



**T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ LABORATUVAR UYGULAMALARI



Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa ÇELİK

Doç. Dr. Müzeyyen İZMİRLİ

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÇİÇEK

Dr. Öğr. Üyesi Lutfiye ÖZPAK

Öğr. Gör. Dr. Bekir Mehmet KELLEÇİ

DÖNEM I

İÇİNDEKİLER

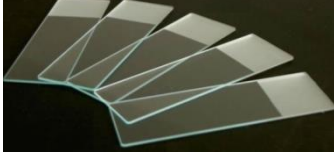
Uygulama 1: Laboratuvar Çalışma Kuralları	1
Uygulama1.1. Laboratuvar Malzemelerinin Ve Cihazlarının Tanıtımı	2
1.1.1.Laboratuvarda Kullanılan Malzemeler	2
1.1.2.Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar	6
Uygulama 2: Işık Mikroskobu ve Kullanımının Öğrenilmesi.....	10
2.1.Işık Mikroskobu.....	10
2.1.1.Mekanik Kısımın.....	10
2.1.2.Optik Kısımını Oluşturan Parçalar.....	11
Uygulama 2.1: Mikroskopik İnceleme	13
Uygulama 3: Ökaryotik Hücre	14
Uygulama 3.1. Bitkisel Hücrenin Mikroskopta İncelenmesi	14
Uygulama 3.2. Hayvansal Hücrenin Mikroskopta İncelenmesi	15
Uygulama 4.Prokaryotik Hücre.....	16
Uygulama4.1. Et Suyu Bakterilerinin İncelenmesi	16
Uygulama4.2. Yoğurt Suyu Bakterilerinin İncelenmesi	17
Uygulama 4.3. Diş Kiri Bakterisinin (<i>Borrelia buccalis</i>) İncelenmesi:	18
Uygulama 5. Kan yayma Preparatının Hazırlanması ve Kan Hücrelerinin İncelenmesi	19
Uygulama 5.1: Kandan DNA İzolasyonu	20
Uygulama 6: Nükleik Asit Analiz Yöntemleri.....	22
Uygulama 6.1. Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Yöntemle Kantitasyonu	22
Uygulama 6.2. Jel Elektroforez Yöntemi	23
Uygulama 7: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	24
Uygulama 8 : İnsan Kromozom Mikroskobisi	26

Uygulama 1: Laboratuvar Çalışma Kuralları

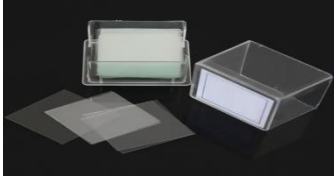
1. Laboratuvara yiyecek ve içecek getirilmesi yasaktır.
2. Laboratuvarda beyaz önlük giyilmesi zorunlu olup laboratuvar çalışması süresince önlük düğmeleri iliklenmeli ve laboratuvar uygulaması sonuna kadar çıkartılmamalıdır.
- 3 Mikroskop kullanılan laboratuvar çalışmalarında, mikroskobun taşınmasına ve kullanımına dikkat edilmelidir.
4. Kimyasal maddelere dokunmak, koklamak ve tatmak kesinlikle yasaktır.
5. Laboratuvar çalışmasının bittiğinde, deneyde kullanılan cihazlar temizlenmeli, kullanılan masaların üzeri temiz bırakılmalıdır.
6. Su muslukları, elektrik düğmeleri ve mikroskopların ışıkları çalışılmadığı durumlarda kapatılmalıdır.
7. Her çalışmadan önce ve sonra eller mutlaka yıkanmalıdır.

Uygulama1.1. Laboratuvar Malzemelerinin Ve Cihazlarının Tanıtımı

1.1.1.Laboratuvarda Kullanılan Malzemeler



1. Lam: Mikroskopta incelenecek maddelerin, üzerine konulduğu veya yayıldığı dar ve uzun yassı cam parçasıdır.



2. Lamel: Lamın üstüne konularak mikroskop altında incelenecek maddenin üzerine kapatılan kare biçiminde çok ince cam parçasıdır



3. Beher: Sıvıları muhafaza etme, hacimlerini ölçme veya çözelti hazırlama, maddelerin karıştırılması, aktarılması, ısıtılması amacıyla kullanılan cam, porselen veya plastikten yapılan silindirik biçimindeki tabanı düz kaplara denir. Sıvının kolayca akmasını sağlamak amacıyla ağız kısmı oluk şeklindedir. Isıya karşı dayanıklıdır.



4. Erlen: Çözeltileri hazırlama, çalkalama, saklama, kristalizasyon ve titrasyon gibi laboratuvar işlemlerinde kullanılan koni biçiminde tabanı düz cam malzemelerdir.



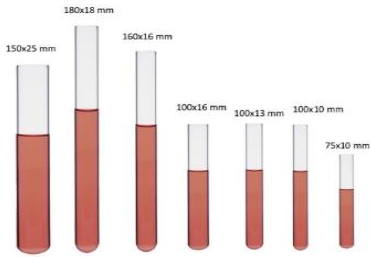
5. Mezür: Sıvı maddelerin ölçülerek kullanılması veya besiyeri ve boyaların hazırlanmasında kullanılan silindirik şeklinde cam malzemeden yapılmış üzerinde ml cinsinden bölmelerin olduğu ölçü kabıdır.



6. Balon: Bazı kimyasal reaksiyonları gerçekleştirme, çözeltileri hazırlama, ısıtma, kaynatma gibi işlemlerde ve soğutucuya takılarak çeşitli deney düzeneklerinde kullanılan iki veya üç ağızlı da olabilen cam malzemelerdir.



7. Balon joje: Sıvı hacimleri hassas olarak ölçme, belli derişimdeki çözeltileri hazırlama, titrasyon sırasında ayarlı çözelti hazırlama ve saklamada kullanılan alt kısmı yuvarlak olup, üst kısmı dar ve uzun olan cam malzemelerdir. Dar ve uzun boyun kısmında ölçü çizgisi net bir şekilde belirtilmiştir. Balon jojelerin kapakları (şilif) vardır. Balon jojenin içine konulan sıvının sıcaklığı balon jojenin üzerinde belirtilen sıcaklıkta olması gerektiğine dikkat edilmelidir.



