

# **MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVARI**

---

## **Deneyler**

**Doç. Dr. Haydar KARAKAYA**

**Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü  
2021**



## ***Escherichia coli*'nin Transformasyonu**

1944 yılında Avery, McLoad ve McCharty, pneömokokal bakterilerin IIR nonpatojen tipinin IIS patojen tipe dönüşünden (transformasyon) sorumlu ajanın DNA olduğunu ve bu özelliğin nesiller boyu aktarıldığını gösterdikleri deneylerini yayınladılar. (tipler R ve S farklı antijenik yapıya sahip bakterileri ifade eder ve bu antijenik yapılar iki farklı gen tarafından oluşturulur). Bu araştırmanın tetiklemeyle DNA üzerine daha yoğun çalışmalar yapılmış ve sonunda DNA yapısı Watson ve Crick tarafından açıklanmıştır. İzole edilmiş az miktardaki DNA'nın bakteri hücre duvarını geçerek kromozomun parçası haline gelmesi standart Mendel genetiği ile bağdaşmaz, ancak organizmadan organizmaya tek bir genin aktarılması alıcı organizmanın genotipine müdahaleyi mümkün kılar.

Bu gün çoğu transformasyon sürecinde plazmitler, bakteriyofajlar ve kozmitler (bakteriyofaj ve plazmid DNA'sının integrasyonu ile oluşmuş rekombinant DNA) kullanılır. (Bazı durumlarda, bu DNA tiplerinden herhangi biri için transformasyonun yanında transdüksiyon ve transfeksiyon terimleri de kullanılabilir. Burada plazmit aktarımı için **transformasyon** terimi tercih edilecektir). Plazmit DNA yapısına hedef bir DNA molekülü bağlanarak rekombinant vektör molekülleri elde edilir. Bu rekombinant vektörler bakteri hücrelerine transforme edilebilirler, transforme olmuş hücreler (transformantlar) içinde replike olabilirler ve böylece yeni nesillere aktarılırlar. Ayrıca taşıdıkları gen bölgelerine bağlı olarak transformantlara bazı fenotipler de kazandırabilirler. Buna tipik örnek antibiyotik direncidir. Bir vektör eğer sözcüğü kanamisin direnç geni (*kan*) taşıyorsa bulunduğu transformant hücreye kanamisin direnci kazandıracaktır.

Bir çok plazmit için her bir mikrogram ( $\mu\text{g}$ ) plazmit DNA'sının transformasyon sıklığı  $10^5$ - $10^7$  kadar yüksek olabilir yani  $1 \mu\text{g}$  DNA  $10^5$ - $10^7$  bakteri hücrelerini transforme edebilir. Gerçekte böyle bir durumda sadece her 10 000 DNA molekülünden sadece biri aktarılabilir ve kültürdeki bakteri hücrelerinin birçoğu transforme olmamış durumdadır. Böyle karışık bir bakteri popülasyonunda transforme olmuş ve olmamış bakteri hücrelerinin ayırt edilmesi gerekir. Bu durumda plazmit bir antibiyotik direnç geni taşıyorsa transformant hücreler antibiyotiğe dirençli olacaktır. Ortama bu antibiyotik eklenerek transformantlar kolayca ayırt edilebilir (yani transforme olmamış hücreler ölür!). Yaygın kullanılan antibiyotikler arasında ampisilin, tetrasiklin, kanamisin ve spektinomisin sayılabilir.

Yüksek sıklıkta transformasyon elde etmek için kullanılacak bakterilerin transformasyon için uyumlu hale getirilmesi gerekir (alıcı hücre). Bunu başarabilmek için bakteri hücre duvarı ve hücre zarının plazmid DNA'sının geçişine izin verecek şekilde farklılaştırılması gerekir. Bakteri hücrelerini yabancı DNA için alıcı hale getirmek için kullanılan yaygın metot hücrelere kalsiyum klorür uygulayarak soğuk ve sıcak şokuna maruz bırakmaktır. Bu deneyde kullanacağınız alıcı hücreler bu metodun bir türevi olan Inoue methoduna göre hazırlanmıştır (Sambrook ve Russell, 2001).

Bu deneyde pSG45 rekombinant plazmitinin *E. coli* hücrelerine transformasyonunun sıklığını belirleyeceksiniz. Plazmit, kanamisin direnç geni ve diğer bazı genleri içermektedir. Besiyerine kanamisin antibiyotiği ekleyerek transformantların üremesini sağlayacaksınız. Ayrıca antibiyotiksiz besiyerinde, canlı hücre sayımı ile transformasyon gerçekleştirilen *E. coli* kültüründeki toplam canlı hücre sayısını belirleyeceksiniz.

## Deneyin Amacı

Bu deneyin tamamlanması durumunda şunları yapabiliyor olmalısınız:

- Plazmit, bakteriyofaj, transformasyon ve rekombinant DNA'yı tanımlamak,
- *E. coli* hücrelerinde plazmit pSG45'in transformasyon sıklığını belirlemek üzere bir protokol hazırlayabilmek.

## Transformasyon Deneyi İçin Gerekli Materyaller:

*Escherichia coli* DH5a alıcı hücreleri

42°C su banyosu

37°C çalkalamalı inkubatör

800 µl SOC broth içeren 1 adet tüp

Kanamisin (50 µg/ml) içeren 2 adet steril agar petrisi

3 adet steril agar petrisi

Bakterileri agar yüzeyine yaymak için L-şeklinde dağıtıcı (spreader)

70 % alkol içeren beher

Mikropipet ve steril mikropipet uçları

Buz

1.5 ml'lik eppendorf tüpleri

Cam kalemi

## I. A. pSG45 Plazmiti Kullanılarak Yapılan *E. coli* Transformasyon Prosedürü

1. Transformasyon deneyine başlamadan önce *Escherichia coli* DH5a alıcı hücreleri verilen, prosedür izlenerek hazırlanır ve deney gününe kadar -80°C de muhafaza edilir. (Kompetent=alıcı hücreler size hazır olarak verilecektir).
2. 500 µl *Escherichia coli* DH5a alıcı hücreleri içeren 1.5 ml lik eppendorf tüpleri -80 °C den, buz içeren bir kaba alınarak, buz içerisinde yavaşça çözünmesi beklenir.
3. Buz içerisinde çözünürken bir yandan tüpler cam kalemi ile +DNA ve -DNA olarak etiketlenir.
4. Alıcı bakteriler çözüldükten sonra, tüpler nazikçe bir kaç defa baş aşağı çevrilerek bakteri solüsyonunun tüp içerisinde homojen olarak dağılması sağlanır.
5. Çözünmüş olan, 500 µl alıcı hücre solüsyonundan mikropipet kullanılarak 100 µl hücre alınarak, daha önce +DNA ve -DNA olarak etiketlenmiş 1.5 ml lik eppendorf tüplerinin her birine aktarılır.
6. Transformasyon deneyinde kullanılacak olan pSG45 plazmitinin seyreltilmiş DNA solüsyonları buz içerisinde muhafaza edilir ( $10^{-4}$ - $10^{-9}$ ). (Seyreltilmemiş orijinal plazmit DNA konsantrasyonu 1 µg/µl dir).
7. Mikropipet kullanılarak seyreltilmiş pSG45 plazmit solüsyonundan 1 µl alınarak bir önceki basamakta 100 µl alıcı hücre aktarılan +DNA olarak etiketlenmiş tüplere eklenir. (Kullanacağınız plazmit solüsyonunun seyreltme oranı size verilecektir).

**Not:** Negatif kontrol olarak, plazmit DNA yerine aynı miktar (1 µl) steril su –DNA olarak etiketlenmiş 100 µl alıcı hücre içeren tüpe eklenir.

8. Hemen, zaman kaybetmeden bütün tüpler buz içine konarak 30 dak. inkübe edilir.
9. 30 dak. buzda beklettikten sonra tüpler çabucak 42°C su banyosuna konarak 90 sn (1.5 dak.) inkübe edilir.
10. Zaman kaybetmeden tüpler tekrar buz içerisine alınarak 2 dak. daha buz içerisinde bekletilir. Daha sonra steril SOC-broth besiyerinden 800 µl (0.8 ml) alınarak bu tüplere eklenir ve 37°C çalkalamalı inkubatör de 45 dakika boyunca ortalama bir hızda inkübe edilir.
11. 45 dak. inkübasyon adımından sonra, +DNA olarak işaretlenmiş tüpten 100 µl hücre alınarak kanamisin içeren agar besiyerinin ortasına (Kan1 olarak işaretlenmiş petri) mikropipet aracılığı ile bırakılır. Dağıtıcı (spreader) 70 % etil alkole batırılır ve ateşten geçirilerek steril edilir. Dağıtıcı agar besiyerinin boş kısmına dokunarak soğutulur. Çok bastırmadan dağıtıcı kullanılarak daha önce petrinin ortasına bıraktığımız hücreler agar besiyerine yayılır.
12. Yine daha önce sulandırılan +DNA tüpünden 100 µl alarak ikinci kanamisin agar besiyerine (Kan2) bir önceki adımdaki gibi bırakılıp yayılır.

