

TEMEL MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK TEKNİKLERİ

Yazarlar:

Ceren CANATAR

Furkan AYAZ

2022

as atlas
akademi

atlas akademi yayınevi

ISBN: 978-625-8101-18-8

© 1. Baskı, Ağustos 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:

CANATAR, Ceren

AYAZ, Furkan

Anahtar Kelimeler:

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, DNA ve RNA İzolasyonu,
Elektroforetik Yöntemler ile Analiz, Bakterilerde
Transformasyon, Nükleik Asitler, Proteinler,
Kromatografik Yöntemler, Diyaliz Yöntemi, Serolojik
Tepkimeler, Flow Sitometri Yöntemi, Mikroskop Çeşitleri,
Sitotoksitate Testleri, Monoklonal Antikorlar



Akademi Mah. Yeni İstanbul Cad.

No: 22 Selçuklu / KONYA

Tel: 0332 241 30 59

TEŐEKKÜR

Öncelikle lisans eğitimim süresince öğreticiliğinden ve yol göstericiliğinden dolayı sonrasında ise kitap yazma sürecimde bana karşı gösterdiği sonsuz desteğinden ve sabrından dolayı başarılı ve çok değerli hocam Doç. Dr. Furkan AYZA'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatımın her anında verdiğim her kararda arkamda duran, destekleyen ve teşvik eden çok sevgili aileme, arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ceren CANATAR

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1: POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE DNA'NIN BELLİ DİZİLERİNİN ÇOĞALTILMASI	1
1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bazı Kullanım Alanları	1
1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Çalışma Prensipleri	1
1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri	2
1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşamaları.....	4
1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Bazı Avantajları ve Dezavantajları	5
1.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Çalışma Koşullarını Etkileyen Bazı Etmenler.....	6
1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü.....	6
1.8. Bazı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çeşitleri.....	7
1.8.1. Real-Time PCR.....	7
1.8.2. Multiplex PCR.....	8
1.8.3. Nested PCR	9
1.8.4. Revers-Transkriptaz PCR.....	9
1.8.5. Asimetrik PCR.....	10
1.8.6. In Situ PCR	10
BÖLÜM 2: DNA VE RNA İZOLASYONU	11
2.1. DNA İzolasyonu	11
2.2. DNA İzolasyonunun Kullanıldığı Bazı Alanlar	11
2.3. Genel Olarak DNA İzolasyon Yöntemi Aşamaları.....	12
2.3.1. Lizis Aşaması.....	12
2.3.2. Protein ve DNA Yapısının Ayrılması Aşaması	12
2.3.3. DNA Molekülünün Çöktürülmesi Aşaması	12
2.4. Genomik DNA Ekstraksiyonu Protokolü	13
2.5. Plazmid DNA.....	14
2.5.1. Plazmid DNA İzolasyonu Protokolü.....	15
2.6. RNA İzolasyonu	16

2.6.1. RNA Molekülü	16
2.6.2. RNA İzolasyonunda Bazı Önemli Noktalar	17
2.6.3. RNA İzolasyonu Protokolü	18
BÖLÜM 3: ELEKTROFORETİK YÖNTEMLER İLE ANALİZ	19
3.1. Elektroforez Yöntemleri	19
3.2. Bazı Elektroforetik Yöntem Çeşitleri	20
3.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi	20
3.2.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi Protokolü	22
3.2.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	23
3.2.2.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) Protokolü	25
3.2.3. Kapiller (Kılcal) Elektroforez	27
3.2.3.1. Kapiller (Kılcal) Elektroforez Protokolü	27
3.2.4. Değişken Alanlı (Pulsed-Field) Jel Elektroforezi	27
3.2.4.1. Değişken Alanlı (Pulsed-Field) Jel Elektroforezi Protokolü	28
BÖLÜM 4: BAKTERİLERDE TRANSFORMASYON	29
4.1. Kompetan Hücre	29
4.2. Griffith'in Transformasyon Deneyi	30
4.3. Isı ile Şoklama Yöntemi	31
4.4. Elektroporasyon Yöntemi	31
4.5. Bakteriyel Transformasyon Protokolü	32
BÖLÜM 5: NÜKLEİK ASİTLERİN HİBRİDİZASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER	33
5.1. Nükleik Asitlerin Hibridizasyonu	33
5.2. Problar	33
5.3. In Situ Hibridizasyon (ISH) Yöntemi	34
5.3.1. In Situ Hibridizasyon (ISH) Yönteminin İşleyişi	34
5.3.2. In Situ Hibridizasyon (ISH) Yöntemi Protokolü	35
5.4. Southern Blot Hibridizasyon Yöntemi	37
5.4.1. Southern Blot Hibridizasyon Yöntemi Aşamaları	37
5.4.2. Southern Blot Hibridizasyon Yöntemi Protokolü	39

