

TEMEL ve İLERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÖNTEMLERİ

GENOMİK ve PROTEOMİK ANALİZLER

2. BASKI

EDİTÖRLER

PROF. DR. GÜLER TEMİZKAN

İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

PROF. DR. NAZLI ARDA

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği
Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM)

NOBEL TIP KİTABEVLERİ

© 2021 Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti.

**TEMEL ve İLERİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÖNTEMLERİ
GENOMİK ve PROTEOMİK ANALİZLER**

2. BASKI

Editörler

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN

Prof. Dr. Nazlı ARDA

1. Baskı: Aralık 2017

ISBN: 978-605-335-362-1

5846 ve 2936 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri yasası hükümleri gereğince herhangi bir bölümü, resmi veya yazısı, yazarların ve yayıncısının yazılı izni alınmadan tekrarlanamaz, basılamaz, kopyası çıkarılamaz, fotokopisi alınamaz veya kopya anlamı taşıyabilecek hiçbir işlem yapılamaz.



NOBEL TIP KİTABEVLERİ TİC. LTD. ŞTİ.

www.nobeltip.com

Millet Cad. No: 111 Çapa-İstanbul

Tel : (0212) 632 83 33

Faks : (0212) 587 02 17

DAĞITIM

Tel : (0212) 771 52 11 - (0212) 771 33 09

Faks: (0212) 771 52 03 - (0212) 771 06 18

Yayımcı : Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti.
Millet Cad. No:111 34104 Fatih-İstanbul

Yayımcı Sertifika No : 50192

Baskı / Cilt : No-bel Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti.
Akçaburgaz Cad. No: 24/1
Esenyurt-İstanbul

Matbaa Sertifika No : 46069

Sayfa Tasarımı - Düzenleme : Hakkı Çakır

Kapak Tasarımı : Hakkı Çakır

Baskı Tarihi : Mayıs 2021- İstanbul

Bu kitabımızı, COVID-19 ile savaşta kahramanca görev alarak yaşamlarını yitirmiş olanlar ile fedakarca m¼cadeleyi s¼rd¼ren t¼m sağlık çalışanlarımıza ve tanı laboratuvarlarında yaptıkları analizlerle onlara destek veren molek¼ler biyologlarımıza ithaf ediyoruz.

2. BASKININ ÖNSÖZÜ



Alanlarında uzman bilim insanları tarafından geniş kapsamlı ve ayrıntılı şekilde yazılmış olan ve yazarların kendi araştırmalarında uyguladıkları yöntem örnekleriyle dolu kitabımızın ilk baskısının oldukça kısa sürede tükenmiş olması editörler ve yazarlar olarak bizleri çok mutlu etti. Bu ilgi ülkemizde moleküler biyoloji alanında teorik ve uygulamalı Türkçe telif yayınların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, son bir yıldır yaşamlarımızı değiştiren pandemi nedeniyle okullarımızdan ve laboratuvarlarımızdan biraz uzakta kalmış olmamıza rağmen kitabın bu kadar hızlı tükenmesi, moleküler tekniklere duyulan ilginin giderek arttığının da bir göstergesini oluşturmaktadır. Her gün bir yenisi keşfedilen biyomoleküllerle doğayı daha iyi kavramak, hastalıkları daha çabuk teşhis ve tedavi etmek, yaşam kalitesini yükseltecek yeni biyoteknolojik ürünler geliştirmek isteyen genç araştırmacıların sayısındaki bu artış sevincimizi ve geleceğe ilişkin umutlarımızı daha da artırıyor.

Kitaba katkı sağlayan tüm yazarlarımıza; redaksiyon aşamasında destek olan öğrencilerimize; kitabın özenle baskıya hazırlanmasını sağlayan Hakkı ÇAKIR'a; yeniden basım sürecinde her zaman yanımızda olan Erol BİROğLU'na ve emeği geçen tüm Nobel Tıp Kitabevleri çalışanlarına çok teşekkür ederiz.

İlk baskıdaki gözden kaçmış küçük yazım hatalarını düzelterek sunduğumuz bu baskının da okuyucularına yarar sağlaması ve çalışmalarında yol göstermesi dileğiyle.

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN
Prof. Dr. Nazlı ARDA
Nisan 2021

