

GENETİK ANABİLİM DALI

LABORATUVAR ANALİZ METODLARI VE REFERANSLARI

1. *Kandan DNA izolasyonu – Fenol-kloroform yöntemi*

Öncelikle 1,5'lik eppendorf tüpe 750 µl periferik kan konulacak ve üzerine 750 µL TE buffer ilave edilip 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde TE buffer eklenerek vorteks yardımıyla iyice homojenize edilir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmak suretiyle renk açılana kadar devam edilir son yıkamadan sonra üst faz uzaklaştırılır. Pellet üzerine 80 µL SDS, 90 µL 1M NaCl ve 30 µL Proteinaz K ilave edilir. Son hacim TE buffer konularak 500 µl'ye tamamlanır ve örnek 56°C'de 12 saat çalkalamalı inkübatörde bırakılır. İnkübasyonu takiben örnek üzerine 500 µL fenol-kloroform konulup ve 500 rpm de 2 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan DNA içeren kısım yeni tüpe aktarılır. Çökmesi için saf etil alkol, 1,5 ml'ye tamamlanacak şekilde ilave edilir (DNA gözleninceye kadar alt üst edilmesi gerekmektedir). DNA santrifüj edilip çöktürüldükten sonra alkol tamamen uzaklaştırılarak 500 µL %70'lik etil alkol ilave edilerek vortekslenir. 12000 rpm de 1 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp santrifüj edilerek DNA çöktürülür ve alkol uzaklaştırılarak tamamen kuruma sağlanır. 500 µL 10 mM Tris tamponunda 60°C'de 1 saat bekletilerek DNA izolasyonu tamamlanır.

REFERANSLAR

[1] Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells Using Formamide. Cold Spring Harbor Protocols.

2. *Kandan izolasyon kitleri yardımıyla DNA izolasyonu*

Ticari olarak kullanıma sunulan DNA izolasyonu kitleri ile yapılacak olan DNA izolasyonunda kullanılacak olan kite ait talimatlar kullanılacaktır.

3. *Farklı hayvansal dokulardan DNA izolasyonu*

100 mg doku üzerine 1 ml parçalama tamponu eklenerek motor gücüyle çalışan pistonlu homojenizatör ile doku parçalanır. Homojenize edilen örnek kullanılarak kandan DNA izolasyonu yöntemi olan fenol-kloroform yöntemi prosedürü uygulanır.

REFERANSLAR

[1] Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells Using Formamide. Cold Spring Harbor Protocols.

4. *RNA izolasyonu*

100 mg doku üzerine 1 ml parçalama tamponu eklenerek el veya motor gücüyle çalışan pistonlu homojenizatör ile doku parçalanır. Homojenat 5 ml polipropilen tüpe aktarılır ve 0,1 ml 2M sodyum asetat eklenerek karıştırılır. 1 ml fenol eklenir karıştırılır ve

0,2 ml kloroform eklenerek 15 dk 4°C'de bekletilir. 10000 g'de 20 dk 4°C'de santrifüjleme yapılır. Üst sıvı yeni tüpe aktarılır. 1 ml isopropanol eklendikten sonra 30 dk -2°C'de bekletilir. 10 dk 10000 g'de 4°C'de santrifüjlenerek RNA çöktürülür. RNA 0,3 ml parçalama tamponu içerisinde çözündürülür. Mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Üzerine 0,3 ml isopropanol eklenerek ve 30 dk -20°C'de bekletildikten sonra 10 dk 10000 g'de 4°C'de santrifüjlenerek çöktürülür. RNA % 75'lik etanolde süspansiyon haline getirilir. Tüp karıştırıcı ile karıştırılır. 10-15 dk oda sıcaklığında bekletilir. 10000 G'de 5 dk santrifüjlenir. RNA çökeltisi vakumda kurutulur. 100-200 ml DEPC'li suda çözündürüldükten sonra -70°C'de saklanır.

REFERANSLAR

[1] Temizkan, G and Arda, N (2008). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel yayıncılık.

5. *Spektrofotometre ile ölçüm yapılması*

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. Buna göre aşağıdaki formül kullanılmaktadır.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırma oranı} \times 50$$

REFERANSLAR

[1] Temizkan, G and Arda, N (2008). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel yayıncılık.

6. *Agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme yapılması*

DNA'nın elektroforetik analizinin temeli bu molekülün elektriksel bir alanda, jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu amaçla, agaroz konsantrasyonu % 0,5-1,5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece, küçük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanabilir. Kullanılacak yöntem:

a) Kullanılacak jelin büyüklüğüne göre tartılan agaroz TBE tampon içerisinde kaynatma yolu ile (mikrodalgada) çözündürülür.

b) =0,5 µg/ml etidyum bromür ilave edilir.

c) Kenraları kapatılmış özel elektroforez tankları üzerine sızıntı olmamasına dikkat edilerek dökülür.

d) Cepleri oluşturacak tarak yerleştirilerek donması beklenir.

e) Tarak dikkatlice uzaklaştırılarak örnekler yüklenir.

f) Elektrik kaynağı yardımıyla 80-100 V elektrik akımında yürüme sağlanır.

e) Jel dökümentasyon sistemi kullanılarak sonuçlar değerlendirilir.