8. Deney Tüpü: maddelerin birbirleriyle etkileşimini görmek amacıyla kullanılan ince, uzun ve silindirik biçimindeki bir tarafı açık olan cam malzemelerdir. 100 °C sıcaklığa dayanıklı olup çeşitli ebatlara sahiptirler.



9. Şale: Çalışma sırasında içerisine boya çözeltisi konularan, lamin uzun veya kısa kenarı üzerinde dik vaziyette durmasını sağlayan preparatların ayrı ayrı dizildiği belirli bölmelere ayrılmış, cam boya kaplarıdır.



10. Pipet: sıvı maddelerin istenilen ölçüde bir kaptan başka bir kaba aktarılmasında kullanılan üzerinde hacim ölçüleri bulunan cam borulardır. 1 ml, 5ml, 10ml'lik pipetler laboratuvarlarda en çok kullanılan pipetler olup çok hassas ve az miktarda sıvı hacimlerinin ölçümünde kullanılır



11. Pastör pipeti: az miktarda sıvının alınması ve başka bir kaba aktarılması için kullanılan uç kısmı ince boru şeklinde olantek kullanımlık plastik pipetlerdir.



12. Otomatik pipetler: Hassas ve çok az miktarda ölçüm (0,1-1000 μ l) yaparken kullanılan pipetlerdir. İstenilen miktarda ayarlanabilir, kolaylıkla değiştirilebilen uca sahiptir. Bir piston yardımı ile sıvı çekilip başka bir kaba boşaltılabilir. Genellikle hassas deneylerde(tıp, genetik, moleküler ve kimyasal çalışmalarda) kullanılır ve seri çalışma için kolaylıklar sağlamaktadır.

13. Mikropipet: Çok küçük hacimleri (0,01- 0,1 ml) arasındaki hacimleri aktarmak için kullanılır.



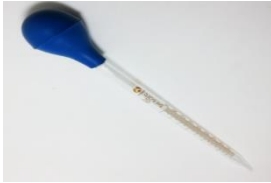
14. Puar: Cam pipetlerin ucuna takılarak sıvı çekmeye ve başka bir kaba boşaltmaya yarayan laboratuvar gerecidir.



15. Piset: Laboratuvar ortamında deneyde kullanılan tüpleri ve şişeleri yıkamak için sıkılıp fişkırtılarak kullanılan yumuşak polietilen şişelerdir. Pisetlere genellikle etanol, izopropanol, aseton, deiyonize su veya deterjan solüsyonları konulur.



16. Şişeler: katı veya sıvı maddelerin muhafaza edilmesinde kullanılan değişik hacimlere sahip saklama kaplarıdır. Işıktan etkilenen malzemeler için kahverengi şişeler kullanılır. Şişeleri kullanırken dikkat edilmesi gereken en önemli şey etiketlemedir.



17. Damlalık: Sıvı maddelerin istenilen ortama az miktarda yuvarlak damlalar halinde eklenmesi için kullanılan bir ucu kısmına kauçuktan yapılmış bir başlık, diğer ucu ise sivri, plastik ya da camdan yapılmış laboratuvar aracıdır.



18. Huni: Sıvıların veya toz halindeki katıların geniş ağızlı bir kaptan dar ağızlı bir kaba aktarılmasında ve süzme yapmada kullanılan cam veya plastik laboratuvar gereçleridir.

1.1.2.Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar



1.Mikroskop: Gözle görülemeyecek kadar küçük olan nesneleri görmemizi sağlayan mikroskop laboratuvarlarımızın başlıca cihazlarından biridir. Mikroskop ile ilgili detaylı bilgi uygulama 2 bölümünde anlatılmıştır



2. pH Metre: Sulu çözeltilerdeki H^+ ve OH^- konsantrasyonlarını logaritmik olarak ifade eden, pH değeri ölçen laboratuvar cihazıdır. pH bir maddenin asitlik bazlık (alkalinlik)derecesini ifade eder.



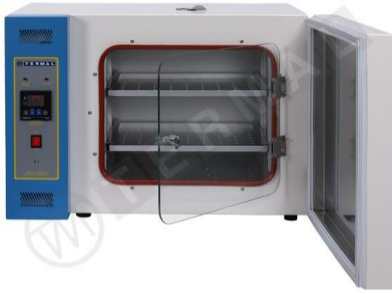
3.Santrifüj: Merkez kaç kuvveti prensibine göre çalışan santrifüj, farklı yoğunluklara sahip olan katı ve sıvı maddelerin yoğunluklarına göre birbirinden ayrılmasını sağlayan laboratuvar cihazıdır. Karışımdaki katı maddeleri sıvı olan kısımdan ayırırken çökelme prensibini kullanır. Santrifüj kullanılırken öncelikle ayrışmasını istediğimiz maddeler santrifüj tüplerinin içerisine eşit miktarda konulur daha sonra bu tüpler dengeyi sağlamak adına simetrik bir şekilde cihaza yerleştirilir. Tüpler simetrik olarak yerleştirmede takdirde cihaz çalışırken titreşim olur ve santrifüj tüplerinin içerisindeki sıvılar dökülüp cihaza zarar verebilir. Son aşamada ise cihazın hızı, santrifüj işleminin dakikası ve sıcaklığı ayarlanır ve cihaz çalıştırılır.



4.Vorteks: Küçük tüpler içerisindeki az miktarda sıvının girdap oluşturacak bir şekilde homojen karışmasını sağlayan cihazdır. Sabit bir mil üzerinde dönen tek bir döner başlığa sahip olup, döner başlığın kapatılması ile otomatik olarak çalışır.



5. Su Banyosu: Tüp, erlen ve beher benzeri kaplar içerisindeki maddelerin istenilen ısıda belirli bir süre boyunca tutulmasına, donmuş maddelerin çözünmesine veya inkübasyon işleminde kullanılan cihazdır. Zaman ve ısı ayarlı olan bu alet elektrik veya hava gazıyla ısıtılır.