1. BASKININ ÖNSÖZÜ



Daha önce Nobel Tıp Kitabevleri tarafından yayımlanan ve alanındaki uygulamalara ilişkin kapsamlı teorik ve pratik bilgiler veren “*Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*” adlı kitabımız araştırmacıların gösterdikleri yoğun ilgi nedeniyle üç baskı yaptıktan sonra hızla tükenmişti. Kitabın yeni baskısını çıkarmayı düşündüğümüzde, ilk baskısını yaptığımızdan bu yana moleküler biyoloji ve biyoteknolojide baş döndürücü bir hızla artan bilgi birikimi ve sürekli geliştirilen yeni yöntemler bizi zorunlu olarak daha geniş kapsamlı bir kitap hazırlamaya yöneltti. Bu amaçla, ilk kitabımızda var olan bölümlerin içeriğini zenginleştirmenin yanı sıra yazar sayısını da artırarak yeni ve güncel konular ekledik. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemlerin hepsini bir kitap içerisinde toplamak kuşkusuz mümkün olmamakla birlikte, bu yeni eserde özellikle rekombinant DNA teknolojisi, genom ve proteom analizleri, omik teknolojiler ve biyoenformatiğe ait temel teorik bilgileri ve uygulama örneklerini sunmaya çalıştık. Ortaya çıkan bu eser, her biri alanlarında uzman bilim insanları tarafından yazılmış 37 bölümden oluşmakta olup moleküler biyolojide kullanılan klasikleşmiş ve yeni yöntemlere ilişkin teorik bilgiler ile birçoğu yazarları tarafından da laboratuvarında uygulanmakta olan teknikleri ve deneyimleri kapsamaktadır. Bu nedenle neyi niçin yaptığını bilmek isteyen araştırmacılar için iyi bir kaynak olacağını ve özellikle uygulama örneklerinde yer alan ipuçlarıyla da kullanıcılara pratikte yarar sağlayacağını düşünüyoruz.

Gerek teknik bilgi birikiminin oluşum sürecinde çalışmalarıyla, gerekse kitabın hazırlanmasında yardımlarıyla destek olan araştırma görevlilerine ve lisansüstü öğrencilerine teşekkür ederiz. Aynı şekilde, basım ve yayım sürecinde her zaman yanımızda olan Nobel Tıp Kitabevleri’ne, oldukça uzun süren hazırlık sırasında yazım işlemlerini hiç yorulmadan, büyük bir titizlik, sabır ve güler yüzlülikle gerçekleştiren Hakkı ÇAKIR’a teşekkürü borç biliriz.

Bu eserin de moleküler biyolojiye ilgi duyan ve bu güncel bilim dalının kapsadığı çeşitli konularda çalışan araştırmacıların, ilgili alanlarda öğrenim gören lisans ve lisansüstü öğrencilerinin zevkle okuyup yararlanacağı bir başvuru kitabı olmasını dileriz.

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN
Prof. Dr. Nazlı ARDA
Aralık 2017

İÇİNDEKİLER



1. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemlere Genel Bakış	1
<i>Güler TEMİZKAN</i>	
1.1. Parçalama (Homojenizasyon) Yöntemleri	3
1.1.1. Fiziksel Yöntemler	5
1.1.2. Kimyasal Yöntemler	6
1.2. Ayırma, Saflaştırma ve Analiz Yöntemleri	7
1.2.1. Süzme	7
1.2.2. Diyaliz	7
1.2.3. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)	9
1.2.4. Çöktürme	10
1.2.5. Enzim Uygulaması	10
1.2.6. Santrifüjleme	10
1.2.7. Kromatografi	18
1.2.8. Elektroforez	26
1.2.9. Spektral Yöntemler	33
1.2.10. Radyoizotopların Kullanımı	39
1.2.11. İmmünolojik Yöntemler	42
1.2.12. Nükleik Asit Melezlemesi	43
1.2.13. Mikroskopik Yöntemler	43
1.2.14. Yapı Analizleri	49
1.2.15. İşlev Analizleri	55
1.2.16. Moleküler Etkileşim Analizleri	56
1.3. Biyoenformatik	66

NÜKLEİK ASİTLERİN İZOLASYON ve ANALİZİ 69

2. Güncel Organizmalardan DNA İzolasyonu	71
<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
2.1. Bakterilerden Genom (Kromozom) DNA'sı İzolasyonu	73
2.2. Bakteriyofaj DNA'sı İzolasyonu	74
2.3. Mayalardan Kromozom DNA'sı İzolasyonu	75
2.4. Memelilerden Kromozom DNA'sı İzolasyonu	78
2.4.1. Kan Hücrelerinden DNA İzolasyonu	78
2.4.2. Ağız Mukozasından Genomik DNA İzolasyonu	79
2.5. Bitkilerden DNA İzolasyonu	79
2.6. Plazmid DNA'sı İzolasyonu	80
2.7. Mitokondri DNA'sı İzolasyonu	81