5.5. Northern Blot Hibridizasyon Yöntemi.....	40
5.5.1. Northern Blot Hibridizasyon Yöntemi Protokolü	41
5.6. Dot Blot Hibridizasyon Yöntemi	42
5.6.1. Dot Blot Hibridizasyon Yöntemi Protokolü.....	42
5.7. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.....	43
5.7.1. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yönteminin Kullanım Alanları.....	45
5.7.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi Protokolü	45

BÖLÜM 6: PROTEİNLERDE BAZI ELEKTROFOREZ

UYGULAMALARI.....	47
6.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi.....	47
6.1.1. İzoelektrik Odaklama (IEF)	47
6.1.2. Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	48
6.1.3. İki Boyutlu Jel Elektroforezi Protokolü	48
6.2. Native (Doğal) Jel Elektroforezi	49
6.2.1. Native (Doğal) Jel Elektroforezi Protokolü.....	49

BÖLÜM 7: PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASINDA

KULLANILAN TEMEL KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER.....	51
7.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	51
7.1.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Protokolü	52
7.2. Jel Filtrasyon Kromatografisi	52
7.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografisi Protokolü	53
7.3. Afinite Kromatografisi.....	53
7.3.1. Afinite Kromatografisi Protokolü	54
7.4. İyon Değişim Kromatografisi.....	54
7.4.1. İyon Değişim Kromatografisi Protokolü	55
7.5. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi.....	55
7.5.1. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Protokolü	55

BÖLÜM 8: PROTEİNLERİN TAYİN EDİLMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	57
8.1. Proteinlerin Tayin Edilmesinde Kullanılan Bazı Yöntemler	57
8.1.1. Lowry Yöntemi	57
8.1.1.1. Lowry Yöntemi Protokolü	57
8.1.2. Biüret Yöntemi	58
8.1.2.1. Biüret Yöntemi Protokolü	58
8.1.3. Bradford Yöntemi	58
8.1.3.1. Bradford Yöntemi Protokolü	59
8.1.4. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi.....	59
8.1.4.1. Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi Protokolü	59
8.1.5. Warburg-Christian Yöntemi ve İşleyişi.....	60
BÖLÜM 9: DİYALİZ YÖNTEMİ	61
9.1. Diyaliz Yöntemi Protokolü.....	61
BÖLÜM 10: ULTRAFİLTRASYON YÖNTEMİ ÇALIŞMA PRENSİBİ	63
BÖLÜM 11: TUZ İLE ÇÖKTÜRME YÖNTEMİ ÇALIŞMA PRENSİBİ	65
BÖLÜM 12: PROTEİNLERİN SAPTANMASINDA WESTERN BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ	67
12.1. Western Blot Hibridizasyon Yöntemi Aşamaları.....	67
12.2. Western Blot Hibridizasyon Yöntemi Protokolü.....	69
BÖLÜM 13: SEROLOJİK TEPKİMELEER	73
13.1. Antijen Tanımı.....	73
13.2. Antikor Tanımı.....	74
13.3. Antijen-Antikor İlişkileri.....	75
13.4. Primer Bağlanma Testleri	76
13.5. Sekonder Bağlanma Testleri	77
13.6. Serolojik Testleri Etkileyebilecek Bazı Etmenler	77
13.7. Serolojik Testlerin Kullanıldığı Bazı Enfeksiyonlar	78
13.8. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) Yöntemi	79
13.8.1. ELISA Yönteminin Komponentleri	80

13.8.2. ELISA Yöntemiyle Antijen Aranması	80
13.8.3. ELISA Yöntemiyle Antikor Aranması	81
13.8.4. Tanısında ELISA Testinden Yararlanılan Bazı Hastalıklar....	82
13.8.5. ELISA Çeşitleri	82
13.8.5.1. Doğrudan ELISA Yöntemi.....	83
13.8.5.2. Dolaylı ELISA Yöntemi.....	84
13.8.5.3. Rekabetçi ELISA Yöntemi.....	86
13.8.5.4. Sandwich ELISA Yöntemi	88
13.9. Radyoimmün Test (RIA)	89
13.9.1. Radyoimmün Test (RIA) Yönteminin Çalışma İlkesi	90
13.9.2. Kompetisyon Mekanizmasına Dayalı Yöntemin Genel Prensibi	90
13.9.3. Sandwich Yönteminin Genel Prensibi	91
13.10. ELISA ve RIA Yöntemleri Arasındaki Temel Farklar.....	92
13.11. İmmünfloresan Test	92
13.11.1. Doğrudan (Birincil) İmmünfloresan Testi.....	93
13.11.1.1. Doğrudan (Birincil) İmmünfloresan Test Yönteminin İşleyişi	93
13.11.2. Dolaylı (İkincil) İmmünfloresan Testi	93
13.11.2.1. Dolaylı (İkincil) İmmünfloresan Test Yönteminin İşleyişi	94
13.12. Aglütinasyon Testi	94
13.12.1. Bazı Aglütinasyon Yöntemleri	95
13.12.1.1. Lam Aglütinasyon Testi.....	95
13.12.1.2. Tüp Aglütinasyon Testi	95
13.12.1.3. Hemaglütinasyon (HA) Testi.....	95
13.12.1.4. Hemaglütinasyon İnhibisyon (HI) Testi	97
13.13. Presipitasyon Testi	97
13.13.1. Tüpte Presipitasyon Yöntemi	98
13.13.2. Agar Jel İmmünodifüzyon Yöntemi	98
13.13.2.1. Mancini Yöntemi (Tek Yönlü Difüzyon).....	99
13.13.2.2. Ouchterlony Yöntemi (Çift Yönlü Difüzyon).....	99