6. Etüv: İnkübatör ve kuru hava sterilizatörü anlamına da gelen etüv, sıcaklığı ayarlanabilen kabin içinde belirli bir sıcaklık elde edilerek kurutma, mikrop üretme, dezenfekte, sterilizasyon, doku ve hücre kültürü çalışmaları gibi amaçlarla kullanılan, dış ortamdan iyi izole edilmiş bir cihazdır.



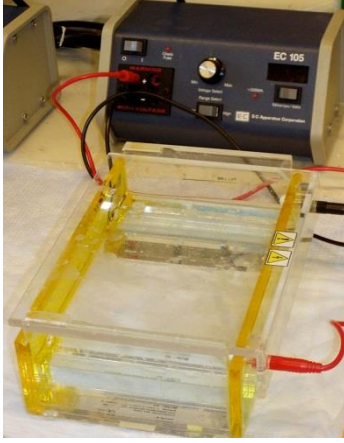
7. Hassas Terazî: laboratuvar ortamlarında ve endüstriyel sektörlerde sıkça kullanılan çok hassas ve küçük ölçüm birimlerinde tartım gerçekleştirebilen tartım cihazıdır. Bir çözelti hazırlarken veya bir maddeden istenilen ölçüde tartım yaparken kullanılan bu teraziler gram ve miligram düzeyindeki ağırlıkları ölçmede oldukça yüksek hassasiyete sahiptir.



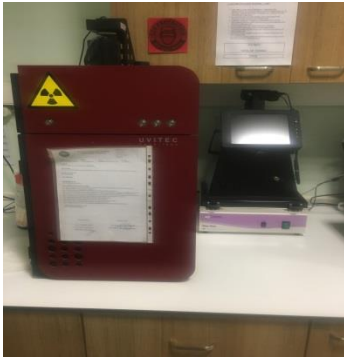
8. Laminar Flow Kabin: Biyolojik açıdan tehlikeli olmayan malzemeler üzerindeki araştırmalar, ilaç hazırlama, besiyeri plakası hazırlama, mikroorganizma ekimi, hücre ve doku kültürü araştırmaları, sitogenetik, moleküler genetik, DNA/RNA izolasyonu ve DNA/RNA ile ilgili çalışmalar, steril teçhizat ve elektronik cihaz montajı gibi steril ortamda çalışılması istenilen birçok çalışmada kullanılır. İçi steril, UV ışınları bulunan kapalı ve ya yarı açık çalışılabilen içerisinde hava sirkülasyonunda olduğu güvenlik kabinleridir. Yatay Laminar Flow kabin ve Dikey Laminar Flow kabin gibi çeşitleri vardır. Yatay Laminar flow kabin havayı bir filtreden geçirerek filtrelenmiş havayı çalışma yüzeyine ve kullanıcıya doğru yatay olarak sabit bir hızda yönlendirir. Dikey Laminar Flow kabin havayı kabinin üzerinde duran bir HEPA filtreden geçirerek filtrelenmiş havayı dikey açıyla aşağı doğru çalışma yüzeyine yönlendirir. Yatay Laminar flow kabin, Dikey kabine göre daha geniş bir çalışma alanı sağlar ve daha yüksektir



9. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Cihazı: DNA 'nın belirli bir bölgesinin primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla, Polimeraz Zincir Reaksiyonu yoluyla çoğaltılması işleminde kullanılan cihazdır. Denatürasyon, primer bağlanması (Annealing) ve yeni zincir sentezi (Polimerizasyon) olmak üzere 3 aşaması vardır. Cihaz içerisinde Pcr tüplerinin yerleştirileceği kuyucuklar bulunup aynı zamanda döngü basamakları, sıcaklık ve zaman ayarlamaları da istenilen şekilde yapılabilmektedir.



10. Jel Elektroforezi: Saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin moleküler ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında kullanılan moleküler inceleme yöntemine denir. Agaroz jel elektroforezi ve poliakrilamid jel elektroforezi gibi çeşitleri vardır. Elektroforez, elektriksel bir alanda, anot(+) ve katod(-) uçlarla belirlenmiş bölgelerde, ortamda çözünmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Molekülün ağırlığı jel üzerindeki yürüme hızını etkilemektedir. DNA ve RNA molekülleri serbest fosfat grubu içerdiği için eksi yüklü moleküllerdir bu nedenle jel elektroforezinde eksi kutuptan (katoddan), artı (anota) doğru hareket eder.



11. Jel Görüntüleme Sistemleri (UV Transülliminatör): beyaz ışık ve ultraviyole ışığı altında agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi sonrası nükleik asitlerin ve proteinlerin görüntülenmesi, miktar ve büyüklük tayini, optik dansitesi belirlememizi sağlayan cihazdır. Aynı zamanda bakteri kolonilerinin de sayılmasına imkan sağlar. Cihazdaki görüntü bir kamera aracılığı ile bilgisayara aktarılır ve görüntü bazı programlar ile analiz edilmektedir.

11.Buzdolabı: Çalışmalarda kullanılacak malzemelerin istenilen derecelerde muhafaza edilmesini sağlar. Gerekli durumlarda derin dondurucular da kullanılır.

Uygulama 2: Işıık Mikroskobu ve Kullanımının Öğrenilmesi

2.1.Işıık Mikroskobu

Işıık mikroskobu mekanik ve optik olmak üzere iki kısımdan oluşur.

2.1.1.Mekanik Kısımın

Ayak (Alt Kaide): Mikroskobun tüm parçalarını üzerinde bulundurur.

Mikroskop Kolu: Mikroskobun arka kısmında bulunur ve taşıma esnasında mikroskobun tutulmasını sağlar.

Tabla: Preparatın yerleştirildiği yerdir.

Sıkıştırma Klipsleri: Preparatın tabla üzerinde iki tarafından sabitlenmesini sağlayan maşa vazifesini gören kısımdır.

Revolver: Üzerinde objektifleri taşıyan hareketli (dönebilen) parçadır.

Mikroskop Tüpü: Mikroskop kolunun üst kısmında bulunan parçadır. Üst kısmına oküler, alt kısmına ise objektifler yerleştirilmiştir.