REFERANSLAR

[1] Temizkan, G and Arda, N (2008). Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel yayıncılık.

7. *Poliakrilamid jel elektroforezi ile görüntüleme yapılması*

Proteinlerin ve nükleik asitlerin ayırımında kullanılan ve oldukça güçlü bir jel olan poliakrilamid jel; akrilamidin polimerizasyonu sonucunda oluşmuştur. Bu jel, küçük ya da orta boyuttaki nükleik asit ve proteinler için uygundur. Agaroz jele kıyasla DNA'nın daha saf olarak yeniden elde edilebilmesi, poliakrilamid jelin avantajlarından bir diğeridir. Agaroz jelde olduğu gibi poliakrilamid jelde de; jel konsantrasyonu ile nükleik asitlerin moleküler ağırlıkları ters ilişkilidir. Poliakrilamid jelin hazırlanmasında, aralarında ayıraç (spacer) olan 2 adet cam plaka ile örneklerin koyulması için kuyucuk oluşturmada kullanılan taraktan yararlanılmaktadır. Jel kasetleri 2 tampon deposu arasına yerleştirilerek oluşan kuyucuklara PCR ya da DNA örnekleri yüklendikten sonra uygun voltaj verilmektedir. Elektroforez işlemi sonunda poliakrilamid jel cam kasetler arasından çıkartılarak boyama işlemine tabi olmaktadır.

REFERANSLAR

[1] BARRIL P, NATES S. Introduction to Agarose and Polyacrylamide Gel Electrophoresis Matrices with Respect to Their Detection Sensitivities. Editor: MAGDELDIN S. Gel Electrophoresis - Principles and Basics, 1. edition, Intech, sayfa 3-14, 2012.

8. *Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)*

PCR işlemi için başlangıç materyali oluşturacak olan temel baz dizilimini oluşturan genetik materyal olarak tanımlanmaktadır. Kalıp DNA'yı oluşturacak olan bölge tek ya da çift zincir şeklinde reaksiyona katılabilir. Hedef bölge RNA'dan seçilecekse öncelikle reverse transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA'ya (RNA komplementer DNA) çevrilerek kalıp olarak kullanılmalıdır. Kalıp DNA üzerindeki hedef dizinlerin konsantrasyonu reaksiyonun durumuna göre değişmektedir. Kalıp olarak seçilecek olan bölgenin fonksiyonel olması gerekmektedir. DNA polimeraz enzimleri, kalıp DNA'ya tamamlayıcı ipliği meydana getirmek üzere dört çeşit deoksiribonükleotid trifosattan polinükleotid zincirinin oluşmasını sağlayan reaksiyonu katalize ederler. Kalıp DNA'dan tamamlayıcı ipliğin sentezinin gerçekleşmesi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP olarak bilinen dört tip deoksiribonükleozid karışımına ihtiyaç vardır. Sentezlenecek hedef DNA'nın uzunluğu, sayısı, döngünün kaç kez tekrarlanacağı dNTPs miktarı ile yakından ilgili olduğu için uygun konsantrasyonların seçimi önemlidir. 10 mM Tris (pH: 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, jelatin, %0,01 NP40 ve Tween 20' dir. MgCl₂ konsantrasyonu denatürasyon, primerlerin bağlanması, enzim aktivitesi ve primer-dimer yapısı üzerine etkileri bulunmaktadır. PCR işlemi, denatürasyon, bağlanma ve uzamadan oluşan üç temel basamaktan meydana gelir. Reaksiyonun gerçekleşmesi sıcaklık, döngü ve zaman değerlerinin spesifik olarak ayarlanabildiği Thermal Cycler adı verilen cihazlarda meydana gelir. DNA sekanslarının tek iplikçikli hale geldiği basamak olan denatürasyon için kullanılan sıcaklık değerleri 92-95 0C arasında değişmektedir. Reaksiyon yaklaşık 3-5 dakika sürmektedir. Denatürasyonu takiben tek iplikçikli hale dönüşen DNA