## I. B. Canlı Hücre Sayımı

1. Bir sonraki adımda –DNA (negatif kontrol) tüpünden 100 µl (0.1 ml) hücre alınarak Dil. 1 olarak işaretlenmiş dilüsyon tüpüne (9.9 ml L-Broth) aktarılır ve vortex kullanılarak karıştırılır. Bu adım sonunda baştaki orijinal –DNA tüpündeki bakteri solüsyonunun  $1 \times 10^{-2}$  dilüsyonunu elde ederiz.
2. Dil.1 tüpünden 100 µl (0.1 ml) hücre alınarak Dil. 2 olarak işaretlenmiş dilüsyon tüpüne (9.9 ml L-Broth) aktarılır ve vortex kullanılarak karıştırılır. Bu adım sonunda –DNA tüpündeki bakteri solüsyonunun  $1 \times 10^{-4}$  dilüsyonunu elde ederiz.
3. Dil.2 tüpünden 100 µl (0.1 ml) hücre alınarak Dil. 3 olarak işaretlenmiş dilüsyon tüpüne (9.9 ml L-Broth) aktarılır ve vorteks kullanılarak karıştırılır. Bu adım sonunda –DNA tüpündeki bakteri solüsyonunun  $1 \times 10^{-6}$  dilüsyonunu elde ederiz.
4. Dil.3 tüpünden 1000 µl (1 ml) hücre alınarak Dil. 4 olarak işaretlenmiş dilüsyon tüpüne (9.0 ml L-Broth) aktarılır ve vortex kullanılarak karıştırılır. Bu adım sonunda –DNA tüpündeki bakteri solüsyonunun  $1 \times 10^{-7}$  dilüsyonunu elde ederiz.
5. Bu tüpten 200 µl alarak NA1 olarak işaretlenmiş agar besiyerinin ortasına bırakılır ve bir önceki adımlarda tarif edildiği gibi dağıtıcı (spreader) kullanılarak yayılır.
6. Dil.4 tüpünden 1000 µl (1 ml) hücre alınarak Dil. 5 olarak işaretlenmiş dilüsyon tüpüne (9.0 ml L-Broth) aktarılır ve vortex kullanılarak karıştırılır. Bu adım sonunda –DNA tüpündeki bakteri solüsyonunun  $1 \times 10^{-8}$  dilüsyonunu elde ederiz.
7. Bu tüpten de 200 µl alarak NA2 olarak işaretlenmiş agar besiyerinin ortasına bırakılır ve önceki adımlarda tarif edildiği gibi dağıtıcı (spreader) kullanılarak yayılır.
8. Dil.5 tüpünden 1000 µl (1 ml) hücre alınarak Dil. 6 olarak işaretlenmiş dilüsyon tüpüne (9.0 ml L-Broth) aktarılır ve vorteks kullanılarak karıştırılır. Bu adım sonunda –DNA tüpündeki bakteri solüsyonunun  $1 \times 10^{-9}$  dilüsyonunu elde ederiz.

9. Bu tüpten de 200 µl alarak NA3 olarak işaretlenmiş agar besiyerinin ortasına bırakılır ve önceki adımlarda tarif edildiği gibi dağıtıcı (spreader) kullanılarak yayılır.
10. Agar petrileri 37°C inkubatöre kaldırarak agar yüzleri üst tarafa bakacak şekilde 24 saat inkübe edilir ve koloniler süre sonunda sayılır.

## II. Transformasyon Sıklığı ve Herbir Mikrogram (µg) DNaya Karşılık Oluşan Transformant Sayısı

Transformasyon sıklığı, pSG45 plazmitini alarak (transforme olarak) kanamisin antibiyotiğine direnç kazanan bakterilerin populasyondaki oranını ifade eder. Aşağıdaki formül hem halkasal plazmit DNA'sının transformasyon sıklığının hesaplanmasında kullanılabilir.

1. Halkasal plazmit DNA'sının transformasyon sıklığını aşağıdaki gibi hesaplayınız:

$$\text{Transformasyon Sıklığı} = \frac{\text{Kan 1 ve Kan 2 petrilerindeki koloni sayısı}}{\text{Nutrient Agar 1, 2 ve 3 petrilerinden belirlenen ml'deki ortalamakoloni sayısı}}$$

Sulandırma yaptığınızı unutmayınız. Hesaplama yapmadan önce sulandırma faktörünü de hesaba katarak orijinal değerleri bulunuz (Tablo 1)

Hesapladığınız değeri buraya yazınız: \_\_\_\_\_

Tablo1 Transformasyon deneyinin verileri.

Petri No	Koloni sayısı	Düzeltilme faktörü	Hacim düzeltme (100 µl x 10 =1000 µl)	1 ml'deki hücre sayısı (koloni sayısı!)
Kan1		-	10x	
Kan2		-	10x	
NA1		10 <sup>7</sup> x		
NA2		10 <sup>8</sup> x		
NA3		10 <sup>9</sup> x		

2. Her µg plazmit DNA'sına karşı oluşan transformant sayısını aşağıdaki gibi hesaplayınız. Hesapladığınız değerleri Tablo 2'ye yerleştiriniz.

$$\text{Halkasal DNA'nın her } \mu\text{g karşılık oluşan transformant sayısı} = \frac{\text{Kan1 ve Kan2 petrilerindeki ortalama koloni sayısı}}{\text{Plazmit DNA'sının sulandırma faktörü}} \times$$

Hesapladığınız değeri buraya yazınız: \_\_\_\_\_

Tablo2: Her bir mikrogram DNA'ya karşılık oluşan transformant sayısı.

Petri No	Koloni Sayısı	Sulandırma düzeltmesinden sonra koloni sayısı	Ortalama
Kan1			
Kan2			

3. Transformasyon sıklığı sonuçlarınızı diğer gruplarla karşılaştırınız. Arada farklılıklar var mıdır? Eğer varsa farklılığı nasıl açıklayabilirsiniz?

## Genetik Madde: DNA İzolasyonu

1944 yılında Avery, MacLeod ve McCarty, pnömokok bakterilerinde genetik maddenin DNA olduğunu gösterdiler. O zaman bu buluş tam olarak kabul edilmediyse de, sonraki yıllarda James Watson, Francis Crick ve Maurice Wilkins tarafından DNA'nın yapısal modelinin ve kimyasal yapısının açıklanmasıyla DNA molekülünün önemi anlaşılabilir. Watson-Crick modeli, DNA'nın nasıl replike olduğu, bilgiyi nasıl kodladığı (şifrelediği), yapısındaki değişikliklerin (mutasyonların) organizmada nasıl fenotipik değişiklikler oluşturduğunu açıklamaya çalışmaktaydı.

Son elli yılda biyoloji lisans öğrencilerinin çoğu DNA ve moleküler genetiğin sentral dogması (DNA→RNA→Protein→Karakter) hakkında çok fazla şey öğrendi. Replikasyona ilave olarak DNA, üç ana RNA tipinin sentezi için de bir kalıp olarak iş görür. Taşıyıcı RNA (tRNA) molekülleri küçük moleküller olup (75-80 nükleotit) belli amino asitlere bağlanırlar. mRNA üzerindeki özel kodonları tanırlar. Haberci RNA (mRNA) proteinler içindeki farklı amino asitleri temsil eden üçlü nükleotit dizileri (kodonlar) taşırlar. Farklı tip ribozomal RNA'lar (rRNA) proteinlerle beraber bir ribozom kütesini oluşturur, bu yapı amino asitlerin polipeptitleri oluşturmak üzere bir birine bağlandığı montaj bölgeleridir.

Şaşırtıcı olan DNA, RNA ve protein sentezi hakkında çok şey öğrenmesine rağmen bir çok biyoloji öğrencisi yüksek molekül ağırlığına sahip DNA'yı ne görürler ne de onların özelliklerini doğrudan incelerler. Bu deney size DNA'yı izole etme, görme ve çözelti içindeki konsantrasyonunu belirleme şansını verecektir.

### Deneyin Amaçları

Bu deneyin tamamlanması durumunda şunları yapabiliyor olmalısınız:

1. Sığır dalak veya karaciğerinden hazırlanmış dokudan DNA saflandırması (ekstraksiyonu).
2. Saflandırılan DNA'nın görünümünün tanımlanması.
3. Başlangıçta kullanılan dokunun her gramına karşılık taşıdığı miligram DNA miktarının belirlenmesi.
4. 3. amacı gerçekleştirmek üzere bir spektrofotometrenin çalıştırılması.

Deney için gerekli materyal

#### ***Her grup öğrenci için:***

7 test tüpü  
 1 kapak (bir test tüpü için)  
 6 test tüp kapağı veya alüminyum folyo  
 1 250 ml beher  
 1 1000 ml beher  
 1 cam karıştırma çubuğu  
 1 50 ml vidalı kapaklı santrifüj tüpü  
 100°C su banyosu veya kaynayan su  
 Spektrofotometre  
 Spektrofotometre küvetleri

#### ***Sınıfın genel kullanımı için***

Buz ve buzlu su



- Pastör pipetleri
- Standart DNA stok çözeltisi (1 mg/ml)
- 5 ml pipetler
- 1 otomatik pipet pompası
- Santrifüj
- Tülbent ve 1000 ml beher
- 1 blender veya havan
- 1000 ml soğuk salin sitrat çözeltisi
  - 2.94 gr Sodyum sitrat
  - 8.12 gr NaCl
  - 1000 ml distile suda çözünüz ve HCl veya NaOH ile pH'yı 7.0-7.4 aralığına ayarlayınız.
- 1000 ml soğuk 2.6 M NaCl çözeltisi
  - 152.1 gr NaCl saf suda çözülür, toplam hacim 1000 ml.
- 200 ml Dische ayırıcı
  - 2.0 gr difenilamin'e
  - 200 ml glasiyal asetik asit ekleyiniz, sonra
  - 5.5 ml konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ekleyiniz
- 1000 ml buzlukta soğutulmuş %95 etanol.

## I. Spektrofotometre ile Optik Yoğunluk (Density) Ölçümü

Optik yoğunluk (absorbans) bir çözeltinin belli bir dalga boyundaki ışığın geçişini engelleme yeteneğini ifade eder. Bu çalışmada sığır dalağından elde edilmiş ve Dische ayırıcı ile tepkimeye girmiş DNA çözeltisinin optik yoğunluğunu (absorbansını) ölçeceksiniz. Daha koyu baya reaksiyonu (daha yoğun DNA demektir) daha yüksek absorbans gösterecektir. Spektrofotometre bu çalışmadaki renkli çözeltinin optimal absorbans dalga boyu olan 500 nm'ye ayarlanması gerekir. **Beer yasasına** göre bir çözeltinin konsantrasyonu ile absorbans arasında doğrudan bir ilişki vardır. Bu ilişki  $A = kc$  şeklinde ifade edilebilir.  $A$  = absorbans,  $k$  = cihaz sabiti ve  $c$  = konsantrasyon. Kullanacağınız spektrofotometre hakkında ölçüm sırasında sizlere bilgi verilecektir. Sizin doğrudan ayarlamamız gereken ve kullanacağımız bölgeler aşağıdaki gibi özetlenebilir.

**Dalga boyu göstergesi** "Wavelength" + veya - tuşları ile çalıştırılır. Bu tuşları kullanarak uygun dalga boyunu ayarlayınız. **Ölçüm modu** "absorbance" olarak seçilmelidir. Makine doğrudan bu moda çalışacaktır. **Küvet yuvası** spektrofotometre küvetinin yerleştirildiği ve aletin absorbansı belirlemek üzere ölçüm yaptığı bölmedir. Küvet bulunduğu kapalı olmalıdır. **Küvet** kuvars, cam veya polimer yapıdaki küçük kaplardır. Küvetin ışığın geçeceği işaretli yüzeyine çıplak elle veya herhangi bir nesne ile dokunmayınız. Bu ölçüm doğruluğunu etkileyecektir.