3.	Fosillerden DNA İzolasyonu	83
	<i>Ercan ARICAN</i>	
	3.1. Fosiller ve Antik DNA.	83
	3.2. Arkeolojide Kullanılan Diğer Biyolojik Moleküller	85
4.	Kriminal Örneklerden DNA İzolasyonu	87
	<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
5.	Maternal Kandan Hücre Dışı Serbest Fetal DNA İzolasyonu	91
	<i>Tuba GÜNEL</i>	
6.	DNA Replikasyon Kinetiği Analizi	93
	<i>Cenk KIĞ</i>	
7.	DNA Hasarları ve Tayin Yöntemleri	103
	<i>Melek ÖZTÜRK, Matem TUNÇDEMİR</i>	
	7.1. TUNEL Yöntemi	103
	7.2. Komet Yöntemi (Tek Hücre Jel Elektroforezi).	109
8.	Total RNA ve mRNA İzolasyonu	113
	<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
	8.1. Gram (-) Bakterilerden Total RNA İzolasyonu	114
	8.2. Gram (+) Bakterilerden Total RNA İzolasyonu	115
	8.3. Mayalardan Total RNA İzolasyonu	116
	8.3.1. Cam Boncuk Kullanarak Yapılan RNA İzolasyonu	116
	8.3.2. Cam Boncuk Kullanmadan Hızlı ve Basit RNA İzolasyonu	117
	8.4. Memeli Dokularından Total RNA İzolasyonu	117
	8.5. Bitkilerden Total RNA İzolasyonu.	118
	8.6. Mitokondri RNA'sı İzolasyonu.	119
	8.7. mRNA İzolasyonu.	120
9.	siRNA ve miRNA İzolasyonu	123
	<i>Tuba GÜNEL</i>	
10.	Nükleik Asitlerin Analizi	127
	<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
	10.1. Spektral Analiz	127
	10.1.1. UV-Spektrofotometrik Yöntem	127
	10.1.2. Floresans Temelli Yöntem	128
	10.2. Kromatografik Yöntemler	128
	10.3. Elektroforetik Yöntemler.	129
	10.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi	129
	10.3.2. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi	130
	10.3.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.	131
	10.3.4. Kapiler Elektroforez.	132
	10.3.5. RNA'nın Elektroforetik Analizi.	132

11. Nükleik Asitlerin İşaretlenmesi	139
<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
11.1. Radyoaktif İşaretleme	139
11.2. Enzimatik İşaretleme	140
11.3. Floresan İşaretleme	142
12. Nükleik Asit Melezleme Yöntemleri	145
<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
12.1. Nükleik Asit Melezlemesinin İlkeleri	146
12.2. Nokta Damgalamasıyla Melezleme	147
12.3. Southern Damgalamasıyla Melezleme	147
12.4. Northern Damgalamasıyla Melezleme	148
12.A. Southern Melezleme: HyHel 10 ScFv Geninin Prob Olarak İşaretlenmesi ve Belirlenmesi	149
<i>Şule ARI</i>	
12.B. Northern Melezleme: Genel Uygulama Örneği	157
<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
13. In situ Melezleme	161
<i>Selma YILMAZER, Melek ÖZTÜRK, Fatma KAYA DAĞISTANLI</i>	
13.1. ISH İçin Biyolojik Materyal Hazırlama	162
13.1.1. Dokunun Sabitlenmesi (Fiksasyonu)	162
13.1.2. Lamaların Hazırlanması	163
13.1.3. Kesit Alma	163
13.1.4. Bütün Halinde Hazırlanan Preparatlar	163
13.1.5. Materyale Uygulanan Ön İşlemler	164
13.2. Denatürasyon, Melezleme ve Yıkamalar	164
13.2.1. Melezleme Öncesi (Prehibridizasyon) İşlemleri	164
13.2.2. Denatürasyon	165
13.2.3. Melezleme (Hibridizasyon)	165
13.2.4. Melezlenme Sonrası (Posthibridizasyon) Yıkamaları	165
13.3. In situ Melezleme Bölgelerinin Saptanması	166
13.4. In situ Melezleme Problemlerinin Seçimi	169
13.4.1. Prob Tipleri	169
13.4.2. Prob Uzunluğu	170
13.4.3. Probu İşaretlenmesi	170
13.5. In situ Melezlemede Kontrol	172
13.6. In situ Melezlemede Ortaya Çıkan Sorunlar ve Çözümleri	173
14. DNA/DNA in situ Melezleme: Kromozomlarda Floresan in situ Melezleme (FISH) Yöntemi	179
<i>Selma YILMAZER, R. Dilhan KURU</i>	
14.1. FISH Yönteminin Temelleri	180
14.2. FISH Yönteminin Teknik Yönleri	182