parçalarının her birinin 3'-uçlarındaki (terminus) nükleotidlere primerlerin bağlanması uygun sıcaklık sağlanarak bu aşamada gerçekleşir. Bu işleme primer annealing adı verilmektedir. Bu aşamada sıcaklık 50-60 0C düzeyindedir. Reaksiyon yaklaşık 2-5 dakika sürmektedir. Annealing sıcaklığının hesaplanmasında oligonükleotid dizisindeki bazların sayısı temel alınmaktadır. Bu amaçla yaygın olarak (Adenin + Timin sayısı) x 2 + (Guanin + Sitozin sayısı) x 4 formülünden yararlanılmaktadır. Uzama basamağında Taq DNA polimeraz enziminin optimum sıcaklık değeri olan 720C kullanılmaktadır. Bu aşama ortamdaki tek iplikçikli DNA'dan tekrar çift iplikçiklerin in vitro koşullarda sentezlendiği aşamadır. Polimerizasyon işlemi 5' ucundan 3' ucuna doğru gerçekleşmektedir. Aşama süresi yaklaşık 5-15 dakika olarak uygulanmaktadır.

REFERANSLAR

- [1] GIBBS RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. Analytical Chemistry, 62 (13): 1202-1214, 1990.
- [2] ERLICH HA, ARNHEIM N. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. Annual Review of Genetics, 26 (1): 479-506, 1992.
- [3] ERLICH HA, GELFAND D, SNINSKY JJ. Recent advances in the polymerase chain reaction. Science, 252 (5013): 1643-1651, 1991.
- [4] TÜRKİYILMAZ S, ESENDAL M. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 8 (1): 71-76, 2002.

9. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi

Restriksiyon parçacık uzunluğu polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphisms: RFLP), bilinen mutasyonların saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. Restriksiyon enzim kesimleri ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar RFLP olarak adlandırılır. DNA'nın restriksiyon enzimlerinden bir veya birkaçı ile kesilmesi işleminin ardından ortaya çıkan parçacıklar, jel elektroforez yöntemi kullanılarak görüntülenebilmektedir. Bu amaçla uygun restriksiyon enzimi seçilerek bilinen mutasyon veya polimorfizmlerin analizi gerçekleştirilir. Analizde enzim için spesifik olan inkübasyon koşulları kullanılır. . DNA'nın restriksiyon enzimlerinden bir veya birkaçı ile kesilmesi işleminin ardından ortaya çıkan parçacıklar, jel elektroforez yöntemi kullanılarak görüntülenebilmektedir.

REFERANSLAR

- [1] VIGNAL A, MILAN D, SANCRISTOBAL M, EGGEN A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics Selection Evolution, 34 (3): 275-306, 2002.
- [2] BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, DAVIS RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32 (3): 314-331, 1980.

10. Real Time PCR

Öncelikle primerlere yanında gelen kullanım kılavuzlarında yazan 100µM için gerekli su miktarı eklenerek 100 µM'a (yani 100pmol/ µl'ye) sulandırılır. Sonra her parametre için aşağıda tek tek belirtilen ara stoklar oluşturularak çalışılır. Probe'lar için yine kullanım kılavuzunda belirtilen 20µM için gerekli su miktarı eklenerek 20 µM'a (yani 20pmol/ µl'ye) sulandırılır. Ardından 20 µM'lık ana stoktan 4uL alınıp üzerine 16ul su eklenerek 4 µM'lık ara stoklar oluşturulur. (Tüm parametreler için aynı şekilde hazırlanır). F ve R yazan primerler kullanılır. F primerden 10 µM (100µM'lık ana stoktan 10ul alınıp üzerine 90ul su eklenerek), R primerden 4 µM (100µM'lık ana stoktan 4ul alınıp üzerine 96ul su eklenerek) ara stok oluşturulur. Problar için 4 µM ara stok hazırlanır ve aşağıda yer alan tablodaki gibi reaksiyon hazırlanarak çalışılır. Data analizi, Tm Calling modunda yapılır. Her olgunun Tm farkı olup olmadığına bakılır. Buna bağlı olarak SNP analizi gerçekleştirilir.

Denaturasyon		Amplifikasyon				Melting curve			Cooling
Parametre									
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu				Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	60				1			1
Hedef [°C]	95	95	60	50	72	95	32	80	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:05	00:00:10	00:00:10	00:00:10	00:00:20	00:00:20	00:00:00	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20	20	20	20	20	0.2	20
Acquisition Mode	yok	yok	yok	single	yok	yok	yok	Continuous	yok

REFERANSLAR

[1] Schmittgen, TD., Livak, KJ. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. Nature protocols, 3: 1101–1108.