Ölçüm için aşağıdaki işlemleri yapınız.

1. Kör (blank) çözeltiden (tüp 5) 1ml bir küvete doldurunuz. Küvetin ölçüm yüzeyine dokunmayınız.
2. Dalga boyunu 500 nm'ye ayarlayarak küveti küvet yuvasına doğru pozisyonda yerleştirerek kapağı kapatınız.
3. "Set Ref" tuşuna basınız. Birkaç saniye içinde absorbans değeri sıfırlanacaktır.
4. Kör tüpü uzaklaştırarak test tüpünü (tüpler 1-4, 6 ve 7) küvet yuvasına doğru pozisyonda yerleştirerek kapağı kapatınız.
5. Ekrandan absorbans değerini okuyunuz.

## II. DNA Saflaştırması (Ekstraksiyonu) ve Miktar Tayini

Yeni kesilmiş sıgır dalağı veya karaciğeri mezbahalardan sağlanarak buz içinde laboratuara nakledilebilir ve aşağıdaki gibi bir DNA çözeltisi hazırlamak için kullanılabilir. Dalak ve karaciğerin kullanılış nedeni yüksek oranda çekirdek materyali ve dolayısıyla DNA içermesidir. DNA saflandırması ve miktar tayini yapmak için aşağıdaki yolu takip ediniz.

1. Taze dalak dokusunu küçük küpler şeklinde kesiniz (1 cm<sup>3</sup>). Yağ ve bağ dokusunu ayırınız, bu dokular açık renklidirler. 40 ml DNA çözeltisi için 4 gr dalak kullanınız (10 ml için 1 gr). Her grup için 40 ml (4 ml) çözeltiye ihtiyaç duyulacaktır.
2. 4 gr dalağı seramik havanda iyice döverek parçalayınız. 40 ml soğuk salin sitrat çözeltisini azar azar ekleyerek tekrar karıştırın ve homojen hale getiriniz. Homojenatı birkaç tabaka tülbentten bir behere süzünüz. Bu işlemle nispeten büyük doku parçaları ayrılmış olacaktır.
3. Homojenatı 50 ml santrifüj tüplerine taksim ediniz (yaklaşık 40 ml), santrifüje koymadan önce tartarak dengeleyiniz. Bir silinmez kalem ile tüplerdeki sıvı seviyesini işaretleyiniz. Köpük mevcutsa 1-2 dakika bekleyiniz, sonra pastör pipetiyle köpüğü uzaklaştırarak boşluğu tekrar homojenat ile doldurunuz.
4. 15 dakika 6000 rpm (mümkünse daha yüksek) hızda tercihen soğutmalı bir santrifüjde döndürünüz.
5. Süpernatantı (sıvı kısmı) uzaklaştırınız.
6. Her bir santrifüj tüpüne işaretli kısma kadar soğuk sitrat-salin tamponunu doldurunuz ve çökeltiliyi yeniden süspanse ediniz. Çökeltiliyi dağıtmak için bir cam çubuk kullanınız, tüpü kapağı ile birkaç dakika güçlü bir şekilde çalkalayınız. Tüpleri dengeleyerek santrifüje koyunuz.
7. 15 dakika 6000 rpm hızda döndürünüz.
8. Süpernatantı uzaklaştırınız.
9. Her tüpe işaretli noktaya kadar 2.6 M NaCl çözeltisi ekleyiniz. Çam çubuk kullanarak ve sonra güçlü çalkalama ile çökeltiliyi çözünüz. Tüpleri dengeleyiniz.
10. 15 dakika 6000 rpm hızda döndürünüz.
11. Süpernatantı 250 ml'lik bir behere dökünüz. 1000 ml behere bir buz banyosu yaparak 250 ml beheri içine yerleştiriniz. **DNA çözeltisini daima soğuk tutunuz.**
12. 100 ml buzlukta soğutulmuş %95 etil alkolü DNA çözeltisini taşıyan beherin içine çabucak dökünüz, alkol DNA çözeltisinin üst kısmında bir tabaka oluşturacaktır. DNA alkol ve DNA çözeltisi ara yüzeyinde çökelecektir. DNA çökeltilisini gözleyerek tanımlayınız.

13. Bir cam karıştırma çubuğu kullanarak alkol ile çözelti arasında oluşan çökeltiyi karıştırınız, bu işlem sırasında çökelti cam çubuğa sarılacaktır. Bu yumak şeklindeki çökelti DNA'dır. Bütün DNA'nın cam çubuğa bağlandığından emin olunuz. Bu yöntemde DNA'nın ne tür fiziksel özellikleri kullanılmıştır. Sözgelimi DNA'yı cam çubuğa sarabilmenizi sağlayan fiziksel özellik nedir?
14. DNA'nın bağlı bulunduğu karıştırma çubuğunu beherden çıkarınız. Akmasını sağlayarak ve dikkatlice bir emici kağıta emdirerek alkolü uzaklaştırınız. Alkolün uzaklaştırılması DNA'nın su içinde çözülmesini sağlayacaktır.
15. DNA'yı taşıyan cam çubuğu 4 ml distile su bulunan bir test tüpüne transfer edin ve su içinde aşağı yukarı hareket ettirerek DNA'nın cam çubuktan ayrılmasını sağlayınız. Tüpü kapatarak DNA çözeltiye geçene kadar güçlü bir şekilde çalkalayınız. Bütün DNA'nın çözülmesi için kuvvetli ve uzun süreli çalkalama gerekebilir.
16. Aşağıdaki seyreltme ve ölçüm işlemlerini uygulayarak bu çözelti içindeki DNA konsantrasyonunu belirleyiniz.
- 6 test tüpünü 1'den 7'ye doğru işaretleyiniz.
  - 2, 3, 4 ve 5. tüplere 2 ml distile su koyunuz.
  1. ve 2. tüplerin her birine 1 mg/ml standart DNA stok çözeltisinden 2 ml ekleyiniz. Tüp 1'i bir kenara bırakınız. Tüp 2'yi karıştırınız.
  - Tüp 2'den tüp 3'e 2 ml ekleyiniz.
  - Tüp 3'ü karıştırdıktan sonra 2 ml alarak tüp 4'e koyunuz.
  - Karıştırdıktan sonra tüp 4'ten 2ml alarak uzaklaştırın. Tüp 1'den 5'e kadar 1 mg/ml'den (tüp 1) hiç DNA olmayacak (tüp 5) şekilde 2 ml sıvı mevcuttur.
  - İzole ettiğiniz DNA çözeltisinden 2 ml tüp 6'ya koyunuz.
  - Tüp 7'ye 1 ml izole ettiğiniz DNA'dan ve 1ml su koyunuz.
  - Tüplerin içine (1-7) 4 ml Dische ayırıcı ekleyiniz ve tüplerin ağzını buharlaşmayı engellemek için aliminyum folyo ile kapatınız. Şimdi kaynamakta olan suda tüpleri 10 dakika ısıtınız.
  - Tüpleri buzlu suda birkaç dakika soğuttuktan sonra tüp numaraları işaretlenmiş spektrofotometre küvetlerinden her birine 1 ml ekleyiniz. Spektrofotometrede absorbansı ölçmek için hazır durumdasınız.
  - Tüp 5'i (distile su + Dische ayırıcı) 500 nm'ye ayarlanmış spektrofotometreyi sıfırlamak için kör tüp olarak kullanınız.
  - Her tüpü 500 nm'de okuyunuz ve absorbansları aşağıdaki boşluğa yerleştiriniz

Tüp Numarası	Absorbans	DNA Konsantrasyonu
1		1.000
2		0.500
3		0.250
4		0.125
5	0	0.000
6		
7		

- Tüp 1, 2, 3 ve 4'e ait absorbans değerlerini standart bir grafik kağıdında grafik haline getiriniz. Absorbansı dikey eksene, DNA konsantrasyonunu (mg/ml)

yatay eksene yerleştiriniz. Bu standart grafiği saflandırdığınız DNA konsantrasyonunu belirlemek için kullanınız. Bunun için tüp 6 ve 7'ye ait absorbens değerine karşılık gelen DNA miktarını grafikten belirleyiniz. Burada hangi konsantrasyondaki DNA'nın bu absorbens oluşturduğu temel ilkesinden hareket edilmektedir. Değerlerinizi grafiğe yerleştiriniz

- n. 4 ml DNA zengin çözeltinin 4 g dokudan elde edildiğini düşünerek sıgır dokusundaki DNA yüzdesini hesaplayınız. Kayıtlarınızı boşluğa kaydediniz. Hesaplama için şöyle bir formül kullanabilirsiniz:

$$\%DNA \text{ oranı} = \frac{4 \text{ ml'deki DNA miktarı (mg)} \times 100}{\text{Toplam doku miktarı (mg)}}$$

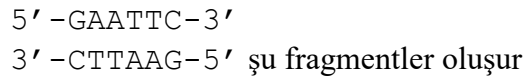
### Kaynaklar

1. Mertens T. R. ve R. L. Hammersmith. 2001. **Genetics. Laboratory Investigations.** Prentice Hall, New Jersey.
2. Levin B. 1994. **Genes V.** Oxford University Pres, Oxford.
3. W.S.Klug ve M.R.Cummings. 1991. **Concepts of Genetics.** Macmillan, New York

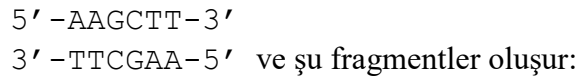
## Kromozomal DNA ve Plazmit DNA'sının Restriksiyon Endonükleaz Kesimi ve Agaroz Jel Elektrofrezisi

Modern moleküler genetiğin gelişmesini sağlayan iki önemli prosedür DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla sindirilmesi ve agaroz jel elektrofrezidir. Bu iki prosedür DNA'nın özgül büyüklükte fragmentlere kesilmesine ve bir elektrik alan içinde bu fragmentlerin molekül ağırlığına göre ayrılmasına izin vermektedir. Bu prosedürler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), ters transkripsiyon, plazmit transformasyonu ve klonlama gibi tekniklerle beraber moleküler genetiğin temelini oluşturur.

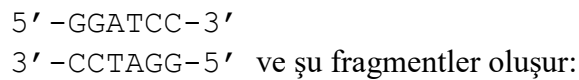
**Restriksiyon endonükleazlar** tanıma dizisi olarak adlandırılan özgül DNA bölgelerinden DNA'yı düz (kör uç) veya girintili (yapışkan uç) olarak kesen enzimlerdir. Sözelimi restriksiyon endonükleaz *EcoRI* (saflaştırıldığı organizmaya göre isimlendirilir) bir altılı nükleotit dizisini girintili olarak keser.



Diğer yandan *HindIII* şu nükleotit dizisine sahiptir.



Yine *BamHI* şu nükleotit dizisine sahiptir.



*EcoRI*, *HindIII* ve *BamHI* enzimlerinin tanıma dizilerinin palindromik (rotasyonel simetrik) olduğuna dikkat ediniz. Tamamı değil ama restriksiyon endonükleazların çoğu bir palindromik dizi üzerinde aktivitelerini gösterirler. Restriksiyon endonükleazların diğer iki özelliği tanıma dizilerinin büyüklüğü (çoğu altılı veya dördü nükleotitlerdir) ve bazı restriksiyon endonükleazların tanıma dizilerine metillenmenin etkisidir.

Eğer bir restriksiyon endonükleaz bir altılı nükleotit dizisini tanıyorsa, bu durumda genomik DNA'yı 4100 bp aralıklarla kesmesi beklenir (Dört farklı nükleotitin altıncı gücü olarak alınır,  $4^6$ ). Elbette bütün DNA fragmentleri 4100 bp büyüklüğünde olmayacaktır; bazıları daha küçük ve bazıları da daha büyük olacaktır. Bununla beraber nükleotitlerin rastgele dağıldığı kabul edilirse ortalama fragment büyüklükleri 4100 bp olmalıdır. Bir restriksiyon endonükleaz dördü nükleotit bir diziyi tanıyorsa ortalama  $4^4=256$  bp büyüklüğünde fragmentler

oluşturacaktır. Bu bilgi çalışmak istediğiniz DNA fragmentlerinin ortalama büyüklüklerini belirlemede kullanılabilir.

**DNA metilasyonu** (bir adenin veya sitozin bazına bir metil grubunun bağlanmasını ifade eder) bir restriksiyon endonükleazın bir DNA'yı kesmek üzere bir tanıma dizisine bağlanıp bağlanmamasını etkiler. Bazı plazmitlerin DNA'sı restriksiyon enzimleriyle sindirilmeye karşı metilasyon ile korunmuştur. Eğer çalışacağınız DNA metillenmişse metilasyondan etkilenmeyen bir restriksiyon endonükleaz kullanmanız gerekmektedir.

**Agaroz jel elektrofrez**, bir elektrik yükü tarafından çekilme özelliği kullanılarak, moleküllerin ayrılması esasına dayanır. DNA, deoksiriboz omurgasını bağlayan fosfat gruplarından dolayı negatif bir yük taşıdığı için, bir elektrik alanına konduğunda pozitif kutba doğru hareket eder. Agaroz agarın oldukça saflaştırılmış hali olup eritilip katılaştırıldığı zaman içinde DNA'nın hareket ettiği bir porlar ağı oluşturur. Bunun sonucunda büyük DNA molekülleri agaroz içinde yavaş hareket ederken küçük moleküller daha hızlı hareket edecektir. Bu farklı hareket oranları bir DNA fragmenti karışımındaki farklı büyüklükteki fragmentleri molekül ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılabilir. Belli bir DNA'nın molekül ağırlığı o DNA molekülü içinde yaklaşık kaç nükleotit bulunduğunu belirlemede kullanılabilir. [Not: Halkasal veya doğrusal DNA, süper sarılma ve tamponun iyonik gücü gibi diğer faktörler de DNA'nın yürümesini etkileyebilir. Daha öte tartışmalar için Sambrook ve ark.(1989) tarafından yazılmış "Molecular Cloning" adlı esere bakabilirsiniz].

## Deneyin Amaçları

Bu deneyin tamamlanması durumunda şunları yapabiliyor olmalısınız:

1. DNA'yı restriksiyon endonükleaz kullanarak sindirmek üzere bir prosedür hazırlayabilmek,
2. Restriksiyon endonükleaz kesimi sonucu oluşturulmuş DNA fragmentlerini agaroz jel elektrofrez kullanarak ayırmak için bir protokol oluşturmak,
3. Bilinen bir molekül büyüklüğü standardı ile karşılaştırarak bir DNA fragmentinin yaklaşık büyüklüğünü hesaplayabilmek.

## Elektrofrez için gerekli materyal:

### Sınıf için:

1 hassas terazi,  
1 şişe agaroz,  
1 rulo otoklav bandı,  
1 UV transillüminatör,  
1 vorteks karıştırıcı,  
1 şişe etidyum bromür stok çözeltisi (10 mg/ml),  
İnkübatör veya su banyosu (37°C),  
Farklı restriksiyon endonükleazlar (*Bam*HI, *Eco*RI ve *Hind*III),  
Farklı 10x stok restriksiyon endonükleaz kesim tamponları,  
1 tüp yükleme tamponu,  
Saf su,  
DNA molekül büyüklük işaretleyicisi,  
Eğer sınıf kendi  $\lambda$  DNA'sını hazırlamayacaklarsa *Hind*III ile kesilmiş 1.5  $\mu$ l  $\lambda$  DNA'sı. Bu örnek daha sonra 1.5  $\mu$ l yükleme tamponu ve saf su ile 15  $\mu$ l hacme ayarlanmalıdır.

### Her öğrenci grubu için:

- 1 agaroz jel aparatı, tarak ve tepsisi ile beraber,
- 1 güç kaynağı,
- 1 250 ml erlen,
- 1 tartı kabı,
- 1 spatül,
- 2 litre 1x elektroforez tamponu (TBE),
- 1 100 ml mezür,
- 1 sıcak cisimleri tutmak için eldiven,
- 1 mikropipet pompası ve uçlar,
- 1.5 ml Eppendorf tüpleri,
- Escherichia coli* kromozomal DNA'sı,
- $\lambda$  DNA stok çözeltisi veya *Hind*III ile kesilmiş 1.5  $\mu$ l  $\lambda$  DNA'sı,
- Kesilmemiş plazmit DNA'sı,
- 1 tüp yükleme tamponu,
- 1 çift plastik veya lateks eldiven.

## I. *E. coli* ve $\lambda$ Kromozomal DNA'sı ve Plazmit DNA'sının Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Lamda ( $\lambda$ ) yaklaşık 50 kb büyüklüğünde doğrusal çift zincirli bir DNA genomuna sahip bir bakteriyofajdır. Büyüklüğü ve metillenmemiş formda sağlanabilmesinden dolayı lamda DNA'sı restriksiyon analizleri için idealdir. Bu gün *Hind*III restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş  $\lambda$  DNA fragmentlerini analiz edeceksiniz. Ayrıca *E. coli* kromozomal DNA'sını *Bam*HI enzimi ile ve bir plazmit DNA'sını *Eco*RI enzimi ile keseceksiniz. Laboratuvar sorumlusu ilave enzimler de uygulamanızı isteyebilir. Bu durumda grup olarak hangi enzim kombinasyonunu kullanacağınız size söylenecektir.

1. Laboratuvar sorumlusu kimin hangi enzimle veya hangi enzim kombinasyonu (çift kesim) ile çalışacağını belirleyecektir. Her biriniz farklı enzim veya enzim kombinasyonlarıyla çalışarak elektroforez sonrasında farklı fragment takımları (örneklemeleri) göreceksiniz. Hangi enzim veya enzim kombinasyonu ile çalıştığınızı doğru şekilde kaydediniz.
2. Bir mikropipet pompası kullanarak 10  $\mu$ l *E.coli* kromozomal DNA çözeltisini 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne ekleyiniz.
3. Sonra kullanacağınız restriksiyon endonükleazın 10x tamponundan mikropipeti kullanarak 1.5  $\mu$ l alıp DNA'yı içeren tüpe ekleyiniz ve vorteksleyerek veya parmağınızla sarsarak karıştırınız.
4. Restriksiyon endonükleazlar % 30-50 gliserol çözeltisi içinde -20°C'de tutulduğunda stabildir fakat çalışma tamponunda değildir. Bu nedenle siz 1. ve 2. basamakları yürütürken, laboratuvar sorumlusu çalışır durumdaki enzim çözeltisini hazırlayacaktır. Bir enzim çözeltisinin 1  $\mu$ l'si genellikle 1 ünite enzim aktivitesi gösterir. Bir **enzim ünitesi**, 1  $\mu$ g lamda ( $\lambda$ ) DNA'sını 37°C'de 1 saat içinde sindirmek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanır.
5. Laboratuvar sorumlusu her grubun tüplerine uygun enzim çözeltisinden 1  $\mu$ l ekleyecektir. (her enzim için yeni bir pipet ucu kullanılmalıdır). Çift kesim için her enzimden 1  $\mu$ l kullanınız. Enzim eklendikten sonra içeriği karıştırınız ve 37°C'de 1 saat inkübe ediniz. DNA sindirilirken kısım II'deki kılavuza göre agaroz jelinizi hazırlayınız.

6. 1 saatin sonunda Eppendorf tüpünün 37°C inkübatör veya su banyosundan çıkarın ve 1.5 µl jel yükleme tamponu ekleyip karıştırınız. Eğer karışımın bir kısmı tüpün duvarında kaldıysa yavaşça bençe vurarak dibe çökmesini sağlayınız.
7. Jel elektrofrez işlemine geçiniz.
8. Lambda kromozomal DNA ve plazmit DNA'sını kesmek için yukarıdaki 1.-7. basamaktaki işlemleri tekrarlayınız.

## II: Jelin Hazırlanması

1. 0.35 gr agarozu tartarak 150 ml erlen içerisine duvarlara yapışmayacak şekilde dökünüz. Sonra 50 ml 1x elektrofrez tamponunundan (1x TBE) ekleyiniz. Bu karışım % 0.7 agaroz oranı sağlayacaktır. Erlenin ağzını alüminyum folyo ile kapatarak bir bunzen bek alevinde ısıtınız. Arada bir karıştırarak agarozun homojen kalmasını sağlayınız. Karışım kaynadıktan sonra erleni dikkatlice sallayarak karıştırınız ve ısıtma işlemine agaroz tamamen eriyene kadar (herhangi bir partikül görülmeyene kadar) devam ediniz. (Agaroz jel size hazır olarak sağlanabilir).
2. Elektrofrez aygıtının tepsisini (tray) temizleyerek uçlarını kapatınız. Kapatma tepsinin orijinal parçaları ile olabileceği gibi plastik olmayan yapışkan bir band ile de olabilir. Tepsinin bir ucuna yakın bir pozisyona yükleme oyuklarını sağlayacak tarağı yerleştiriniz.
3. Erimiş durumdaki agarozu bir su banyosunda 50-55°C'ye kadar soğutunuz. Sonra bir etidyum bromür stok çözeltisinden (10 mg/ml) 2 µl ekleyerek karıştırıp homojen olarak dağılmasını sağlayınız. (Not: Etidyum bromür bir DNA aralayıcı ajan olup mutajenik ve karsinojeniktir. Bu nedenle gerek doğrudan etidyum bromür ile çalışırken veya etidyum bromür içeren materyalle çalışırken daima eldiven kullanınız).
4. Etidyum bromür karıştırılmış agarozu, hazırlanmış ve düz bir zemine yerleştirilmiş olan elektrofrez tepsisine dikkatlice dökünüz. Karışımın jel haline gelmesi için bekleyiniz. Bu süre ortam sıcaklığına bağlı olarak 30 dk kadar sürebilir.
5. Jel oluştuktan sonra tepsinin kapatılan uçlarını açarak 1x elektrofrez tamponu ile doldurduğunuz elektrofrez tankı içindeki yerine yerleştiriniz. Jelin yüzeyi tampon ile tamamen kaplanmış olmalıdır.
6. Jelin içine yerleşik olan ve elektrofrez aygıtının negatif kutbu tarafındaki tarağı dikkatlice çekerek çıkarınız. Oyuklar daha şeffaf alanlar olarak görülür.

## III: Jelin Yüklmesi ve Jel Elektrofrez

1. Jel oyuklarına 20 µl kadar yükleme yapabilirsiniz. Restriksiyon endonükleazlarla kesilmiş ve kesilmemiş kromozomal ve plazmit DNA örneklerinizden 10 µl alarak 1.5 µl 10x yükleme tamponu ve 3.5 µl saf su ekleyiniz. DNA çözeltisi ile yükleme tamponunu mikropipet uçları ile iyice karıştırınız. Bu basamakta jele yüklenecek bütün örnekler aynı şekilde hazırlanmalıdır. Bunlar *HindIII* kesilmiş λ DNA, kesilmemiş λ DNA, *BamHI* kesilmiş *E. coli* kromozomal DNA, kesilmemiş *E. coli* kromozomal DNA, kesilmiş ve kesilmemiş plazmit DNA'larıdır. Kesilmemiş DNA örneklerinden ne kadar yüklemeniz gerektiğini laboratuvar görevliniz size söyleyecektir.
2. Yükleme tamponu ilave edilmiş bu karışımı mikropipet ile çekiniz. Çekme işlemi tamamlandığında pipetin ucunda hava boşluğu kalmamalıdır.



3. Sonra pipetin ucunu oyuklardan birinin kenarına dokunacak pozisyona getirerek pipetin pompasını bastırarak DNA çözeltilisinin oyuğun içine boşalmasını sağlayınız. Pompayı ne çok hızlı nede çok yavaş bastırmamanız gerekir.
4. Diğer örnekleriniz için de aynı işlemleri tekrarlayınız.
5. Yükleme tamamlandıktan sonra güç kaynağına bağlı olan elektroforez aygıtının kapağını, doğru bir şekilde yerleştiriniz. Negatif kutup (siyah renkli) jelin DNA'nın yüklendiği tarafında pozitif kutup (kırmızı renkli) ise uzak tarafında olmalıdır.
6. Güç kaynağında akım gücünü 70 mA-100 mA arasında bir değere ayarlayınız.
7. Başlama düğmesine basarak elektroforezi başlatınız. Bu düzenekte DNA molekülleri pozitif kutba doğru hareket edeceklerdir (yürüyeceklerdir). Belli bir sürenin sonunda daha küçük DNA molekülleri pozitif kutba doğru daha uzun bir yol almış olacaklardır. Yürütme işlemini en az 1 saat sürdürünüz.

#### IV: Jelin Görüntülenmesi

1. Yürütme işlemini yükleme tamponu içinde bulunan iki farklı boyayı gözleyerek takip edebilirsiniz. Öndeki boya sona yaklaştığında güç kaynağını durdurunuz, elektroforez aygıtının kapağını açınız. Eldivenlerinizi giyiniz ve tampon içindeki jeli tepsiyle beraber alınız. Jelin kaygan olduğunu unutmayınız.
2. Jeli tepside kaydırarak 256 nm veya 312 nm dalga boyunda ışık üreten transillüminatörün cam tablasına yerleştiriniz.
3. Transillüminatörün cam koruma levhası varsa onu jelin üzerine kapatınız veya UV ışınlarını geçirmeyen bir gözlük ya da yüzü koruyan bir cam koruyucu kullanınız.
4. Sonra transillüminatörün düğmesine basarak UV ışınlarının salınmasını sağlayınız. Etidyum bromür ile muamele edilmiş durumdaki DNA moleküllerini taşıyan jel bölgeleri parlak renkli olarak görülecektir. Her bir oyuktaki farklı büyüklükteki DNA moleküllerinin (bandların) ne kadar yol aldığını görebileceksiniz.
5. Her bir yoldaki DNA bandlarını dikkatlice inceleyerek bu DNA örneklerinin görünüşleri arasındaki farkları not ediniz. Mümkün olduğu takdirde laboratuvar görevliniz elektroforez jel ortamının fotoğrafını çekerek birer kopyasını size verecektir.
6.  $\lambda$  DNA'sının *Hind*III kesimi sonucu oluşan fragmentlerin gerçek büyüklükleri size verilecektir. Bu bandların büyüklükleri ile karşılaştırarak büyüklüğünü bilmediğiniz diğer bandların büyüklüklerini tahmin edebilirsiniz.

#### Değerlendirme Soruları

1. Hangi restriksiyon endonükleazları kullandınız ve bu restriksiyon endonükleazlar  $\lambda$  ve *E. coli* kromozomal DNA'sından ve plazmit DNA'sından ne kadar fragment oluşturmuştur?
2.  $\lambda$  kromozomal DNA'sı farklı enzimlerle kesildiğinde bandların büyüklüğü aynı mıdır? Niçin?
3. *E. coli* kromozomal DNA'sı ile  $\lambda$  kromozomal DNA'sının oluşturduğu bandlanmanın nasıl bir farkı vardır? Bu farkı nasıl açıklayabilirsiniz?
4. Bandların farklı uzaklıklara göçü için nasıl bir açıklama getirebilirsiniz?
5. Jel içindeki DNA niçin normal ışıktaki değil de UV ışıktaki parlak görülür?
6. Kullandığımız restriksiyon endonükleaz enzimlerinin DNA'yı hangi sıklıkta kestğini teorik olarak hesaplayınız. Hesapladığınız band büyüklüklerinden sapmalar var mıdır? Niçin?

## Çözeltiler

**Etidyum bromür çözeltisi:** (10 mg/ml).

**10x elektroforez tamponu (10x TBE):**

Tris baz	108 gr
Borik asit	55 gr
0.5 M EDTA (pH 8.0)	40 ml
Son hacim su ile 1000 ml'ye tamamlanır.	

**Yükleme tamponu:**

Ficoll 400	0.5 gr
Glycerol	0.5 gr
% 0.1 Bromfenol mavisi	0.5 ml
% 0.1 Ksilen siyanol FF	0.5 ml

Son hacim su ile 5 ml'ye tamamlanır.

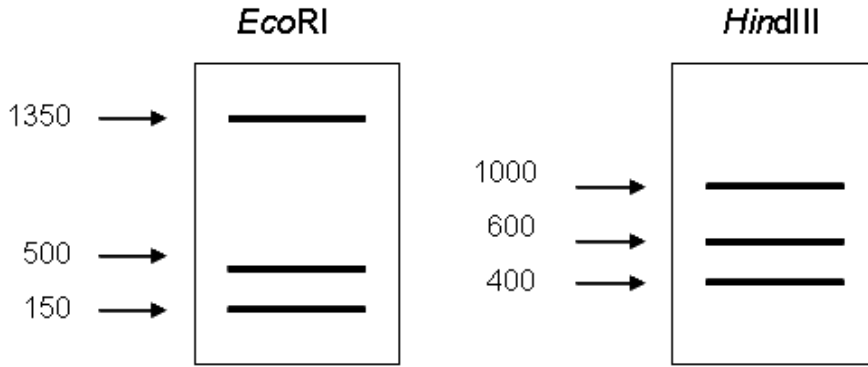
**10x restriksiyon endonükleaz reaksiyon tamponu:** Üretici firma tarafından sağlanır.

## Kaynaklar

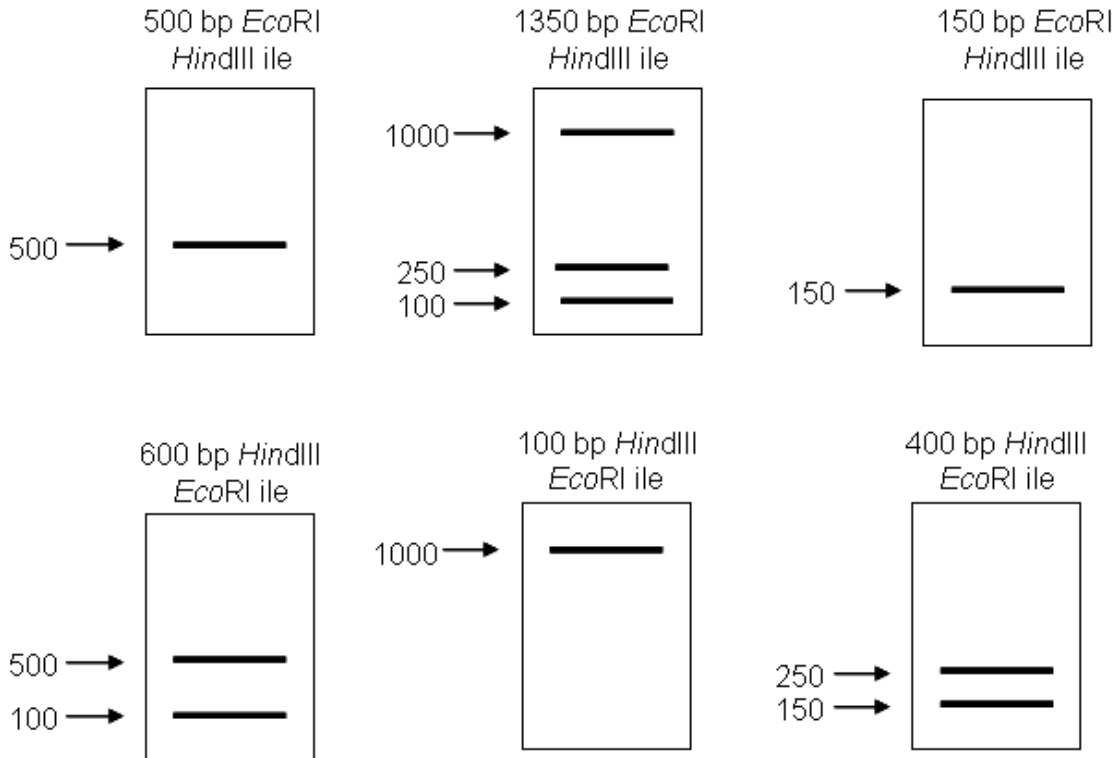
1. Mertens T. R. and Hammersmith R. L. (2001). Genetics. Laboratory Investigations. 12th ed. Prentice Hall, New Jersey
2. Sambrook, J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.

## Plazmit DNA'sının Restriksiyon Haritalaması

Farklı restriksiyon endonükleazlar tarafından oluşturulan farklı DNA fragmentleri DNA'nın haritalanmasında kullanılabilir. Sonuçta bir DNA molekülü üzerindeki restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi pozisyonları belirlenebilir. Restriksiyon haritası olarak isimlendirilen bu harita rekombinant DNA işlemlerinde son derece önemli bilgiler sunar. Sözelimi, 2000 bp büyüklüğündeki bir DNA molekülü *EcoRI* veya *HindIII* ile kesildiğinde aşağıdaki jel şemasında gösterilen fragmentleri oluşturmuştur.



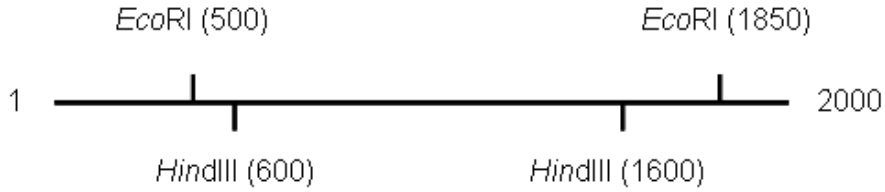
Bu durumda *EcoRI* üç fragment (1350, 500 ve 150 bp büyüklüğünde) ve *HindIII* üç fragment (1000, 600 ve 400 bp büyüklüğünde) oluşturmuştur. Bu fragmentler tek başlarına DNA dizisinin haritalanması için yeterli bilgi sağlamaz. Bunun yanında “çift kesim” yapılmalı, *EcoRI* fragmentleri *HindIII* ile *HindIII* fragmentleri de *EcoRI* ile kesilmelidir. Bu şekilde yapılan kesimler sonucu elde edilmiş olan fragmentler aşağıda şematik olarak gösterilmektedir.



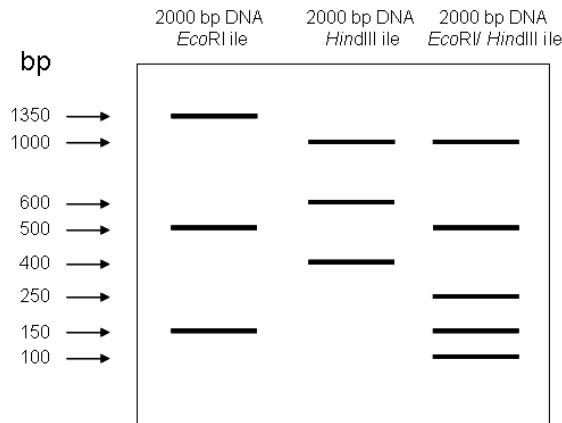
500 bp *EcoRI* ve 150 bp *EcoRI* fragmentleri aynı kaldığı için bu fragmentler üzerinde *HindIII* tanıma dizisi yoktur. Diğer yandan 1350 bp *EcoRI* fragmenti *HindIII* tarafından 1000, 250 ve 100 bp üç fragmente kesildiğine göre bu fragment içinde iki adet *HindIII* tanıma dizisi vardır. 600 bp *HindIII* fragmenti *EcoRI* tarafından bir defa kesilir ve 500 ve 100 bp fragmentler oluşturur. Bu durum 500 bp *EcoRI* fragmenti ile 600 bp *HindIII* fragmentinin çakıştığını göstermektedir. Yine 1350 bp *EcoRI* fragmenti 600 bp *HindIII* fragmenti ile 100 bp'lik bir bölgede çakışmakta, ayrıca 1000 ve 400 bp *HindIII* fragmentiyle de çakışmaktadır. 1350 bp *EcoRI* fragmenti *HindIII* ile kesildiğinde 250 bp fragment oluştuğuna göre 400 bp *HindIII* fragmentiyle de çakışıyor olması gerekir. 400 bp *HindIII* fragmenti *EcoRI* ile kesildiğinde 150 bp bir fragment oluşur, öyleyse bu fragment 150 bp *EcoRI* fragmenti ile çakışmalıdır. Bu bilgiler kullanılarak bir şöyle bir restriksiyon haritası oluşturulabilir:



Ayrıca restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin DNA molekülü üzerindeki yaklaşık pozisyonları da belirlenebilir:



Yukarıdaki diyagramlar izole edilen fragmentlerin yeniden ikinci bir enzimle kesimi esasına dayalı basit bir restriksiyon haritalama örneğini göstermektedir. Ancak gerçek uygulamalarda bu yaklaşım takip edilmez. Bunun yerine üç reaksiyon tüpü hazırlanır: biri *EcoRI* içeren, diğeri *HindIII* içeren ve üçüncüsü eş zamanlı olarak çift kesimin oluşabilmesi için *EcoRI* ve *HindIII* enzimlerinin her ikisini de içeren tüpler. Sonuçta bu her üç reaksiyon sonucu oluşan fragment büyüklükleri karşılaştırılarak bir restriksiyon haritası oluşturulur. Böyle bir elektroforez jelinin şematik görünümü şöyle olacaktır:



## Deneyin Amacı

Bu deneyin tamamlanması durumunda şunları yapabiliyor olmalısınız:

- Bir organizmanın DNA'sının haritalanmasında restriksiyon endonükleazlar tarafından oluşturulmuş fragmentlerin nasıl kullanılabileceğini tanımlayabilmek.
- Halkasal bir DNA molekülünün restriksiyon haritasını yapmak üzere bir deney tasarlayabilmek.

## 1. Restriksiyon Fragmentlerinin Oluşturulması ve Jel Elektroforez

Size sağlanacak bir plazmit DNA stokunu (pSDG37) kullanarak üç ayrı test tüpü içinde üç restriksiyon endonükleaz kesimi gerçekleştiriniz: Plazmit DNA'sı-*EcoRI* kesimi, plazmit DNA'sı-*HindIII* kesimi ve plazmit DNA'sı-*EcoRI/HindIII* çift kesimi. Bunun için aşağıdaki süreci takip ediniz.

1. Laboratuvar sorumlusu hangi enzimle veya hangi enzim kombinasyonu (çift kesim) ile çalışacağınızı belirleyecektir. Bu çalışmada *EcoRI* ve *XbaI* enzimlerini kullanacaksınız. Hangi enzim veya enzim kombinasyonu ile çalıştığınızı doğru şekilde kaydediniz.
2. Bir mikropipet pompası kullanarak 10 µl plazmit DNA (pSDG37) çözeltisini 1.5 ml'lik Eppendorf tüpüne ekleyiniz.
3. Sonra kullanacağınız restriksiyon endonükleazın 10x tamponundan mikropipeti kullanarak 1.5 µl alıp DNA'yı içeren tüpe ekleyiniz ve vorteksleyerek veya parmağınızla sarsarak karıştırınız. Çift kesim reaksiyon karışımına hangi enzimin tamponunun ekleneceği kararlaştırılmalıdır. Bazı tampon şartlarında bazı enzimler çalışmayabilir ya da beklenmedik spesifik olmayan kesimler yapabilir. Laboratuvar sorumlusu uygun tampon stokunu sağlayacaktır.
4. Restriksiyon endonükleazlar % 30–50 gliserol çözeltisi içinde -20°C'de tutulduğunda stabildir fakat çalışma tamponunda değildir. Bu nedenle siz 1. ve 2. basamakları yürütürken, laboratuvar sorumlusu çalışır durumdaki enzim çözeltisini hazırlayacaktır. Ya da kullanıma hazır enzim stokunu sağlayacaktır.
5. Laboratuvar sorumlusu her grubun tüplerine uygun enzim çözeltisinden 1 µl ekleyecektir. (her enzim için yeni bir pipet ucu kullanılmalıdır). Çift kesim için her enzimden 1 µl kullanınız. Son hacminizin 15 µl olmasını sağlayınız. Bunun için eksik kalan hacmi saf su ile tamamlamanız gerekir. Enzim eklendikten sonra içeriği karıştırınız ve 37°C'de 1 saat inkübe ediniz. İnkübasyon süresini daha uzun tutmak mümkündür.
6. 1 saatin sonunda Eppendorf tüpünün 37°C inkübatör veya su banyosundan çıkarın ve 1.5 µl jel yükleme tamponu ekleyip karıştırınız. Eğer karışımın bir kısmı tüpün duvarında kaldıysa yavaşça bençe vurarak dibe çökmesini sağlayınız.
7. Jel elektroforez işlemine geçiniz. Daha önce uyguladığımız gibi agaroz jel elektroforez uygulayınız. Standart DNA "marker"ini ilk kuyucuğa veya son kuyucuğa ya da ilk ve son kuyucuğa yükleyiniz. İkinci kuyucuğa kesilmemiş pSDG37 DNA'sını, üçüncü kuyucuğa *EcoRI* ile kesilmiş pSDG37 DNA'sını, dördüncü kuyucuğa *HindIII* kesilmiş pSDG37 DNA'sını ve beşinci kuyucuğa da *EcoRI/HindIII* çift kesilmiş pSDG37 DNA'sını yükleyin ve yeterli bir süre yürütün (70 mA'de 90 dk).
8. Yürütmenin sonunda elektroforez jelinizi u.v. ışık altında inceleyiniz. Oluşan bandların büyüklüklerini tek tek marker ile karşılaştırarak belirleyiniz. Eğer mümkün ise jel görüntüsünü fotoğraflayınız.
9. Tek kesim fragmentlerini ve çift kesim fragmentlerini karşılaştırarak bir restriksiyon haritası oluşturunuz.

10. Haritanızı aşağıdaki boşluğa çiziniz. Fragment büyüklüklerini ve restriksiyon yaklaşık kesim endonükleazların pozisyonlarını yaklaşık gösteriniz.

Plazmitler halkasal DNA molekülleridir. Bir restriksiyon enzimi bir plazmit DNA'sını tek bir bölgeden kestiğinde tek bir fragment, iki bölgeden kestiğinde ise iki fragment oluşacaktır. Doğrusal DNA moleküllerinde ise fragment sayısı kesme sayısının bir fazlasıdır. Deđerlendirmenizde bu durumu göz önünde bulundurunuz.

## **Kaynaklar**

1. Mertens T. R. and Hammersmith R. L. (2001). Genetics. Laboratory Investigations. 12th ed. Prentice Hall, New Jersey
2. Sambrook, J., Russell, D.W., (2001). Molecular cloning a laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

## Gen Ekspresyonunun Gözlenmesi: *Escherichia coli* hücrelerinde $\beta$ -Galaktosidaz Sentezi

Bir genin faaliyeti morfolojik ve fizyolojik son ürünün nicel değişimlerinin gözlemlenmesi yoluyla dolaylı olarak çalışılır. Genler, proteinlerin (enzimlerin) sentezini yönettiğine göre gen ekspresyonunu gözlemeyi hedefleyen deneyler, belli bir genin faaliyeti sonucu üretilen bir enzimi doğrudan takip etmek üzere tasarlanabilir. Bu deneyde bir mutant genin *Escherichia coli* hücreleri içindeki  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesine etkisi ve bu genin yabancı tipine sahip hücrelerde farklı besin ortamlarındaki faaliyetleri çalışılacaktır. Bu deneye hazırlanırken, gen ekspresyon mekanizması ve düzenlenmesini açıklayan bir kaynaktan ilgili biyokimyasal yol ve kavramları incelemeniz tavsiye edilir.

### I. Giriş

Lac<sup>+</sup> ve indüklenebilir olan bir *E. coli* kültürü eğer enzimin substratı olan laktoz varlığında üretilirse yüksek bir  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi gösterir. Laktoz (allolaktoz)  $\beta$ -galaktosidaz enziminin sentezini uyararak bir indükleyici olarak iş görür. Aynı bakteri nutrient broth gibi bir zengin besiyerinde üretilirse farklı enerji ve karbon kaynakları (örnek glukoz) kullanılacağından  $\beta$ -galaktosidaz üretilmeyecektir. Eğer zengin besiyerinde üretilmiş bu tip bir organizma, laktozun tek karbon kaynağı olarak sağlandığı bir besiyerine transfer edilirse bir lag evresinden (gecikme) sonra üssel gelişme başlayacaktır. Buna karşın zengin besiyerinde üretilmiş ve laktozun tek karbon kaynağı olarak sağlandığı minimal besiyerine transfer edilmiş Lac<sup>-</sup> *E. coli* hücreleri  $\beta$ -galaktosidaz üretmeyecektir.

Lac<sup>-</sup> bakterilerin tek karbon kaynağı olarak laktozun bulunduğu bir ortamda üremesini bekler misiniz? Açıklayınız:

$\beta$ -galaktosidaz sentezinin aranması için tam bir genotipe (lac<sup>+</sup>) sahip bakteriyle bir indüser (Laktoz) ve bir subtrata (o-nitrofenol- $\beta$ -D-galaktosid, ONPG) ihtiyaç vardır. Substrat (ONPG) enzim tarafından parçalanır ve sarı renkli o-nitrofenol bileşiği oluşur. Nitel bir o-nitrofenol gözlemi çıplak gözle yapılabilir de açığa çıkan o-nitrofenolün miktarının nicel olarak belirlenmesi 420 nm'de spektrofotometrik olarak gerçekleştirilebilir. 420 nm o-nitrofenolün maksimum absorbans gösterdiği bir dalga boyudur.

Bu deney iki aşamalı bir deneydir. Her iki aşamayı da yürütebileceğiniz gibi sadece ilk aşamayı da yürütebilirsiniz. Bu konuda laboratuvar sorumlunuz size bilgi verecektir.

Deneyin birinci aşamasında farklı besin kaynaklarıyla desteklenmiş minimal besiyerinde Lac<sup>+</sup> ve Lac<sup>-</sup> *E. coli* hücrelerinin  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesini belirleyerek gen ekspresyon düzeylerini belirleyeceksiniz. İkinci aşamada ise yine farklı besin ortamlarında belli bir zaman boyunca  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin ve dolayısıyla zamana bağlı ekspresyon düzeyini ve ekspresyon düzeyi ile populasyon büyüklüğü arasındaki ilişkiyi belirleyeceksiniz.

## Deneyin Amaçları

Bu deneyin tamamlanmasıyla öğrenci şunları yapabiliyor olmalıdır:

1. *Escherichia coli* hücresinde  $\beta$ -galaktosidaz enziminin sentezini nicel olarak gösteren bir deney planı yapabilme ve,
2. Bu deneyden elde edilen verileri kullanarak  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi ile bakteriyel gelişme arasındaki ilişkiyi anlatan özet bir rapor yazabilme.

### Deney için gerekli malzemeler:

- Karbon kaynağı olarak laktozda gelişebilen  $Lac^+$  *E. coli* suşu
- Zengin besiyerinde gelişen  $Lac^+$  *E. coli* suşu
- Zengin besiyerinde gelişen  $Lac^-$  *E. coli* suşu
- Zengin besiyeri (nutrien broth)
- Minimal besiyeri (Bu deneyin III. bölümünde nutrient broth ve minimal besiyeri içerikleri verilmiştir)
- 6 adet 250 ml Erlen
- 5 ml pipetler
- 1 ml pipetler
- 37°C inkübatör veya çalkalayıcı su banyosu
- Damlalıklı kaplarda toluen
- Nötral 0.25 M sodyum fosfat içinde hazırlanmış 0.013 M o-nitrofenol- $\beta$ -D-galaktopiranosid (ONPG) stoku
- 1 M  $Na_2CO_3$
- Saf su
- İki adet spektrofotometre. Biri 600 nm'de diğeri 420 nm'de ölçüm yapmak için
- Spektrofotometre küvetleri
- Yarı logaritmik grafik kağıdı

## II. İşlem

### Aşama 1: Besin kaynağı ve genotipe bağlı gen ekspresyonu

1. Deneyden bir gece önce  $Lac^+$  *E. coli* suşu ve  $Lac^-$  *E. coli* suşunun her birini nutrient broth ve laktoz eklenmiş ikişer adet 50 ml M63 minimal besiyerine ekiniz.
2. Ekim için her bir besiyerine ya öze ile orta büyüklükte birer koloni veya 10  $\mu$ l sıvı kültür ekleyiniz. Canlı kültürlerle çalışırken size gösterilen şekilde steril şartları sağlamanız gerekir. Ekim sonrasında dört farklı erlende dört farklı kültürünüz olmalı:
  - a. % 0,8 Nutrient broth içeren M63 besiyerine ekilmiş  $Lac^-$  *E. coli* kültürü,
  - b. % 1,0 Laktoz içeren M63 besiyerine ekilmiş  $Lac^-$  *E. coli* kültürü
  - c. % 0,8 Nutrient broth içeren M63 besiyerine ekilmiş  $Lac^+$  *E. coli* kültürü ve
  - d. % 1,0 Laktoz içeren M63 besiyerine ekilmiş  $Lac^+$  *E. coli* kültürü.
3. Sıvı kültürlerinizi 37°C de yüksek bir hızda (~225 rpm) karıştırarak gece boyu inkübe ediniz.
4. Ertesi gün laboratuvarında dört erlenin her birinden bir test tüpüne 1 ml kültür transfer ediniz, her birine bir damla toluen ekleyiniz ve güçlü bir şekilde çalkalayınız. Sonra enzimin substratı olarak 0.200 ml 0.013 M ONPG ekleyip karıştırarak reaksiyonu başlatınız. Bu tüpleri 20 dakikadan daha fazla olmamak üzere veya sarı bir renk görülene kadar 37°C'de inkübe ediniz. Sonra reaksiyonu 2.70 ml 1 M  $Na_2CO_3$  ekleyerek durdurunuz. 420 nm'de her bir tüpteki çözeltinin optik yoğunluğunu belirleyiniz ve



Tablo 1'in A sütununa kaydediniz. Reaksiyonun başlamasıyla ( $t_0$ ) bitişi ( $t_1$ ) arasında geçen zamanı tablodaki ilgili bölüme yazınız.

5. Her erlenden tekrar 1 ml alarak 2.70 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi ve 0.30 ml su ekleyiniz. Karıştırınız. Her bir tüpü ilgili kültür için kör tüp olarak kullanınız. 420 nm'de optik yoğunluğu belirleyerek tabloda B sütununa ekleyiniz. Sonra bu değeri ONPG içeren ilgili tüpün değerinden çıkarınız ve tabloya kaydediniz.

Tablo 1: Gen Aksiyonu ile ilgili deneye ait veri kayıtları

Kültür Şartları	Fenotip	Spektrofotometrik Ölçümler (Absorbans, $A_{420}$ )			Zaman (dk)
		A	B	Fark (A-B)	Reaksiyon süresi: ( $t_1-t_0$ )
		1 ml Deneysel 420 nm	1 ml Kontrol 420 nm		
Lac <sup>-</sup> <i>E.coli</i> suşu	% 0,8 Nutrient Broth içeren M63 Minimal Besiyeri				
	% 1 Laktoz içeren M63 Minimal Besiyeri				
Lac <sup>+</sup> <i>E.coli</i> suşu	% 0,8 Nutrient Broth içeren M63 Minimal Besiyeri				
	% 1 Laktoz içeren M63 Minimal Besiyeri				

6. Şu anda  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesini hesaplamak için hazırsınız. Sonuçları her örnekteki enzim aktivitesi olarak ifade edeceksiniz. Bir **enzim ünitesi** her dakikada 1 mmol o-nitrofenol üretecek enzim miktarı olarak tanımlanabilir. Bu deneyde kullanılan substrat ONPG'dir ve  $\beta$ -galaktosidaz enzimi tarafından o-nitrofenol oluşturacak şekilde hidroliz edilmektedir. Bu bileşik sarı renklidir ve 420 nm ışığı maksimum olarak absorbe eder. Bir milimol o-nitrofenol 420 nm'de 0.004 optik yoğunluk (absorbans) gösterdiği için spektrofotometrik okuma verileri kullanılarak oluşturulan o-nitrofenol miktarı milimol olarak belirlenebilir.

- a. Şimdi bu bilgiyi ve Tablo 1'deki verileri kullanarak Tablo 1'deki dört örneğin her birindeki o-nitrofenolün mmol miktarını bulunuz. Bilgileri aşağıdaki boşluğa kaydediniz.

1) 3)  
2) 4)

- b. Bu kadar milimol o-nitrofenol üretilmesi için gerekli zamanı bildiğinize göre dört örneğin her biri için üretilen enzim ünitesi sayısını hesaplayınız ve aşağıdaki boşluğa kaydediniz.

1) 3)  
2) 4)

- c. Basamak 4'de toluen eklenmiş *E. coli* hücreleri niçin güçlü bir şekilde çalkalanmıştır? Toluenin işlevi nedir?

## Aşama 2: Besin kaynağı, genotip ve zamana bağlı gen ekspresyonu

1. Deney başlamadan önce size 4000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek karbon kaynağı içermeyen steril minimal besiyerinde konsantre edilmiş üç adet bakteri kültürü sağlanacaktır. Bu bakteri kültürleri 600 nm'de 0.100 absorbans göstermesi için yeterli miktarda (yaklaşık 100 ml) minimal besiyeri içinde süspanse edilmiş durumdadır.
2. Her kültürü Erlenler içinde iki eşit parçaya ayırınız. Canlı kültürlerle çalışırken size gösterilen şekilde steril şartları sağlamanız gerekir.
3. Her üç kültürün bulunduğu erlenlerden birine karbon kaynağı olarak %1 son konsantrasyonda laktoz ekleyiniz. Her kültüre ait ikinci erlene ise %0.8 son konsantrasyonda nutrient broth ekleyiniz.
4. Şimdi altı erlenin her birinden 1ml örnek alınız.
  - a. 1 ml örneği spektrofotometre küvetine transfer ediniz ve 600 nm'de absorbansı okuyarak Tablo 1'in A sütununa kaydediniz.
  - b. Her erlendenden 1 ml diğer bir test tüpüne transfer ediniz, her birine bir damla toluen ekleyiniz ve güçlü bir şekilde çalkalayınız. Sonra enzimin substratı olarak 0.200 ml 0.013 M ONPG ekleyiniz. Karıştırınız. Bu tüpleri 20 dakikadan daha fazla olmamak üzere veya sarı bir renk görülene kadar 37°C'de inkübe ediniz. Reaksiyonu 2.70 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ekleyerek durdurunuz ve zamanı Tablo 1'deki ayrı sütuna kaydediniz. 420 nm'de çözeltinin optik yoğunluğunu belirleyiniz ve Tablo 1'in B sütununa kaydediniz.
  - c. Her erlendenden 1 ml alarak 2.70 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve 0.30 ml su ekleyiniz. Karıştırınız. Her bir tüpü ilgili kültür için kör tüp olarak kullanınız. 420 nm'de optik yoğunluğu belirleyerek tabloda C sütununa ekleyiniz. Sonra bu değeri ONPG içeren ilgili tüpün değerinden çıkarınız.

Tablo 1: Gen Aksiyonu ile ilgili deneye ait veri kayıtları

Başlangıç Kültür Şartları	Resüspanse edilmiş kültür	Spektrofotometrik Ölçümler (A <sub>420</sub> )				Reaksiyon Zamanı
		A	B	C	Fark (B-C)	
		1 ml 600 nm	1 ml Deneysel 420 nm	1 ml Kontrol 420 nm		
Nutrient broth'ta üretilmiş <i>Lac</i> <sup>-</sup> <i>E. coli</i> suşu	1 %1 laktoz					
	2 %0.8 nutrient broth					
Laktoz içinde üretilmiş <i>Lac</i> <sup>+</sup> <i>E. coli</i> suşu	3 %1 laktoz					
	4 %0.8 nutrient broth					
Nutrient broth'ta üretilmiş <i>Lac</i> <sup>+</sup> <i>E. coli</i> suşu	5 %1 laktoz					
	6 %0.8 nutrient broth					

5. Şu anda  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesini hesaplamak için hazırsınız. Sonuçları her örnekteki enzim aktivitesi olarak ifade edeceksiniz. Bir **enzim ünitesi** her dakikada 1 mmol o-nitrofenol üretecek enzim miktarı olarak tanımlanabilir. Bu deneyde kullanılan substrat ONPG'dir ve enzim tarafından o-nitrofenol oluşturacak şekilde hidroliz edilmektedir. Bu bileşik sarı renklidir ve 420 nm ışığı maksimum olarak absorbe eder. Bir milimol o-nitrofenol 420 nm'de 0.004 optik yoğunluk (absorbans) gösterdiği için spektrofotometrik okuma verileri kullanılarak oluşturulan o-nitrofenol miktarı milimol olarak belirlenebilir.

- a. Şimdi bu bilgiyi ve Tablo 1'deki verileri kullanarak Tablo 1'deki altı örneğin her birindeki o-nitrofenolün mmol miktarını bulunuz. Bilgileri aşağıdaki boşluğa kaydediniz.

- |    |    |
|----|----|
| 1) | 4) |
| 2) | 5) |
| 3) | 6) |

- b. Bu kadar milimol o-nitrofenol üretilmesi için gerekli zamanı bildiğinize göre altı örneğin her biri için üretilen enzim ünitesi sayısını hesaplayınız ve aşağıdaki boşluğa kaydediniz.

- |    |    |
|----|----|
| 1) | 4) |
| 2) | 5) |
| 3) | 6) |

- c. Basamak 4b'de toluen eklenmiş *E. coli* hücreleri niçin güçlü bir şekilde çalkalanmıştır? Toluenin işlevi nedir?

6. Her kültür için basamak 4'deki işlemleri 100 dakika boyunca 20 dakikada bir tekrarlayınız. Verileri Tablo 2'ye kaydediniz. Yada nutrient broth'da üretildikten sonra laktoz minimal besiyerine eklenen kültürün üssel gelişme fazına ulaşana kadar 20 dakikada bir bu işlemleri tekrarlayınız.

Ne zaman üssel gelişme fazına ulaştığınızı nasıl anlayacaksınız?

Tablo 2: Altı kültürün 100 dk boyunca 20 dakikada bir yapılan spektrofotometrik ölçümleri

Kültür	20. dk Okuması			40. dk Okuması			60. dk Okuması			80. dk Okuması			100. dk Okuması		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1															
2															
3															
4															
5															
6															

Bu okumalardan elde edilen verilerin tamamını Tablo 2'ye kaydediniz. Basamak 5'deki hesaplamaları her veri grubu için (40. 60. 80. ve 100. dakika verileri) tekrarlayınız, her bir zaman için her bir kültürün enzim aktivite miktarlarını hesaplayınız. Verileri Tablo 3'e kaydediniz.

Tablo 3: Altı kültürden her birinin farklı zaman aralıklarında sahip olduğu  $\beta$ -galaktosidaz enzim ünitesi sayıları

Kültür	Zaman (dk)				
	20	40	60	80	100
1					
2					
3					
4					
5					
6					

Her alt kültür için optik yoğunluğu logaritmik olarak grafikleyiniz. Zamana karşı gelişmeyi ve enzim aktivitesini gösteriniz. Her eğriyi belirgin şekilde çiziniz. Bu grafikler deney raporunuza eklenmelidir.

Karbon kaynağı olarak laktozda gelişen kültürlerle ait spektrofotometrik verileri kullanarak enzim aktivitesi ile gelişme hızını karşılaştırınız. Gen fonksiyonu bakımından değerlendirerek bu karşılaştırmanın kısa bir özetini yazınız:

### III. Ek Öneriler

1. *E. coli* için bir minimal besiyeri (sadece karbon kaynağı eksik) aşağıdaki gibi hazırlanabilir. Bu besiyeri M63 minimal besiyeridir.

#### 10 x M63 tuzları

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 gr
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 gr

Tuzları erittikten sonra ayrı stok olarak hazırlanmış 1 mg ml<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> çözeltisinden 5 ml ekledikten sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlayınız ve 121°C'de 15 dakika otoklavlayınız.

#### 1 x M63 minimal besiyeri

100 ml 10 x M63 tuzunu pH'sını 7.4'e ayarladıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlayarak otoklavlayınız. Otoklavdan çıktıktan sonra ayrı olarak steril lenmiş olan 1 M MgSO<sub>4</sub> stok çözeltisinden 0.100 ml ekleyiniz.

Tuz çözeltisinin pH'sını 7'ye ayarlayınız ve sonra otoklavlayınız. Tuzların çökmesi durumunda ayrı bir şekilde otoklavlanmaları tercih edilir. Uygun bir karbon kaynağı eklendiğinde bu minimal besiyeri *E. coli* hücrelerinin gelişmesini destekler. Karbon kaynağının son konsantrasyonu %1 olmalıdır.

2. *Lac*<sup>+</sup> *E. coli* hücrelerinin geliştiği ortam yukarıdaki minimal besiyeri ve %1 laktoz içermelidir.
3. Nutrient broth 8 gr nutrient broth ve 5 gr NaCl'ün 100 ml'de çözülmesiyle elde edilir.
4. Canlı kültürlerde kullanılan bütün besiyerleri ve kimyasallar steril olmalıdır.
5. Bu deney eğer iki spektrofotometre aynı anda kullanılabiliyorsa daha etkili bir şekilde yürütülebilecektir. Spektrofotometrelerden biri 600 nm'ye diğeri de 420 nm'ye ayarlanabilir. Ölçüm yapmadan önce uygun bir kör tüp kullanmayı unutmayınız.

### Kaynaklar

1. Mertens T. R. ve R. L. Hammersmith. 2001. **Genetics. Laboratory Investigations.** Prentice Hall, New Jersey.
2. Levin B. 1994. **Genes V.** Oxford University Pres, Oxford.
3. W.S.Klug ve M.R.Cummings. 2002. **Genetik Kavramlar.** Ankara, 2002.
4. Miller 1992. **A Short Course in Bacterial Genetics.** A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

## İçindekiler

<i>Escherichia coli</i> 'nin Transformasyonu .....	1
Genetik Madde: DNA İzolasyonu .....	6
Kromozomal DNA ve Plazmit DNA'sının Restriksiyon Endonükleaz Kesimi ve Agaroz Jel Elektroforezi .....	11
Plazmit DNA'sının Restriksiyon Haritalaması .....	17
Gen Ekspresyonunun Gözlenmesi: <i>Escherichia coli</i> hücrelerinde $\beta$ -Galaktosidaz Sentezi ...	21