

# **BİYOTEKNOLOJİDE KULLANILAN TEKNİKLER VE PROTOKOLLER**

*Yazarlar:*  
**Havva TÜRK BEN**  
**Furkan AYZ**

**2022**



atlas akademi yayınevi

**ISBN: 978-625-8101-17-1**

**© 1. Baskı, Eylül 2022**

**© Copyright 2022, ATLAS AKADEMİ**

Bu baskının bütün hakları Atlas Akademi'ye aittir.  
Yayınevinin yazılı izni olmaksızın, kitabın tümünün veya bir kısmının  
elektronik, mekanik ya da fotokopi yoluyla basımı, yayımı,  
çoğaltımı ve dağıtımı yapılamaz.

**SERTİFİKA NO: 49704**

**Kapak ve Dizgi**  
**Atlas Akademi Yayınevi**

**Baskı ve Cilt**  
**Vadi Grafik**  
**47479**  
Anakara

## **KÜTÜPHANE BİLGİ KARTI**

### **Yazarlar:**

TÜRK BEN, Hawva  
AYAZ, Furkan

### **Anahtar Kelimeler:**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Elektroferez, Hibridizasyon  
Yöntemleri, Southern Blot, Northern Blot, Western Blot, Dot  
Blot, İn Situ, FISH, Protein Tayin Yöntemi, DNA İzolasyonu,  
RNA İzolasyonu, Protein İzolasyonu, Kromatografik  
Yöntemler, MLST, MALDI-TOF MS, DNA Mikroarray  
Teknolojisi, Bakteriyofaj İzolasyonu, Bakterilerde Genetik  
Madde Aktarımı, Serolojik Tepkimeler, Flow Akım  
Sitometrisi, Sitotoksitesite Testleri



Akademi Mah. Yeni İstanbul Cad.

No: 22 Selçuklu / KONYA

Tel: 0332 241 30 59

## **Teşekkür**

*Yalnızca bu kitabı yazmamda değil, lisans eğitimim boyunca benden hiçbir desteği esirgemeyen; bilgi, deneyim ve başarısının yanı sıra yol göstericiliği ile hayatıma yön verdiğim süreçte bana ışık tutan, bana ve başaracağıma olan güveniyle beni kendime inandıran ve başarmamı sağlayan çok değerli hocam Doç. Dr. Furkan AYZAZ'a;*

*Biyoteknoloji lisans programına beni yönlendiren, akademik kariyer planlarımda desteklerini benden esirgemeyen abim Cengiz KÜÇÜKKAYA'ya;*

*Kitap yazma sürecim boyunca manevi destekleri ve anlayışları ile yanımda olan annem ve babam başta olmak üzere kardeşlerim Melike, Baran ve Ahmet'e, ablam Dilek'e, biricik yeğenim Fırat'a ve arkadaşlarıma;*

*Teşekkür ederim.*

**Havva TÜRK BEN**



# İÇİNDEKİLER

<b>BÖLÜM 1: POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR/PCR)</b> .....	1
1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Basamakları .....	2
1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temel Bileşenleri .....	3
1.2.1. Kalıp DNA (Hedef DNA) .....	3
1.2.2. Primerler (Oligonükleotidler) .....	3
1.2.3. Deoksinükleotit- Trifosfat (dNTP) .....	4
1.2.4. Polimeraz Enzimleri .....	5
1.2.5. Tampon Çözeltiler (Buffer).....	5
1.3. PCR Başarısını Etkileyen Faktörler .....	5
1.4. PCR Testi İçin Gerekli Aletler .....	5
1.5. PCR Testinin Genel Çalışma Basamakları .....	6
1.6. PCR Çeşitleri .....	6
1.6.1. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	7
1.6.2. Kantitatif (Real Time) Gerçek Zamanlı PCR .....	8
1.6.2.1. Real Time PCR Kullanım Alanları.....	8
1.6.3. Multipleks PCR .....	8
1.6.4. Nested PCR .....	9
1.6.5. Asimetrik PCR.....	9
1.6.6. <i>In Situ</i> PCR .....	10
<b>BÖLÜM 2: ELEKTROFOREZ</b> .....	11
2.1. Elektroforez Prensibinde Dikkat Edilen Hususlar .....	11
2.2. Elektroforez Çeşitleri.....	13
2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi .....	13
2.2.1.1. Agaroz Jel Elektroforez Protokolü .....	13
2.2.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	14
2.2.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforez Protokolü .....	15
2.2.3. Değişken Alanlı (Pulsed Field) Jel Elektroforezi.....	16