11. Et numunelerinden kolorimetre ile renk tayini

Renk tayini için etin yağsız bölümünden alınmış olan örnekler kullanılır. Et rengi, etin içermekte olduğu pigmentlerin belirli dalga boyundaki ışığı absorbe etmesi ve yansıtmasından kaynaklanmaktadır. Et rengi ölçümü için L*, a*, b* koordinat sistemi ile

ölçüm yapan spektrokolorimetre kullanılır. Bu sistemde üç temel renk parametresi (L*= parlaklık, a*= kırmızı renk indeksi, b*= sarı renk indeksi) rakamsal olarak belirlenmektedir. Işık kaynağı olarak D65 seçilir. Ölçüm öncesinde standart beyaz plakaya göre cihazın kalibrasyonu yapılır. Cihaz her komutta 3 ölçüm yapmaya ve bunların ortalamasını almaya ayarlanır. Elde edilen verilere göre L*, a* ve b* değerleri kullanılarak et renginin sayısal olarak değerlendirilmesi sağlanır.

REFERANSLAR

- [1] Konica Minolta Spektrokolorimeter Manual
[2] Ekiz, B., Yılmaz, A., Ozcan, M., Kaptan, C., Hanoglu, H., Erdogan, I., and Yalcintan, H.: Carcass measurements and meat quality of Turkish Merino, Ramlic, Kivircik, Chios and Imroz lambs raised under an intensive production system, Meat. Sci., 82, 64– 70, 2009

12. Talep edilen hücrelerin kültüre edilmesi/üretilmesi

Talep edilen hücreler için; doku veya ticari olarak temin edilebilecek hücre hatları kullanılmaktadır. Her hücrenin, kendine özgü üreme şartları doğrultusunda çoğalması sağlanmaktadır. Bu amaçla genel olarak; fetal sığır serum (FBS) (yüzde oranla), L-glutamin (mM ölçüsüyle), penisilin (IU/ml ölçüsüyle) ve streptomisin (mg/ml ölçüsüyle) içeren DMEM/RPMI1640/MEM/IMDM/Opti-MEM medium/DMEM/F-12 gibi hücre kültür ortamları ile kültür ortamı ile kültüre edilmektedir. Hücrelerden yeterli üreme (yeterli sayı) elde edilinceye kadar 37°C, % 95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmektedir. Hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri inverted mikroskop ile izlenmektedir. Çalışmanın amacına uygun olarak hücre hattının subkültürü yapılmaktadır. Talep üzerine çoğaltılan ve arzu edilen yoğunluğa ulaşan hücreler dondurulmakta; ve alınana kadar -86°C'de saklanmaktadır.

REFERANSLAR

- [1] Freshney R.I., 1986. "Animal cell culture: A practical approach", *Oxford: IRL Press Limited.*, New York.
[2] Freshney, R.I., 1994. "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 3rd edition, *Alan R. Liss, Inc.*, New York.
[3] Davis, J.M., 1996. "Basic Cell Culture. A Practical Approach", *Oxford University Press INC.*, New York.
[4] Phelan, M.C., 2007. "Basic techniques in mammalian cell tissue culture", *Curr Protoc Cell Biol.*, Chapter 1:Unit 1.1.

13. Periferik Kandan Kromozom Analizi

Analiz için aşağıda yer alan prosedür kullanılır.

a)Besiyeri:

50 cc RPMI-1640
10 cc fetal bovine serum (heat inactivated)
1 cc L-glu
0,5 cc pen-str

b) Ekim:

5 cc RPMI-1640 besiyerine, 10 damla kan (lithium heparinli (yeşil kapaklı tüpler) alınmış tüplere), 4 damla PHA eklenir.

c) Colcemid:

71. saatte 3 damla colcemid eklenir ve 2 saat beklenir (37°C) santrifüj edilir süpernatant atılır pellet üzerine hipotonik konur 45 dakika 37°C'de beklenir. santrifüj edilir süpernatant atılır pellet üzerine (3/1 glasiyal asetik asit, metanol) fixatif konur 1 gece 4°C'de beklenir. Ertesi gün iki kez fixatif ile yıkayıp preparat haline getirilir. GTG bantlama ile kromozomlar boyanarak değerlendirilir.

REFERANSLAR

[1] Holmquist, GP. (1992). Chromosome bands, their chromatin flavors, and their functional features. American journal of human genetics, 51: 17-37.

14. Hücre kültüründe XTT sitotoksitesite testi

- Hücreler, 96 kuyucuklu plate'e ekilecek ve 37°C'de CO₂'li etüvde 24 saat boyunca inkübe edilir.
- 24 saat sonra proliferen olan hücreler, standart koşullarda kemoterapötik ajanlar ile 24, 48, 72 saat boyunca inkübe edilir.
- 24, 48 ve 72 saatlik tedavi süresi sonunda, XTT reaksiyon solüsyonu (1 mikropilaka için: 5 ml XTT reaktifi + 100 µl aktivasyon solüsyonu) hazırlanır.
- 96 kuyucuklu plate'in tüm kuyucuklarındaki besiyeri aspiratör cihazı kullanılarak aspire edilir. Böylece, kemoterapötik ajanları içeren besiyeri ortamdant uzaklaştırılır.
- 96 kuyucuklu plate'in her kuyucuğuna 100 µl besiyeri (L-Glutamin, Penisilin-Streptomisin ve FBS içeren) eklenir.
- Ardından, her kuyucuğa 50 µl XTT reaksiyon solüsyonu eklenir ve plate çok yavaşça ve nazıkçe sallanarak solüsyonun kuyucuklardaki besiyeri ile karışması sağlanır.
- Ardından, plate 37°C'deki CO₂'li etüvde 4 saat boyunca inkübe edilir.
- İnkübasyon süresi sonunda, her kuyucuğun absorbansı mikropilaka okuyucu kullanılarak 655 nm referans 450 nm background dalga boyu aralıklarında ölçülür.
- Okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlenir.

