



**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
KİMYA-METALURJİ FAKÜLTESİ
BİYOMÜHENDİSLİK BÖLÜMÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK LABORATUVARI – II BYM4242

LABORATUVAR FÖYÜ

Ders Koordinatörü

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

Laboratuvar Koordinatörü

Ar. Gör. Nurseda SÜRGİT

2023-2024 BAHAR



ÖNSÖZ

YTÜ Biyomühendislik Bölümü'nde, Biyomühendislik Laboratuvarı I ve Biyomühendislik Laboratuvarı II, 7. ve 8. yarıyıllarda zorunlu ders olarak yer almaktadır. Biyomühendislik Laboratuvarı II kapsamında hazırlanan bu deneyler, 8. yarıyıda Bölüm Öğretim Üyeleri koordinatörlüğünde yürütülmektedir.

Dersin amacı, öğrencilere Biyomühendislik eğitimi boyunca, teorik olarak aldıkları meslek dersleri için seçilmiş deneyler ile uygulama yaptırmak, elde edilen sonuçları tartışarak değerlendirmektir.

Biyomühendislik Laboratuvarı II dersini alan tüm öğrencilerimize başarılar dileriz.

Biyomühendislik Öğretim Elemanları adına,

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN

ÇALIŞMA YÖNERGESİ

CLASS ID: 42826330
CLASS ENROLLMENT KEY: BYM4242GR1

- Raporlar en geç deneyden sonraki hafta Perşembe günü 23:59'a kadar Turnitin sistemine yüklenmelidir.
- Her gruptan sadece bir üye kayıt yapmalı ve final raporunu yüklemelidir. 'Your First Name' sekmesine TR/Grup numarası yazılmalıdır. 'Your Last Name' sekmesine ise deney adı yazılmalıdır. **Bu sekmelere öğrenci isim-soy ismi yazılmamalıdır!**
- Rapor değerlendirmede Turnitin intihal oranı;
 - %40'ın üzerinde olan öğrenciler 0 puan alacaktır.
 - %30-40 arasında olan öğrenciler 50 puan alacaktır.
 - %20-30 arasında olan öğrenciler 75 puan alacaktır.
 - %20'den az olan öğrenciler 100 puan alacaktır.
- Turnitin'e yüklenmiş raporları revize etme hakkı yoktur. Raporlar Turnitin sistemine ön kapağı silinmeden yüklenmelidir. Sisteme geç yüklenen raporlardan puan kırılabacaktır.
- Raporlar laboratuvar koordinatörüne e-mail ile, yazılı çıktıları ise deneyden sorumlu asistana deneyden sonraki Cuma gününe kadar teslim edilmelidir.
- Her geç teslim için raporlardan 10 puan kırılabacaktır.

BAŞARI VE DEĞERLENDİRME DURUMU

Yıl İçi Değerlendirme: 40%

Deney Raporları	20%
Pre-quiz	10%
Post-quiz	10%
Tasarım Deneyi Föyü	10%
Tasarım Deneyi Raporları	10%
Sunum	20%
Grup Üyeleri ve Liderlerinin Değerlendirilmesi	20%

Vize: 20%

Final: 40%

- Yarıyıl boyunca 2 deney ve 1 tasarım deneyi yapılacaktır. **Bütün deneylere katılmak zorunludur.**
- Deneye 10 dakikadan daha geç gelen öğrenciler pre-quizde alınmayacaktır. Pre-quizden 50 altında alan öğrenciler deneye katılamayacaklardır. Deneye katılımında olduğu gibi ikinci kez pre-quizde katılmayanlar veya yeterli notu alamayanlar deneye katılmamış sayılacağından dersten kalmış olacaklardır. Deney sonuçları ve hesaplamalar her grup tarafından detaylıca hazırlanıp tek bir grup raporu haline getirilecek, bir sonraki hafta deneyden sorumlu araştırma görevlisine ve laboratuvar koordinatörüne çıktı olarak teslim edilecektir.
- Rapora katkı sağlamayan öğrenciler rapordan not alamayacaktır, aynı zamanda rapor teslimi sırasında gerçekleştirilecek olan post-quizde de alınmayacaktır. Dolayısıyla deney raporu notundan ve post-quiz notundan sıfır alacaktır.
- Rapora katkı sağlamış olsa bile rapor teslimi sırasında gerçekleştirilecek olan post-quizde katılım sağlamayan öğrenciler post-quiz notundan sıfır alacaktır.
- Post-quiz'den <50 alan öğrencilerin yalnızca bir deneyde telafi hakkı bulunacaktır.
- Her öğrencinin 1 deney için telafi deneye katılma hakkı vardır. Bir deneye katılmayan öğrenciler dersten kalırlar.
- Öğrenciler deneyin her aşamasından sorumludur ve raporlara dahil edilen her şey post-quiz ve sınavlarda sorulabilir.
- **Deneye geçerli mazeret doğrultusunda katılamayacak öğrencilerin laboratuvar koordinatörü ile iletişime geçmeleri gerekmektedir.**

Grup Üyesi – Takım Lideri Değerlendirme Anketleri

- Her deney için grup içerisinde iki kişi grup liderliği görevi yürütecektir. Grup liderleri o hafta deney süresince deneyin yürütülmesinden, talimat alıp verilmesinden, deney raporundaki görev dağılımı, rapor hazırlığı, raporun son halinin birleştirilmesi gibi görevlerden sorumlu olacaktır. Bu doğrultuda paylaşılacak olan online ‘Grup Üyelerinin Takım Lideri Değerlendirme Formu’ üzerinden grup üyeleri takım liderinin bu vasıflarını değerlendirecektir. Aynı zamanda takım lideri de online ‘Takım Liderinin Grup Üyelerini Değerlendirme Formu’ formu üzerinden grup üyelerini teker teker talimat alıp-verme, takım içi çalışma, rapora katkı sağlama açısından değerlendirecektir.
- Grup liderleri aşağıdaki görevleri üstlenecektir:

Görev 1	Deney 1 (Rapor)
Görev 2	Deney 2 (Rapor)
Görev 3	Tasarım Deneyi (Rapor)
Görev 4	Tasarım Deneyi (Föy)
Görev 5	Tasarım Deneyi (Sunum)

- Her öğrenci dönem boyunca en az bir defa takım liderliği görevini üstlenecektir.

LABORATUVAR TAKVİMİ

HAFTA	TARİH	KONULAR
1	23 Şubat	Öğrencilerle Tanışma ve Derse Giriş Toplantısı / Mühendislik Uygulamalarına Yönelik Standartların Sunumu
2	1 Mart	Deney 1 (Grup 1, Grup 6) Deney 2 (Grup 2, Grup 5)
3	8 Mart	Deney 1 (Grup 3, Grup 8) Deney 2 (Grup 4, Grup 7) Deneylerin Final Raporu / Post-quiz
4	15 Mart	Deney 1 (Grup 5, Grup 2) Deney 2 (Grup 6, Grup 1) Deneylerin Final Raporu / Post-quiz
5	22 Mart	Deney 1 (Grup 7, Grup 4) Deney 2 (Grup 8, Grup 3) Deneylerin Final Raporu / Post-quiz
6	29 Mart	Telafi Deneyleri Deneylerin Final Raporu / Post-quiz
7	5 Nisan	Tasarım Deney Föylerinin Teslimi Telafi Deneylerinin Final Raporu / Post-quiz
8	12 Nisan	BAYRAM HAFTASI
9	19 Nisan	VİZE HAFTASI STANDARDİZASYON DERSİ
10	26 Nisan	Tasarım Deneyleri
11	3 Mayıs	Tasarım Deneyleri
12	10 Mayıs	Tasarım Deneyleri
13	17 Mayıs	<u>Tasarım Deney Raporunun Teslimi için Son Tarih</u>
14	24 Mayıs	Tasarım Deney Sunumları
15	-	FİNAL SINAVI

DENEYLER VE SORUMLU ÖĞRETİM ELEMANLARI

Deney No	DENEY ADI	DENEY SAATİ	SORUMLU ÖĞRETİM ELEMANLARI	E-posta
1	Plazmid DNA İzolasyonu ve Spektral Analizi	13.00	Arş. Gör. Nurseda SÜRGİT (Laboratuvar Koordinatörü)	nursedasurgit@gmail.com
2	Biyoreaktörde Maya (<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>) Üretimi	13.00	Arş. Gör. Beyza KARACAOĞLU	beyzak@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 1	-	Arş. Gör. Muhammet ÇELİK	mcelik@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 2	-	Arş. Gör. Ayça ASLAN	aaslan@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 3	-	Arş. Gör. Zişan TOPRAK	zisantoprakytu@gmail.com
-	Tasarım Grup 4	-	Arş. Gör. Selcan AKAR	seakar@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 5	-	Arş. Gör. Ayça ASLAN	aaslan@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 6	-	Arş. Gör. Taha YÜCEL	taha.usa@yildiz.edu.tr
-	Tasarım Grup 7	-	Arş. Gör. Nurseda SÜRGİT	nursedasurgit@gmail.com
-	Tasarım Grup 8	-	Arş. Gör. Muhammet ÇELİK	mcelik@yildiz.edu.tr

TASARIM DENEYİ TAKVİMİ

Hafta	Çalışmalar
4	Problem ve Konu Belirleme, Sorumlu Asistana Bildirme
5	Belirlenen Konuyu Sorumlu Asistana Onaylatma
7	Deney Föyü Gönderimi
10-12	Tasarım Deneyi Gerçekleştirme
13	Tasarım Deneyi Sonuç Raporu Gönderimi
14	Tasarım Deneyi Sunumları

- A ve B grupları ortak bir konu belirleyecek, **ardından deneyleri ayrı olarak gerçekleştirecektir.**
- Her grup laboratuvar föyündekilerin dışında bir Tasarım Deneyi oluşturmalıdır. Ardından deneyinizle alakalı, bu dersin laboratuvar föyü gibi bir föy oluşturmanız gerekmektedir. Tasarım Deneyinizin Final Raporu'na grafikler, veriler, figürler vb. eklemeniz gerekmektedir.
- Grupların belirlenmiş tarihlere bağlı kalması zorunludur.
- Her grup tasarım deneyi için 4. Haftaya kadar problem/konu belirlemeli, ardından tasarım deneyleri için önemli tarihleri takip etmeli, sorumlu asistan ile süreç boyunca iletişimde kalmalıdır.

DENEY GRUPLARI

Gr. A1		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
Ç18051044	SELİN ELİTAŞ	Görev 1
Ç19051028	FAHRETTİN TAHA AYVALI	Görev 2
18056044	BİKEM ULUSAL	Görev 3
18056050	ERBEY ESKİTÜTÜNCÜ	Görev 4
18056060	DOĞAN ALP KARA	Görev 5

Gr. A2		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056010	ELİF AYDOĞAN	Görev 1
19056014	DAMLA NUR YAŞAR	Görev 2
19056015	MELİKE AKDAĞ	Görev 3
19056016	YAREN İNAL	Görev 4
19056018	BURÇAK BULUT	Görev 5

Gr. A3		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056024	CEREN ÇERÇİ	Görev 1
19056026	PELİN ŞİŞLİ	Görev 2
19056028	YUNUS EMRE DUNDAR	Görev 3
19056029	FATMA ÖZDEMİR	Görev 4
19056031	EGE GÜRSEL	Görev 5

Gr. A4		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056041	SILA NURSU YÜCEL	Görev 1
19056045	SUDE TOPTAŞ	Görev 2
19056046	ERDİ ÜSTÜN	Görev 3
19056047	FIRAT AYKURT	Görev 4
19056048	AHMET KURU	Görev 5

Gr. A5		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056064	ELİF TINMAZ	Görev 1
19056065	EZGİ KOÇYİĞİT	Görev 2
19056501	AYŞE SUDE ÖZDEMİR	Görev 3
19056602	MERYEM ŞİFA ALTUNHAN	Görev 4
19056903	NOUR ALHUDA ALSAMEER	Görev 5

Gr. A6		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
20056018	ZEYNEP FATMA KARAMAN	Görev 1
20056023	FATMA GÜLTAŞLAR	Görev 2
20056025	HİLAL YENİCİ	Görev 3
20056029	DESTAN IŞIK ELMAS	Görev 4
20056037	YAREN ELA TÜRTÜK	Görev 5

Gr. A7		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
20056064	ELİF EMEKDAR	Görev 1
20056065	ELİF AYGÜN	Görev 2
20056067	DENİZBEY KÖSTEKSİZOĞLU	Görev 3
20056069	ZEYNEP KANTER	Görev 4
20056071	CANAN BOZYOKUŞ	Görev 5

Gr. A8		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
20056903	FERYAL SHAWA	Görev 1
20056904	FATMA ELREİS	Görev 2
21056028	EDA NUR GÖRÇİN	Görev 3
21056052	MELİKE SÜRMELİ	Görev 4
21056067	MELİKE DEMİRCİOĞLU	Görev 5

Gr. B1		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056001	UĞUR MERT KÖSE	Görev 1
19056002	KÜBRA KALAFAT	Görev 2
19056003	ÖZLEM REYHAN YAZKAN	Görev 3
19056004	BİRCAN ALEYNA YALÇIN	Görev 4
19056005	ZEYNEP SÜNBÜL	Görev 5

Gr. B2		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056019	ZEYNEP KOCACIK	Görev 1
19056020	ELİF BÜŞRA KARAKAYA	Görev 2
19056021	SERRA NUR ÜNSAL	Görev 3
19056022	MISRA NAZ SEVİNÇ	Görev 4
19056023	YAĞMUR KAZANCIOĞLU	Görev 5

Gr. B3		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056033	BETÜL ŞURA AKALIN	Görev 1
19056036	ŞEVVAL KIZILKAYA	Görev 2
19056037	ZEYNEP HOTAMAN	Görev 3
19056039	DİLEK BOZKURT	Görev 4
19056040	SEVCAN ÇETİNKAYA	Görev 5

Gr. B4		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
19056056	SELİN NUR CAN	Görev 1
19056059	ELİF KALKAN	Görev 2
19056060	KEVSER YILDIZ	Görev 3
19056062	PELİN ÖZTÜRK	Görev 4
19056063	MERVE ORHAN	Görev 5

Gr. B5		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
20056002	KEVSER DUMAN	Görev 1
20056004	ÇAĞLA KAYA	Görev 2
20056005	ECEM BAŞARAN	Görev 3
20056008	ECENUR BÜLBÜL	Görev 4
20056010	TURAÇ OZAN ANILIR	Görev 5

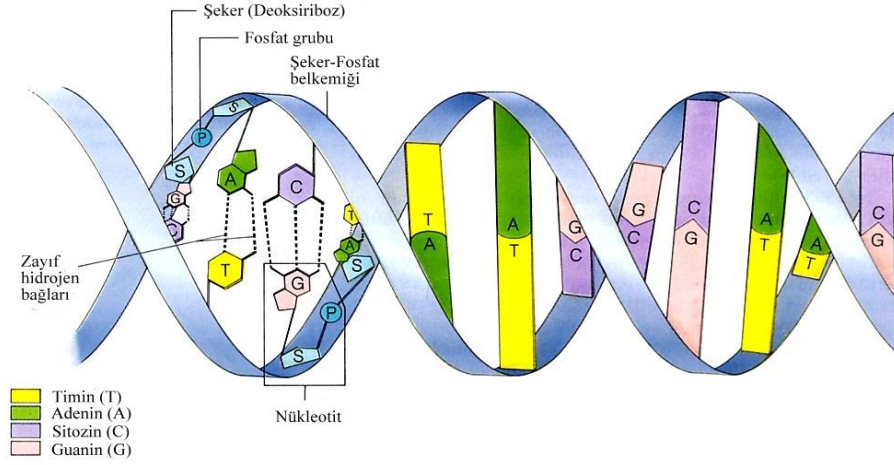
Gr. B6		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
20056040	AKIN GÜVEN	Görev 1
20056043	MERVE SERİN	Görev 2
20056048	YAĞMUR AYIKLAR	Görev 3
20056049	EYLÜL DİLA ÇARKCI	Görev 4
20056050	ESRA AYGÜN	Görev 5

Gr. B7		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
20056604	ELİF KILIÇ	Görev 1
20056606	MERVE ÇETİN	Görev 2
20056610	MİNEL BAYAZİT	Görev 3
20056704	ALİHAYDAR AYDIN	Görev 4
20056902	SALMA ASHRAF ELSAYED ZAGHLOL	Görev 5

Gr. B8		
Öğrenci No.	İsim - Soyisim	Liderlik
21056602	SENA ÇELİK	Görev 1
21056606	NEŞE ERDOĞAN	Görev 2
21056607	SEFA MÜCAHİD YAVUZ	Görev 3
23056609	ELİF KÜBRA KILIÇ	Görev 4

DENEY 1: PLAZMİD DNA İZOLASYONU VE SPEKTRAL ANALİZİ

Bir DNA molekülü 5 karbonlu şekere bağlı bir fosfat grubu ve azotlu bazlardan meydana gelen nükleotit adlı yapıtaşlarından oluşmuş, çift sarmal oluşturan bir moleküldür. Bu karbonlar 1'-5' numaralı olacak şekilde düzenlenmiştir. DNA'da birbirinden farklı 4 tip nükleotit bulunur. Bunlardan ikisi olan guanin ve adenin ikili halkasal yapıya sahip pürinler, diğer ikisi sitozin ve timin ise tekli halkasal yapıya sahip pirimidinlerdir. Bir DNA molekülünde nükleotitler özel bir sıra ile dizilirler. Şekerler birbirine, birinin 3' karbonu ile diğerinin 5' karbonunu birleştiren fosfat grupları ile bağlanırken, azotlu bazlar zincire yan grup olarak bağlanırlar. DNA molekülünün çift iplikli yapısı da azotlu bazlar arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Bu tip bir bağlanma sadece sitozin ile guanin ve timin ile adenin arasında oluşur. Böylece bir zincirdeki baz dizilimi diğerinin tamamlayıcısı, yani komplementeri olur. İki zinciri polaritesi birbirine zıttır; her biri 5'-3' yönünde dizilirken doğrultuları birbirine tam aksi yöndedir. Sonuç olarak merdiven benzeri çift zincirli molekül, çift sarmal şeklinde kıvrılır ve aradaki hidrojen bağları ile stabilize edilir. Nükleotit merdivenlerinin basamakları arasındaki bu bağlar proteinlerin alfa-heliks yapısını stabilize eden bağlarla analogtur.



Şekil 1. DNA yapısının şematik gösterimi

Genetik bilginin DNA tarafından taşındığının kabul edilmesinden sonra çalışmalar, DNA yapısının aydınlatılması ve bu molekülde depolanan bilginin gözlenebilir bir fenotip oluşturmak üzere ifade edilme mekanizması üzerine odaklanmıştır. Sonraki yıllarda bu başarılmış ve araştırmacılar, DNA molekülünü izole ederek özgül bölgelerini çoğaltmayı öğrenmişlerdir. Böylece rekombinant DNA teknolojisi çağının yolu açılmıştır.

Genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda total hücre DNA'sı, faj DNA'sı ve plazmid DNA olmak üzere üç tip DNA molekülünden yararlanılmaktadır. Plazmitler, bakteri hücreleri içinde doğal olarak bulunan, bağımsız olarak replike olabilen, bakteri kromozomunun dışında, çift zincirli DNA molekülüdür. İlk geliştirilen vektörler, genetik olarak değişikliğe uğratılmış plazmitlerdir ve hala klonlama için yaygın olarak kullanılmaktadır. Plazmidlerin rekombinant DNA teknolojisi çalışmalarında taşıyıcı DNA (vektör) olarak geniş çapta kullanılması plazmid izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Genel olarak DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen üç temel aşama bulunmaktadır. Bu aşamalar yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın ortaya çıkması amacıyla hücrelerin **lisis solusyonu yardımıyla parçalanması**, **denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması** ve **DNA'nın çözünür duruma getirilmesi**, **DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makro moleküllerden ayrılması** basamaklarından oluşmaktadır. Plazmid DNA izolasyonunda ise en sık kullanılan

yöntemlerden biri Metot I olarak verilen Birnoim ve Doly tarafından geliştirilen **alkalin lizis yöntemi**dir (Birnoim HC, Doly J; 1979). Bu metod temel olarak sodyum hidroksit ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi kimyasallar kullanılarak bakterinin parçalanması ve nötralize edilmesiyle bakteri kromozomal DNA'sının ve diğer yüksek molekül ağırlıklı hücre komponentlerinin seçici olarak çöktürülmesini sağlar. Bu şekilde diğer hücresel bileşenlerden ayrılan plazmid DNA izopropanol ile izole edilir. Bunun yanı sıra daha hızlı, basit ve verimi yüksek çeşitli plazmid DNA izolasyon yöntemleri de bulunmaktadır. Metot II olarak plazmid DNA izolasyonu aşağıda ek olarak verilmiştir.

Deneyin Amacı:

Bakteri kültüründen alkalın lizis yöntemi ile plasmid DNA izolasyonu yapılması ve spektrofotometrik yöntem ile DNA miktar tayini yapılmasıdır.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

- Plazmid DNA izolasyonu dışında, diğer DNA izolasyon yöntemleri hangileridir, Açıklayınız.
- Genel olarak tüm DNA izolasyon yöntemlerinde bulunan temel aşamalar nelerdir?
- Plazmid DNA ve genomik DNA arasındaki farklar nelerdir?
- DNA'nın miktar tayini için kullanılan yöntemleri açıklayınız.

MATERYALLER

Bakteri Kültürü

Deneyde klonlanması hedeflenen geni içeren plazmid DNA'ya sahip *E.coli* bakteri kültürü kullanılacaktır. Bakteri kültürü bir gece (veya 24 saat) geliştirilmiş sıvı besi yeri içinde inkübe edilerek çoğaltılacaktır.

Solüsyon I:

50 mM glikoz
25 mM TrisCl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

Solüsyon II:

0.2 N NaOH
%1 (wt/vol) sodyum dodesil sülfat (SDS)
3 M potasyum asetat (pH 4.8)
İzopropanol
Etanol
dH₂O

Cihazlar

Mikrosantrifüj, UV spektrofotometre, otomatik mikropipet

Sarf malzemeler

Steril mikropipet uçları, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpleri, beher, falkon tüp

Ön Hazırlık

Buz banyosu (veya buz dolu bir strafor kutu) önceden hazırlanmalıdır.

METOD

Bu metoda göre plazmid DNA, bir alkalın liziz yöntemi kullanılarak ekstrakte edilir (Birnboim ve Doly, 1979).

1. *E.coli* içeren ependorf tüp buz üzerine alınır ve I. Solüsyondan 100 µL [50 mM glikoz, 25 mM TrisCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] eklenerek süspanse edilir.
2. Hücreler 4 dakika boyunca 200 µL II. Solüsyonu (liziz solüsyonu) [0.2 N NaOH, %1 SDS] ile muamele edilir.
3. 150 µL soğutulmuş 3 M potasyum asetat ile nötralize edilir.
4. Örnekler, 4°C'de 10 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlenir.
5. Plazmid içeren süpernatant **eşit hacimde** izopropanol ile karıştırılır ve -20°C'de 15 dakika inkübe edilir.
6. Örnekler 14,000 rpm'de 30 dakika 25°C'de santrifüjlenir.
7. Süpernatant çıkarılır ve pelete 500 µL %70 etanol ilave edilir ve 25°C'de 5 dakika 14,000 rpm'de santrifüjlenir.
8. Pelet, 50 µL dH₂O içinde yeniden süspanse edilir.
9. İzole edilen plazmid DNA'nın miktar tayini gerçekleştirilir.

Plazmid DNA'nın Miktar Tayini

İzole edilen plazmid DNA'nın miktar tayini için UV spektrofotometre kullanılarak ölçüm yapılır.

Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50 µg/ml ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır:

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

Solüsyon içindeki protein ve RNA kontaminasyonu hakkında yorumda bulunabilmek için $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ oranı kullanılır.

Bu oran > 1.8 ise RNA kontaminasyonu,
< 1.8 ise Protein kontaminasyonu,
≈ 1.8 ise kontaminasyonun olmadığı şeklinde bir yorum yapılabilir.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

- DNA miktar tayininde neden 260 nm'deki absorpsiyon değerinin ölçüldüğünü yorumlayınız.
- UV spektrofotometre ile miktarını tayin ettiğiniz DNA'nın saflığını yorumlayınız.
- UV spektrofotometre haricinde bir yöntem ile DNA miktarını tespit etmek isteseydiniz, hangi yöntemi seçerdiniz, açıklayınız.
- Ortaya çıkan deneysel hataların nereden kaynaklanabileceğini ve nasıl düzeltilebileceğini tartışınız.
- Deney sonuçlarının tekrarlanabilirliği ve doğruluğunu saptamak isteseydiniz ne yapmanız gerekirdi tartışınız.

Kaynaklar

- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6), 1513-1523.
- Carpenter, T. A., Colebrook, L. D., Hall, L. D., & Pierens, G. K. (1993). Application of gradient-selective COSY and double-quantum filtered gradient-selective COSY experiments to carbohydrates: 2-deoxy-d-arabino-hexose ("2-deoxy-d-glucose"). *Carbohydrate research*, 241, 267-272.
- Domenico, P., Marx, J. L., Schoch, P. E., & Cunha, B. A. (1992). Rapid plasmid DNA isolation from mucoid gram-negative bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11), 2859-2863.
- Takahashi, S., & Nagano, Y. (1984). Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 10, 1305-1313.

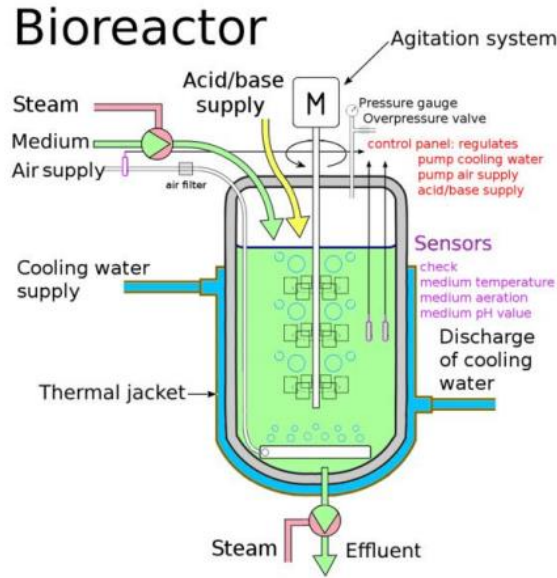
DENEY 2: BİYOREAKTÖRDE MAYA (*Saccharomyces cerevisiae*) ÜRETİMİ

2.1. Deneyin Amacı

Bu deneyin amacı kapalı sistemde çalışan 5 L hacimli bir biyoreaktörde *Saccharomyces cerevisiae* üretmek, gelişim sürecinde örnekler alarak büyüme eğrisi oluşturmak ve büyüme evrelerini gözlemlemektir.

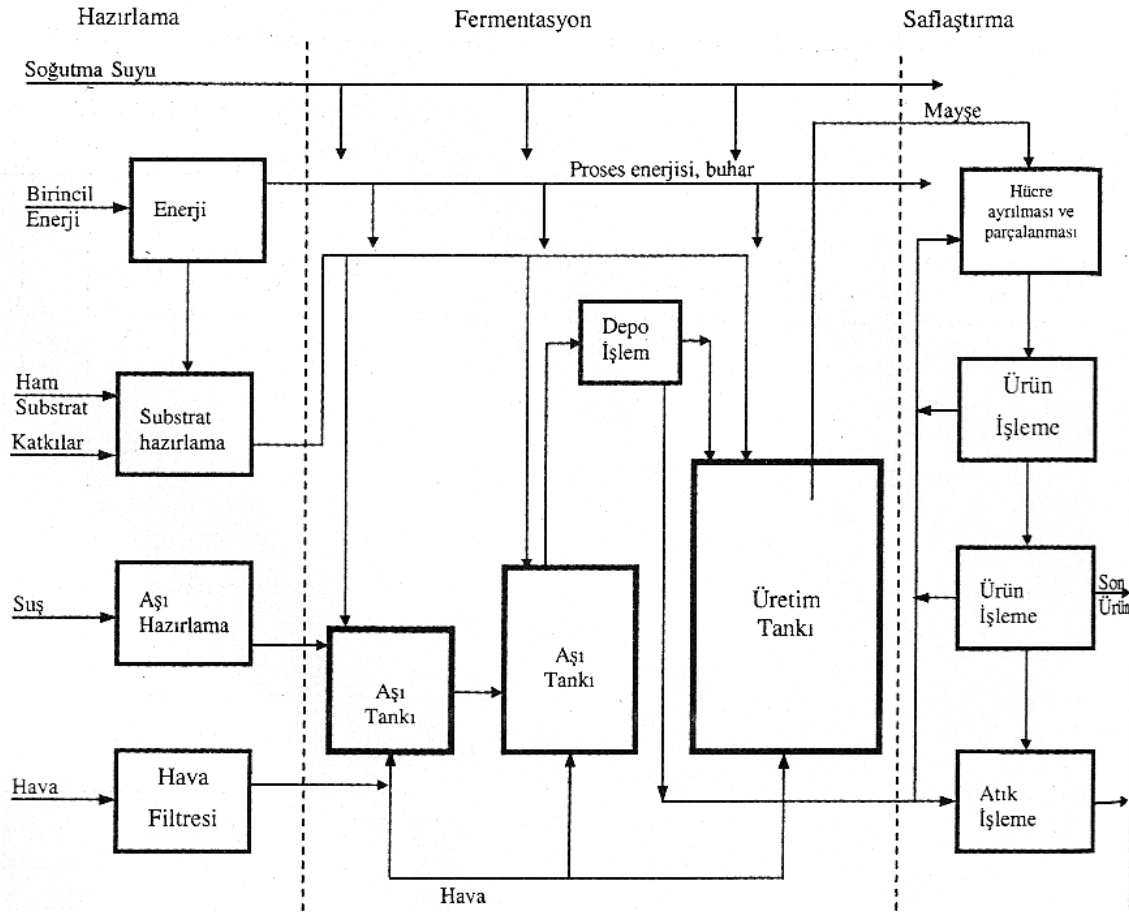
2.2. Teorik Bilgi

Biyoreaktör; içinde kontrollü yöntemlerle organizma (bakteriler, mantarlar, mayalar, vb.) veya ürün üretimi için organizmaların geliştirildiği veya bazı özel durumlarda özgül reaksiyonların yapıldığı tanklardır (Şekil 9). Biyoreaktörler proteinlerin, organik asitlerin, aminoasitlerin, antibiyotiklerin, enzimatik veya mikrobiyal proseslerinde önemli bir role sahiptir. Bu prosesler aerobik veya anaerobik olabilir. Biyoreaktörlerin temel hedefi istenilen ürünün en verimli ve kaliteli şekilde üretilmesi için uygun ortam sağlamaktır. Biyoreaktörün gaz (oksijen, nitrojen, karbondioksit) ve sıvı akış hızları, sıcaklık, pH, substrat ve ürünlerin konsantrasyonu, hücre sayısı ve bileşimi (proteinler ve nükleik asitler), çözülmüş oksijen seviyeleri ve karıştırma hızı gibi çevresel koşulları yakından ve sürekli olarak izlenmeli ve kontrol edilmelidir.



Şekil 2. Biyoreaktör

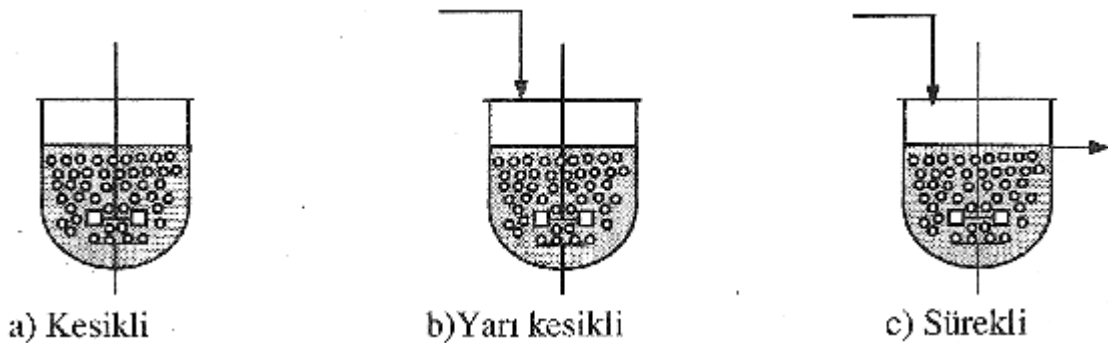
Biyoteknolojik bir proses 3 ana bölümde incelenebilir: hammaddelerin hazırlanması ve ön işlemden geçirilmesi (upstream processing), fermentasyon veya biyolojik reaksiyon (cultivation) ve ayırma ve saflaştırma (downstream processing). Biyoteknolojik bir prosesin genel akış diyagramı Şekil 3'te verilmiştir. Diyagramı oluşturan basamaklardan en önemlisi biyoreaktörlerde mikroorganizmaların üretilmesidir.



Şekil 3. Biyoteknolojik üretim prosesinin genel akış şeması (Schügerl ve Bellgardt, 2000).

2.2.1. Biyoreaktörlerin İşletim Şekilleri

Biyoprosesler besiyerinin reaktöre beslenmesine ve sisteme oksijen verilir verilmemesine bağlı olarak çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Besiyerinin akışına bağlı olarak biyoreaktörler kesikli, yarı kesikli ve sürekli olarak temelde 3 gruba ayrılır.



Şekil 4. Biyoproseslerin temel işletim şekilleri.

2.2.1.1. Kesikli Prosesler

Kesikli proseslerde sisteme gelen ve sistemi terk eden besiyeri yoktur. Substratların tamamı başlangıçta reaktöre konur. Az bir miktar biyokütle ile aşılandıktan sonra hücreler üreme için gerekli substratlardan biri tükeninceye kadar veya inhibitör ürünler üremeyi durduruncaya kadar çoğalmaya devam eder. Küçük ölçekli işlemlerde, tam olarak geliştirilmemiş yeni prosesleri test etmek, çok pahalı ürünlerin üretimi ve sürekli işlemlerle dönüşümü zor olan proseslerde kesikli reaktörler kullanılır. Ayrıca bu reaktörler yüksek substrat derişimlerinin istenen biyolojik reaksiyon üzerine olumsuz etkisinin olmadığı ve ürün miktarının az olacağı durumlarda kullanılabilir. Kesikli reaktör, girdinin uzun süre reaktörde kalması ile elde edilen yüksek dönüşüm üstünlüğüne sahiptir ve proses kontrolü için az emek gerekmektedir. Ancak aynı zamanda yükleme başına yüksek işçilik maliyeti, ürünlerin yüklemekten yüklemeye ürün değışkenliği ve büyük ölçekli üretim zorluğu gibi dezavantajlara sahiptir.

2.2.1.2. Yarı Kesikli Prosesler

Reaktöre sürekli besiyeri beslenir, fakat ortamdan uzaklaştırılmaz. Yani reaktörde sıvı hacmi sürekli artar. Yarı kesikli proses, substrat derişiminin ortamda düşük olması gerektiği durumlarda kullanılır. Biyokütle derişimi sürekli olarak artar ve biyolojik reaksiyonun hızı kesikli prosesin aksine besleme hızı ile kontrol edilir.

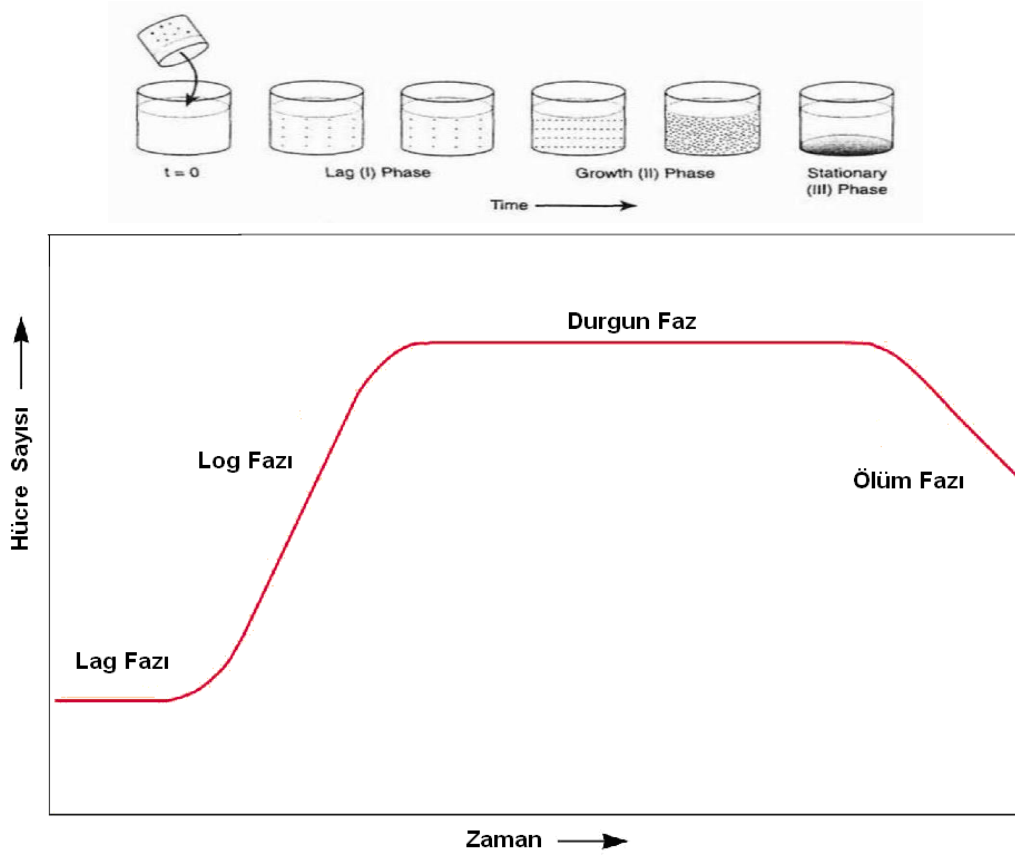
2.2.1.3. Sürekli Prosesler

Besiyeri reaktöre sürekli beslenir ve genellikle aynı hızda ortamdan uzaklaştırılır. Yarı kesikli prosese benzer şekilde biyolojik reaksiyon hızı besleme hızıyla kontrol edilir. Besleme hızının nasıl kontrol edildiğine bağlı olarak değışik sürekli prosesler vardır. En önemlisi olan kemostat, sabit giriş besleme hızında işletilir. Türbidostat ise giriş besleme hızı çıkış hücre derişimi ile kontrol edilir. pH-auxostat ise kontrol değışkeni pH'tır. Sürekli prosesin avantajı genellikle verimliliğin diğerlerine göre yüksek olmasıdır. Fakat uygulamada kesikli veya yarı kesikli prosesler daha çok tercih edilmektedir. Bunun nedeni, proses seçiminde verimliliğin tek başına belirleyici bir etken olmaması ve diğer başka etkenlerin de dikkate alınması gerektiğidir.

2.2.2. Mikrobiyal Büyüme Kinetikleri

Biyoteknolojide fermentasyonlar kesikli (batch), kesikli beslemeli (fed-batch) veya sürekli (continous) yöntemlerle yürütölmektedir.

Kesikli kültürlerde fermentasyon ortamı hazırlanır ve mikroorganizma aşılanır. Sistemin pH, sıcaklık ve diğer değeri ayarlandıktan sonra ortama yeni substrat veya mikroorganizma ilavesi olmaz. Fermentasyon, ortamdaki besin elementleri tükeninceye kadar veya çevresel koşullarda gözlemlenen değışikliklere göre sonlandırılır. Fermentasyon boyunca fermentöre oksijen, köpük önleyici ve pH ayarı için ilave edilen asit ve bazlar hariç herhangi bir madde ilave edilmez. Kültür ortamı, biyokütle ve metabolit konsantrasyonu hücre metabolizmasının bir sonucu olarak sürekli olarak değışiklik gösterir. Kesikli fermentasyonda steril besiyerine aşılandıktan sonra (inokülasyon), uygun koşullar altında inkübasyona bırakılan mikroorganizmada dört temel büyüme fazı görülür (Şekil 5).



Şekil 5. Kesikli kültürde hücre büyümesinin kinetiği.

Lag Faz:

Lag faz olarak adlandırılan alışma fazında, hücre konsantrasyonunda çok az artış vardır. Lag faz aşamasında hücreler kendilerini yeni ortamlara göre ayarlamaktadır. Bu süre içinde hücreler, substratın hücreye girmesi için gereken taşıma proteinlerinin sentezlenmesi, yeni substratı kullanmak için gereken enzimlerin sentezlenmesi ve hücrelerin genetik materyalini kopyalanması gibi işlevleri yerine getirir. Lag fazın uzunluğu veya kısalığı hücrelerin inokulum öncesi hangi fazda olduklarına bağlıdır. Hücrelerin inokulum ortamı ile fermantasyon ortamı arasında farklılığa göre de bu süre uzun veya kısa olabilir.

Log Faz:

Lag fazın sonunda hücre yeni kültür ortamına adapte olmuş olarak hızla üremeye başlar. Hücre kütlesi bu aşamada hızla artar. Hücre sayısı logaritmik olarak artarken, kültürün spesifik büyüme hızı sabit kalmaktadır. Log faz, hücre çoğalma hızı hücre konsantrasyonu ile orantılı olması nedeniyle çoğalma fazı olarak adlandırılır. Bu fazda metabolizma için gereken tüm enzimlerin yolu besin içinde olduğundan (alışma fazının bir sonucu olarak) ve hücreler besinleri en verimli şekilde kullanacaklarından dolayı hücreler maksimum hızda bölünmektedir.

