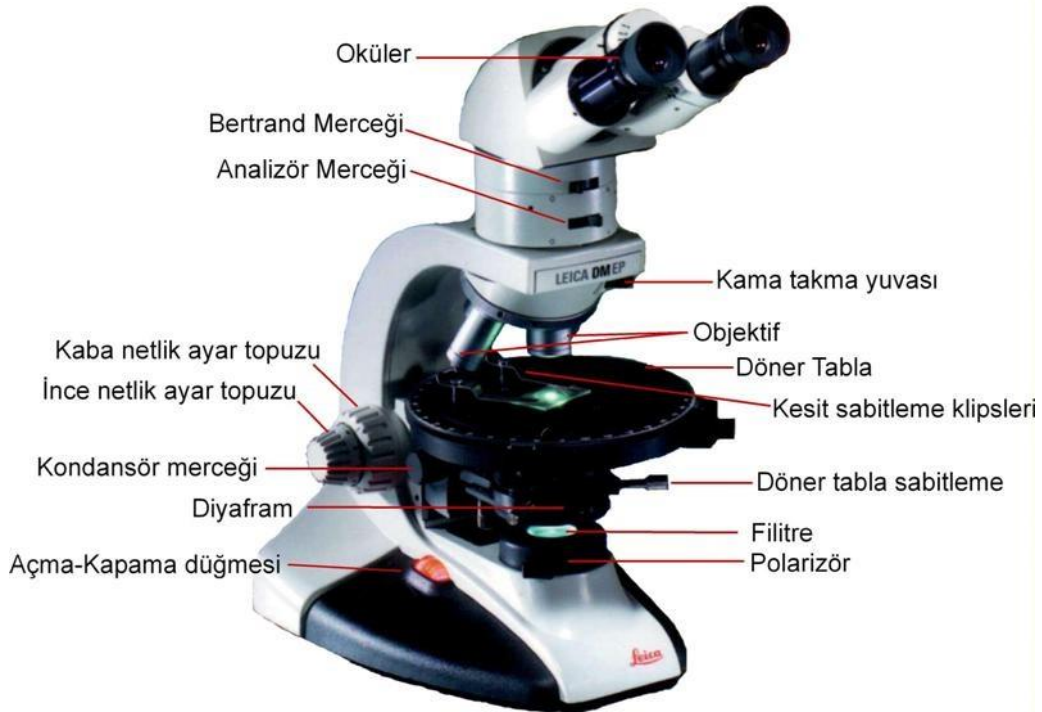
Mikroskop tüpü: Üst ucunda oküler ve alt ucunda objektifleri taşıyan bir tüptür. Mikroskop koluna bağlıdır ve bir dişli yardımıyla düşey yönde hareket ettirilir. Bazı mikroskoplarda mikroskop tüpü hareketsizdir. Bu takdirde düşey hareket mikroskop tablası ile yapılmaktadır. Tabla objektife yaklaştırılıp uzaklaştırılmalıdır.

Revolver: Mikroskop tüpünün alt ucuna bağlı olan, üzerinde çeşitli objektifleri taşıyan ve istenilen objektifin görüş eksenine kolaylıkla gelebilmesini sağlayan, dönen bir daire şeklinde ayar düğmesidir.

Makrovida: Mikroskop tüpünü hızlı hareket ettirir ve kaba bir ayarlama sağlar. Kaba ayar düğmesidir.

Mikrovida: Mikroskop tüpünü çok yavaş hareket ettirir. Bu nedenle ayarlamayı keskinleştirmekte kullanılır. İnce ayar düğmesidir.

Mikroskop tablası: İncelenecek preparatın üzerine oturtulduğu ortası delik bir levhadır. Sabit veya hareketli olabilir. Preparat tabla üzerinde iki klips yardımıyla sabitleştirilir.



Şekil 1.2 Işık Mikroskobunun Genel Kısımları (<https://www.yenibiyoloji.com/mikroskop-nedir-mikroskobun-kisimlari-cesitleri-ve-ozellikleri-2769/>)

B) Optik kısım:

Ayna/aydınlatma lambası: Bazı mikroskoplarda aydınlatma lambası bulunurken bazılarında ayna bulunur. Aydınlatma lambası direkt ışık kaynağı olarak kullanılırken, ayna ışık kaynağından gelen ışığı cismin üzerine yöneltmeye yarar.

Kondansör: Mikroskop tablasının altında bulunan yakınlaştırıcı, kuvvetli iki mercekten yapılmış bir sistemdir. Aynadan gelen ışığı cismin üzerinde toplamaya yarar.

Diyafram: Kondansörün altında bulunan, ortasındaki boşluğu istenilen oranda daraltıp genişletebilen bir perdeden oluşmuştur. Aynadan kondansöre gelen ışık demetinin çapını ayar eder.

Mikroskopun en değerli parçaları ve cisimi büyütülmüş bir şekilde gösteren kısımlar objektif ve okülerdir.

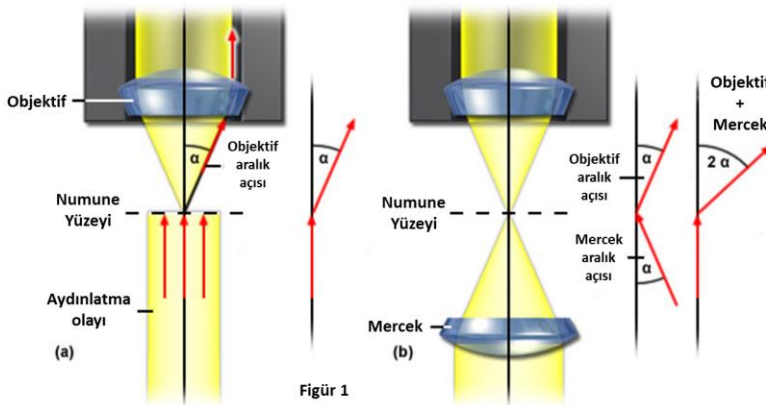
Objektif: Objektifler, mikroskop tüpünün alt ucunda bulunan revolverin deliklerine vidalanmış bir veya birkaç mercekten yapılmış bir sistemdir. Kuvvetlerinin artış sırasına göre takılır. Görüntü ayarlanırken zayıf objektiflerden daha kuvvetlisine sıra ile revolver'dan döndürerek geçilir. Objektifin büyütme yeteneği kendi üzerinde yazılıdır. Zayıf objektifler kısa, kuvvetli objektifler daha uzundur. Cisimden gerçek, ters ve büyütülmüş bir görüntü verirler.

Oküler: Mikroskop tüpünün göze yakın ucuna yerleştirilen ve iki mercekten yapılmış bir sistemdir. Görevi, objektifin verdiği görüntüyü büyütürken görüntüyü iletmektir. Oküler üzerinde büyütme kabiliyetleri yazılıdır.

Mikroskopla gözlediğiniz objeyi ne kadar büyüttüğünüzü bilmeniz önemlidir. Büyütme derecesini bulmak için oküler ile kullandığınız objektif üzerindeki rakamları çarpmanız yeterlidir.

Örneğin eğer okülerin gücü 10X (on defa büyütme) ve objektifin gücü 40X (kırk defa büyütme) ise toplam büyütme $10 \times 40 = 400$ 'dür.

Bir mikroskopun en önemli özelliği onun ayırt etme gücüdür (çözünürlük). Ayırma gücü, yan yana duran nokta şeklindeki iki cisimi net olarak seçebilme yeteneğidir. Işıkların oluşturduğu koninin tepe açısı 2α ile gösterildiğinde ayırma gücü (d) şu formülle hesaplanır.



$$d = 0.61 \lambda / n \sin \alpha$$

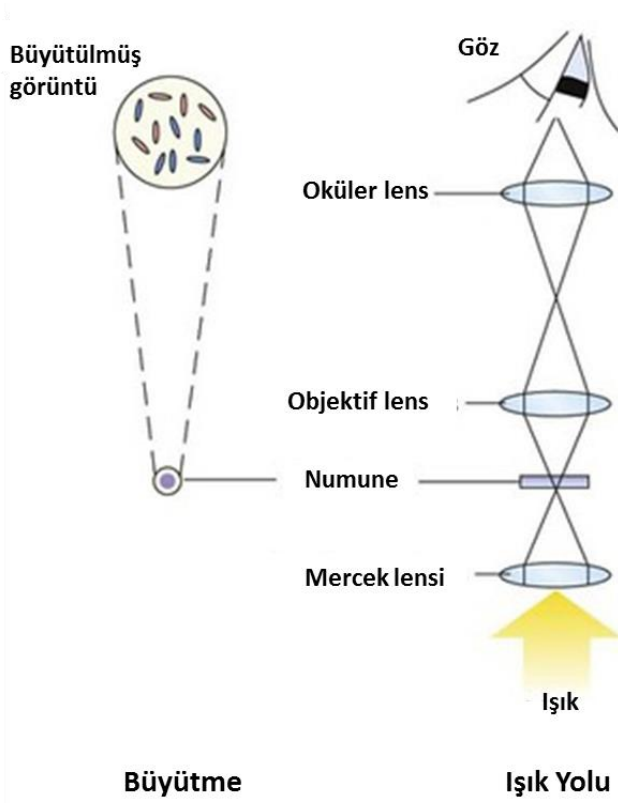
d: ayırma gücü

λ : kullanılan ışığın dalga boyu

n: objektif ile cismin arasında bulunan ortamın kırma indisi (hava veya yağ)

α : cisimden objektife gelen ışınların oluşturduğu koninin tepe açısının yarısıdır.

Şekil 1.3 Mikroskoptaki ışık kaynağından gelen ışığın merceklerde kırılması. a) kondansör yok, b) kondansör mevcut (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html>)



Şekil 1.4 Mikroskopta görüntünün oluşması (<https://clinicalgate.com/role-of-microscopy/>)

Objektifin cisme yaklaştırılması α açısının büyümesine, dolayısıyla ayırma gücünün azalmasına, diğer deyimle görüntünün daha büyük ve net görünmesine neden olur. Kırma indisi (n) hava için $n=1.0$ kabul edilir, immersiyon yağında bu değer $n=1.5$ olup ayırma gücünü 1.5 kat daha güçlendirir. Yine kullanılan ışığın dalga boyu ne kadar kısa olursa ayırma gücü o kadar güçlenir. Günümüzde kullanılan en iyi mikroskoplarda; α açısı 70° dir. Görünür ışınların en kısası mavi olup dalga boyu $\lambda =450\text{nm}$, havanın kırma indisi $n=1.0$ olduğuna göre $d=292\text{nm}$, yani yaklaşık 300nm dir. Eğer immersiyon yağı kullanılırsa $d=194\text{nm}$, oda yaklaşık 200nm dir.

Ne tür objektif kullanılırsa kullanılsın, görüntü ne kadar büyütülürse büyütülsün normal ışık mikroskoplarıyla birbirlerine $0,2 \mu\text{m}$ 'den daha yakın cisimler veya boyu $0,2 \mu\text{m}$ 'den daha küçük cisimler iyi seçilemezler.

Mikroskop özenli bir bakım gerektiren duyarlı bir araçtır. Mikroskobu kullanırken daima aşağıdaki genel kurallara dikkat etmeniz gerekmektedir:

- Mikroskobu bir elinizle altından, diğer elinizle kolundan sıkıca tutarak daima iki elle taşıyınız.
- Mikroskobunuzu masanın kenarına fazla yakın koymayınız ve masanın üzerindeki gereksiz şeyleri önceden kaldırınız.
- Eğer su ile hazırlanmış bir preparat kullanıyorsanız, mikroskobun tabanını tam yatay duruma getiriniz.
- Mikroskobun mercekleri yumuşak tülbent beziyle siliniz.
- Mikroskobun ayar vidaları zorlanmamalıdır.
- Kaba ayar yapılırken merceğin lama çarpmamasına özen gösterilmelidir.

- Çalışmanız bittiği zaman, mikroskobun kılıfını yerleşirmeden önce küçük objektifi kullanma durumuna getiriniz.

Mikroskobun çalışmaya hazırlanması

- Küçük objektifi kullanma durumuna getiriniz. Objektifin tam olarak yerine oturduğu bir tık sesinden anlaşılır.
- Tablanın ortasındaki boşluğu aydınlık hale getirecek şekilde aynayı ayarlayınız.
 - Mikroskopların çoğunda ışığı azaltıp çoğaltmaya yarayan bir diyafram bulunur.
 - Bazı objeler parlak ışıkta, bazıları da hafif ışıkta daha iyi incelenirler.
- Merceklerin temizliğini kontrol ediniz ve gerekiyorsa siliniz.