REFERANS

[1] Scudiere, D. A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R., 1988. " Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines", *Cancer Research* 48(17), 4827-4833.

[2] Neofroxx. <http://www.neofroxx.com/> (Cell Proliferation XTT Kit) Erişim tarihi: 15 Şubat 2018.

15. Hücre kültüründe MTT sitotoksosite testi

- Kullanılması talep edilen ilaçlarla 24, 48 ve 72 saatlik muamele sonrasında, 96 kuyucuklu mikrolakanın her bir kuyucuğuna 20 µl MTT boyası karanlık ortamda ve pipetaj yapılmadan eklenir.
- MTT (5 mg/ml) eklendikten sonra, hücreler 37°C'de 4 saat süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılır.
- 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda oluşan formazan kristallerini çözünür hale getirmek için bütün kuyucukların üzerine 100 µl SDS (%10 (w/v)'luk) solüsyonunu eklenir; SDS eklenirken pipetaj yapılır.
- Ardından hücreler, gece boyunca (16-18 saat boyunca) 37°C' de %5 CO₂'li etüvde ve karanlıkta inkübe edilir.
- İnkübasyon süresi sonunda hücrelerde oluşan renk şiddeti spektrofotometrede 570/595 nm dalga boyunda ölçülerek ve okunan absorbanslar kullanılarak hücrelerin canlılık oranları belirlenir.
- MTT solüsyonu hazırlanırken final konsantrasyonu, 5 mg/ml olacak şekilde hazırlanır. Bu amaçla; 500 mg MTT ile 50ml 1X PBS (10 ml 10X PBS+90 ml steril distile su) homojen bir şekilde karıştırılarak hedeflenen konsantrasyon elde edilir.

REFERANS

[1] Mosmann, T., 1983. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

[2] Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/> (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) Erişim tarihi: 15 Şubat 2018.

16. Hücre kültüründe Sulforhadamine B (SRB) sitotoksosite testi

- Hücreler, 96 kuyulu plate'e 200 µl medium içinde 5000h/kuyu olacak şekilde ekilir. (MDA-MB-231 için belirlenen optimum hücre sayısıdır.) Kör kullanılacak kuyulara 200 µl medium eklenir.
- Tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya %50'lik TCA'dan 50 µl eklenir ve +4°C'de en az 1 saat fikse edilir.
- Fiksasyon süresi sonunda TCA plate'den uzaklaştırılır (Plate ters çevrilerek dökülür).
- TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez, deiyonize su ile yıkanır. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek dökülür (Deiyonize su doğrudan her kuyuların üzerine dökülerek yıkama işlemi gerçekleştirilir).
- Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50 µl eklenir ve 30 dk oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilir.
- İnkübasyon süresi sonunda SRB plate'den dökülerek uzaklaştırılır.

- Bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyular, 5 kez %1'lik asetik asit ile yıkanır. Her yıkamanın sonunda plate ters çevrilerek doklr.
- Yıkama sonunda plate kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulur.
- Proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için, 10mM tris bazı (150 μl/kuyu) eklenir.
- Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için, plate en az 10 dk. Shakerda inkübe edilir.
- Optik dansite ELISA reader'da 564 nm'de okunur.

Kimyasalların Hesaplanması:

- %10 (w/v) TCA (Trikloroasetik asit) (+4°C'de saklanabilir).
(10 gram TCA + 100 ml steril dH₂O)-----%10 'luk için*****
*****%50'lik için 50 gr TCA + 100 ml z.
- %1 asetik asit
(1 ml asetik asit + 99 ml steril dH₂O)
- %0.4 (w/v) SRB (sulforhodamine B). %1'lik asetik asit içinde hazırlanır. +4°C'de ışıktan koruyarak saklayınız.
(400 mg SRB + 100 ml %1'lik asetik asit)
- 10 mM tamponlanmamış tris bazı. (pH: 10.0)
(121 mg tris bazı + 100 ml steril dH₂O)
- Deiyonize su

REFERANS

- [1] Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening", *J. Natl. Cancer. Inst.*, 82(13), 1107.
- [2] Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/> (Sulforhodamine B sodium salt)
Erişim tarihi: 15 şubat 2018.