15.	Rekombinant DNA Teknolojisi	195
	<i>Güler TEMİZKAN, Nermin GÖZÜKIRMIZI</i>	
15.1.	Gen Klonlaması Aşamalarında Kullanılan Temel Yöntemler	196
15.1.1.	Hücrelerden Nükleik Asit Moleküllerinin İzolasyonu	196
15.1.2.	Gen İzolasyonu	196
15.1.3.	Rekombinant DNA Moleküllerinin Oluşturulması	203
15.1.4.	Rekombinant DNA Moleküllerinin Konak Hücrelere Sokulması	225
15.1.5.	Klonlama Stratejileri	231
15.1.6.	Tarama ve Rekombinantların Seçilimi	238
15.1.7.	Klonlanan Genlerin Yerleşim ve Yapısının Tanımlanması	246
15.2.	Klonlanmış Genlerin Yabancı Konakta Anlatımı (Rekombinant Protein Üretimi).	253
15.2.1.	Anlatım (Ekspresyon) Vektörleri	253
15.2.2.	Kaset Vektörler	256
15.2.3.	Gelişmiş Yapılı Ökaryotlarda Anlatım Vektörleri	258
15.2.4.	Rekombinant Proteinlerin Konak Hücrelerdeki Kararlılığı	259
15.3.	Transkriptom Analizleri	260
15.4.	Gen Anlatımı Düzenlenmesinin Analizi	263
15.4.1.	DNA-Protein Komplekslerinin Jelde Gecikme Tekniğiyle Belirlenmesi	263
15.4.2.	DNazI ile Ayakizi Analizi	263
15.4.3.	Modifikasyon Engelleme Yöntemi	264
15.4.4.	Delesyon Analizi	264
15.4.5.	Maya Tekli ve İkili Melez Sistemleri	267
15.5.	Proteomik Analizler.	267
15.5.1.	HRT ve HART Yöntemleri	267
15.5.2.	<i>In vitro</i> Mutageniz (Yere Özgü Mutageniz)	269
15.5.3.	Protein-Protein Etkileşimlerinin Analizi	273
15.6.	Protein Mühendisliği.	273
15.A.	Bakteri Transformasyonu	277
	<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA</i>	
15.B.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> İnozin Monofosfat Dehidrogenaz (<i>gua1</i>) Geninin Klonlanması	281
	<i>Semian KARAER UZUNER, Güler TEMİZKAN</i>	
16.	DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması	291
	<i>Şule ARI</i>	
16.1.	PCR'nin Mekanizması	292
16.2.	PCR'nin Temel Bileşenleri	293
16.3.	PCR'nin İşleyişi	300
16.4.	PCR ile Doğru Ürünün Çoğaltılması	301
16.4.1.	PCR Ürünlerinin Belirlenmesi ve Analizi.	301
16.4.2.	PCR'de Bulaşmadan Korunma	302
16.5.	PCR Çeşitleri	303
16.5.1.	Yuvalanmış PCR.	303
16.5.2.	Demirlenmiş PCR.	303
16.5.3.	Geri Transkripsiyon PCR'si	303
16.5.4.	Asimetrik PCR	303
16.5.5.	Ters PCR	304

16.5.6.	<i>In situ</i> PCR	305
16.5.7.	Çoklu PCR	305
16.5.8.	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA	305
16.5.9.	İmmüno PCR	305
16.6.	PCR Teknolojisindeki Gelişmeler ve Yeni Nesil PCR Çeşitleri	306
16.6.1.	Mikrosistem PCR	306
16.6.2.	Dijital PCR	307
16.6.3.	Hızlı PCR ve Erime Analizi	307

GENOMİK ANALİZLER 313

17. Genom Haritalama ve Dizileme Yöntemleri 315

Şule ARI

17.1.	Genom Haritalama Yöntemleri	316
17.1.1.	Haritalama Çalışmalarında Kullanılan Genetik Belirteçler	317
17.1.2.	Genetik Haritalama Yöntemleri	319
17.1.3.	Bakterilerde Genetik Haritalama Yöntemleri	325
17.1.4.	Fiziksel Haritalama Yöntemleri	327
17.2.	Genom Dizileme Yöntemleri	332
17.2.1.	DNA Dizileme Metodolojisi	333
17.2.2.	Birinci Nesil Dizileme Yöntemleri	335
17.2.3.	Yeni Nesil Dizileme (YND) Yöntemleri	343
17.2.4.	Genom Dizileme Yöntemleri	351

18. Transkriptom Analizinin İşlevsel Genomikteki Yeri 359

Gülruh ALBAYRAK

18.1.	Anlatımı Yapılan Dizi Etiketlerinin (EST) Analizi	360
18.2.	Farklılık Gösterimi	362
18.3.	Kayıplı Melezleme	363
18.4.	Anlatımsal Farklılık Analizi	365
18.5.	Gen Anlatımının Seri Analizi	366
18.6.	Kitlesel Paralel İmza Dizilemesi	367
18.7.	Karşılaştırmalı Genomik Melezleme	369

18.A. Elisitörle Tetiklenebilen Sitokrom P450 Genlerinin *Astragalus chrysochlorus*'da Hedeflenmiş Farklılık Gösterimi ("Differential Display", DD) ile İncelenmesi 371

Neslihan TURGUT KARA

18.B. Patates Yumrusunda SAGE ve/veya long-SAGE Yöntemiyle Transkriptom Analizi 379