13.14. Nötralizasyon Testi	100
13.14.1. Nötralizasyon Testinin Kullanım Alanları	101
13.15. Flokülasyon Testi	101
13.15.1. VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) Testi	102
13.15.2. RPR (Rapid Plasma Reagin) Testi.....	102
13.16. Kompleman Fiksasyon Testi	102
BÖLÜM 14: FLOW SİTOMETRİ YÖNTEMİ	105
14.1. Flow Sitometrinin Temel Komponentleri.....	105
14.2. Flow Sitometri Çalışma Prensibi.....	106
14.3. Flow Sitometri Kullanım Alanları.....	107
14.4. Tespitinde Flow Sitometri Yönteminden Faydalanılan Bazı İmmünolojik Hastalıklar.....	107
14.5. İmmünofenotipleme	108
BÖLÜM 15: BAZI MİKROSKOP ÇEŞİTLERİ.....	109
15.1. Konfokal Mikroskopu	109
15.1.1. Konfokal Mikroskopunun Temel İlkesi.....	109
15.1.2. Konfokal Mikroskopunun Bazı Kullanım Alanları	110
15.2. Floresan Mikroskopu	110
15.2.1. Floresan Mikroskopunun Temel Bileşenleri	111
15.2.2. Floresan Mikroskopunun Çalışma Prensibi	111
15.2.3. Floresan Mikroskopunun Bazı Avantajları	111
15.2.4. Floresan Mikroskopunun Bazı Kullanım Alanları	112
15.3. Elektron Mikroskopu	112
15.3.1. Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM).....	113
15.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	113
15.3.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopunun Bazı Kullanım Alanları	113
15.3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Çalışma Prensibi	114
BÖLÜM 16: SİTOTOKSİSİTE TESTLERİ	115
16.1. Apoptoz Olayı	116

16.2. Nekroz Olayı	118
16.2.1. Nekroz Tipleri	118
16.2.1.1. Koagülasyon Nekrozu	118
16.2.1.2. Kazeifikasyon Nekrozu	118
16.2.1.3. Likefaksiyon Nekrozu	118
16.2.1.4. Yağ Nekrozu	119
16.2.1.5. Zenker Nekrozu.....	119
16.2.1.6. Fibrinoid Nekrozu	119
16.3. Apoptoz ve Nekroz Arasındaki Bazı Farklılıklar	120
16.4. Otofaji.....	120
16.5. <i>In Vitro</i> Sitotoksosite Testlerinin Bazı Avantajları ve Dezavantajları	121
16.6. Sitotoksitenin Tespit Edilmesinde Tercih Edilen Bazı Yöntemler.....	122
16.6.1. Kolorimetrik Yöntemler	122
16.6.1.1. MTT Testi	123
16.6.1.1.1. MTT Testi Protokolü	123
16.6.1.2. XTT Testi.....	124
16.6.1.2.1. XTT Testi Protokolü.....	125
16.6.1.3. MTS Testi	125
16.6.1.3.1. MTS Testi Protokolü.....	126
16.6.1.4. Nötral Kırmızı Alımı (NRU) Testi.....	126
16.6.1.5. WST-1 Testi	127
16.6.1.5.1. WST-1 Testi Protokolü	127
16.6.1.6. WST-8 Testi	128
16.6.1.7. Sulforhodamin B (SRB) Testi.....	128
16.6.1.8. Kristal Viyole Testi.....	129
16.6.1.9. LDH Testi	129
16.6.2. Florometrik Yöntemler	130
16.6.2.1. Alamar Blue Testi.....	130
16.6.2.1.1. Alamar Blue Testi Protokolü.....	131

16.6.2.2. CFDA-AM Testi	131
16.6.3. Luminometrik Yöntemler	132
16.6.3.1. ATP Yöntemi	132
16.6.3.2. Gerçek Zamanlı Canlılık Testi	133
16.6.4. Boyama Yöntemleri	133
16.6.4.1. Tripan Mavisini ile Boyama Yöntemi	133
16.6.4.2. Eritrosin B Boya Dışlama Testi	134
16.6.4.3. Kongo Kırmızısı ile Boyama Yöntemi	134
16.6.4.4. Eozin ile Boyama Yöntemi	135
BÖLÜM 17: MONOKLONAL ANTİKORLAR VE HİBRİDOMA	
TEKNOLOJİSİ	137
17.1. Monoklonal Antikor (mAb) Üretiminin Basamakları	137
17.2. Monoklonal Antikor (mAb) Kullanım Alanları	138
KAYNAKÇA	141