Durgun Faz:

Durgun faz, kararlı fazdır. Durağan faz sırasında, besinlerin veya önemli metabolitlerin tükenmesinin bir sonucu olarak net çoğalma hızı sıfırdır. Bu fazda net büyüme gözlenmez, biyokütle miktarı sabit kalır. Çoğu antibiyotik dahil birçok önemli fermantasyon ürünü, sabit

fazda üretilir. Örneğin, *Penicillium chryogenurn* küfö kullanılarak ticari olarak üretilen penisilin, ancak hücre çoğalması sırasında meydana gelen organik asitlerin ve zehirli maddelerin etkisi ile de yavaşlar.

Ölüm Fazı:

Hücrenin enerji rezervlerinin tamamen tükendiği ve metabolik aktivitenin durduğu dönemdir. Ticari işlemlerde ölüm fazının hiçbir değeri yoktur. Bu aşamaya gelir gelmez fermentasyon kesilmektedir.

2.2.3. Üreme Kinetiği

Eksponansiyel büyüme aşaması (log faz), ürünü ve/veya biyokütlenin kendisini üretmek istediğimizde büyüme kinetiğinin en önemli aşaması olarak belirtilir. Üstel büyüme hızının ölçülmesi (yani hücrelerin ne kadar hızlı büyüdüğü), kültür kinetiğinin ölçülmesinde ilk temel adımdır.

Kültür ortamının besin oranları ve pH, sıcaklık, iyon kuvveti vb. gibi fizikokimyasal koşulları uygunsa “dt” gibi belirli ve küçük bir zaman aralığındaki mikroorganizma (biyokütle) artışı “dx”; ortamdaki mikroorganizma konsantrasyonu (x) ile orantılıdır. Bu tanımlama aşağıdaki matematiksel bağlantılar ile gösterilir:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$*t_d = \ln 2 / \mu$$

(μ =spesifik üreme hızı; X_2 =Log faz sonundaki hücre sayısı; X_1 =Log faz başındaki hücre sayısı; t_2-t_1 = log faz süresi; t_d =ikilenme süresi)

NOT!! Üreme kinetiği için olan bu denklemler sadece log faz süresince uygulanabilir. Yani spesifik üreme hızı ve ikilenme süresi hesaplanması için oluşturulacak grafik log faza göre çıkartılmalıdır.

*Spesifik büyüme oranı (μ), hücrelerin ne kadar hızlı çoğaldığını tanımlar. Spesifik büyüme oranının daha yüksek değeri, hücrelerin daha hızlı büyüdüğü anlamına gelir. Hücreler büyümediğinde, spesifik büyüme hızları sıfırdır. Log faz sırasında, spesifik büyüme hızı nispeten sabittir.

Saccharomyces cerevisiae tek hücreli canlılar grubundan olup ekmek mayası olarak bilinir. Maya hücreleri yuvarlak veya oval şeklinde olup, boyutları 2-3 μm ile 20-50 μm arasında değişir. 1 gr yaş maya yaklaşık 10 milyar hücre içerir. Yaklaşık 600 adet bilinen maya türü olmakla birlikte bunlardan sadece birkaç tanesi ticari öneme sahiptir. Ekmek yapımında kullanılan maya türü *Saccharomyces cerevisiae*'dir.

Deney Öncesi Araştırılması Gereken Sorular:

- Bir biyoreaktörün sahip olması gereken özellikleri ve çalışma prensipleri nelerdir?
- Biyoreaktörü oluşturan ana elemanlar hangileridir?
- İnokülasyon, inokulum, kültivasyon ve fermantasyon nedir?
- Mikroorganizmalar hangi yollarla çoğalırlar?
- Mikroorganizmalar laboratuvar koşullarında üretilmek isteniyorsa nasıl bir yöntem izlenmelidir?
- *Saccharomyces cerevisiae* nasıl bir mikroorganizmadır, özellikleri nelerdir?

Ön Çalışma:

- *Saccharomyces cerevisiae*'nin saf kültürü katı besiyerine yayma yöntemi ile ekilir, 48 saat 30°C'de inkübe edilir.
- Katı besiyerinden tek koloni ekimi ile 10 mL'lik sıvı besiyerine geçilir (mini-prep). 48 saat 30°C'lik çalkalayıcı inkübatörde bırakılır.
- Ölçek büyütme işleminde kullanılan sıvı besiyeri hacmi büyük ölçeklinin %10 kadarı olmalıdır.
- Süre sonunda 10 mL'lik kültür 100 mL'lik steril besiyerine aktarılır ve 48 saat 30°C'lik çalkalayıcı inkübatörde bırakılır.

Deneyin Yapılışı:

- Süre sonunda 100 mL'lik besiyerinin tamamı büyük ölçekli besiyerine (biyoreaktöre) aktarılır.
- Biyoreaktöre ekim yapıldığında ($t = 0$, kontrol) örnek alınmaya başlanır ve büyümenin gerçekleşeceği 48 saat içinde belirli aralıklarla örnek alınmaya devam edilir.
- Örnek alım işleminde cihazın tahliye vanası kapatılır, örnek alma aparatı kullanılarak birkaç mL sıvı besiyeri bir deney tüpüne aktarılır.
- Alınan örneklerin absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülür. Blank (kör) olarak steril besiyeri kullanılmalıdır. Blank cihaza yerleştirilir. Auto zero yapıldıktan sonra örnek küvete eklenir ve OD₆₀₀ belirlenir.

Sonuç Raporunda Olması Gerekenler:

- Alınan her örnek için $t = 0$ anından başlayarak zamanı belirleyiniz.
- Elde ettiğiniz OD₆₀₀ değerlerini (x =hücre sayısı) kaydedip zamana karşı bir grafik oluşturunuz.
- Grafik üzerinde büyüme evrelerini gösteriniz.
- Log fazı belirleyiniz.
- Spesifik üreme hızı (μ) ve ikilenme süresini (t_d) hesaplayınız.
- Lag fazdan logaritmik faza geçişi hızlandırmak için yapılması gerekenleri yazınız.