BÖLÜM 1 SORULAR

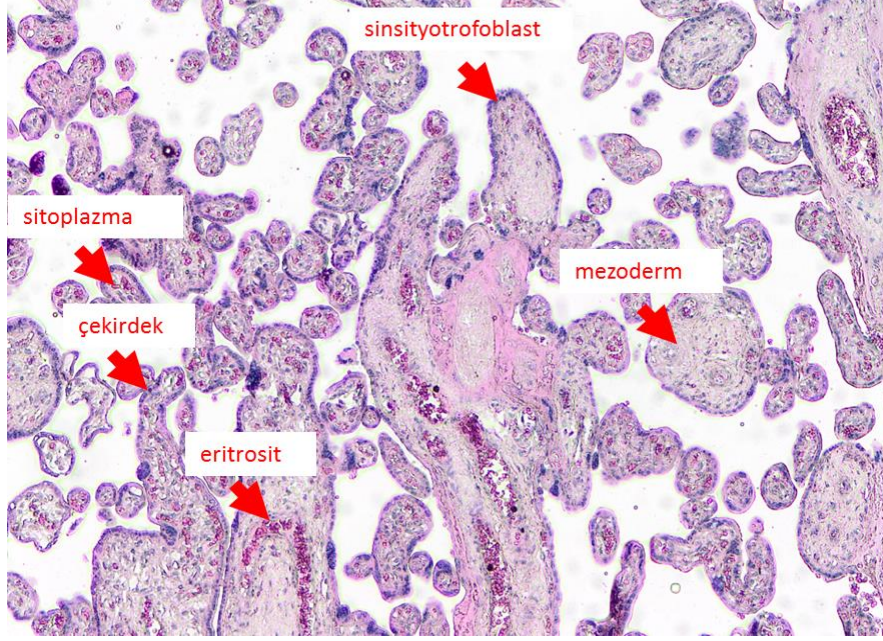
Hazırlayan:

Denetleyen:

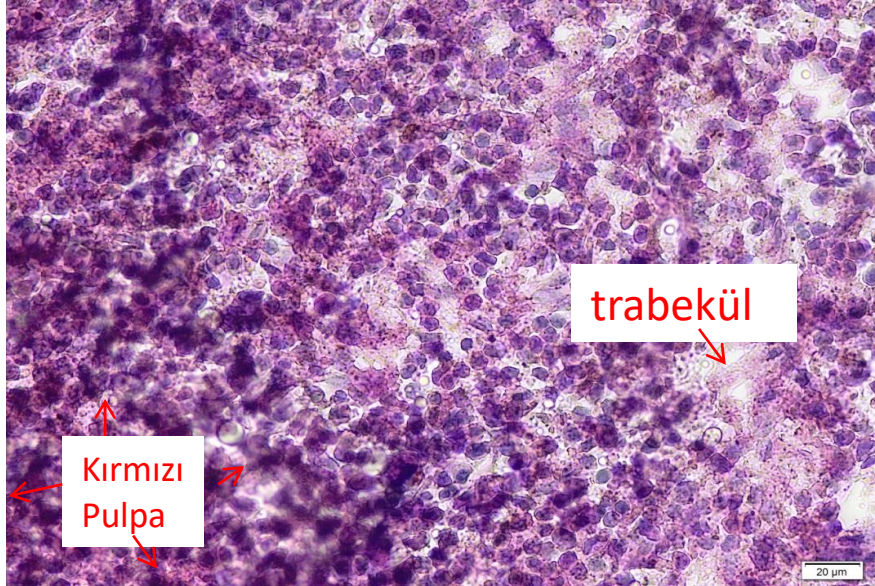
Yorum:

LAB 2. İNSAN HÜCRE PREPARATLARININ HAZIRLANMASI ve İNCELENMESİ

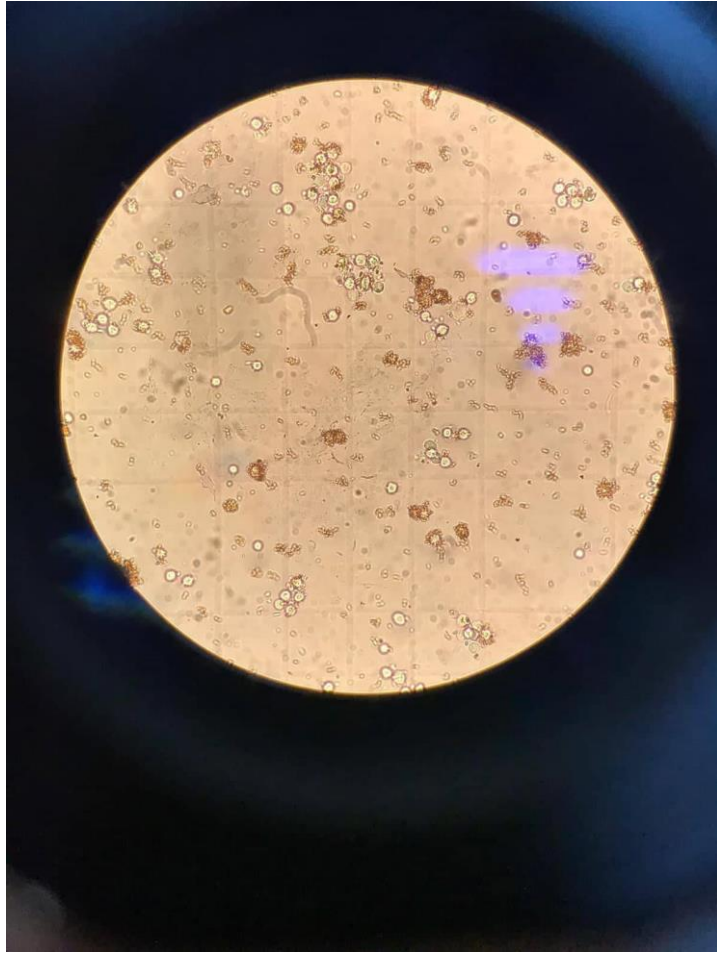
Bu laboratuvar dersinde insan dalak dokusundan ve plasentadan hazırlanan preparatlarda farklı hücre tipleri incelenecek, çekirdek –sitoplazma ayrımı ve hücre boyut ölçümü yapılacaktır.



Şekil 2.1 Plasenta doku kesitinden hemotoksilen- eozin boyama



Şekil 2.2 Dalak doku kesitinden hemotoksilen- eozin boyama



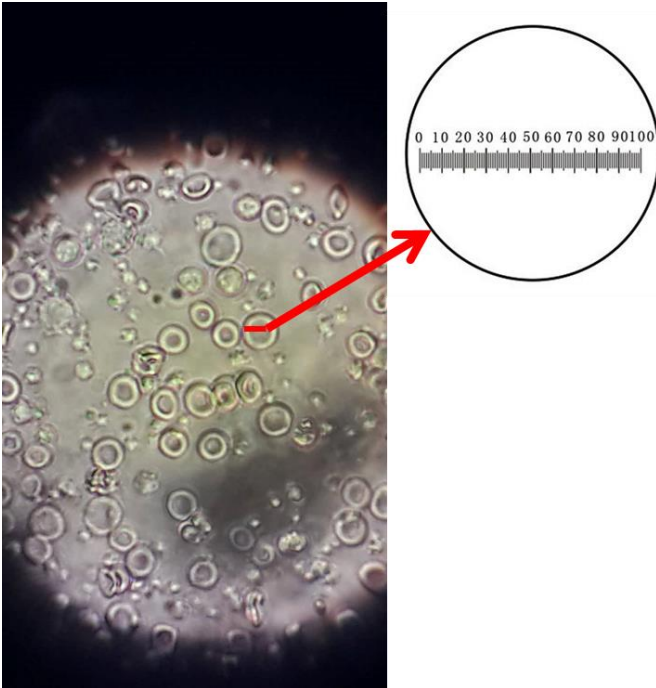
Şekil 2.3 Dalaktan izole edilen B hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü

Hücre Boyutunun Ölçülmesi

- Hücrelerin boyutunu ölçmek için oküler ve objektif mikrometre kullanılır.
- Oküler mikrometre, yuvarlak, ince camdan yapılmış ve üzerindeki çizgi 100 eşit parçaya bölünmüştür. Oküler tübü içine yerleştirilir.
- Objektif mikrometre, 1/100 mm bölmeli çizgiyi taşır. İki çizgi aralığı = 1/100 mm = 0.01 mm = 10 µm dir. Mikroskop tablasına yerleştirilir.
- Büyütme kapasitesi en düşük objektif kullanılarak, objektif mikrometre görüş alanının ortasına getirilir.
- Oküler mikrometrenin başlangıç çizgisi ile objektif mikrometrenin başlangıç çizgisi üst üste getirilir.
- Her iki mikrometrenin bölmeleri takip edilerek, başlangıç noktalarından mümkün olduğu kadar uzakta üst üste çakışan çizgiler bulunur.
- Başlangıç çizgisi ile çakışan çizgiler arasındaki bölmeler hem oküler hem objektif mikrometrede sayılır.
- Kullanılan objektife göre, oküler mikrometrenin iki çizgisi arasındaki mesafe hesaplanır.

Örnek: Oküler mikrometrenin 90. Çizgisi, objektif mikrometrenin 11. Çizgisi ile çakışmış olsun. Objektif mikrometrenin her bölmesi 10 µm olduğuna göre 11 aralık = 110 µm olur. Bu durumda; Oküler mikrometredeki her bölme $110 / 90 = 1.22$ µm uzunluğundadır.

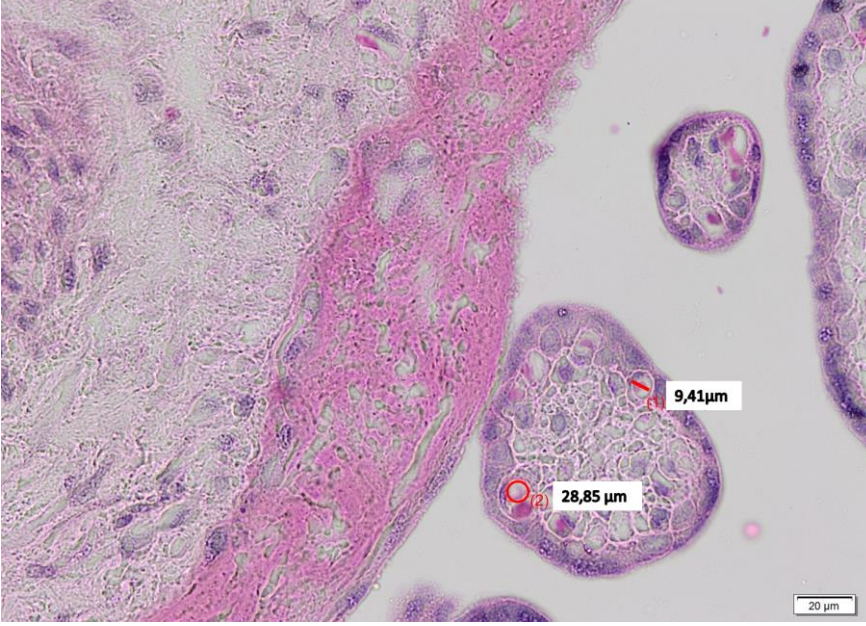
- Bu kalibrasyon işlemi her objektif için ayrı ayrı yapılır, ayarlama yapıldıktan sonra objektif mikrometre kaldırılarak yerine preparat konur.
- Ölçülmesi istenen hücre, oküler mikrometrenin kaç bölmelerini işgal ediyorsa bu değer 1.22 ile çarpılarak mikroorganizma boyu mµ olarak bulunur.



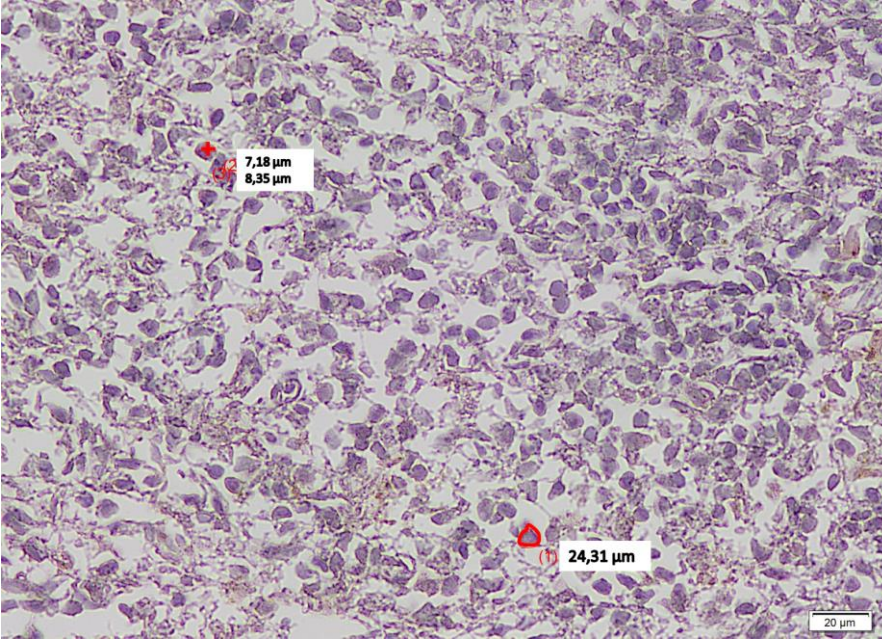
Şekil 2.4 Işık mikroskopunda eritrosit hücrelerinin görüntülenmesi ve boyutunun ölçülmesi

Bir insanda eritrositlerin **çapı ortalama 6-8 µm**'dir.

Günümüzde, hücre boyut ölçümünde bilgisayar programları da kullanılmaktadır. Hazırlanan preparat mikroskop tablasına yerleştirilir. Kamera yardımıyla ekrana yansıtılan görüntü program ile açılır. Mikroskoptaki ölçek büyütme programa tanıtılır. Ölçüm yapılacak hücreler işaretlenir ve programda belirtilir. Ölçümü yapılan görüntü kaydedilir.



Şekil 2.5 Plasenta doku kesitinde hücre boyutlarının ölçülmesi



Şekil 2.6 Dalak doku kesitinde hücre boyutlarının ölçülmesi

BÖLÜM 2 SORULAR

1. İncelediğiniz hücreleri küçükten büyüğe doğru sıralayınız.

2. İncelediğiniz hücrelerin arasında mikroskobik olarak ne gibi farklılıklar gözlediniz?

Hazırlayan:

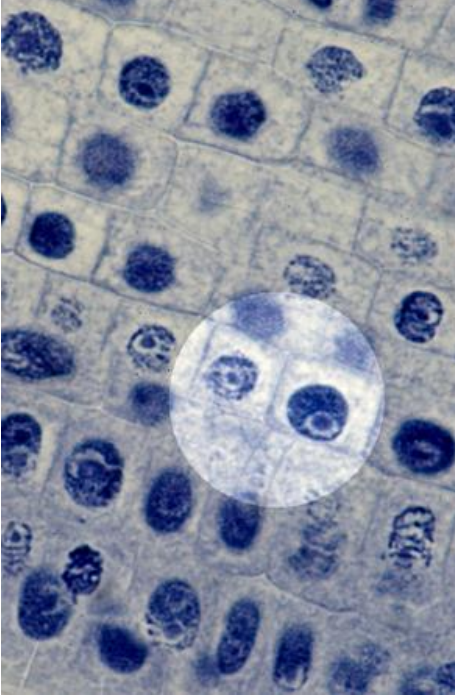
Denetleyen:

Yorum:

LAB.3- MİTOZ BÖLÜNMENİN İNCELENMESİ

Bu laboratuvar dersinde mitoz bölünme evrelerinin hazır preparatları incelenecektir.