Ayar Vidaları: Mikroskop kolunun yan tarafında bulunur. Kaba ayar vidası (makro vida) ve ince ayar vidası (mikro vida) olmak üzere iki tiptir. Dıştaki makro vidadır ve tablayı aşağı, yukarı doğru hareket ettirir. Makro vida, arama objektifi ile objenin ilk görüntüsü bulunup netleştirmede kullanılır. Mikro vida ise makro vidanın iç kısmına geçecek şekilde yerleştirilmiştir. Görüntüyü netleştirmek için kullanılır

X ve Y Ekseni Ayar Vidaları: Tablanın ileri-geri ve sağa-sola hareket ettirilmesini sağlayan parçalardır Bu sayede preparatın farklı kısımları taranabilir.



Işık mikroskobun mekanik ve optik kısımları

2.1.2. Optik Kısımını Oluşturan Parçalar

Objektif: Revolver üzerine monte edilmiştir, Görüntünün ilk oluştuğu ve görüntü netliği ile ilgili parçadır. Bir ışık mikroskobunda genellikle 4 adet objektif bulunur. Bunlardan büyütme gücü en küçük (4X) olanına arama objektifi denir. Hazırlanan preparattaki objenin ilk görüntüsü arama objektifi ile bulunur. “4X” ifadesi bu objektifin görüntüyü 4 kez büyüttüğünü ifade eder. Bunların dışında revolver üzerinde büyütme gücü 10X, 40X ve 100X olan üç tane daha objektif bulunur. 100X lik olan merceğin kullanılmasında immersiyon yağı kullanılır.

Oküler (Göz Merceği): Tüpün üst kısmına monte edilmiş ve objektiften gelen görüntüyü büyütmeye yarar. Mikroskopta bir tane oküleri bulunursa monoküler, iki tane oküleri taşırsa binoküler adı verilir. Okülerin büyütme gücü üzerinde yazılıdır.

Mikroskop Büyütmesi: Bir mikroskobun toplam büyütme gücü oküler ve objektifin büyütme gücünün çarpımına eşittir. $MB = \text{Oküler Büyütme Gücü} \times \text{Objektif Büyütme Gücü}$, Örneğin kullandığınız mikroskobun oküleri 10X büyütme gücüne sahipse ve siz objeyi 40X’lik objektif ile inceliyorsanız, o objenin görüntüsünü 400 defa ($10X \times 40X$) büyütmüş olursunuz.

Işık Kaynağı: Mikroskop ayağına monte edilmiş ve üst kısımdaki preparata doğru ışık yansıtan parçadır.

Kondansör: Mikroskop tablasının altında bulunan ve kaynaktan gelen ışığın **preparat** üzerinde toplanmasını sağlayan mercek sisteminden oluşan parçadır.

Diyafram: Kondansörün altında bulunan ve preparata ulaşacak olan ışığın yoğunluğunu ayarlamaya yarayan parçadır.

Uygulama 2.1: Mikroskopik İnceleme

Deneyin Amacı: Çeşitli renklerde dikiş ipliği ve gazeteden kesilmiş harflerin mikroskopta incelenmesi

Gereçler: Mikroskop, lam, lamel, iplik, gazete parçası, makas

Metod: Çeşitli renklerde siyah, beyaz, kırmızı, mavi, sarı iplikleri makasla küçük parçalara bölerek lam ortasına yerleştirip lameli kapatınız en küçük objektiften başlayarak sırasıyla X4/, X10 ve X40'luk objektiflerde inceleyiniz.

Bir gazete veya dergiden küçük puntıyla yazılmış çeşitli harfler veya kelimeler kesiniz. Lamın ortasına bu harfi okunduğu şekliyle koyunuz. Lameli düzgünce kapatınız. Sırasıyla X4, X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. Gördüklerinizi yorumlayınız ve şekillerini çiziniz.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 3: Ökaryotik Hücre

Uygulama 3.1. Bitkisel Hücresinin Mikroskopta İncelenmesi

Deneyin Amacı: Soğan (*Allium cepa*) bitki hücresinin ışık mikroskobunda incelenmesi

Gereçler: Mikroskop, lam, lamel, beher, su, pastör pipeti, soğan, metilen mavisi, bistüri, kurutma kağıdı

Metod: Soğanın dış zarını soyduktan sonra küçük parçalara ayırıp etli yapraklarının dış kısmından bir parça zar alınız. Lamın üzerine pastör pipeti ile 1-2 damla su damlatınız ve aldığınız bu zarı lamın üzerine yerleştiriniz. Lamelinizi hava kabarcığı kalmayacak şekilde 45°'lik açı ile dikkatlice kapatınız. Sırasıyla X4 , X10 ve X40 'luk objektiflerde inceleyiniz. Çalışmanın ikinci aşamasında hazırlamış olduğunuz preparatınızı metilen mavisi ile boyamak için lamelin bir ucundan metilen mavisi damlatarak diğer ucundan kurutma kağıdı çekiniz. Preparatınızı sırasıyla X4, X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz ve elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 3.2. Hayvansal Hücresinin Mikroskopta İncelenmesi

Deneyin Amacı: Dil epitel hücresinin incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, tahta çubuk, metilen mavisi, pastör pipeti, kurutma kağıdı

Metod: Dilin üzeri çok tabakalı yassı epitel hücreleri ile kaplıdır. Dilin epitel hücrelerini elde etmek için tahta çubuğu dilinizin üzerine arkadan öne doğru hafifçe sürünüz. Bu şekilde dil epitelinden alınan hücreler, bir miktar tükürük ile tahta çubuğun kenarında toplanır. Bundan sonra tahta çubuğun ıslak tarafını lam üzerine sürünüz ve üzerini lameli dikkatlice ile kapatınız.(Lam üzerine az miktarda su ekleyebilirsiniz.). Epitel hücrelerini, hücrelerin çekirdeklerini ve sitoplazmasını görmeye çalışınız. Hazırladığınız bu preparatı boyasız inceledikten sonra metilen mavisi ile boyayarak tekrar mikroskopta inceleyiniz. Gördüklerinizi çiziniz.