Gülruh ALBAYRAK

19.	siRNA'lar ile Kültürdeki Hücrelerde Transkripsiyon Sonrası Gen Susturulması	391
	<i>Duygu GEZEN AK, Erdiñç DURSUN, Selma YILMAZER</i>	
	19.1. RNA Engellemesi ve Küçük RNA'lar	391
	19.2. siRNA'lar ile Gen Susturulması	391
	19.3. siRNA'ların Kültürdeki Memeli Hücrelerine Aktarılması.	392
	19.4. Kültür Hücrelerinde siRNA'lar ile Gen Susturulması Yöntemi	392
20.	miRNA Anlatım Analizi Yöntemleri	395
	<i>Tuba GÜNEL</i>	
21.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile Gen Anlatımının Analizi	399
	<i>Filiz GÜREL</i>	
	21.1. qPCR'nin İşleyiş Mekanizması.	400
	21.1.1. TaqMan Tekniğı ile qPCR	400
	21.1.2. DNA'ya Bağlanan Floresan Boyalarla qPCR	401
	21.2. Diğer Yaklaşımlar	403
	21.3. qPCR'nin Uygulama Aşamaları	404
	21.3.1. Deney Tasarımı	404
	21.3.2. Primer ve Prob Tasarımları.	405
	21.4. qPCR'de Kullanılan Aletler.	406
	21.5. Miktar Belirleme (Kantitasyon)	407
	21.5.1. Mutlak Miktar Belirleme	409
	21.5.2. Oransal Miktar Belirleme	410
	21.6. Gen Anlatımı Profillemesi	410
	21.7. Normalizasyon	411
	21.8. Laboratuvar Koşulları ve Kalite Kontrolü	412
21.A.	Gerçek Zamanlı PCR ile Maternal Kanda Fetal RhD Geninin Tanımlanması	423
	<i>Tuba GÜNEL</i>	
21.B.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>'de <i>aft1</i> Geninin Göreceli Anlatım Analizi	425
	<i>Bedia PALABIYIK</i>	
21.C.	Sybr Green I Boya Temelli Gerçek Zamanlı PCR ile <i>Fusarium graminearum tri5</i> Geninin Anlatım Analizi	429
	<i>Emre YÖRÜK, Gülruh ALBAYRAK</i>	
21.D.	HeLa Hücre Kültüründe Oksidatif Stres ile Oluşturulan DNA Hasarının qPCR ile Belirlenmesi	435
	<i>Özlem EROL TINAZTEPE</i>	

22.	Mikrodizilim Teknolojisi	441
	<i>Ayşegül TOPAL SARIKAYA, Tuba GÜNEL</i>	
	22.1. DNA Mikrodizilimleri	441
	22.2. Protein Mikrodizilimleri	445
	22.3. DNA Mikroçipi Üretimi.	447
	22.3.1. Robotik Baskılama	448
	22.3.2. Oligonükleotid Mikrodizilim Problarının <i>in situ</i> Sentezle Hazırlanması	449
22.A.	Serbest Fetal DNA'da Trizomi21 Tanısı için aCGH	455
	<i>Tuba GÜNEL</i>	
23.	Genetik Çeşitlilik (Varyasyon) Analizleri	459
	<i>Nermin GÖZÜKIRMIZI</i>	
	23.1. Genetik Çeşitlilik (Varyasyon) Mekanizmaları	459
	23.2. Genetik Çeşitlilik (Varyasyon) Analiz Tipleri.	460
24.	Epigenetik Analizler	465
	<i>Nermin GÖZÜKIRMIZI</i>	
	24.1. DNA Değişimleri	465
	24.2. Kromatin Değişimleri	467
	24.3. Transkripsiyon Sonrası Değişimler	467
	24.4. Özel Epigenetik Örnekler	467
	24.5. Epigenetik Yeniden Programlama	467
	24.6. Epigenomik	468
	24.7. Epigenetik Değişimlerle Çalışma Yöntemleri.	468

PROTEİNLERİN İZOLASYON ve ANALİZİ 473

25.	Proteinlerin İzolasyonu.	475
	<i>Nazlı ARDA, Haluk ERTAN</i>	
	25.1. Alet, Malzeme ve Kimyasal Maddeler	475
	25.2. Protein Ekstresinin (Özütünün) Hazırlanması	477
	25.2.1. Biyolojik Materyaller	477
	25.2.2. Protein Ekstraksiyonu	478
	25.2.3. Saklama Koşulları	480
	25.3. Suda Çözünen Proteinlerin Ekstraksiyonuna Örnekler	480
	25.3.1. Memeli Dokularından Ekstraksiyon	480
	25.3.2. Eritrositlerden Ekstraksiyon	481
	25.3.3. Yumuşak Bitkisel Dokulardan Ekstraksiyon	481
	25.3.4. Mayalardan Ekstraksiyon	482
	25.3.5. Bakterilerden Ekstraksiyon	482
	25.3.6. Yağlı Dokulardan Ekstraksiyon	483
	25.4. Zar (Membran) Proteinlerinin Ekstraksiyonu	483
	25.5. Protein Derişiminin Artırılması	485
	25.5.1. Kuru Polimer Kullanımı	486
	25.5.2. Ultrafiltrasyon	486
	25.5.3. Diyaliz	486
	25.5.4. Liyofilizasyon	488
	25.5.5. Çöktürme	489
25.A.	Protein A veya Protein G Bağlı Sefaroz Boncuklarla İmmün Çöktürme	495
	<i>Cenk KİĞ</i>	