17. cDNA eldesi

- cDNA sentezinde, her örnek için elde edilen RNA ve RNase-free su karışımından 11 μl'ye kadar konulur (maksimum 4000ng) ve 2 μl Random hexamer primer (vial 6) eklenir (**Tablo 1**).

RNA rneđi	11 μl
Random hexamer primer (vial 6)	2 μl
TOPLAM*	13 μL
*Belirtilen miktar tek örnek içindir.	

Tablo 1. Her bir örnek için hazırlanacak karışım

- Hazırlanan tüpler thermalcycler'a yerleştirilir ve RNA'ların denature olması için 65°C 'de 10 dk bekletilir.
- Tek reaksiyon için aşağıdaki master mix hazırlanır; bu miktar örnek sayısı ile çarpılarak arttırılır (**Tablo 2**).

Tablo 2. Master mix hazırlanışı

Master mix	
Reaction Buffer (vial 2)	4 µl
Protector RNase Inhibitor (vial 3)	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix (vial 4)	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1)	0,5 µl
TOPLAM*	7 µl
<i>*Belirtilen miktar tek örnek içindir.</i>	

- Thermalcycler 'dan alınan örnekler soğutma kabına yerleştirilir.
- Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtılmakta ve pipetle 3-4 kez karıştırılır.
- Ardından tüpler thermalcycler'a yerleştirilir. Program uygun prosedüre göre çalıştırılır.

REFERANS

[1] Roche Applied Science. <https://www.roche-applied-science.com/> (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit) Erişim tarihi:15 Şubat 2018.

18. Hücre kültüründe RT-PCR ile gen ekspresyon analizi

- Öncelikle ekspresyonu analizi hedeflenen genler için primer dizayn edilir. Primer dizaynı için hedef genler ve housekeeping gen olarak ActB gen bölgeleri NCBI ve Ensemble Gen bankaları kullanılarak belirlenir. Bu iki fragmentin cDNA sekansları, aynı zamanda normal bölgeleri kullanılarak da primer ve probe dizayn yapılmaktadır. Primer probe dizaynı ClustalW align Programı ve Oligo7 Software kullanılarak yapılmaktadır. Elde edilen primer ve probe'ların blast programı ile spesifikasyonu kontrol edilmektedir. Referans gen olarak Beta Actin kullanılmaktadır. Bu genin primeri de aynı prosedürle dizayn edilmektedir.
- Primerler ve prob'lar için optimizasyonda; hedef genler için dizayn edilen primerler üretici firmanın hazırladığı prosedür kapsamında; 100 µM (yani 100pmol/µl'ye) konsantrasyon elde etmek üzere gerekli miktardaki distile su ile sulandırılır.

- Sonrasında her parametre için ara stoklar oluşturulur. Primer ara stokları hazırlanırken; 100 µM'lık ana stoktan 20 µl alınıp üzerine 80 µl distile su eklenir; böylelikle Forward ve Reverse primer için 20 µM ara stok elde edilir (Ara stoklar hazırlanırken $M1*V1=M2*V2$ klasik formülü kullanılmaktadır.).
- Hedeflenen genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi için real-time PCR: SYBR green metodu kullanılır. Bu kapsamda öncelikle tabloda (Tablo 3) verilen PCR karışımı hazırlanır.

Tablo 3. PCR Reaksiyonu için hazırlanacak karışım

Bileşenler	Konsantrasyon*	Hacim*
Forward Primer (F) (ara stok 20 µM)	0,4 µM	0,4 µl
Reverse Primer (R) (ara stok 20 µM)	0,4 µM	0,4 µl
Su, PCR-grade (FastStart ile birlikte sağlanacaktır.)	-	7,2 µl
Enzim Karışımı (2x)	x	10 µl
TOPLAM		18 µl
<i>*Tek reaksiyon için gerekli konsantrasyon/hacim</i>		

- Tek bir reaksiyon/örnek için yukarıda belirtilen miktardaki bileşenler; çalışılır ve reaksiyon/örnek sayısı kadar çoğaltılır.
- Ardından bu karışım platelere 18 µl hacminde dağıtılır.
- Hazırlanan plâtelere (karışım ilave edildikten sonra) homojen hale gelmesi için santrifüj edilir.
- PCR karışımının dağıtıldığı her bir kuyuya (örnek/kontrol), çalışılacak örnek ya da kontrol grubundan 2 µl ilave edilerek son hacim 20 µl olacak şekilde final konsantrasyonu elde edilir.
- Hazırlanan reaksiyon karışımı Real-time PCR cihazında Tablo 4'teki prosedüre göre mplifiye edilir.

Tablo 4. RT-PCR protokolü.