Boyama işlemi: Boya bir taraftan lam ve lamel arasına pastör pipeti ile damlatılırken, diğer taraftan kurutma kağıdı ile çekilerek boyama gerçekleştirilir.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 4.Prokaryotik Hücre

Uygulama4.1. Et Suyu Bakterilerinin İncelenmesi

Deneyin amacı: Et suyunda bulunan bakterilerin ışık mikroskobu altında incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, et suyu, pastör pipeti, kurutma kağıdı

Metod: Et suyunda bakterilerin oluşumunu görmek için ilk olarak et suyunu oda sıcaklığında 5 ila 7 gün arasında bekletiniz. Mikroskobu açınız, lam üzerine bekletilmiş olan et suyundan pastör pipeti ile bir iki damla damlatınız ve 45⁰'lik açı ile lameli dikkatlice üzerine kapatınız. İlk olarak X4 objektifinde görmek istenilen alanı bulunuz ve sonra X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X10 ve X40 objektiflerde elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama4.2. Yoğurt Suyu Bakterilerinin İncelenmesi

Deneyin amacı: Yoğurt suyunda bulunan bakterilerin ışık mikroskobu altında incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, yoğurt suyu, pastör pipeti, kurutma kağıdı

Metod: Yoğurt suyundaki bakterilerin oluşumunu görmek için ilk olarak yoğurt suyunu oda sıcaklığında 5 ila 7 gün arasında bekletiniz. Mikroskobu açınız, lam üzerine bekletilmiş olan yoğurt suyundan pastör pipeti ile bir iki damla damlatınız ve 45⁰'lik açı ile lameli dikkatlice üzerine kapatınız. İlk olarak X4 objektifinde görmek istenilen alanı bulunuz ve sonra X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X10 ve X40 objektiflerde elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 4.3. Diş Kiri Bakterisinin (*Borrelia buccalis*) İncelenmesi:

Deneyin amacı: Diş kirinde yaşayan bakterilerin ışık mikroskobu altında incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, diş kiri, kürdan, kurutma kağıdı, pastör pipeti, steril su

Metod: Diş kirinde yaşayan bu bakteriyi incelemek için temiz bir kürdan yardımı ile diş kirinizi kazıyarak lam üzerine bırakınız. Bıraktığınız diş kiri üzerine pastör pipeti ile bir damla su ekleyerek yayınız. 45⁰'lik açı ile lameli dikkatlice üzerine kapatınız. İlk olarak X4 objektifinde görmek istenilen alanı bulunuz ve sonra X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X10 ve X40 objektiflerde elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz. Mikroskopta görülen eğilip kıvrılabilen çomaklar şeklindeki yapılar diş kiri bakterileridir.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

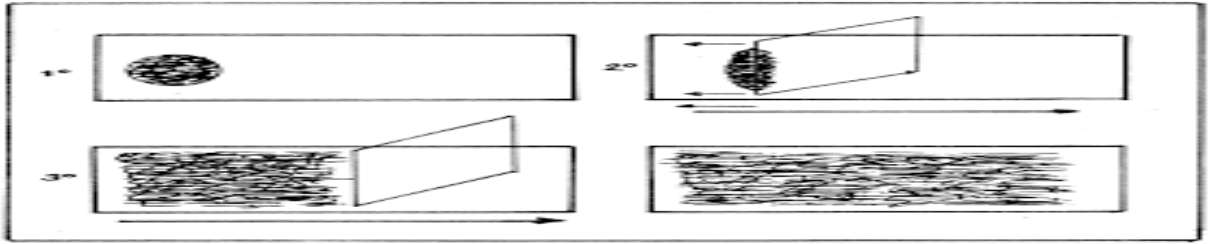
Uygulama 5. Kan yayma Preparatının Hazırlanması ve Kan Hücrelerinin İncelenmesi

Deneyin Amacı: Bu deneyimiz de yayma preparatı hazırlamayı ve aynı zamanda kanda bulunan hücre çeşitlerini göreceğiz.

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, kan örneği, saf su, metanol boyası, giemsa boyası, kanada balması

Metod: kan örneğinin alınacağı pamağınızı antiseptikli pamuk ile temizleyiniz. Steril kan lansetini parmağınıza batırınız ve daha önceden temizlenmiş lamın bir kenarına bir damla kan damlatınız. İkinci bir lamı 45°'lik açı ile hemen kan damlasının önüne yerleştiriniz. Bu açı korunarak hızlı bir şekilde lam çekilip kanın yayılması sağlanır. Böylece geride ince bir kan tabakası yayılarak preparat (kan froti) hazırlanmış olur. Lam üzerindeki kanın kuruması için kısa bir süre bekletiniz ve bu yayma preparatını mikroskopta inceleyiniz.

Kan hücrelerinin boyanarak incelenmesi; kuruma işleminden sonra lam üzerine metanol damlatınız ve 5 dk bekletiniz. Saf su ile yıkama yapınız ve yıkama işleminden sonra giemsa boyası damlatınız ve 15-20 dk bekletiniz. Boya fazlası saf su ile yıkayınız ve preparatı kurutunuz. Üzerine 45°'lik açı ile lamel koyunuz. Bu işlem sonrasında inceleme yapmak için mikroskoba geçiniz.



Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 5.1: Kandan DNA İzolasyonu

Canlı hücrelerde tüm özelliklerin kuşaktan kuşağa aktarılması genler aracılığı ile olur. Genler, kromozom üzerinde lokalize olmuş bir veya daha fazla nükleotidden oluşan parçacıklardır. Hücrelerdeki genetik, fizyolojik, biyokimyasal vb. olayların tamamını yöneten, genetik bilginin kuşaktan kuşağa aktarılmasını sağlayan DNA molekülüdür. Deoksiribonükleik asit olarak adlandırılan DNA molekülü, 5 karbonlu şeker, bir fosfat grubu ve pürin veya pirimidin olarak adlandırılan organik bazların birleşiminden oluşan, nükleotidlerden meydana gelir. Pürinler, Adenin (A) ve Guanin (G) ; primidinler ise Sitozin (C) ve Timin (T) bazlarıdır. Bazların bağlanması özgün olup her zaman bir pürin bir primidinle eşleşir. Bu eşleşmede daima Adenin(A) Timinle(T), Guanin(G) ise Sitozin(C) ile eşleşmektedir. DNA hücre içerisinde serbest halde bulunmamakla birlikte, büyük bir kısmı çekirdekte, bir kısmı ise mitokondride bulunmaktadır. Bitki hücrelerinde ise DNA kloroplastta bulunur.