26.	Proteinlerin Nicel Analizi	503
	<i>Nazlı ARDA, Haluk ERTAN</i>	
	26.1. A_{280}/A_{260} Oranının Belirlenmesi (Warburg-Christian Yöntemi)	503
	26.2. Biüret Yöntemi	504
	26.3. Boya-Bağlama (Bradford) Yöntemi	505
	26.4. Lowry Yöntemi	506
	26.5. Bisinkonik Asit (BCA) Yöntemi	507
27.	ELISA	513
	<i>Ali KARAGÖZ</i>	
	27.1. Doğrudan ELISA	515
	27.2. Dolaylı ELISA	515
	27.3. Sandviç ELISA	516
	27.4. Yarışmalı ELISA	516
	27.5. ELISA Kaplarının Seçimi ve Kaplanması	517
	27.6. ELISA Yöntemini Etkileyen Faktörler	517
	27.7. ELISA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	517
28.	Tek Boyutlu Protein Elektrofrez ve Protein Saptama Yöntemleri	523
	<i>Nazlı ARDA, Evren ÖNAY UÇAR, Haluk ERTAN</i>	
	28.1. Doğal Jel Elektrofrez	528
	28.2. Doğal Olmayan (Denatüre) Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	532
	28.3. Düşük Molekül Ağırlıklı Polipeptidlerin Elektrofrez	537
	28.4. Protein Saptama Yöntemleri	539
	28.4.1. Jel Boyama ve Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	539
	28.4.2. Membrana Aktarım ve Western Damgalama ("Blotting")	545
	28.5. Tek Boyutlu Elektrofrezde ve Western Damgalamada Karşılaşılan Sorunlar ve Çözüm Önerileri	565
	28.5.1. Doğal ve Denatüre PAGE'de Karşılaşılan Sorunlar	565
	28.5.2. Membrana Aktarım ve Western Damgalamada Karşılaşılan Sorunlar	568
29.	Proteinlerin Kromatografik Ayrımı ve Saflaştırılması.	571
	<i>Nazlı ARDA, Haluk ERTAN</i>	
	29.1. Jel Geçirgenlik Kromatografisi	573
	29.2. İyon Değişimi Kromatografisi	575
	29.3. Metal Kelat Kromatografisi	579
	29.4. Tiyofilik Adsorpsiyon Kromatografisi	581
	29.5. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ve Ters Faz Kromatografi	581
	29.6. Yalancı Afinite (Psödoafinite) Kromatografisi	582
	29.6.1. Boya Ligand Kromatografisi	582
	29.7. Afinite (İlgi) Kromatografisi	583
	29.7.1. Rekombinant Proteinlerin Afinite Kromatografisiyle Saflaştırılması	586
	29.7.2. Lektin Afinite Kromatografisi	587
	29.8. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	588
	29.9. Kristallendirme ve Saflık Kontrolü	589

30.	Enzimatik Analiz ve Aktivite Belirleme Yöntemleri	591
	<i>Haluk ERTAN, Nazlı ARDA</i>	
	30.1. Enzimatik Analizin Temel İlkeleri	591
	30.1.1. Başlangıç Hızının Tanımlanması	592
	30.1.2. Başlangıç Hızına İlişkin Sapmalar	593
	30.2. Enzim Aktivitesinin Tanımlanması ve Ölçülmesi	595
	30.2.1. Aktivite Ölçüm Koşulları	596
	30.2.2. Aktivite Ölçümlerinde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar	596
	30.2.3. Enzim Aktivitesinin Hesaplanması: Birimler ve Spesifik Aktivite Absorpsiyon (Ekstinksiyon) Katsayısı	596
	30.3. Enzimlerle İlgili Deneysel Bilgiler	598
	30.3.1. Doğrudan ve Devamlı Ölçüm	598
	30.3.2. Dolaylı Ölçüm	599
	30.4. Enzim Aktivitesinin Jel Üzerinde Gösterilmesi	602
	30.5. Enzim Kinetiği	603
	30.5.1. Enzim Kinetiğinin Temel Bağlantıları	603
	30.5.2. Kinetik Değerlerin Saptanması İçin Enzim Aktivite Ölçümleri	606
	30.5.3. Somut Değerlere Dayalı Kinetik Çalışma Örneği	609
31.	Oksidatif Protein Hasarlarının Belirlenmesi	611
	<i>Nazlı ARDA, Murat PEKMEZ</i>	
	31.A. Hidrojen Peroksit Uygulanmış Maya Hücrelerinde Protein Karbonillerinin Belirlenmesi	617
	<i>Murat PEKMEZ</i>	
32.	Protein-Protein Etkileşiminin Belirlenmesi (Maya İkili Melez Sistemi)	621
	<i>Filiz GÜREL</i>	
	32.1. İkili Melez Sisteminin Temeli	621
	32.2. Maya İkili-Melez Sisteminde Kullanılan Vektörler	622
	32.3. cDNA Kitaplıkları	623
	32.4. Raportör Genler	623
	32.5. Maya İkili Melez Sisteminin Aşamaları	624
	32.6. Yöntemin Üstünlükleri ve Zorlukları	625
	32.7. Maya İkili Melez Sisteminin Uygulandığı Alanlar	626
33.	İzotermal Titrasyon Kalorimetresi	635
	<i>Haluk ERTAN</i>	
	33.1. İTC ve Bağlanma Termodinamiği	636
	33.2. İTC ve Enzim Kinetiği	638
	33.3. MicroCal iTC ₂₀₀ Sistemi	638

PROTEOMİK ANALİZLER

647

34. İki Boyutlu Protein Elektroforezi 649*Nazlı ARDA, Evren ÖNAY UÇAR, Haluk ERTAN*