Denaturasyon	Amplifikasyon				Melting curve			Cooling
Parametre								
Analiz modu	Yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi modu			Yok
Döngü	1	45			1			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	95	60	95	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:10	00:00:30	00:00:00	00:00:30
Acquisition Mode	yok	yok	yok	single	yok	yok	Continuous	yok

- Elde edilen sonuçlardan relatif kantitasyon/ölçüm yapılabilmesi için Δ/Δ Ct metodu kullanılmaktadır. Bu metod ile hedef genlerin ct değerleri ACTB ile normalize edilmektedir. (Değer; Δ Ct olarak geçmektedir.). Bu değer gruplar arasında oranlanarak elde edilen sonuçlardan Δ/Δ Ct değeri elde edilerek ve çıkan sonuçlar analizi yapılmaktadır.

REFERANSLAR

- [1] Blackburn, P., 1979. "Ribonuclease inhibitor from human placenta: rapid purification and assay", *J. Biol. Chem.*, 254, 12484.
- [2] Sambrook, J. Et al., 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd. Edition, *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- [3] Brooke-Powell, E.T. et al., 2004. "Use of Transcriptor Reverse Transcriptase in Microarray Analysis", *Biochemica*, 1, 27-30.
- [4] Ortega, X. Et al., 2005. "Reconstitution of O-Specific Lipopolysaccharide Expression in Burkholderia cenocepacia Strain J2315, Which Is Associated with Transmissible Infections in Patients with Cystic Fibrosis", *J. Bacteriol.*, 187, 1324-33.
- [5] Tanaka, T. Et al., 2004. "Concerted Action of Diacetylchitobiose Deacetylase and Exo- β -D-glucosaminidase in a Novel Chitinolytic Pathway in the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus kodakaraensis KOD1", *J. Biol. Chem.*, 279, 30021-7.
- [6] Wilkie et al., 2005. "Embryonic Poly(A)-Binding Protein Stimulates Translation in Germ Cells", *Mol. Cell. Biol.*, 25, 2060-2071.
- [7] Roche Applied Science. <https://www.roche-applied-science.com/> (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit) Erişim tarihi:15 Şubat 2018.

19. TUNEL(Tünel) immunohistokimyasal analizi

Deney için gerekli solüsyonlar ve ekipmanlar:

- ❖ KCl (Potasyum klorür) : oda sıcaklığında 25cm²'lik falkon içinde saklanıyor.
- ❖ Glasiyel Asetik Asit : oda sıcaklığında depo bölümünde
- ❖ Metanol : oda sıcaklığında depo bölümünde
- ❖ PBS (sıvı, 10X) : oda sıcaklığında hücre kültüründe
- ❖ Distile su : oda sıcaklığında hücre kültüründe
- ❖ Buzlu lam
- ❖ Şale
- ❖ Falkon tüp
- ❖ Plastik damlalık
- ❖ Cam Pastör pipet (steril olmayan)
- ❖ Vorteks
- ❖ 37⁰C'ye ayarlanmış etüv

❖ Santrifüj

Deneye başlamadan önce:

- Taze olarak fiksatif hazırlanmalı ve +4⁰C'de soğutulmalıdır.
- Çalkalamalı inkübatör 37⁰C'ye ayarlanmalıdır (çalkalama olmadan).
- Hipotonik solüsyonu 37⁰C'ye konulur.
- İçerisinde distile su bulunan şale içine lamlar yerleştirilmeli ve +4⁰C'de bekletilmelidir.
- Tüm solüsyonlar hazırlanmalıdır.

Çözeltilerin hazırlanması:

- Hipotonik solüsyonu

1000 mL için	10 mL için
5 gr KCl	0.05 gr KCl
1000 mL distile H ₂ O	10 mL distile H ₂ O
*1-2 hafta kullanılabilir. *Oda sıcaklığında saklanmalıdır.	

- Fiksatif

4 mL için	16 mL için
1 mL glasiyel asetik asit	4 mL glasiyel asetik asit
3 mL metanol	12 mL metanol
*Taze hazırlanmalıdır. *+40C'de saklanmalıdır.	

- PBS (1X)

50 mL için	100 mL için
45 mL distile H ₂ O	90 mL distile H ₂ O
5 mL PBS (10X)	10 mL PBS (10X)

- EDTA'lı tüpte bulunan kan numunesi hafifçe karıştırılarak homojenize edilir ve 0.5 cc (8-10 damla) alınarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarılır.
- Falkon tüp kapağı açık bir şekilde vorteks üzerine alınır.
- 3)Vorteks üzerinde karıştırma yapılırken plastik damlalık ile 4 ml'ye kadar PBS (1X) konulur. PBS hızlıca ilave edilir.
- Falkon tüp tekrar vortekslenir ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılır. Süpernatantın tamamı alınmamalıdır.
- Pellet üzerine vorteks üzerinde hızlıca tekrar 4 ml PBS (1X) eklenir, vortekslenerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılır (yine süpernatantın tamamı alınmamalıdır) ve PBS (1X) ile yıkama işlemi 1 kez daha tekrarlanır.
- Son santrifüjden sonra süpernatant atılır.

- Falkon tüp yine vorteks üzerine alınır ve vorteks üzerinde karıştırma yapılırken plastik damlalık ile 5 ml'ye kadar (kan örneği fazla koyulduysa 8 ml'ye kadar hipotonik solüsyonu eklenebilir) hipotonik solüsyonu (37⁰C'de ısıtılmış) eklenir. Hipotonik solüsyonu hızlıca ilave edilir.
- Hipotonik solüsyonu eklendikten sonra, vorteks yapıp falkon tüp 37⁰C'de 20-30 dakika bekletilir.
- İnkübasyon süresi sonunda, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır ve süpernatant atılır.
- İçerisinde 0,5 cc hipotonik solüsyonu kalacak şekilde süpernatantı atılan örneğe vortex üzerinde damla damla (yavaşça) soğuk 5 ml fiksatif (3:1 oranında metanol:glasiyel asetik asit) eklenir.
- Falkon tüp tekrar vortekslenir ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılır.
- Fiksatif ekleme işlemi toplamda 3 kez olacak şekilde 2 kez daha tekrarlanır.
- Son santrifüjden sonra süpernatant atılır ve pellet 1 ml fiksatif ile süspanse edilerek -20⁰C'de saklanır.
- Hazırlanan örneğin bir kısmı (1-2 damla) lama yayılarak mikroskopta nükleusların durumu kontrol edilir.

REFERANS

[1] Roche Applied Science. <https://www.roche-applied-science.com/> (In Situ Cell Death Detection Kit, POD) Erişim tarihi:15 Şubat 2018.

20. MiRBase, miRwalk, miRTarBase, miRNAmap, miRGator, miRDB, PhenomiR, miRecords ve miRGen gibi veritabanlarında tanımlanmış miRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Öncelikle istenilen miRNA'lar MiRBase, miRwalk, miRTarBase, miRNAmap, miRGator, miRDB, PhenomiR, miRecords ve miRGen gibi veritabanlarında tabanlarında taranarak teyit ve kontrol edilir. Bu veritabanları kullanılarak söz konusu miRNA'ların sekansları belirlenir. miRNA ekspresyon analizi için, ilk olarak ilgili örnekten izole edilen total RNA'dan "cDNA sentez kiti" kullanılarak cDNA (komplementer DNA) sentezi gerçekleştirilir. cDNA sentezi için Tablo 5'te gösterildiği şekilde reaksiyon karışımı hazırlanır.

Tablo 5. cDNA sentezi için kullanılan karışım

Bileşen	Reaksiyon/Miktar
5x Reaksiyon Buffer	2 µl
Nuclease-free Su	4,5 µl

10x Enzim Mix	1 µl
Sentetik RNA	0,5 µl
Total RNA	2 µl
Toplam	10 µl

Reaksiyon karışımını içeren RNase-free ve DNase-free PCR tüpleri, sırasıyla 42⁰C'de 60 dakika ve 95⁰C'de 5 dakika inkübe edilir. İnkübasyon periyotlarından sonra, reaksiyon tüplerinde elde edilen cDNA örnekleri çalışma aşamasına dek -80⁰C'de saklanır.

cDNA sentezini takiben Exilent SYBR Green master mix (Exiqon, California, USA) kullanılarak PCR cihazında planlanan miRNA'ların analizi yapılır. miRNA ekspresyon analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6. miRNA ekspresyon analizi için kullanılan mix

Bileşen (Kit Formatı'na göre)	Reaksiyon/Miktar
2x ExiLENT SYBR [®] Green Master Mix	550 µl
Nuclease-free Su	544,5 µl
Kalıp cDNA	5,5 µl
Toplam	1100 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı, primerlerin bulunduğu mikropate'in her bir kuyucuğuna 10 µl olacak şekilde dağıtılır ve PCR cihazında miRNA ekspresyon analizi yapılır. Yapılan analiz sonucunda elde edilen Δ/Δ Ct sonuçları değerlendirilir. Kontrol ile kıyaslandığında anlamlı derecede up- ya da down-regüle olan (alçalış ya da yükseliş gösteren) miRNA'lar her hücre grubuna göre belirlenir.

REFERANSLAR

[1] Exiqon (now a QIAGEN company). <https://www.exiqon.com/> (Exilent SYBR Green master mix) Erişim tarihi:15 Şubat 2018.

[2] Exiqon (now a QIAGEN company). <https://www.exiqon.com/> (Universal cDNA Syntesis Kit II) Erişim tarihi:15 Şubat 2018.