Deneyin amacı: Kandan DNA elde etmek

Gereçler: Santrifüj, etüv, vorteks, steril tüp, ependorf tüpü, pipet, kurutma kağıdı, buz kalıpları, lizis tamponu, bidistile H₂O, SDS, proteinaz-K, NaCl, kloroform/izoamil alkol, etil alkol

Metod: 10 ml'lik steril bir tüpe 1 ml 5X lizis tamponu, üzerine 3 ml bidistile H₂O konup pipetle homojen hale getirdikten sonra bu karışıma 1 ml EDTA' lı tam kan ilave ederek tüpün kapağını kapatınız ve alt-üst ederek homojen karışım elde ediniz. Karışımı buz içinde 10 dk inkübe ediniz. Sonrasında +4°C'de 4000 rpm' de santrifüj ediniz ve üst sıvıyı uzaklaştırınız. Dipte kalan çözelti üzerine 2 ml bidistile H₂O ve 0.5 ml 5X lizis tamponu koyunuz ve pipetleme yaparak tüpün dibindeki çökeltiyi tamamen dağıtarak homojen arışım elde ediniz. Sonrasında +4°C'de 4000 rpm' de 10 dk santrifüj ediniz ve üst sıvıyı uzaklaştırınız. Çökelti üzerine 1ml %10 SDS ve 20 mg/ml' lik proteinaz-K' dan 2.5 µl koyup köpük oluşturmada iyice pipetleme yaparak çözeltiyi tamamen dağıtınız. Bu çözeltiyi 65°C' ye ayarlı etüvde arada bir hafifçe karıştırarak 15 dk inkübe ediniz. Karışım 10 ml'lik tüpten 2 ml 'lik ependorf tüpe aktarılarak buz içinde 5 dk inkübe ediniz. Bu süre sonunda 300 µl sature (6 N) NaCl ilave ettikten sonra tüp bir vorteks yardımıyla iyice çalkalayarak beyaz görümlü içeriği homojen hale getiriniz. Buz içinde 5 dk bekletiniz ve sonra +4 °C'de 13.000 rpm' de 10 dk santrifüj ediniz. Üst sıvıyı 2 ml'lik steril bir ependorf tüpe aktarınız. Bu tüpe 0.5 ml, 24:1 kloroform/izoamil alkol karışımı koyunuz ve tüpü iyice çalkalayarak karışımı homojen hale getiriniz. Bu işlem sonrasında tekrardan +4 °C' de 13.000 rpm' de 2 dk santrifüj ediniz.

Santrifüj sonrası üst sıvıyı dikkatli bir şekilde 2 ml' lik steril bir ependorf tüpe aktarınız. Tüpe 1 ml %99.5' lik etil alkol koyarak tüpü 8-10 kez yavaşça baş-aşağı çevirip DNA' nın presipite olması sağlayınız. Bu aşamada DNA yumak şeklinde görülecektir. +4 °C' de 13.000 rpm' de 10 dk santrifüj ettikten sonra presipite olmuş DNA çöktürülmüş olur. Daha sonra tüpü ters çevirerek alkolü uzaklaştırınız. Tüpe 1 ml %70 etil alkol koyunuz ve tüpü alt-üst ediniz son olarak +4 °C' de 13.000 rpm' de 5 dk santrifüj ediniz sonra tüpü ters çevirerek alkolü uzaklaştırınız. Tüpün ağzı baş aşağı gelecek şekilde bir kurutma kağıdı üzerine koyarak alkolün tamamen uzaklaşması için 15 dk. bekletiniz. Tüpe 200 µl steril bidistile H₂O koyunuz ve DNA' nın tamamen çözünmesi ve DNaz aktivitesinin ortadan kaldırılması için 75 °C' de 10 dk bekletiniz. Böylelikle DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olur.

Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 6: Nükleik Asit Analiz Yöntemleri

Uygulama 6.1. Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Yöntemle Kantitasyonu

Deneyin Amacı: Nükleik Asitlerin Spektrofotometrik Yöntemle saflık ve konsantrasyonun belirlenmesi

Gereçler: Spektrofotometre, pipet, steril bidistile H₂O, quartz tüp, DNA

Metod: DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra DNA'nın mikrogram ve nanogram cinsinden miktarını belirlemede spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Absorbsiyon temelli olan bu yöntemde, izole edilen DNA'nın konsantrasyonunun belirlemek için ışığın çözelti içerisindeki iletirme oranı kullanılır. Konsantrasyon ölçümü için ml hacimli iki adet quartz tüp alınız. Bunlardan blank olarak kullanılacak tüpe 1000 µl, ikinci tüpe ise 990 µl steril bidistile H₂O koyunuz. İkinci tüpe elde edilen genomik DNA 'dan 10 µl koyup iyice pipetleme yapınız ve homojen hale getiriniz. Her iki tüpüde spektrofotometre de sırasıyla 260 ve 280 nm dalga boyunda ayrı ayrı okuduktan sonra DNA konsantrasyonunu ve DNA saflığını aşağıdaki formülle hesaplayınız.

DNA konsantrasyonu hesaplaması:

DNA konsantrasyonu = Absorbans (ABS)₂₆₀ * Sulandırma Katsayısı* (50/1000)

Örneğin: 260 absorbans değerini spektrofotometrede 0.09 okudunuz. Bu durumda konsantrasyon hesaplaması şu şekilde olacaktır:

DNA konsantrasyonu= 0.09*100*50/1000= 0.45 µg/µl (450 ng/ µl)

DNA saflığının ölçülmesi:

DNA saflığı= Absorbans (ABS)₂₆₀/ Absorbans (ABS)₂₈₀ şeklinde hesaplaması yapılır.