- 34.1. Birinci Boyut: İzoelektrik Odaklama (IEF) 649
- 34.1.1. Dikey Sistemlerde Hazırlanan Jellerle IEF 649
- 34.1.2. Yatay Sistemde ve Hazır Şeritlerle IEF 655
- 34.2. İkinci Boyut: SDS-PAGE. 660
- 34.3. Sonuçların Değerlendirilmesi. 662
- 34.4. İki Boyutlu Elektroforez Sürecinde Karşılaşılan Sorunlar ve Çözüm Önerileri . 663

34.A. C6 Sıçan Glioma Hücrelerindeki Stres Proteinlerinin Proteomik Analizi 667*Evren ÖNAY UÇAR***35. İki Boyutlu DIGE** 675*Murat KASAP, Gürler AKPINAR*

- 35.1. DIGE Yönteminin Temeli. 676
- 35.2. DIGE Deneyinin Tasarlanması. 677
- 35.3. Protein Örneklerin DIGE için Hazırlanması 678
- 35.4. Minimal DIGE Yönteminin Uygulanması 679

36. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) Proteomiği 687*Volkan YILDIRIM, Gülay ÖZCENGİZ*

- 36.1. LC-MS'de Kullanılan Sıvı Kromatografi Aletleri 687
- 36.2. Kütle Spektrometrisi 687
- 36.2.1. LC-MS'de Kullanılan İyonizasyon Kaynağı: Elektro Sprey İyonizasyonu (ESI) . 688
- 36.2.2. LC-MS'de Kullanılan Analizörler. 688
- 36.3. LC-MS ile Nicel (Kantitatif) Proteomik. 692

BİYOENFORMATİK

701

37. Genom ve Proteom Analizinde Biyoenformatik 703*Ercan ARICAN*

- 37.1. Biyolojik Veri Tabanları 703
- 37.2. Farklı Veri Tabanı Türleri 704
- 37.3. Tanımlayıcılar ve Giriş Şifreleri 705
- 37.4. Nükleotid Dizi Veri Tabanları 705
- 37.4.1. Birincil Nükleotid Dizi Veri Tabanları 705
- 37.5. Protein Dizi Veri Tabanları 706
- 37.6. Dizi Motif Veri Tabanları 707
- 37.7. Makromoleküler Üç Boyutlu Yapı Veri Tabanları 708
- 37.8. Diğer Veri Tabanları. 709
- 37.9. Tarama, İndeksleme ve Çapraz Referanslama Sistemleri 709

37.A. Mayada (*Saccharomyces cerevisiae*) Süperoksit Dismutaz (SOD) Enziminin BLAST Analizi 717*Çağatay TARHAN*

EKLER

Ek 1.	Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında Bulunması Gereken Çeşitli Aletler.	721
Ek 2.	Bilimsel Sembol Olarak Kullanılan Yunan Alfabeti Harfleri.	722
Ek 3.	Standart Önekler	722
Ek 4.	Dönüşüm Faktörleri	723
Ek 5.	Önemli Değişmezler	723
Ek 6.	Biyolojik Makromoleküllerle İlgili Bazı Dönüşümler.	723
Ek 7.	Derişik Asit ve Bazlarla İlgili Bazı Değerler	724
Ek 8.	Çeşitli Stok Çözeltilerin Yaklaşık pH Değerleri	724
Ek 9.	Bazı Tamponların Çalışma Aralığı.	725
Ek 10.	Çeşitli Tampon Bileşenlerinin 25°C'daki pKa Değerleri	726
Ek 11.	Çeşitli Tamponlar ve Hazırlanışları	727
Ek 12.	Moleküler Biyolojik Çalışmalarda Ortamda Bulunması İstenmeyen Bazı Metalleri Bağlayan Kelatörlerin Kararlılık Değişmezleri	736
Ek 13.	Moleküler Biyolojik Çalışmalarda Çok Kullanılan Tiyol Bileşikleri	737
Ek 14.	Nükleik Asitlerin ve Proteinlerin Denatürasyonuna Yol Açan Maddeler	737
Ek 15.	Moleküler Biyolojide En Çok Kullanılan Filtre Kağıtları	738
Ek 16.	Millipore® Filtrelerde Por Çapına Göre Geçebilecek Partikül Büyüklükleri.	738
Ek 17.	Damgalama ("Blotting") Filtreleri.	739
Ek 18.	Santrifüj Rotorlarının Etkinlikleri	739
Ek 19.	Santrifüj Tüpü Malzemelerinin Özellikleri.	740
Ek 20.	Çeşitli Hücre Kısımları İçin Uygun Santrifüjleme Koşulları	740
Ek 21.	Çeşitli Partiküllerin İzopiknik Ayrımları İçin Uygun Yoğunluk Derecelenmesi Ortamları	741
Ek 22.	Peptid ve Proteinlerin Ters-Faz HPLC Koşulları ve Kolon Özellikleri.	741
Ek 23.	Proteinlerin Ayrılmasında Kullanılan İyon Değiştirici Matriksler.	742
Ek 24.	İyon Değişimi Kromatografisinde Kullanılan Bazı Tamponlar	742
Ek 25.	Jel Filtrasyonunda Kullanılan Çeşitli Kolon Dolgu Maddelerinin Proteinleri Ayırma Sınırı	743
Ek 26.	Elektromanyetik Spektrum ve Spektroskopik Çalışma Alanları	744
Ek 27.	Radyoaktivite ile İlgili Birimler ve Dönüşüm Faktörleri	744
Ek 28.	Araştırmalarda Kullanılan Radyoizotopların Bazı Özellikleri	745
Ek 29.	Nükleik Asitlerin Yapısal Bileşenlerinin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri.	746
Ek 30.	Bazı Restriksiyon Endonükleazlarının DNA' da Tanıma Dizileri ve Kesme Noktaları.	747
Ek 31.	Bazı Organizmaların Kromozom Sayıları ve Genom Bilgileri.	748
Ek 32.	Genetik Şifre.	749
Ek 33.	Proteinlerin Yapısında Bulunan α -Amino Asitlerin Yapısal Formülleri ve Bazı Fizikokimyasal Özellikleri.	750
Ek 34.	BCA Yöntemiyle Uyumlu Maddeler ve Derişimleri	752
Ek 35.	Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) Düzeneği ve Kurulumu	754
Ek 36.	Bazı Ticari Afinite Matriksleri	759
Ek 37.	Afinite Kromatografisinde Kullanılan Bazı Ligandlar ve Özgüllükleri	759
Ek 38.	Glikoproteinlerin Safılaştırılmasında Kullanılan Bazı Lektinler	760
Ek 39.	2-DE Rehidrasyon Tamponları	761
Ek 40.	Proteinlerde Belli Amino Asitlerde Kesme Yapan Bazı Enzim ve Kimyasal Maddeler	761
	DİZİN	763

YAZARLAR



Prof. Dr. Gülrüh ALBAYRAK

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
gulruh@istanbul.edu.tr – gulruhalbayrak@gmail.com

Prof. Dr. Nazlı ARDA

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği
Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEEM)
narda@istanbul.edu.tr – nazliarda@hotmail.com

Prof. Dr. Şule ARI

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
sari@istanbul.edu.tr

Prof. Dr. Ercan ARICAN

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
earican@istanbul.edu.tr

Prof. Dr. Haluk ERTAN

The University of New South Wales Faculty of Science
School of Biotechnology and Biomolecular Sciences
Kensington-Sydney NSW 2052, Australia
hertan@unsw.edu.au – halukertan@hotmail.com

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Emekli Öğretim Üyesi
nermin@istanbul.edu.tr – mermin1951@gmail.com

Prof. Dr. Tuba GÜNEL

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
gunel@istanbul.edu.tr

Prof. Dr. Filiz GÜREL

Maryland Üniversitesi Bitki Bilimleri Bölümü, ABD
filiz@umd.edu

Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
sanicula@istanbul.edu.tr – alkaragoz@yahoo.com

Prof. Dr. Murat KASAP

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
mkasap@kocaeli.edu.tr

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
evrenonay@istanbul.edu.tr – evrenonay@hotmail.com

Prof. Dr. Gülay ÖZCENGİZ

Orta Doğu Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü
ozcengiz@metu.edu.tr

Prof Dr. Melek ÖZTÜRK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
mozturk@istanbul.edu.tr

Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
bediag@istanbul.edu.tr

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN

İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
guler.temizkan@istun.edu.tr

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
aysegul.sarikaya@yeniuyuzyl.edu.tr

Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
tmatem@istanbul.edu.tr

Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
neslihanhk@istanbul.edu.tr – neslihanurgutkara@gmail.com

Prof. Dr. Selma YILMAZER

Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
drselmayilmazer@gmail.com

Doç. Dr. Gürler AKPINAR

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
gurlerak@kocaeli.edu.tr

Doç. Dr. Erdinç DURSUN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
erdinçdu@istanbul.edu.tr

Doç. Dr. Duygu GEZEN AK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
dgezen@istanbul.edu.tr

Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
fkayadagistanli@gmail.com

Doç. Dr. Cenk KIĞ

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri
Bölümü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
cenk.kig@yeniuyuzyl.edu.tr – kenk75@yahoo.com

Doç. Dr. Emre YÖRÜK

Yeni Yüzyıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
emre.yoruk@yeniuyuzyl.edu.tr – emreyoruk@outlook.com

Dr. Öğr. Üyesi Özlem EROL TINAZTEPE

Çanakkale Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü
ozlemerol@comu.edu.tr – ozlemerolbio@gmail.com

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
semka@istanbul.edu.tr

Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
mpekmez@istanbul.edu.tr – muratpekmez@hotmail.com

Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
cagatay.tarhan@istanbul.edu.tr – cagataytarhan@yahoo.com

Dr. R. Dilhan KURU

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
dilhank@istanbul.edu.tr

Dr. Volkan YILDIRIM

Erzurum Atatürk Üniversitesi
Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve
Araştırma Merkezi Müdürlüğü
volkan.yildirim@atauni.edu.tr