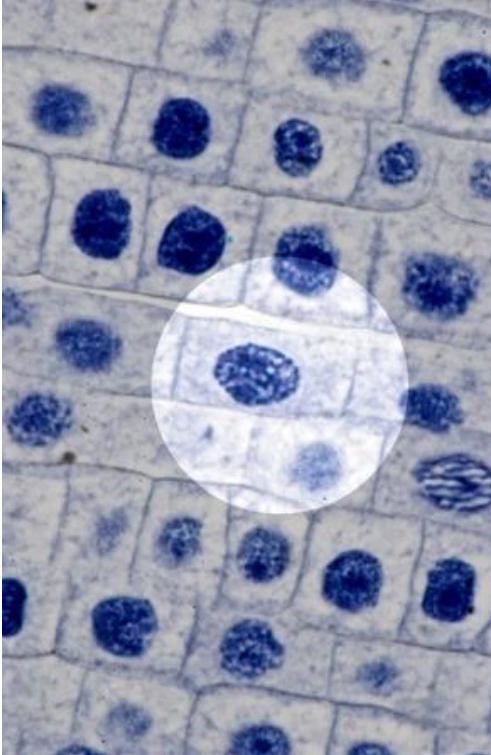
İnterfaz



Hücre boyutu büyür, DNA replike olur, nukleus görünür haldedir.

Şekil 3.1 Soğan kökü hücresinin interfaz aşamasındaki mikroskop görüntüsü (<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov04macro/jronionroot.html>)

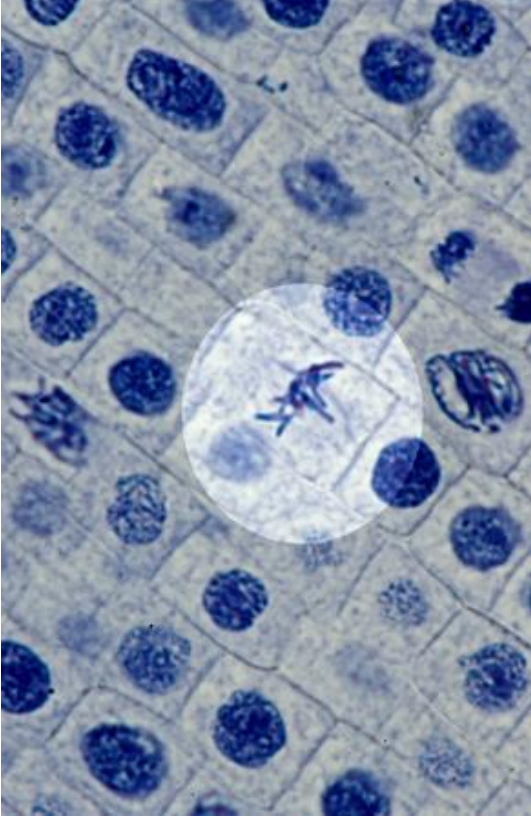
Profaz



İnterfazda eşlenmiş durumdaki kromatinler kısalıp kalınlaşarak kromozoma dönüşürler. Çekirdek zarı, çekirdekçik ve organeller eriyerek tamamen kaybolur. Kromozomlar ekvatorial bölgeye hareket etmeye başlarlar.

Şekil 3.2 Soğan kökü hücresinin profaz aşamasındaki mikroskop görüntüsü (<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov04macro/jronionroot.html>)

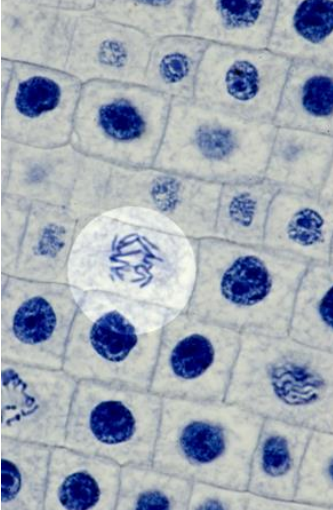
Metafaz



Kardeş kromotitler ekvatorial düzlemde bir çember gibi, bazen de karışık olarak ekvatorial düzlem üzerinde dizilirler ve sentrozomlar interfazda oluşturmuş olduğu iğ ipliklerini kromozomlara doğru göndermeye başlar. Hücrenin ortasında hafif boğumlanma olur. İğ iplikleri kardeş kromatitlere tutunur. Kromozomların en net görüldüğü safhadır.

Şekil 3.3 Soğan kökü hücresinin metafaz aşamasındaki mikroskop görüntüsü (<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov04macro/jronionroot.html>)

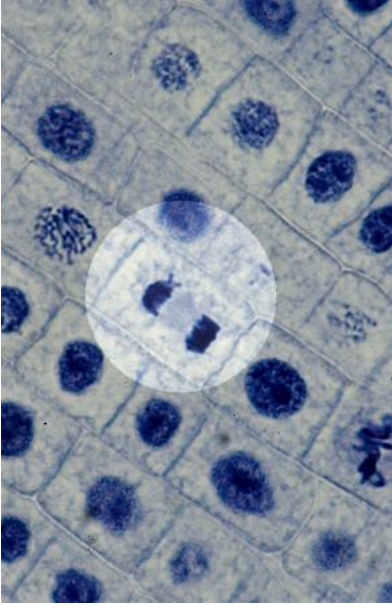
Anafaz



Kromozomlardaki sentromerlerin aynı anda ikiye bölünmesiyle kardeş kromatitler tam olarak birbirinden ayrılır. Kardeş kromatitler sentromerleriyle iğ ipliklerine tutunarak zıt kutuplara doğru harekete geçer. Anafaz evresi kardeş kromatitlerin zıt kutuplara ulaşmasıyla tamamlanır.

Şekil 3.4 Soğan kökü hücresinin anafaz aşamasındaki mikroskop görüntüsü (<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov04macro/jronionroot.html>)

Telofaz

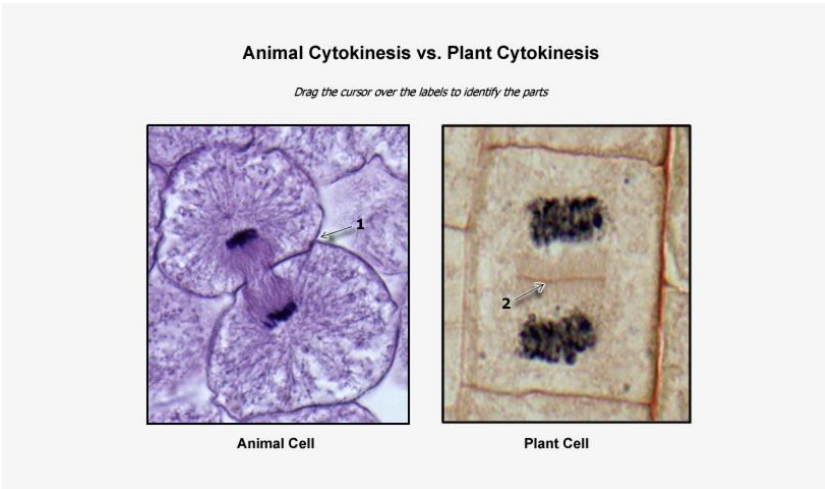


Profaz evresinde eriyen çekirdek zarı, çekirdekçik ve organeller yeniden oluşmaya başlar. Kutuplara çekilen kromatitler çekirdek zarının içine girerler. Kısaca bu evrede Profazda olan herşeyin tam tersi olur. Bu evreden sonra sitoplazma bölünmesi gerçekleşir.

Şekil 3.5 Soğan kökü hücresinin telofaz aşamasındaki mikroskop görüntüsü (<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov04macro/jronionroot.html>)

Sitoplazma bölünmesi (Sitokinez)

Çekirdek bölünmesi gerçekleştikten sonra hayvan hücreleri ortadan boğulanarak, bitki ve diğer çeperli ökaryotik hücreler ise orta lamel (ara lamel) ile bölünerek iki yeni hücre oluşturur.



Şekil 3.6 Hayvan ve bitki hücrelerinde mitoz bölünmenin aşamaları

(https://www.nicepng.com/ourpic/u2e6a9w7w7u2o0a9_plant-cytokinesis-images-cytokinesis-in-plant-cells-microscope/)

BÖLÜM 3 SORULAR

Hazırlayan:

Denetleyen:

Yorum:

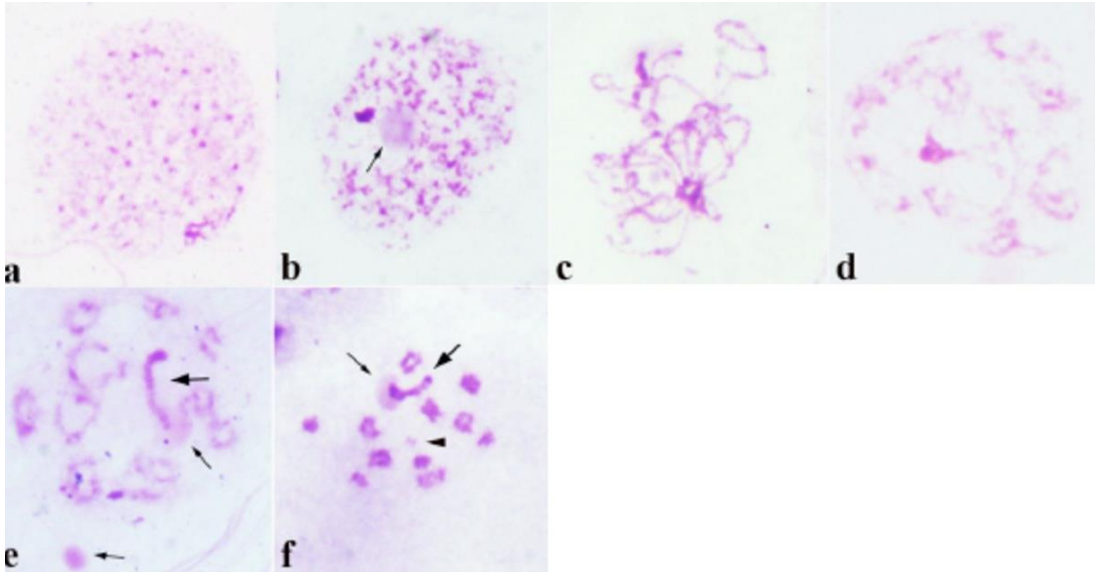
LAB 4- MAYOZ BÖLÜNMENİN İNCELENMESİ

Mayoz bölünme mitozda olduğu gibi profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak adlandırılan dört evre vardır. Bu evreler arada interfaz olmaksızın peş peşe iki kez gerçekleşir ve sonuçta genetik özellikler bakımından 2 çeşit dört yavru hücre meydana gelir. Mayoz bölünme ile mitoz bölünme arasındaki en büyük fark profazda rastlanır. Mayoz bölünme iki aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar, Mayoz-1 ve Mayoz-2 olarak adlandırılır.

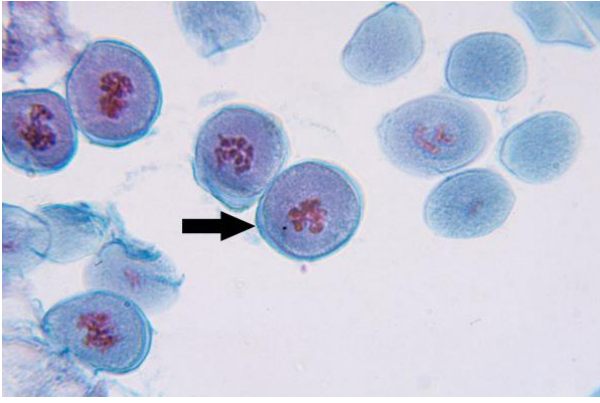
MAYOZ I

Profaz I

- DNA ipliklerinin kısalıp kalınlaşmaya başlaması ile başlar. Bu evre sınırları kesin olmayan 5 evreye ayrılıp incelenir. Bu evreler;
- ✓ **Leptoten:** Kromozomların mikroskopla seçilebildikleri andan itibaren başlar. İki eş kromatit birbirine sarılı halde bulunur.
- ✓ **Zigoten:** Biri anneden diğeri babadan gelen ve birbirlerine benzeyen homolog kromozomlar yan yana gelerek eşleşmeye başlarlar. Bu eşleşme bir uçtan diğeri uca doğru devam eder. Bu evrede her biri iki kromatit taşıyan iki kromozomun yan yana durmasıyla sanki canlı n sayıda kromozom taşıyormuş gibi görülür. Görülen bu yapıya tetrat denir.
- ✓ **Pakiten:** Homolog kromozomların eşleşmesi tamamlanır ancak kromozomlar kısaltmaya devam eder. Ayrıca bu evrede mitozdan farklı olarak tetratlar arasında genetik madde alışverişi olur. Buna **krossing-over** denir. Bu olay homolog kromozomların birbiri üzerine çakışan (kiyazma "chiasma") kısmında gerçekleşir.
- ✓ **Diploten:** Kromozomların sentromerleri ayrılmamıştır. Dört kromatit için iki sentromer vardır. Tetrattaki homolog kromozomlar birbirinden ayrılmaya başlar. Ancak kiyazma bölgelerinde ayrılma olmaz ve kiyazmalar uca doğru kaymaya başlar.
- ✓ **Diakinez:** Kromozomlar son halini alır. Çekirdekçik kaybolur. Çekirdek zarı parçalanır.



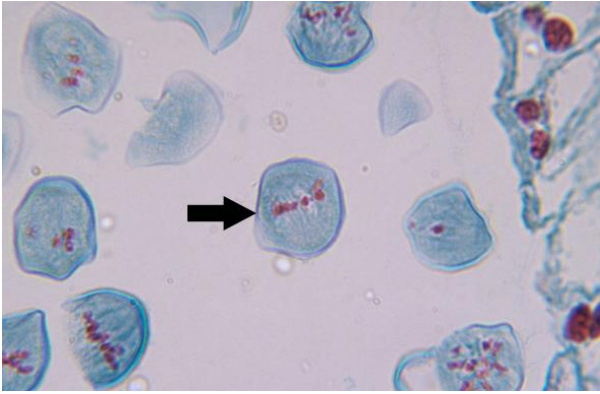
Şekil 4.1 Mayoz bölünme Profaz I evrelerinin mikroskop görüntüleri: (a) kromatin ipliği; (b) leptoten-zigoten; (c) pakiten; (d) dağılma basamağı; (e) diploten; (f) diyakinez (<https://biology.stackexchange.com/questions/51192/how-do-i-identify-the-different-stages-of-meiosis-under-microscope>)



Şekil 4.2 Zakkum üreme hücresinde Profaz I genel mikroskop görüntüsü (<http://sciences.usca.edu/biology/zelmer/122/celldivision/meiosis/>)

Metafaz I

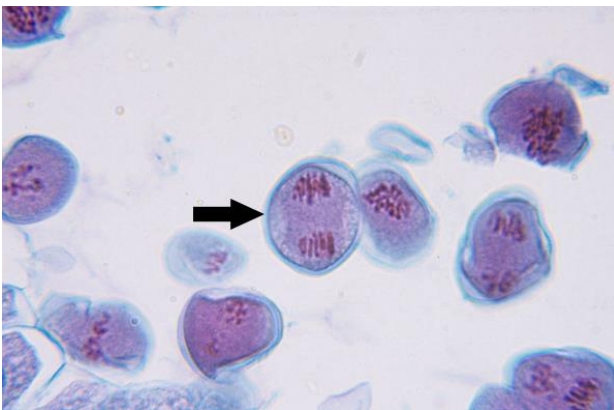
- Homolog kromozomlar ekvatorial plak üzerinde karşılıklı dizilir. Her kromozom sentromeri ile iğ ipliklerine tutunur.



Şekil 4.3 Zakkum üreme hücresinde Metafaz I mikroskop görüntüsü (<http://sciences.usca.edu/biology/zelmer/122/celldivision/meiosis/>)

Anafaz I

- Homolog kromozomlar birbirinden ayrılarak zıt kutuplara ilerler.

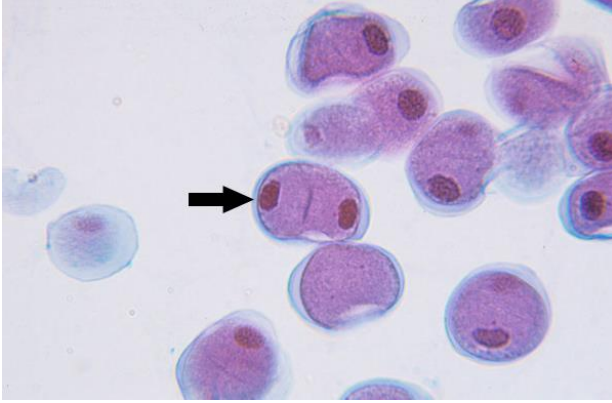


Şekil 4.4 Zakkum üreme hücresinde Anafaz I mikroskop görüntüsü (<http://sciences.usca.edu/biology/zelmer/122/celldivision/meiosis/>)

Telofaz I

- Hücrenin iki kutbunda bulunan kromozomlar uzayıp incelmeye başlar. Etraflarında çekirdek zarı oluşur. Sitoplazmanın boğumlanmasıyla da haploid sayıda kromozoma sahip iki yavru hücre oluşur.

- Hayvansal hücrelerde: Çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra sitoplazma ortadan boğumlanarak ikiye bölünür ve iki ayrı hücre oluşmuş olur.
- Bitkisel hücrelerde: Oluşmuş olan iki çekirdekli hücrenin ortasında bir orta lamel (ara lamel) oluşur ve hücre duvarına kadar ulaşır. Dolayısıyla birbirine bitişik iki hücre oluşur. Hücrenin iki kutbunda bulunan kromozomlar uzayıp incelmeye başlar. Etraflarında çekirdek zarı oluşur. Sitoplazmanın boğumlanmasıyla da haploid sayıda kromozoma sahip iki yavru hücre oluşur.

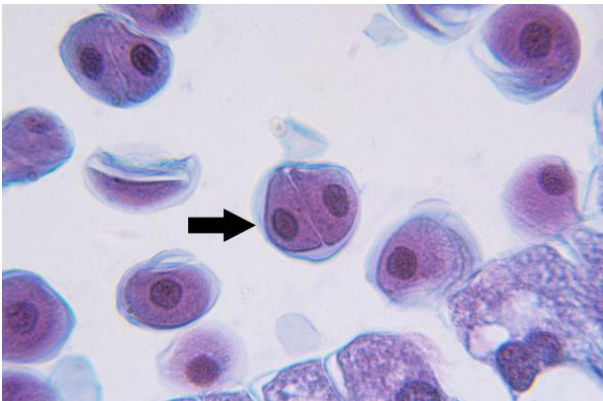


Şekil 4.5 Zakkum üreme hücresinde Telofaz I mikroskop görüntüsü
(<http://sciences.usca.edu/biology/zelmert/122/celldivision/meiosis/>)

Sitokinez I

Sitoplazma bölünmesi ile iki yavru hücre oluşur.

- Buraya kadar geçen olaylar mayoz-I olarak adlandırılır. Bundan sonra mitozdaki aksine arada interfaz evresi olmaksızın profaz-II'nin başlamasıyla mayoz-II başlar. Mayoz-II mitoz bölünmenin hemen hemen aynısıdır. Hücrelerdeki haploid kromozom sayısı korunarak profaz-II, metafaz-II, anafaz-II ve telofaz-II gerçekleşerek mayoz bölünmenin sonunda n kromozom sayısına sahip 4 yavru hücre meydana gelir.

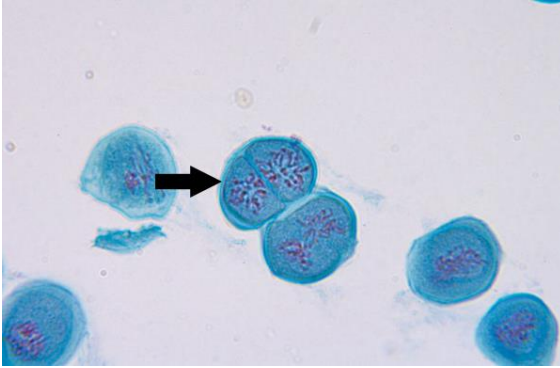


Şekil 4.6 Zambak üreme hücresinde sitokinez I
(<http://sciences.usca.edu/biology/zelmert/122/celldivision/meiosis/>)

MAYOZ 2

Profaz II

- Birinci bölünmenin telofazı ile ikinci bölünme arasında bir dinlenme evresi olmadan çekirdek zarı parçalanır. Birinci iğ iplikçiklerinin doğrultusuna dik yeni iğ iplikçikleri oluşur.

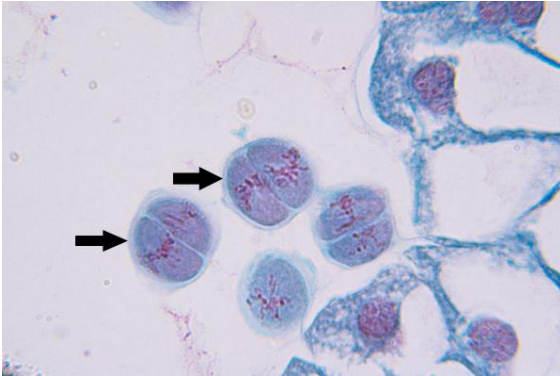


Şekil 4.7 Zambak üreme hücresinde profaz II

(<http://sciences.usca.edu/biology/zelfner/122/celldivision/meiosis/>)

Metafaz II

- Her yavru hücrenin haploid (n) kromozomu ekvatorial düzlem üzerinde dizilir.

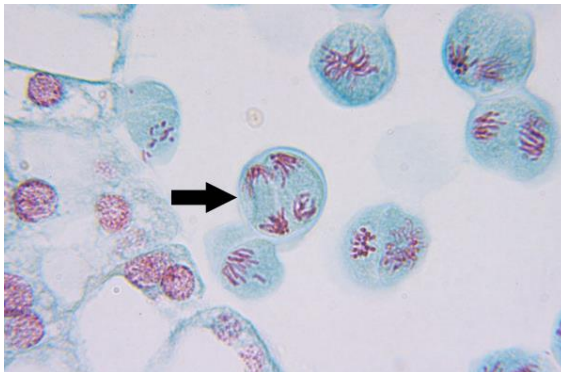


Şekil 4.8 Zambak üreme hücresinde metafaz II

(<http://sciences.usca.edu/biology/zelfner/122/celldivision/meiosis/>)

Anafaz II

- Mayoz bölünmenin 2. bölümü olan Mayoz 2'nin 3. evresidir. Ara evre olarak da adlandırılır. Bu evre mitozdaki anafaz evresine benzer. Ancak, mitozdaki anafazda kardeş kromatitler düzenli bulunurken bu evrede düzensiz bulunurlar. Bu da Mayoz bölünmede genetik çeşitliliği sağlar.

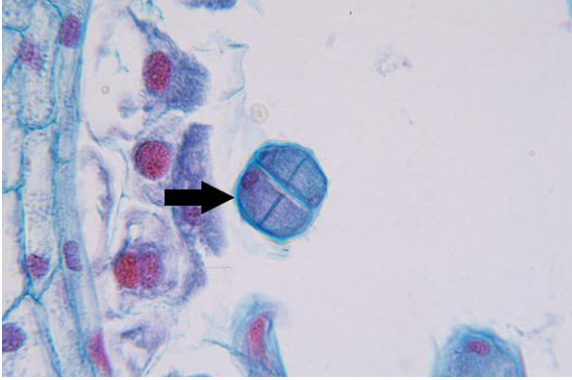


Şekil 4.9 Zambak üreme hücresinde anafaz II

(<http://sciences.usca.edu/biology/zelfner/122/celldivision/meiosis/>)

Telofaz II

- Kromozomların helezonları açılır, dolayısıyla görünmez olurlar. Çekirdek zarları oluşur sitoplazma bölünür. Böylece bir hücreden 4 tane haploid hücre meydana gelir.



Şekil 4.10 Zambak üreme hücresinde telofaz II

(<http://sciences.usca.edu/biology/zelmer/122/celldivision/meiosis/>)

Sitokinez II

- Mayoz bölünme sonucunda n kromozomlu 4 hücre (gamet) oluşur.



Şekil 4.11 Zambak üreme hücresinde sitokinez II

(<http://sciences.usca.edu/biology/zelmer/122/celldivision/meiosis/>)

BÖLÜM 4 SORULAR

Hazırlayan:

Denetleyen:

Yorum:

LAB.5- DNA İZOLASYONU

Genomik DNA, kan, tükürük, saç gibi materyallerden ya da direkt olarak nukleuslu hücrelerden elde edilir.

DNA izolasyonu temelde üç aşamadan meydana gelir.

1. Hücrenin parçalanması ile yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın ortaya çıkarılması
 2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür duruma getirilmesi
 3. DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması.
- **Bu laboratuvar dersinde DNA izolasyon kiti kullanılarak kandan DNA izolasyonu yapılacaktır.**



Şekil 5.1 Laboratuvarında kullanılan DNA izolasyon kitinin görüntüsü (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001>)

Ticari Kit içerisindeki malzemeler

- **RNaz A:** Örnekteki RNA moleküllerinin parçalanmasını sağlar.
- **Proteinaz K:** Proteinleri parçalar. Böylelikle hücre lizisini de sağlar.
- **Lizis/binding tamponu:** Hücre lizisini sağlar ve açığa çıkan DNA molekülünün kolona tutunmasını sağlar.
- **Alkol:** DNA presipitasyonunu sağlar.
- **Yıkama tamponları:** Artık maddelerin uzaklaştırılmasını sağlar.
- **Elüsyon tamponu:** En son basamakta DNA molekülünün elde edilmesini sağlar.
- **Spin-kolon tüpleri:** DNA'yı kaybetmeden filtreleme yöntemiyle protein ve RNA artıklarından arındırılması için kullanılır.

DNA İZOLASYON PROTOKOLÜ

1. Isıtıcı blok 55 °C'ye ayarlanır.
2. Steril 1,5 ml eppendorf tüpüne 200 µl kan örneği konur.
3. Bunun üzerine 20 µl Proteinaz K eklenir.
4. Üzerine 20 µl RNaz A eklenir ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrasında üzerine 200 µl Lysis/Binding tamponu eklenir. İyice vortekslenir.
6. 55 °C'de 10 dk inkübe edilir.
7. İnkübasyon sonrasında 200 µl %96-100'lük etanol eklenir.
8. 5 saniye boyunca iyice vortekslenerek homojenizasyonu sağlanır.
9. Lizat spin kolonuna aktarılır.
10. 10.000xg'de 1 dk santrifüj edilir. Alttaki toplama tüpüne geçen kısım atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne alınır.
11. Üzerine 500 µl wash buffer 1 (yıkama tamponu) konur ve 10.000xg'de 1 dk santrifüj edilir.
12. Alttaki toplama tüpü atılır ve kolon yeni bir toplama tüpüne konur.
13. Üzerine 500 µl wash buffer 2 (yıkama tamponu) konur ve maksimum hızda 3 dk santrifüj edilir.
14. Spin kolonu temiz bir 1,5 ml eppendorf tüpüne konur.
15. 25 µl elüsyon tamponu eklenir ve 1 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
16. Maksimum hızda 1 dk santrifüj edilir.
17. Sonuçta 1,5 ml eppendorf tüpü saf DNA'yı içermektedir. Kısa süreliğine +4 °C'de, uzun süreliğine -20 °C'de saklanır.

DNA miktarı ve saflığının belirlenmesi

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının ölçüsüdür. Proteinler ise 280 nm dalga boyunda soğurum verirler. Buna göre DNA'nın miktar ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilecek değerlerden belirlenebilir.

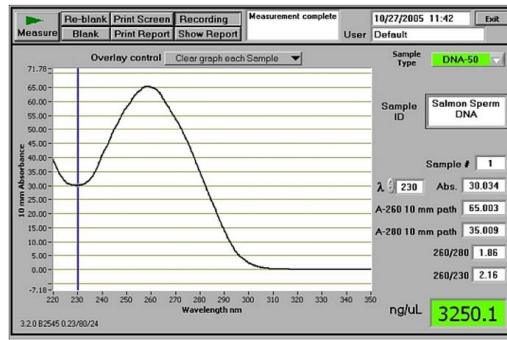
DNA konsantrasyonu şu formülle hesaplanır:

$$C_{DNA} (\mu\text{g/ml}) = (A_{260} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 50 \mu\text{g/ml})$$

260 ve 280 nm dalga boylarındaki oran (A_{260}/A_{280}) DNA'nın saflığı ve kalitesi hakkında fikir verir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1.8 – 2.0 arasındadır. Eğer ortamda fenol ve protein fazla ise oran bu değerlerden düşük olacaktır.



Şekil 5.2 Nanodrop ölçüm sisteminin genel görüntüsü
(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-2000>)



Şekil 5.3 Nanodrop cihazına DNA'nın yüklenmesi ve sonuç analizi

(<https://www.biocompare.com/Product-Reviews/41292-NanoDrop-ND-1000-From-Thermo-Scientific/>,
<https://www.isogen-lifescience.com/NanoDrop-2000>,
http://uoqasim.edu.iq/e_Learning/lec_file/CHAPTER%204.pdf)

BÖLÜM 5 SORULAR

Hazırlayan:

Denetleyen:

Yorum:

LAB.6- POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) ve AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

LAB.6.1 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu çift zincirli bir DNA molekülünde hedef dizilere oligonükleotid primerlerinin bağlanması ve uzaması esasına dayanır.

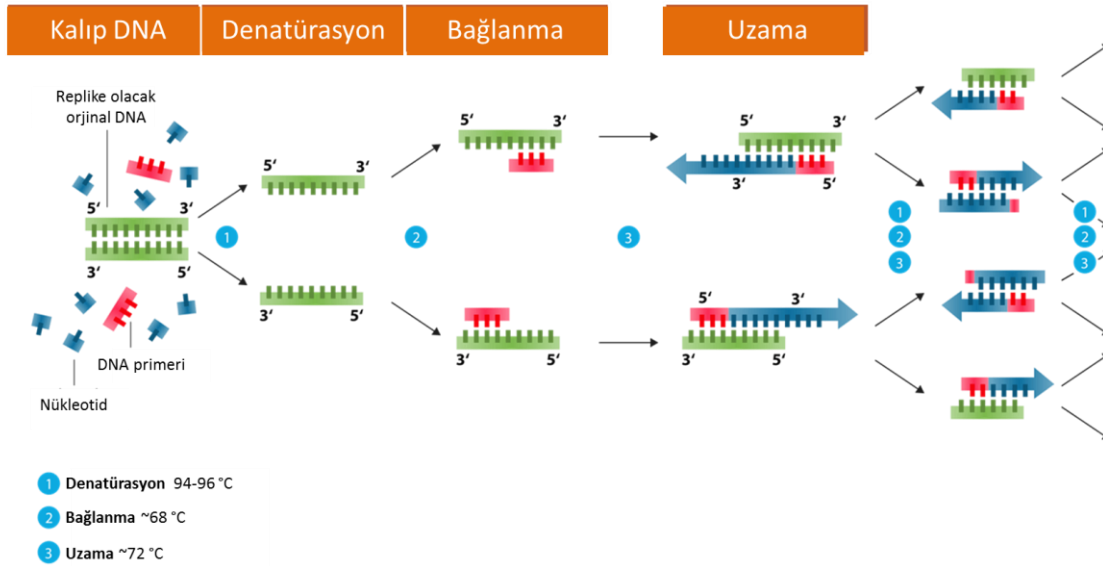
PZR aşağıdaki 3 aşamanın tekrarlanması ile gerçekleştirilir:

1. Denatürasyon: Primerlerin bağlanabilmesi için çift iplikli DNA'nın yüksek sıcaklıklarda tek zincirli hale getirildiği aşamadır. Genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığı 92-95 °C dir.

2. Annealing (Primerlerin bağlanması): Tek zincirli DNA molekülleri üzerinde primerler kendilerine komplementer olan bölgelerle hibridleşirler. Primerler çoğaltılacak olan DNA bölgeleri sınırlarını belirleyerek DNA polimeraz için serbest 3' OH ucu oluşturmak üzere kalıp DNA'ya bağlanır. Bu aşamada T_m/bağlanma sıcaklığı oranı PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi açısından çok önemlidir.

3. Extension (Uzama): Taq DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) varlığında primerlerin 3'OH ucundan uzamasını sağlar. Bu aşamada genellikle Taq DNA polimeraz enziminin polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık olan 72°C tercih edilir.

Ardarda tekrarlanan denatürasyon, annealing ve extension aşamaları ile DNA parçaları aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi üssel olarak çoğalır. Bu üssel artışın sebebi, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün bir sonraki döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır.

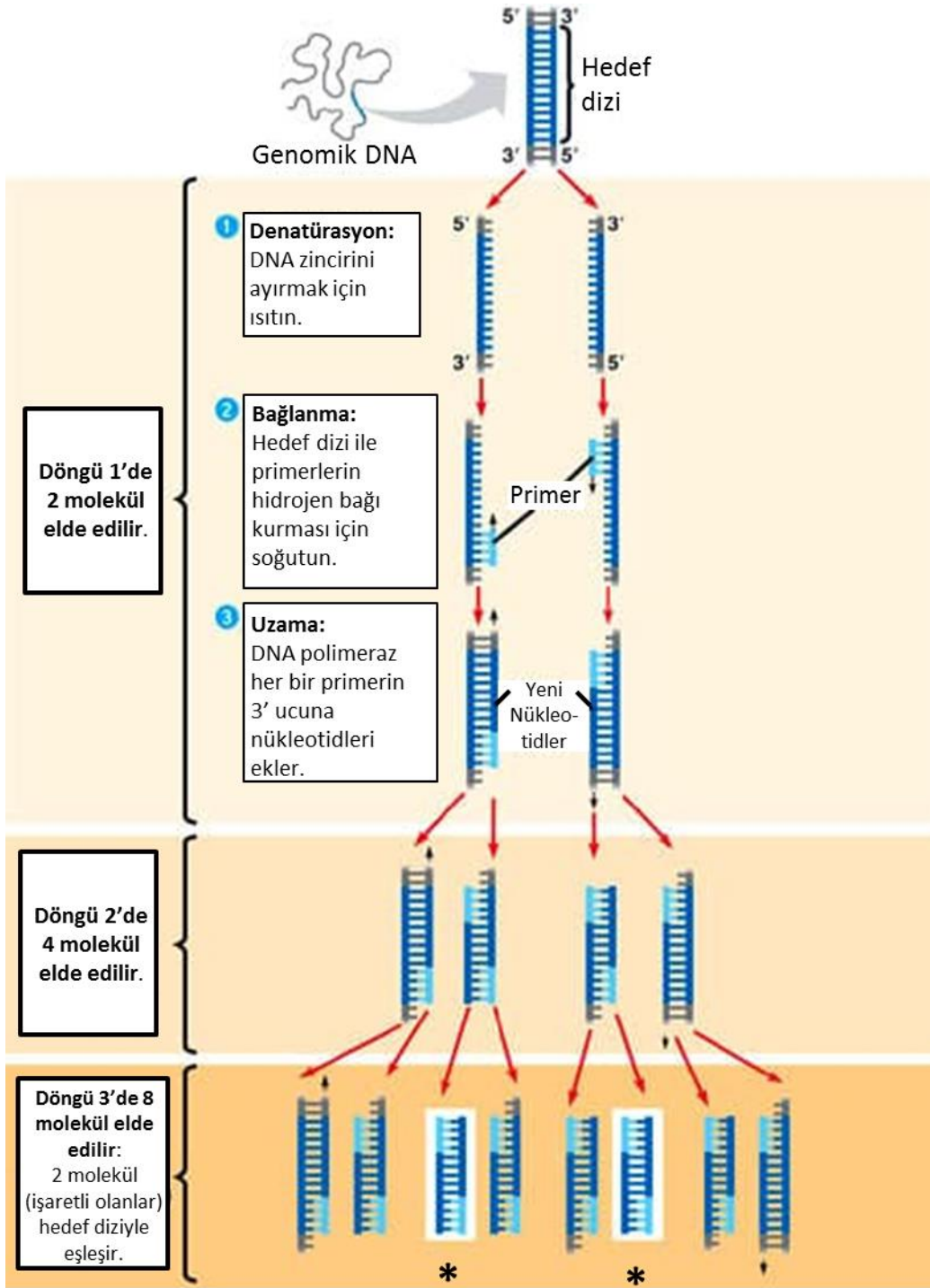


Şekil 6.1 PZR basamakları (<https://microbeonline.com/polymerase-chain-reaction-pcr-steps-types-applications/>)

Matematiksel olarak amplifikasyon sonucu elde edilen ampikon sayısı aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\text{Amplifikasyon} = 2^n$$

n: Tekrarlanan döngü sayısı

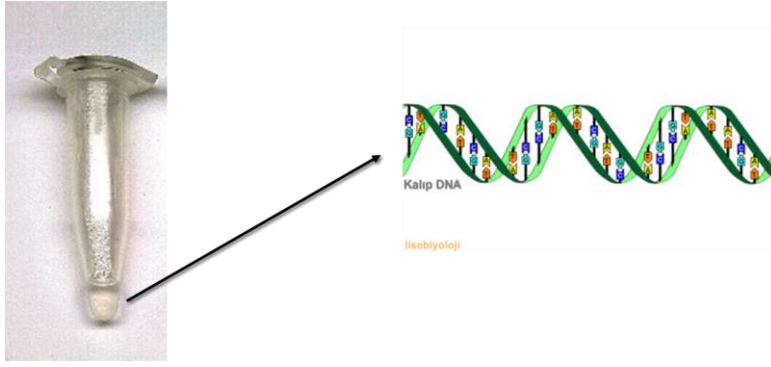


Şekil 6.2 PZR amplifikasyon döngüsü (<https://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>)

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONUNUN TEMEL BİLEŞENLERİ

1. Kalıp DNA:

PZR'de genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler veya herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. Bu laboratuvar dersinde kalıp olarak DNA izolasyon dersinde elde edilmiş olan DNA örnekleri kullanılacaktır.



Şekil 6.3 PZR reaksiyonu için DNA kalıbı

(<https://seraplaekolaybiyoloji.wordpress.com/2017/12/19/replikasyon-dnanin-kendini-eslemesi/>)

2. Polimerazlar:

DNA polimeraz enzimleri kalıp zincire komplementer bir DNA zinciri oluşturmak üzere, kalıp zincirdeki baz bilgisini kullanarak 4 çeşit dNTP'den uzun polipeptid zincirin sentezini kataliz eder. Bu enzimler bu işlem için primerlere ihtiyaç duyar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' OH ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA zincirinin polimerizasyonu sağlanır.

PZR'de termostabil DNA polimerazlar tercih edilir. En sık kullanılanı ise Taq/Amplitaq DNA polimerazdır. Bu polimeraz *thermus aquaticus* adlı bir bakteriden izole edilmiştir. Bu derste de PZR prosedürü için Taq polimeraz kullanılacaktır.



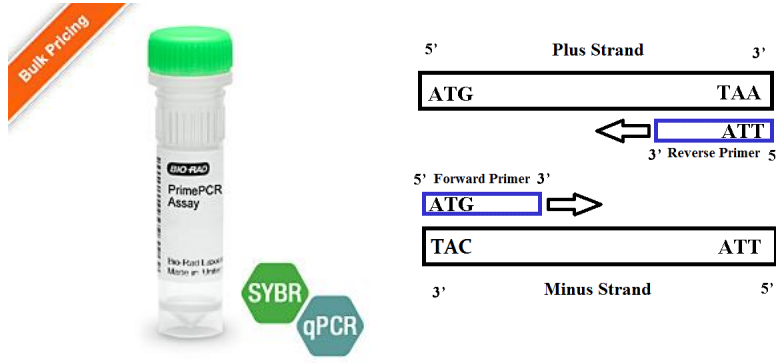
Şekil 6.4 Ticari olarak satılan Taq polimeraz (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10342020>)

3. Primerler:

Kullanılan kalıpla yüksek oranda bağlanma sağlamak için 18-25 nükleotid uzunluğunda primerler tercih edilir. Primer tasarımı yapılırken şunlara dikkat edilmelidir:

1. Olabildiğince dört baz eşit miktarda kullanılmalıdır.
2. Primerler polipürin, poliprimidin veya tekrarlı bölgeler içermemelidir.

3. Primer çiftlerinin 3' uçları birbirine veya primer içindeki bir bölgeye komplementer olmamalıdır.



Şekil 6.5 PZR'de kullanılan primer örneği (<https://biology.stackexchange.com/questions/56304/manual-primer-design-for-a-gene-on-the-reverse-strand>, <http://www.bio-rad.com/en-us/prime-pcr-assays/assay/qhsaced0037870-primepcr-sybr-green-assay-mitf-human>)

4. dNTP karışımı:

Deoksiribonükleozid trifosfatlar yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. PZR için optimal dNTP konsantrasyonu:

- $MgCl_2$ konsantrasyonuna
- Reaksiyon koşullarına
- Primer konsantrasyonuna
- Çoğaltılmış ürünün boyuna
- PZR döngü sayısına bağlıdır.



Şekil 6.6 Ticari dNTP karışımı (<https://www.rpicorp.com/products/molecular-biology/zymo-products/dntp-mix-10-mm-500-ul.html>)

5. Tampon solüsyon ve $MgCl_2$:

PZR'de genellikle DNA polimeraz enzimine özgü tamponlar kullanılır. Mg^{+2} iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturur, polimeraz aktivitesini stimüle eder ve primer/kalıp etkileşimini sağlar. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonu spesifik olmayan ürün birikimine neden olur.



Şekil 6.7 PCR tampon solüsyonu (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4379876>) ile $MgCl_2$ (<http://www.bio-rad.com/en-tr/sku/1708872-mgcl2-solution-for-pcr-50-mm-1-25-ml?ID=1708872>)

PZR'İN KULLANIM ALANLARI:

- Temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi, DNA haritalanması)
- Birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile x sendromu, lösemi vb) DNA temeline dayalı tanısı için klinik tıpta
- Allelik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesiyle doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde (analık-babalık tayini)
- Tıbbın diğer kollarında

!!! Bu laboratuvar dersinde bir önceki derste izole edilen DNA'lar kalıp olarak kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla belirli bir gen bölgesi çoğaltılacaktır



- Kalıp DNA: 5µl
- Reaks. Tamponu: 2,5 µl
- dNTP: 1 µl
- MgCl₂: 3,6 µl
- Primer F: 1 µl
- Primer R: 1 µl
- Ultra saf su: 10,40 µl
- Taq pol: 0,5 µl

PCR tüpünün içerisine belirtildiği miktarlarda konulur ve karıştırılarak Thermal cycler cihazına yerleştirilir.

Tablo 6.1 Termal Cycler programı

Başlangıç 1x	30 x	1x	∞
95°C 5 dakika	95 °C 15 saniye 58 °C 50 saniye 72 °C 30 saniye	72 °C 10 dakika	+4 °C

Bu prosedür sonunda istediğimiz bölgenin birçok kopyasını içeren ampikonları elde ederiz.

BÖLÜM 6.1 SORULAR

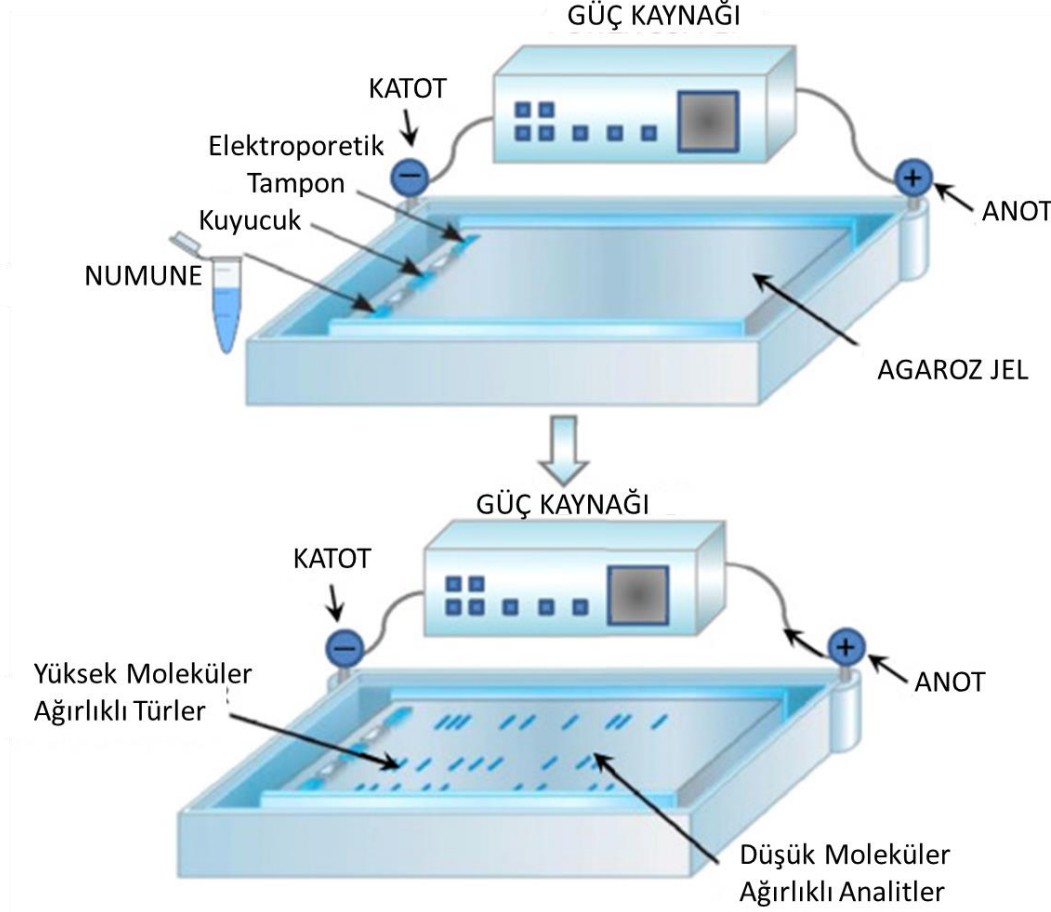
1. Thermal cycler esnasında protokolünüz 35 döngü içermesine rağmen siz 15 döngü olarak ayarladığınızda ne olmasını beklersiniz?
2. PZR tüpüne bileşenlerden taq polimerazı koymayı unutursanız ne olmasını beklersiniz?
3. Bir hastanıza tanı koymak için bu testi yapmanız gerekirse ne tür bir hastalık için nasıl bir prosedür izlersiniz?

HAZIRLAYAN:

**TESLİM ALAN:
YORUM:**

LAB.6.2 AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Moleküllerin sahip oldukları net elektrik yükleri bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkiler. Elektroforez tekniğinde de DNA moleküllerinin jel üzerinde elektrik akımıyla hareketi sağlanır.



Şekil 6.8 Genel Elektroforez prensibi (<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/gel-electrophoresis>)

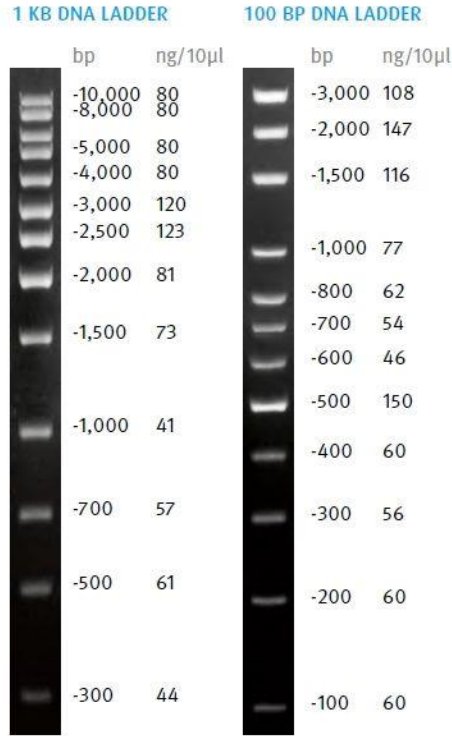
Nükleik asit fragmentlerinin tanımlanması, saflaştırılması ve ayrılması için kullanılan en yaygın yöntem agaroz jel elektroforezidir. Bu nedenle çeşitli amaçlar için izole edilen DNA'ların tanımlanabilmesi, temizliğinin kontrolü, hangi formda olduğunun belirlenebilmesi, büyüklüğünün saptanabilmesi ve özellikle genetik mühendisliği teknikleri ile DNA yapısında oluşturulan değişikliklerden sonra elde edilen yeni formların incelenmesi yönünden, agaroz jel elektroforez tekniği, moleküler genetik alanında önemli bir deneysel sistem oluşturmaktadır.

Agaroz jellerin ayırma gücü poliakrilamid jellere oranla daha düşük olmakla birlikte, ayrabildikleri DNA parçacıklarının uzunlukları 200 baz çifti (bp) ile 50 kilo baz (kb) gibi oldukça geniş bir aralıkta olabilmektedir. Agaroz jeldeki örnekler genellikle yatay pozisyonda, sabit güç ve yöndeki elektriksel alanda yürütülmektedir.

Agaroz, deniz yosunlarından elde edilen, dallanmamış zincirli bir polimerdir. Ticari olarak satılan agaroz tamamen saf olmayıp, diğer polisakkaritler, tuzlar ve proteinlerle birlikte bulunabilir. Bu kirliliklerin oranı, hem DNA'nın jeldeki hareketini hem de jelden elde edilecek DNA'nın enzimatik reaksiyonlardaki substrat olma yeteneğini etkiler.

Agaroz Jelde DNA'nın Hareket Hızını Etkileyen Etmenler:

DNA'nın Molekül Büyüklüğü: Çift zincirli doğrusal DNA moleküllerinin jeldeki hızı, baz çifti sayısının logaritması ile ters orantılıdır. Büyük moleküller, sürtünmenin büyük olması ve jeldeki porlar arasında daha zor yol bularak ilerlemelerinden ötürü, daha yavaş hareket ederler.



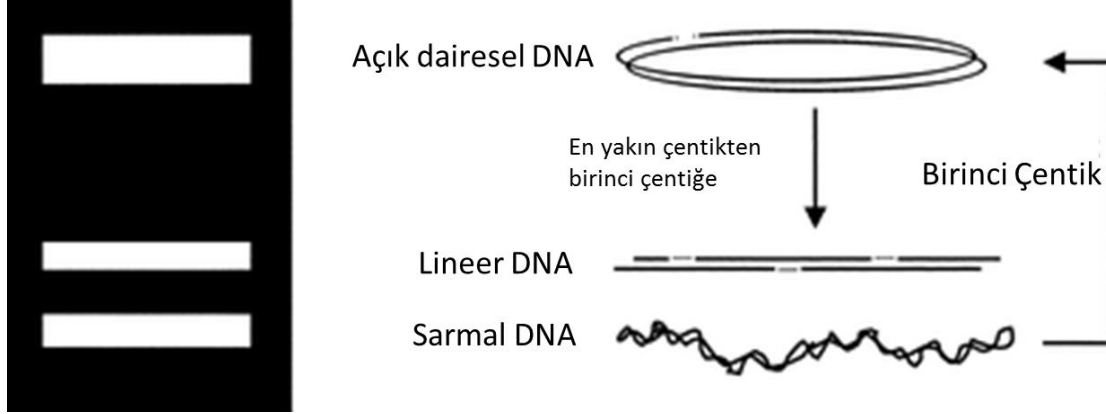
Şekil 6.9 Molekül büyüklüğüne göre DNA molekülleri (<https://laborimpex.be/07-11-00050-100-bp-dna-ladder-ready-to-load-50-g-for-100-applications.html>)

Agaroz Konsantrasyonu: Belirli büyüklükteki doğrusal bir DNA molekülü, değişik agaroz konsantrasyonlarındaki jellerde farklı hızlarla ilerlerler. DNA'nın elektroforetik hareketliliğinin logaritması ile jel konsantrasyonu arasında bir ilişki vardır. Dolayısıyla değişik konsantrasyonlardaki jellerin kullanılmasıyla çok farklı boyutlardaki DNA moleküllerini ayırmak mümkündür.

Tablo 6.2 DNA büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonu

Agaroz jelin yüzdesi (ağırlık/hacim)	DNA büyüklüğü
%0,5	1 - 30 kb
%0,7	800 bç - 12 kb
%1,0	500 bç - 10 kb
%1,2	400 bç - 7 kb
%1,5	200 bç - 3 kb
%2,0	50 bç - 2 kb

DNA'nın Konformasyonu: Aynı molekül ağırlığında süperkırımlı çembersel, tek zincir kırığı içeren çembersel ve doğrusal DNA molekülleri, agaroz jellerde farklı hızlarla ilerler. Bu üç formun bağıl hızları temelde jelin agaroz konsantrasyonuna bağlı olmakla birlikte, uygulanan akımın gücü, tamponun iyonik gücü, süper kıvrımlı çembersel DNA'daki süper kıvrımların sayısı da hızı etkileyen faktörler arasındadır.



Şekil 6.10 Agaroz jelde DNA konformasyonu

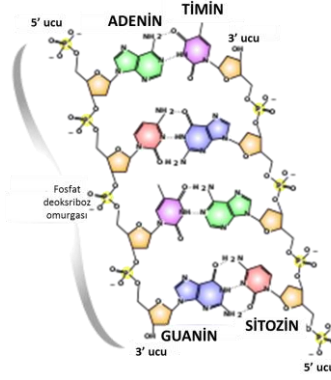
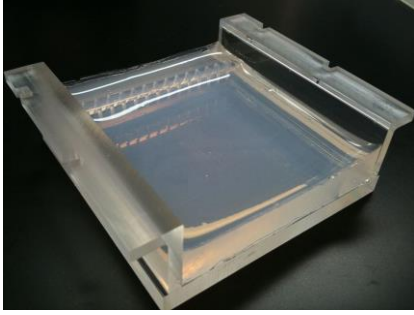
(<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2004/dt/b313634e/unauth#!divAbstract>)

Uygulanan Voltaj: Düşük voltajlarda doğrusal DNA parçalarının hareket hızları, uygulanan voltajla doğru orantılıdır. Bununla birlikte, elektriksel alanın gücü arttıkça büyük molekül ağırlıklı DNA parçalarının hareketi farklı ölçülerde artar. Bundan ötürü voltajın artmasıyla agaroz jeldeki etkili ayırım aralığı azalır. Büyüklükleri 2 kb'dan daha fazla olan DNA parçalarını en iyi şekilde ayırabilmek için agaroz jeller 5 volt/cm'den fazla olmayan akımla yürütülmelidir.



Şekil 6.11 Voltaj kaynağı (<https://www.fishersci.com/shop/products/fisherbiotech-electrophoresis-power-supplies-120v-maximum-voltage-3000v/fb3000q>)

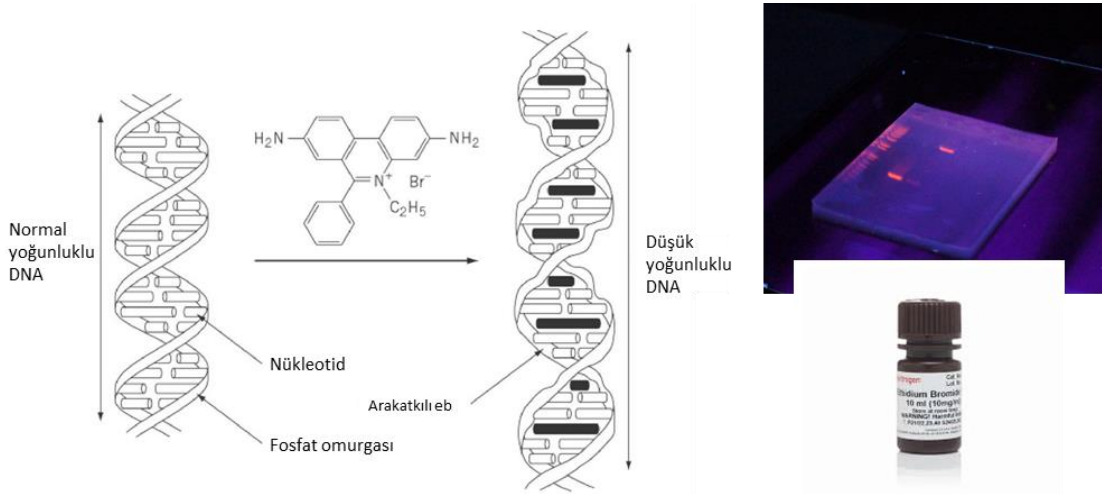
Baz Bileşimi ve Sıcaklık: DNA moleküllerinin agaroz jellerdeki davranışları baz bileşimleri ve jelin yürütüldüğü sıcaklık derecesi tarafından çok fazla etkilenmez. Dolayısıyla değişik boylardaki DNA moleküllerinin agaroz jeldeki bağıl hareketi 4-30 °C arasında değişmez. Jeller genellikle oda sıcaklığında yürütülür. Bununla birlikte, %0.5'den az agaroz içeren jellerin 4 °C'da yürütülmesi daha uygundur.



Şekil 6.12 Oda sıcaklığında Agaroz jeli (<https://en.wikipedia.org/wiki/Agarose>) ve DNA baz bileşimi ([https://en.wikipedia.org/wiki/Complementarity_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Complementarity_(molecular_biology)))

İnterkalasyon Yapan Ajanların Varlığı:

Agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'nın gözlenmesi için kullanılan floresan karakterdeki etidyum bromür boyası, doğrusal DNA moleküllerinin elektroforetik hareketini % 15 oranında azaltır.



Şekil 6.13 Etidyum bromidin flouresans ışımının prensibi

(<http://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/>,
https://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide,
<https://www.fishersci.com/shop/products/ethidium-bromide/15585011>)

Elektroforez Tamponunun Bileşimi: DNA'nın elektroforetik hareketi, elektroforez tamponunun bileşimi ve iyonik gücü tarafından etkilenir. İyonların yokluğunda (örn. hata sonucu jele tampon eklenmemesi durumunda) elektriksel iletkenlik minimum düzeydedir ve DNA'nın hareketi çok yavaştır. Çok yüksek iyonik güçteki tamponun kullanılması halinde (örn. yanlışlıkla 10x elektroforez tamponu kullanıldığında), elektriksel iletim çok fazladır ve çok fazla ısı açığa çıkar. En kötü durum jelin erimesi ve DNA'nın denatüre olmasıdır. Doğal çift zincirli DNA'lar için değişik tamponlar kullanılabilir. Bunlar arasında EDTA (pH 8.0), pH 7.5-8.5 olan yaklaşık 50 mM konsantrasyondaki Tris-asetat (TAE), Tris-borat (TBE) ya da Tris-fosfat (TPE) kullanılabilir. Elektroforez tamponları genellikle konsantre çözeltiler halinde hazırlanır ve oda sıcaklığında saklanır.



Şekil 6.17 UV görüntüleyici (<https://www.industrybuying.com/ultraviolet-transilluminator-tarson-LA.UL.UL.1443645/>, <https://www.coleparmer.in/i/cole-parmer-uv-transilluminator-25w-254nm-21x26cm-filter-230v/9762210>)

1-Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz TBE tamponu içerisinde kaynatılarak çözündürülür.(Bu çalışma için; 2 g agaroz tartılır ve küçük bir behere konur üzerine 100 mL 0,5X TBE eklenerek 2 dakika mikrodalgada kaynatılarak homojen bir şekilde erimesi sağlanır.)

2-Daha sonra jelin içerisine 1µl ethidium bromid eklenir.

3-Kenarları kapatılmış kalıplar içerisine taraklar yerleştirilir, jel dökülür ve yaklaşık 15-20 dakika donması beklenir.

4-Jel donduktan sonra kalıp elektroforez tankına yerleştirilir ve taraklar çıkarılır.

5-Tankın içi elektroforez tamponu ile doldurulur.

6-Jeldeki kuyucuklara DNA amplikonunun tamamı mikropipet yardımı ile yüklenir.

7-Tank güç kaynağına bağlanarak jelden elektrik akımı geçirilir. (105 v 10 dakika yürütülür)

Nötral pH'da (-) yük taşıyan DNA anoda doğru hareket eder. Küçük moleküller büyüklerden daha hızlı (+) elektroda doğru ilerler.

8-Elektroforez sona erdikten sonra jel bir transillüminatör üzerine alınarak DNA UV ışık altında gözlenir.

Tablo 6.3 Çıkabilecek olası problemler, sebepleri ve çözümleri

Problem	Olası Sebep	Çözüm
Jel yolunda DNA süprüntüsü	Yüksek DNA konsantrasyonu	Uygulanan DNA Konsantrasyonunun azaltılması
Arka Fonda Bantlar Spesifik olmayan PCR ürünleri	Saf olmayan DNA Yanlış Amplifikasyon koşulları	DNA'yı tekrar hazırla ve OD 260 / OD 280'de ölç. (ortalama 1.8'lik oran) termal cycler'ı kontrol et. Termal cycler PE 9600/9700 ve PTC 100 metodun gerçekleştirilmesi için valide edilmiştir.
Zayıf B bantlar ya da reaksiyonun baskılanması	Düşük DNA konsantrasyonu Yanlış amplifikasyon koşulları Doğru kapatılmayan kuyucuklar Örneklerin yetersiz karıştırılması	DNA konsantrasyonu arttırılır. Termal cycler'ı kontrol et. Termal cycler PE 9600/9700 ve PTC 100 metodun gerçekleştirilmesi için valide edilmiştir. Kapak striplerinin veya PCR matının kapatıldığını kontrol et (mat üzerine basınç uygula) Mastır miks'i hazırladıktan sonra iyice vorteks'le.

BÖLÜM 6.2 ÇALIŞMA SAYFASI

1. 1600 baz çiftlik PZR ürününüzü Agaroz Jel elektroforezinde görüntülemek istiyorsunuz. Elinizde 10X konsantrasyonunda tamponunuz ve toz halinde agarozunuz bulunmaktadır. 1X TBE tamponu ile 100 ml % kaçlık agarozu nasıl hazırladınız?
2. Kandan izole ettiğiniz DNA örneğinden 2µl ve DNA örneğini kullanarak yaptığımız PZR ürününden 2µl %1'lik agaroz jele yüklediniz. Hangisinin daha hızlı hareket etmesini beklersiniz, neden?

HAZIRLAYAN:

**TESLİM ALAN:
YORUM:**

LAB 7-DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizilemesi, bir DNA molekülündeki nükleotit bazlarının (adenin, guanin, sitozin ve timin) sırasının belirlenmesidir.

İlk DNA dizisi iki boyutlu kromatografik yöntemlerle 1970'lerde elde edilmiştir. Daha sonra boya temelli otomatik dizileme yöntemlerinin gelişmesiyle DNA dizisinin çıkarılması daha kolay ve hızlı olmuştur. Biyolojik araştırmalarda, hastalıkta veya adli vakalarda tanı koymak için ilgili genin veya genomun diğer bir bölümünün dizisinin bilinmesi gereklidir.

DNA Dizi Analizinin Prensipleri:

Bir bazın her tekrarında uç kısmından işaretlenmiş DNA molekülünü kırarak farklı boyutlarda DNA fragmentleri oluşturan bir kimyasal prosedürdür. Her bir işaretli fragmentin uzunluğu bazın pozisyonunu belirler. Sonuçta bu ürünler büyüklüklerine göre poliakrilamid jel üzerinde elektroforezle çözüldüğünde DNA dizileri radyoaktif bantlar şeklinde gözlemlenebilir. Bu teknik işaretleme noktasından itibaren en az 100 bazlık bölgeyi okuyabilir. Burada kullanılan pürinlere spesifik reaktif dimetil sülfat ile primidinlere spesifik olan hidrazindir.

İlk yapılan çalışmalar:

1973 – Gilbert ve Maxam 24 baz diziyi açıklamışlar.

1975 – Sanger zincir sonlandırma yöntemi ortaya konulmuş

1975 - ϕ X174 bakteriyofajının tüm genomunun sekansı yapılmış.

DNA dizisinin bilinmesi birçok hastalığın nedenini açıklar ve tedavisi için olanak sağlar.

SANGER DİZİ ANALİZİ:

Maxam-Gilbert yöntemine göre çok daha etkilidir ve daha az toksik madde kullanımı vardır.

Prensibi: DNA zincir sonlandırıcı olarak dideoksinükleotit trifosfatlar (ddNTP'ler) kullanılması.

ddNTP'lerin dNTP'lerden farkı 3' uçlarında OH grubunun olmamasıdır.

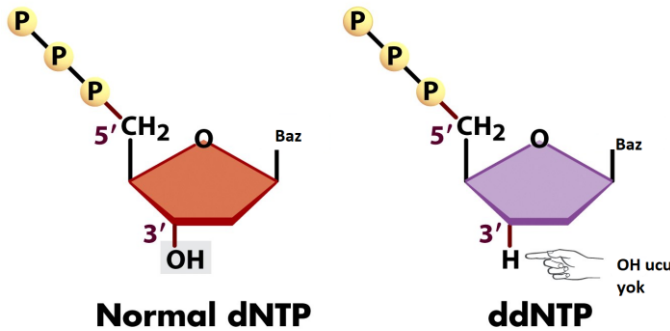


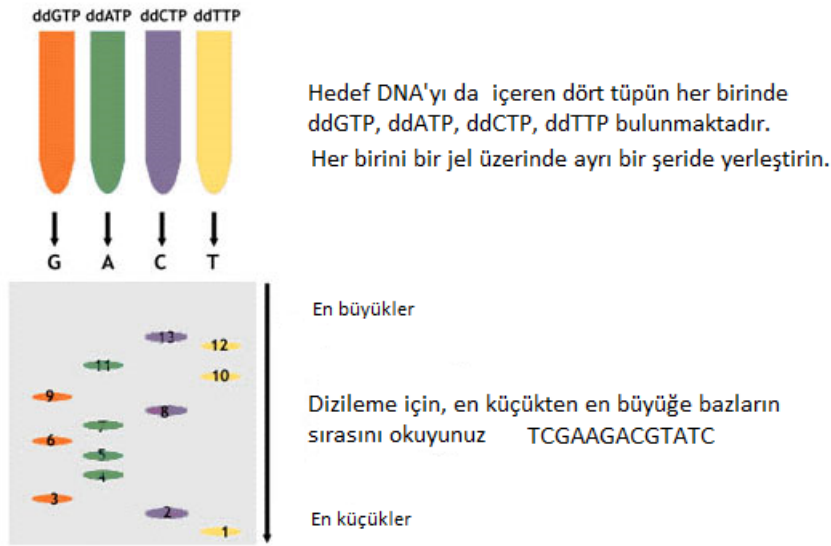
Figure 19-6a Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Şekil 7.1 dNTP ve ddNTP farkı (<https://www.quora.com/In-terms-of-biology-what-is-the-main-and-most-important-difference-between-ddNTP-and-dNTP>)

Gerekli bileşenler:

1. Kalıp DNA – tek iplikli DNA
 2. DNA primer
 3. DNA polimeraz
 4. Radyoaktif veya flüoresan işaretli nükleotidler - dNTP
 5. Radyoaktif veya flüoresan işaretli modifiye nükleotidler - ddNTP
 6. Buffer mix
- Dört standart deoksiniükleotiti içeren dört farklı tüpe ((dATP, dGTP, dCTP, dTTP) DNA örneği ve diğer malzemeler konur.
 - Her tüpe kendisine ait ddNTP'ler eklenir.
 - Yeni oluşan ve işaretli DNA fragmentleri sıcaklıkla denaüte edilir ve jel elektroforeziyle birbirinden ayrılır. Her bir tüpteki örnek ayrı bir sütuna konur.
 - UV ışığında DNA bantları direkt olarak gözlenebilir.



Şekil 7.2 Sanger sekanslama yönteminin temel prensibi (<https://askbiologist.asu.edu/sequencing>)

Sınırlamaları:

1. Non-spesifik primer-DNA bağlanması
2. Okuma işleminin manuel yapılmasından dolayı DNA dizisinin doğruluğunun kesin olmaması.
3. Deneyimli olmak gerekli

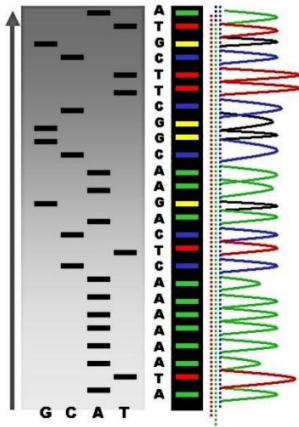
Boya-sonlandırıcı dizi analizi:

Sanger dizi analizinin daha geliştirilmiş halidir. Yukarıda 4 farklı tüpte gerçekleşen reaksiyon bir tüpte gerçekleşir.

Her bir ddNTP farklı bir flüoresan boyayla işaretlenir. Bu boyaların her biri de farklı boyutlarda ışımaya ve emisyon gerçekleştirir. Bu farklılığa bağlı olarak da tek bir tüpte hepsi

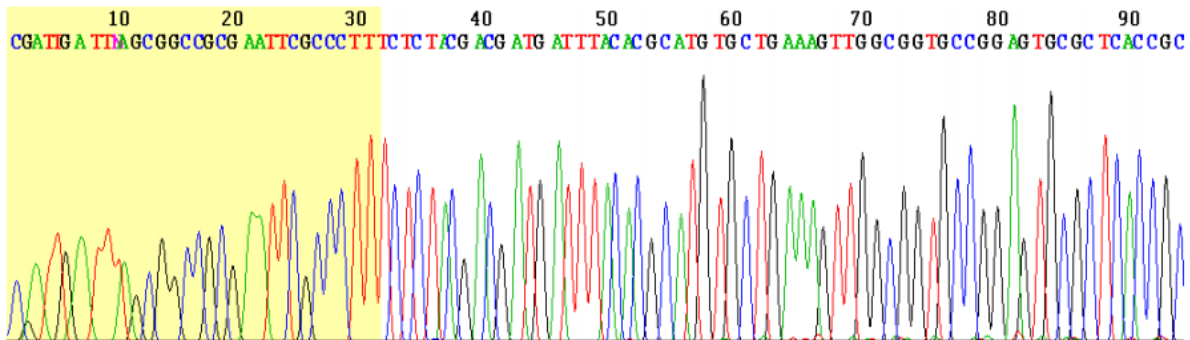
ayrı ayrı analiz edilebilir. Günümüzde bu yöntem otomatize cihazlarda gerçekleşir ve verdiği ışımaya göre de farklı büyüklükte pikler verir.

İlk 15-40 bazı düşük kalitede okuyup, düzeliyor, 700-900 bazdan sonra tekrar bozulması sınırlayıcı faktör.



Şekil 7.3 Sanger sekanslama yönteminde jel ve floresan piklerin karşılaştırılması (https://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_sequencing)

Yeni geliştirilen otomatize cihazlarla 384 örnek tek bir çalışmada 24 saatte sonuç alınabilmektedir. Bu cihazlar kapiller elektroforezi ile büyüklüğüne göre fragmentleri ayırır. Sonuçların analizi ise floresan piklerin analizi ile gerçekleştirilir.

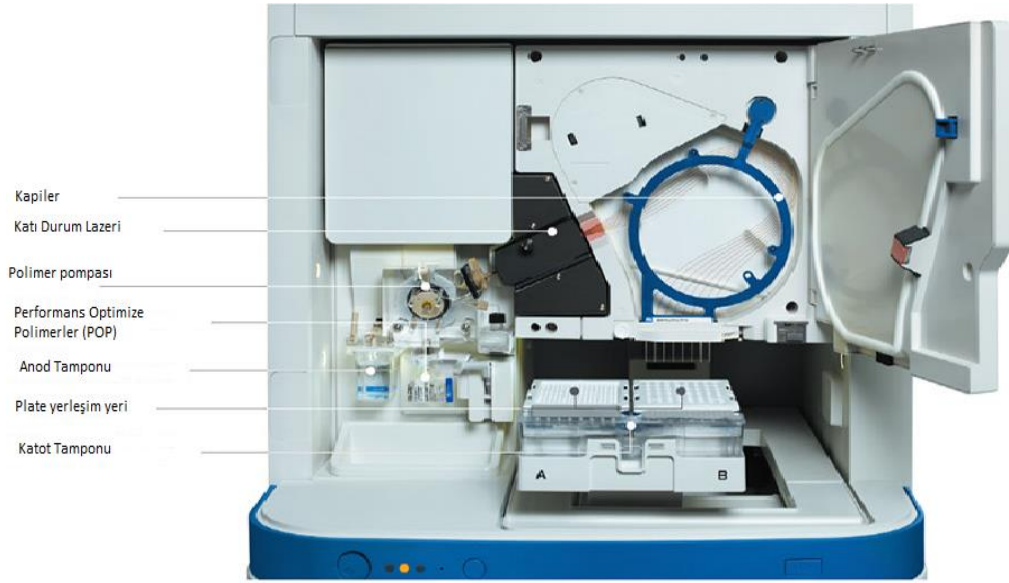


Şekil 7.4 Sanger sekanslama sonucunda elde edilen floresan pikler (https://en.wikibooks.org/wiki/Methods_and_Concepts_in_the_Life_Sciences/DNA_Sequencing)

Otomatize sistem uygulaması:

Gerekli bileşenler:

1. Kalıp DNA – tek iplikli DNA
 2. DNA primer
 3. DNA polimeraz
 4. Radyoaktif veya floresan işaretli nükleotidler - dNTP
 5. Radyoaktif veya floresan işaretli modifiye nükleotidler - ddNTP
 6. Buffer mix
- Bir hasta için tek bir PCR tüpüne gerekli malzemeler eklenir, pipetajla karıştırılır ve thermal cycler da ilgili protokol uygulanarak reaksiyonların gerçekleşmesi sağlanır.
 - PCR sonrası örnekler süzülerek kuyucuklara aktarılır ve plaklar cihaza yüklenir.
 - Sonuçlar bilgisayar programı üzerinden analiz edilir.



Şekil 7.5 ABI 3500 Genetik analizyer (<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger-sequencing-technology-accessories/applied-biosystems-sanger-sequencing-3500-series-genetic-analyzers/3500-series-genetic-analyzer.html>)

Bu laboratuvar dersinde otomatize Sanger dizi analizi prosedürlerinin videoları izlenecektir.

BÖLÜM 7 SORULAR

HAZIRLAYAN:

**TESLİM ALAN:
YORUM:**

LAB.8-KARYOTİP ANALİZİ

Karyotiplendirme, bir organizmanın bütün kromozomlarının çiftlerinin eşlenmesi ve sıraya sokulmasıdır. Bu sayede bir bireyin kromozomlarının genel bir resmi ortaya konmuş olur. Klinikte sitogenetik uzmanları büyük genetik değişiklikleri belirlemek amacıyla karyotiplendirme yöntemini kullanırlar. Karyotiplendirme ile kromozom sayısındaki değişiklikler (anöploidi, trizomi 21 gibi) veya yapısal değişiklikleri (delesyonlar, duplikasyonlar, translokasyonlar ve inversiyonlar) de saptanabilir. Artık günümüzde doğum anomalileri, genetik bozukluklar ve hatta kanser tanısında bile kullanılabilir.

Karyotip Analizi için kullanılan örnekler:

- Periferik kan
- Tümör biyopsileri
- Kemik iliği örnekleri
- Amniyon sıvısı
- Koryonik villus

Karyotip analizi için preparatlar Mitoz bölünme geçiren ve metafaz aşamasında olan hücrelerden hazırlanır ve çeşitli bantlama teknikleriyle boyamaları yapılarak mikroskopta incelenir.

Karyotip Analizi için Preparat Hazırlama Yöntemi

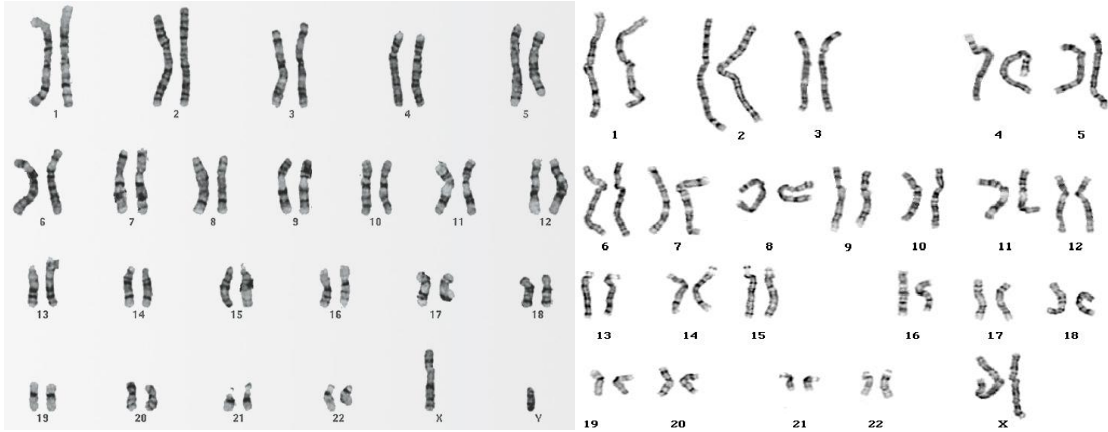
Kromozomların tanımlanmasının ve sınıflandırmanın sağlıklı olması için birçok yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en basiti belirli evrede kromozomları tespit etmek, sonra elde etmek ve boyayarak incelemektir.

- Kromozomlar ya direkt kemik iliği ya da kısa süreli 72 saatlik doku kültürü yöntemleri ile elde edilir. Kemik iliğinden alınan örnek materyal besi ortamı içine konularak direkt çalışılır veya 24 saat kültür ortamında bekletilerek çalışılır.
- Periferik kan örneğinin karyotip analizinde ise, heparinize enjektörle venden alınan kan steril besi ortamı doku kültürü tüplerine konular, fitohemaglutinin eklenecek 37 derecede 72 saat süresince hücrelerin çoğalması beklenir. Bu aşamadan sonra kemik iliği ve periferik kan için yöntem ortak bir seri işlemi takip eder.
- Her iki yöntemde de lenfositleri metafaz evresinde durdurmak için, belirli süre ve dozda kolşisin ilave edilir.
- Sonra santrifüj edilip besi ortamından ayrılan hücrelerin üzerine hipotonik solüsyon ilave edilerek hücrelerin şişmeleri beklenir.
- Daha sonra tekrar santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılır ve fiksatif konur. Bu solüsyonla üç kez yıkanan hücreler eritrositlerden arınır ve tespit edilir.
- Daha sonra temiz lam üzerine yayılan hücreler boyama için hazırlanır.
- Kromozomlar DNA boyaları ile boyanırlar. 1970'li yıllardan sonra geliştirilen bazı tekniklerle bugün her bir kromozom tek tek tanımlanabilmiştir. Bu yeni yöntemlerle lam üzerine yayılan metafazlar önce bazı enzimlerle (tripsin, papain) gibi veya tamponlarla (sörensan fosfat tamponu) veya diğer bazı kimyasal maddelerle (SSC) muamele edildikten sonra Giemsa ile boyanır. Sonuçta her kromozoma özgü boyanan ve boyanmayan kısımlar oluşmuştur.

- Ayrıca floresan boyası ile de aynı bantlar elde edilebilir. Pahalı bir yöntem olduğu için tanımlamada fazla sıklıkla kullanılmayan radyoaktif işaretleme yöntemi de vardır. X kromozomlarının ayırımında kullanılır.

Giemsa Bantlama Tekniği (G-Bantlama):

- En sık kullanılan bantlama tekniğidir.
- Hazırlanan preparatlar yaşlandırıldıktan sonra tripsin enzimi ile histon ve non-histon proteinleri denatüre edilir. Sonuçta açıkta kalan DNA Giemsa ile boyanır.
- 400-700 arasında bant değerlendirilir.
- GC zengin bölgeler açık renk görülür.



Şekil 8.1 G bantlama sonucu görülen bantlar (<http://bio3400.nicerweb.com/Locked/media/ch12/G-banding.html>, <http://labmed.hallym.ac.kr/cytogenetics/methodology/G-banding.htm>)

Bu laboratuvar dersinde hazır preparatlar üzerinde kromozomların sınıflandırılması yapılacaktır.

BÖLÜM 8 SORULAR

1. Karyotip çalışması prosedüründe hipotonik solusyon eklenmezse çalışmaya etkisi ne olur?
2. Karyotip sonuçlarını değerlendirirken ilk olarak ne yapılmalıdır, değerlendirmeye ne ile başlanmalıdır.

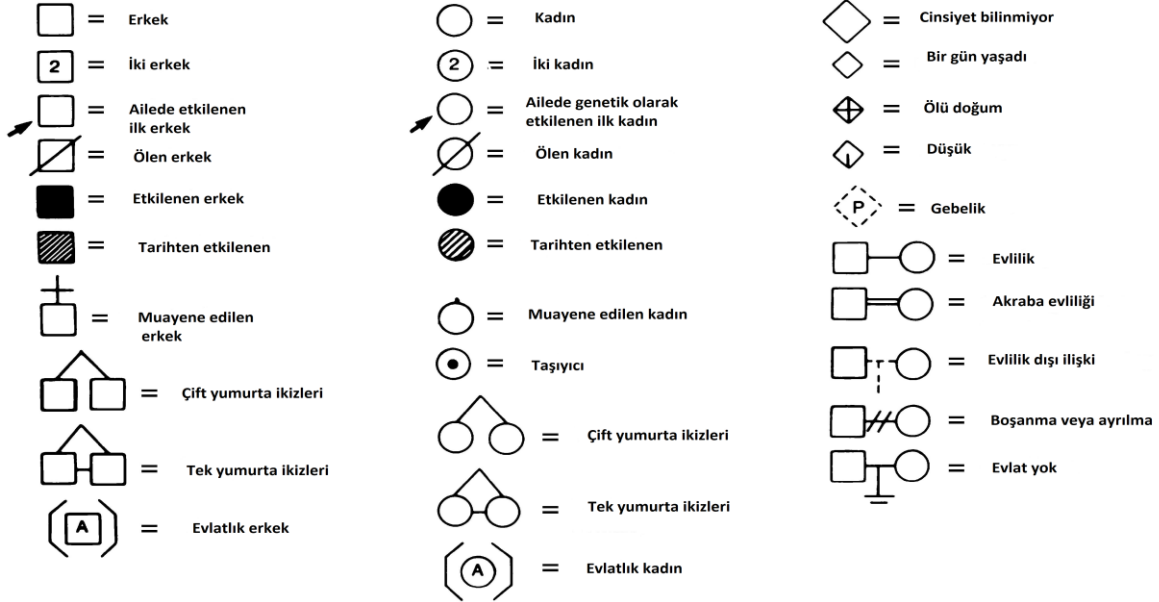
HAZIRLAYAN:

**TESLİM ALAN:
YORUM:**

LAB.9-KALITIM KALIPLARI ve PEDİGRİ ANALİZİ

Terimler

Tek gen bozuklukları kalıtsal olarak ailelerdeki geçişleriyle karakterizedir. Bu geçişin tam olarak ortaya konması için bireyin aile geçmişindeki bilgiler alınarak pedigrisi çizilir. Pedigri, standart semboller kullanılarak soy ağacının oluşturulduğu grafikdir.



Şekil 9.1 Pedigrinde kullanılan standart semboller (<https://www.aao.org/image/symbols-commonly-used-pedigree-analysis-2>)

İlk olarak genetik uzmanına başvurmuş ve aile öyküsü alınmış kişi **proband** olarak isimlendirilir. Akrabalar **birinci derece** (anne, baba, kardeş ve çocuk), **ikinci derece** (anneanne, babaanne, dedeler, torunlar, amcalar, dayılar, teyzeler, halalar, yeğenler, üvey kardeşler) ve **üçüncü derece** (kuzen) olmak üzere üç gruptadır. Eğer proband o ailede etkilenen tek kişiye **izole vaka** denir. Eğer izole vakanın probanddaki yeni bir mutasyondan kaynaklandığı kanıtlanırsa buna **sporadik vaka** denir. Pedigrinin incelenmesindeki ilk önemli basamak bir ailedeki genetik bozukluğun kalıtım paterninin belirlenmesidir.

Kalıtım paternleri iki faktöre bağlı olarak değişir:

- İlgili gen lokusu otozomal kromozom (kromozom 1-22) üzerinde mi?, Cinsiyet kromozomu (X ve Y kromozomları) üzerinde mi? veya mitokondriyal genom üzerinde mi??
- Fenotipi **dominant** mı? (sadece bir kromozom bile mutant alleli taşısa görülür) yoksa resesif mi? (iki kromozom birden mutant alleleri taşıdığında görülür)

BÖLÜM 9 SORULAR

1. Pedigri çalışması çok çocuklu ailelerden oluşuyorsa çizimi kolaylaştıracak nasıl bir yol izlersiniz?
2. Pedigri çalışmasında bireylerin yaşlarının belirtilmesi önemli mi? Neden? nasıl gösterilir?

HAZIRLAYAN:

**TESLİM ALAN:
YORUM:**