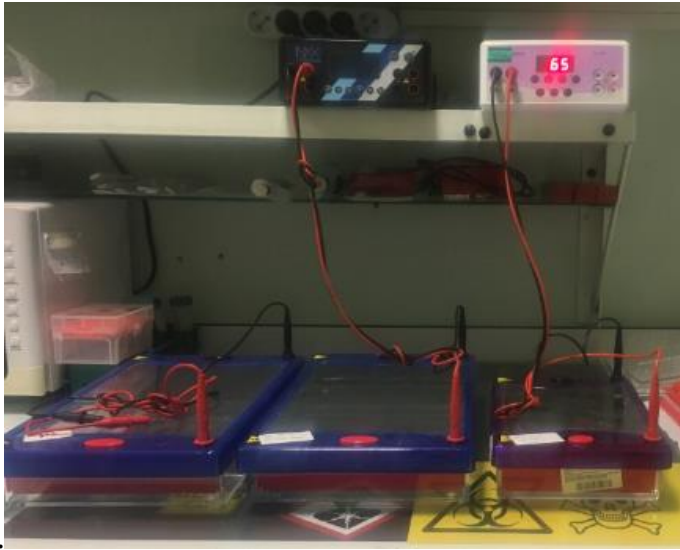
DNA saflığı ((ABS)₂₆₀/ (ABS)₂₈₀) 1.8 – 2.0 aralığında bir değer olmalıdır. Bu aralığın dışında olan DNA saflıkları çalışmalar için net sonuç elde etmemizi zorlaştırır. Örneğin bu oran 1.5 in altında çıkarsa protein fazlalığından dolayı, 2.0' ın üzerinde çıkarsa RNA fazlalığından dolayı PCR çalışmalarında problem teşkil edecektir.

Uygulama 6.2. Jel Elektroforez Yöntemi

Deneyin Amacı: PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde incelenmesi

Gereçler: Isıtıcı, Elektroforez sistemi, Erlenmayer, agaroz, TBE, ethidiumbromid, DNA markır, PCR ürünü

Metod: 2.1 g agaroz tartarak 250 ml'lik bir erlenmayere koyun ve 140 ml 1X TBE tamponu ekleyip (%1.5 lik agaroz) ve 25 mg/ml'lik ethidiumbromid'den 4 µl ilave ediniz. Hotplate (ısıtıcı) üzerinde kaynatınız. Yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına döküp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletiniz. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştiriniz. Jel donduktan sonra tarakları dikkatlice çıkartarak jel kabı elektroforez tankına yerleştiriniz. Jeldeki açılmış olan kuyucuklara 10'ar µl miktarlarda sırasıyla DNA marker (pUC19/Mspl) ve PCR ürünleri aplike ediniz. Jele elektrik akımı (60 Volt/cm) vererek 15 dk. elektroforez yapınız. Oluşan bantları jel görüntüleme sisteminde inceleyiniz Agaroz jel elektroforezi tankları ve güç kaynakları aşağıdaki resimde gösterilmektedir.



Sonuç ve yorumlar:

Çizim:

Uygulama 7: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Deneyin Amacı: Polimeraz Zincir Reaksiyon karışımı hazırlama, PCR Cihazını kullanma

Gereçler ve Metod : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) için gerekli olan malzemeler, kullanılacak miktarlar ve final konsantrasyonları aşağıdaki tabloda verilmiştir. Bu tablo sadece bir örnek için olup örnek sayınıza göre uygulama yapabilirsiniz.

Reaksiyon Karışımı	Kullanılacak Miktar(μl)	Final Konsantrasyon
10X PCR Buffer(S)	2.5	1X
Forward Primer(5pmol/μl)	1	5pmol
Reverse Primer(5pmol/μl)	1	5pmol
MgCl ₂ (50mM)	1.5	1.5mM
DeoksiNTPs (25 mM)	0.5	0.25mM
Genomik DNA (50 ng/μl)	1	50ng
Taq DNA polimeraz (5 U/μl)	0.2	1U
Steril bidistile su	17.3	
Toplam Hacim	25μl	

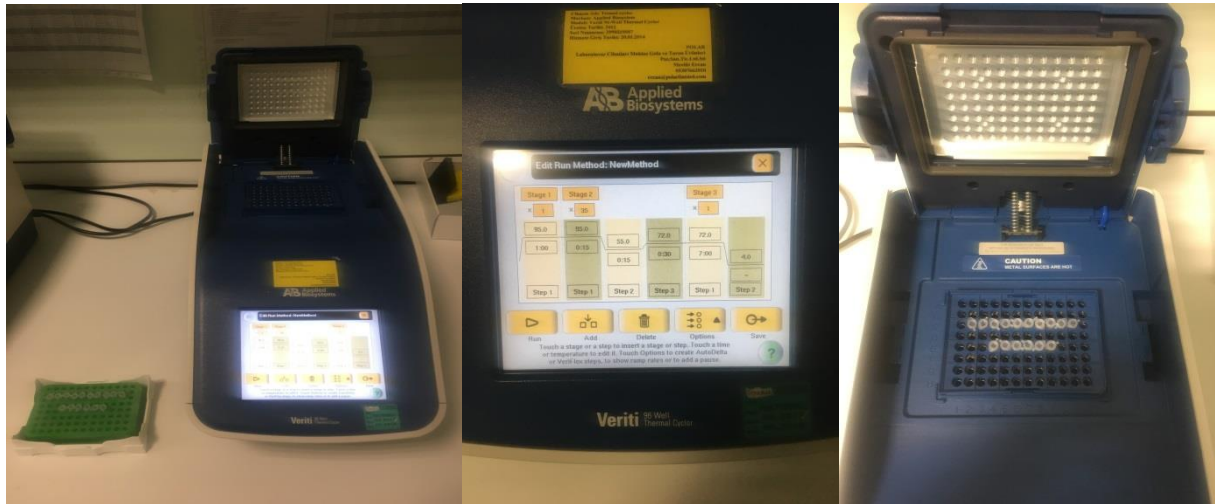
Tablo1: PCR reaksiyon karışımı

PCR karışımı Laminar Flow Kabinde hazırlanacaktır. Gerekli olan diğer malzemeler ise otomatik pipet, mikropipet, pipet uçları, buz aküsü, vorteks, steril tüp, ependorf tüpüdür. Kabinde çalışma yaparken herhangi bir kontaminasyon tehlikesiyle karşılaşmamak için kabini kullanmadan önce ve kullandıktan sonra %70' lik etik alkol ile temizleyiniz. Kabin içerisinde açılmış, kullanılmış ve etiketi bulunmayan hiçbir maddeyi kullanmayınız. Kullanılan malzemelerin steril olduğundan emin olunuz. Çalışmaya başlamadan önce mutlaka ellerinizi yıkayıp steril çalışma eldiveni takınız.