2.2.3.1. Değişken Alanlı (Pulsed Field) Jel Elektrophorez Protokolü .....	16
2.2.4. Kağıt ve Selüloz Asetat Elektrophorezi .....	17
2.2.4.1. Kağıt ve Selüloz Asetat Elektrophorez Protokolü .....	17
2.2.5. Kapiller (Kılcal) Elektrophorezi.....	18
2.2.5.1. Kapiller Elektrophorez Protokolü .....	19
<b>BÖLÜM 3: HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ</b> .....	21
3.1. Problar.....	21
3.2. Hibridizasyonun Dayanıklılığını Etkileyen Faktörler .....	22
<b>BÖLÜM 4: SOUTHERN BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ</b> .....	23
4.1. Genetik Materyalin İzole Edilmesi .....	23
4.2. Uygun Restriksiyon Enzimleriyle DNA'nın Kesilmesi.....	23
4.3. Agaroz Jel Elektrophoreziyle Görüntülenmesi .....	23
4.4. Bantların Membran Üzerine Aktarılması (Southern Blotlama).....	24
4.5. Denatürasyon ve Fiksasyon .....	24
4.6. Hibridizasyon .....	24
4.7. Radyoaktif Prob ile İşaretleme.....	25
4.8. Otoradyografi ile Tespit.....	25
4.9. Southern Blot Hibridizasyon Protokolü .....	25
<b>BÖLÜM 5: NOUTHERN BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ</b> .....	27
5.1. Noutthern Blot Hibridizasyon Protokolü.....	28
<b>BÖLÜM 6: WESTERN BLOT HİBRİDİZASYONU</b> .....	29
6.1. Western Blot Hibridizasyon Protokolü .....	30
<b>BÖLÜM 7: DOT BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ</b> .....	31
7.1. Dot Blot Hibridizasyon Protokolü .....	31
<b>BÖLÜM 8: İN SİTU HİBRİDİZASYON</b> .....	33
<b>BÖLÜM 9: FLOURESAN İN SİTU HİBRİDİZASYON (FISH)</b> .....	35
9.1. Flouresan İn Situ Hibridizasyon Yönteminin Basamakları .....	36
9.1.1. FISH Yönteminin Başarısı İçin Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar .....	36

9.1.2. Flouresan İn Situ Hibridizasyon Protokolü .....	37
9.2. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi Çeşitleri.....	37
9.2.1. Spektral Karyotipleme.....	37
9.2.2. Multicolor FISH (M-FISH) .....	38
9.2.3. Cobra FISH .....	38
9.2.4. R × FISH .....	38
9.2.5. Fiber FISH.....	38
9.3. Genomik İn Situ Hibridizasyon (CGH).....	39
<b>BÖLÜM 10: PROTEİN TAYİN YÖNTEMİ</b> .....	41
10.1. Kjeldhal Yöntemi.....	41
10.1.1. Kjelhald Yöntemi Protokolü.....	41
10.2. Biüre Yöntemi .....	42
10.2.1. Biüre Yöntemi Protokolü .....	42
10.3. Bikinkoninik Yöntemi.....	43
10.3.1. Bikinkoninik Yöntemi Protokolü .....	43
10.4. Lowry Yöntemi .....	44
10.4.1. Lowry Yöntemi Protokolü.....	45
10.5. Bradford Yöntemi.....	45
10.5.1. Bradford Yöntemi Protokolü.....	46
10.6. Warburg-Christian Yöntemi .....	47
<b>BÖLÜM 11: DNA İZOLASYONU</b> .....	49
11.1. Kimyasal ile Hücre Duvarının Parçalanması .....	50
11.2. Lizis .....	51
11.3. Ekstraksiyon.....	51
11.4. Prespitasyon .....	51
11.5. Alkali SDS ile Plazmit DNA İzolasyon Protokolü .....	52
11.6. DNA Örneklerinin Fenol ile İzolasyon Protokolü .....	53
11.7. DNA Örneklerinin Etanol ile İzolasyon Protokolü .....	53
<b>BÖLÜM 12: RNA İZOLASYONU</b> .....	55
12.1. RNA İzolasyonunda Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar .....	55
12.2. RNA İzolasyon Protokolü.....	56

<b>BÖLÜM 13: PROTEİN İZOLASYONU</b> .....	57
13.1. Protein İzolasyonunda Kullanılacak Kimyasallar.....	58
13.2. Protein İzolasyonu Aşamaları.....	58
<b>BÖLÜM 14: KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER</b> .....	59
14.1. Kromatografinin Sınıflandırılması .....	60
14.1.1. Uygulama Biçimine Göre .....	60
14.1.1.1. Kağıt Kromatografisi .....	60
14.1.1.1.1. Kağıt Kromatografisi Protokolü.....	60
14.1.1.1.2. Retensiyon Faktörü (RF Değeri).....	61
14.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	62
14.1.1.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi Protokolü.....	63
14.1.1.2.2. İnce Tabaka Kromatografisinde Dikkat Edilmesi Gerekenler .....	63
14.1.1.3. Kolon Kromatografisi.....	64
14.1.1.3.1. Kolon Kromatografisinde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar .....	65
14.1.1.3.2. Kolon Kromatografisi Protokolü .....	65
14.1.1.4. Gaz Kromatografisi .....	66
14.1.1.4.1. Gaz-Sıvı Kromatografisi Protokolü .....	68
14.1.1.4.2. Gaz Kromatografisi ve Kütle Spektrometresi Kombinasyonu (GC-MS).....	68
14.1.1.5. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	69
14.1.1.5.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Protokolü .....	70
14.2. Ayrılma Mekanizmalarına Göre .....	71
14.2.1. Adsorbisyon Kromatografisi.....	71
14.2.2. Dağılma (Partisyon) Kromatografisi.....	71
14.2.3. İyon Değiştirme Kromatografisi.....	72
14.2.4. Jel Filtrasyon Kromatografisi .....	72
14.2.5. Affinite Kromatografisi.....	73



<b>BÖLÜM 15: MLST (ÇOKLU LOKUS ANALİZ TESTİ)</b> .....	75
15.1. MLST Tekniği İçin Yöntem Basamakları .....	75
15.2. MLST Tekniği Protokolü .....	76
<b>BÖLÜM 16: MALDI-TOF MS (MATRİKS İLE DESTEKLENMİŞ LAZER DESORPSİYON/İYONİZASYON UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ)</b> .....	79
16.1. MALDI-TOF MS Yönteminin Temel Çalışma Prensibi .....	80
<b>BÖLÜM 17: DNA MİKROARRAY TEKNOLOJİSİ</b> .....	81
17.1. DNA Mikroarray Teknolojisinin Genel Protokolü .....	82
<b>BÖLÜM 18: BAKTERİYOFAJ İZOLASYONU</b> .....	85
18.1. Bakteriyofaj İzolasyonu Protokolü .....	86
<b>BÖLÜM 19: BAKTERİLERDE GENETİK MADDE AKTARIMI</b> .....	89
19.1. Bakterilerde Doğal Olarak Genetik Madde Aktarım Yolları .....	89
19.1.1. Konjugasyon .....	89
19.1.2. Transdüksiyon.....	90
19.1.2.1. Özel (Lokalize) Transdüksiyon .....	90
19.1.2.2. Genel Transdüksiyon .....	91
19.1.2.3. Aboratif Transdüksiyon .....	91
19.1.3. Transformasyon .....	92
19.1.3.1. Transformasyon Yöntemi Protokolü .....	92
<b>BÖLÜM 20: ANTİKOR-ANTİJEN BİRLEŞMESİNE DAYALI SEROLOJİK TEPKİMLER</b> .....	95
20.1. Aglütinasyon Testi .....	96
20.1.1. Lam Aglütinasyon Testi .....	97
20.1.1.1. Rose Bengal Lam Aglütinasyon Testi Protokolü ....	98
20.1.2. Tüp Aglütinasyon Testi .....	98
20.1.2.1. Tüp Aglütinasyon Testi Protokolü .....	99
20.1.3. Koaglütinasyon (CoA) Testi .....	99
20.1.4. Hemaglütinasyon Testi (HA).....	100
20.1.4.1. Direkt Hemaglütinasyon .....	100

20.1.4.2. İndirekt Hemaglütinasyon .....	101
20.1.5. Hemaglütinasyon İnhibisyonu .....	101
20.1.6. Aglütinasyon Testinin Başarısını Etkileyen Faktörler .....	101
20.2. Presipitasyon Testi .....	102
20.2.1. Katı Ortamda Presipitasyon .....	103
20.2.1.1. Basit Difüzyon .....	103
20.2.1.2. Çift Difüzyon .....	104
20.2.2. Sıvı Ortamda Presipitasyon .....	104
20.2.3. Tüpte Sulandırma Yöntemi ile Presipitasyon .....	104
20.3. Flokülasyon Testi .....	105
20.4. Kompleman Fiksasyon Testi .....	106
20.5. İmmunofloresan Assay Yöntemi (IFA) .....	106
20.5.1. Direkt İmmunofloresan Yöntemi .....	106
20.5.2. İndirekt İmmunofloresan Yöntemi .....	107
20.5.3. Nötralizasyon İmmunofloresan Yöntemi .....	107
20.6. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Yöntemi .....	107
20.6.1. Direkt ELISA Yöntemi .....	109
20.6.1.1. Direkt ELISA Yönteminin Genel Basamakları .....	109
20.6.2. İndirekt ELISA Yöntemi .....	110
20.6.2.1. İndirekt ELISA Yönteminin Genel Basamakları .....	110
20.6.3. Sandwich ELISA Yöntemi .....	110
20.6.3.1. Sandwich ELISA Yönteminin Genel Basamakları .....	111
20.6.4. Competitive ELISA Yöntemi .....	112
20.6.4.1. Competitive ELISA Yönteminin Genel Basamakları .....	112
20.7. Radio Immuno Assay (RIA) Yöntemi .....	113
20.7.1. Radio Immuno Assay Yönteminin Genel Basamakları .....	113
20.7.2. Sandwich Yöntemine Dayalı Immuno Radio Metric Assay Yöntemi .....	114
<b>BÖLÜM 21: FLOW AKIM SİTOMETRİSİ YÖNTEMİ</b> .....	115
21.1. Flow Akım Sitometrisinin Genel Çalışma Prensipleri .....	116
21.2. Meme ve Pankreas Kanseri Hücre Hatlarının Farklı Boyama Teknikleri Kullanılarak Flow Sitometri ile Analizi Protokolü .....	116

<b>BÖLÜM 22: SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ</b> .....	119
22.1. Sitotoksosite Testlerinin Sınıflandırılması.....	120
22.1.1. Boyama Yöntemlerine Göre Sitotoksosite Testleri .....	121
22.1.1.1. Tripan Mavisi ile Boyama Yöntemi .....	122
22.1.1.2. Eozin ile Boyama Yöntemi .....	122
22.1.1.3. Kongo Kırmızısı ile Boyama Yöntemi .....	123
22.1.1.4. Eritrosin B ile Boyama Yöntemi .....	123
22.1.2. Kolorimetrik Yönteme Göre Sitotoksosite Testleri .....	124
22.1.2.1. Nötral Kırmızısı ile Boyama Yöntemi .....	124
22.1.2.1.1. Nötral Kırmızısı ile Boyama Yöntemi Protokolü .....	124
22.1.2.2. Kristal Viyole ile Boyama Yöntemi .....	126
22.1.2.3. MTT Testi .....	127
22.1.2.3.1. MTT Testinin Temel Çalışma Basamakları .....	127
22.1.2.4. MTS Testi .....	128
22.1.2.5. XTT Testi .....	128
22.1.2.5.1. XTT Testi Protokolü .....	128
22.1.2.6. WST-1 / WST-8 Testi .....	129
22.1.2.6.1. WST-1 Testi Protokolü.....	130
22.1.2.7. SRB (Sulforhodamin B) Testi.....	130
22.1.2.8. LDH (Laktat Dehidrojenaz) Testi .....	131
22.1.2.8.1. LDH Testi Temel Çalışma Prensibi ....	131
22.1.3. Florometrik Yöntemlere Göre Sitotoksosite Testleri .....	131
22.1.3.1. Alamar Blue ile Boyama Yöntemi .....	131
22.1.3.1.1. Alamar Blue Testi Temel Çalışma Prensibi .....	132
22.1.3.2. CFDA-AM Testi .....	133
22.1.4. Luminometrik Yöntemlere Göre Sitotoksosite Testleri .....	133
22.1.4.1. ATP Testi.....	133
22.1.4.2. Gerçek Zamanlı Canlılık Testleri .....	134
22.1.5. Apoptoz Mekanizmasının Belirlenmesi Yöntemine Göre Sitotoksosite Testleri.....	135

---

22.1.5.1. Anneksin V Yöntemi ile Apoptozun Belirlenmesi..	135
22.1.5.2. Kaspaz 3 Aktivitesinin Ölçülmesi ile Apoptoz Seviyelerinin Belirlenmesi.....	136
22.1.5.3. Kaspaz 8 Aktivitesinin Ölçülmesi ile Apoptoz Seviyelerinin Belirlenmesi.....	136
22.1.5.4. Kaspaz 9 Aktivitesinin Ölçülmesi ile Apoptoz Seviyelerinin Belirlenmesi.....	137
22.1.5.5. TUNEL (Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Dntp Çentik Uç İşaretleme) Yöntemi ile Apoptoz Seviyesinin Belirlenmesi .....	137
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>139</b>