PCR karışımını hazırladıktan sonra iyice vorteks yapıp, PCR'ınızı aşağıda verilen amplifikasyon sıcaklık ve sürelerine göre ayarlayınız ve cihazı çalıştırınız. PCR sonucunu yorumlamak için Agaroz Jel Elektroforezine yükleme yapınız. PCR cihazı, programı ve hazırlanıp PCR' a yüklenen karışımlar aşağıda fotoğrafta gösterilmiştir.

Reaksiyon Aşaması	İlk Denatürasyon	Denatürasyon	Primer Bağlanması (Annealing)	Zincir Uzaması (Extension)	Son Uzatma (final extension)
Döngü Sayısı	(1 defa)	(24 defa)			(1 defa)
Sıcaklık	94.0 °C	94.0 °C	68.0 °C	72:00°C	72.0 °C
Süre	7:00dk	0:30dk	0:40dk	0:50dk	5:00dk

Tablo 2: PCR programı



Sonuç ve yorumlar:

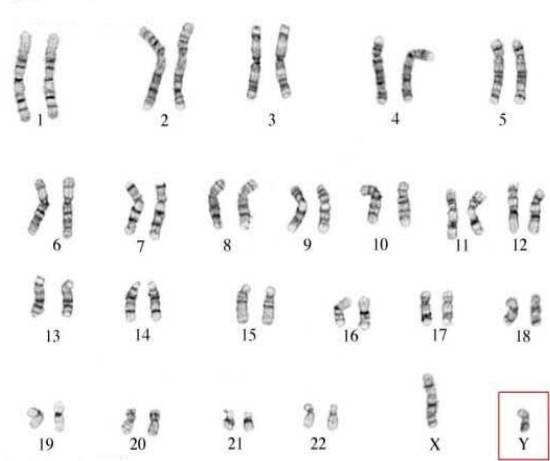
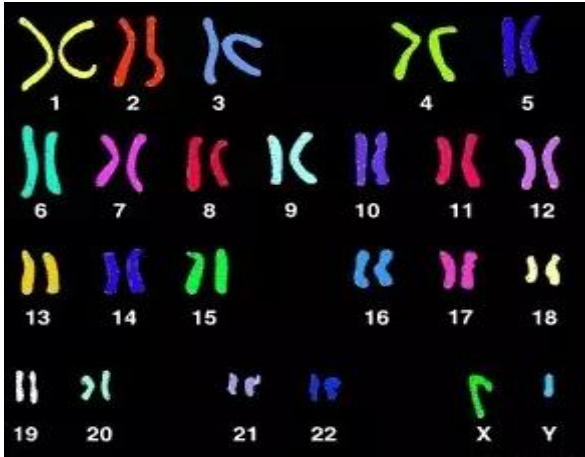
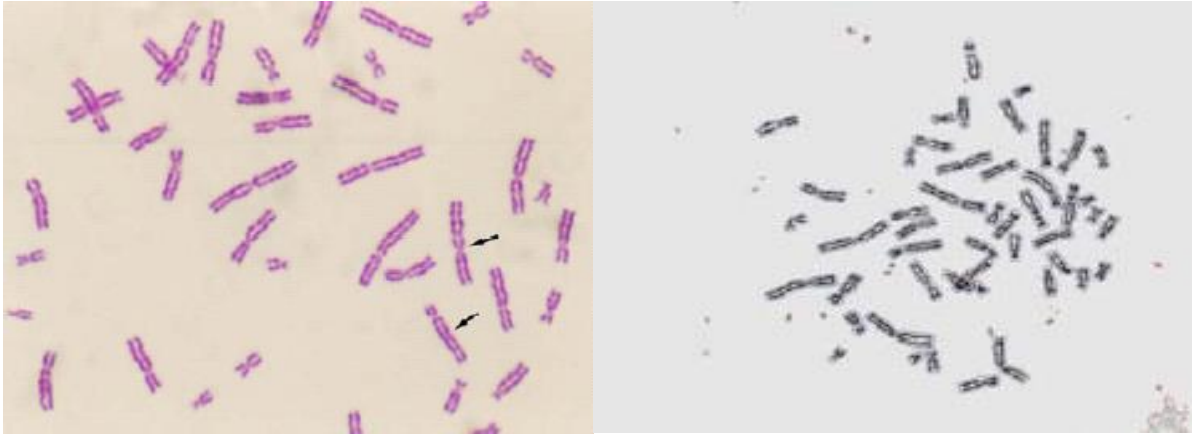
Çizim:

Uygulama 8 : İnsan Kromozom Mikroskopisi

Deneyin Amacı: İnsan kromozom karyotipinin ışık mikroskobu altında incelenmesi

Gereçler: Mikroskop, hazır insan kromozom preparatı

Metod: Önceden hazırlanmış olan insan kromozom mikroskobisi preparatını mikroskoba mikroskoba yerleştiriniz. İlk olarak X4'lük objektifte görüntüyü ve yerini tayin ediniz sonrasında sırasıyla X10 ve X40'lık objektiflerde inceleme yapınız. Hazır preparattan insan kromozom karyotipi görüntüleri aşağıdaki fotoğraflardaki gibi olacaktır. Sizde elde ettiğiniz görüntüyü yorumlarken çiziniz.



Sonuç ve yorumlar:

Çizim: