

Final Sınavı Soruları

Soru1: PCR döngüsünü kısaca anlatınız.

Cevap1:

İlk adımda solüsyonun sıcaklığı artırılarak DNA zincirinin denatüre olması sağlanır. Bu sırada Bundan sonra primerlerin tekli DNA zincirlerine bağlanması için sıcaklık düşürülür. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık polimerizasyonun gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa getirilir: Primerler uzatılır ve primerlerin arasında kalan bölge sentezlenir. Sarmallar tekrar denature edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezi tekrar tekrar gerçekleşir; Bu işlem genelde 20 ila 50 döngü arasında tekrarlanır.

Soru2: Proteomiks nedir, açıklayınız.

Cevap2: Belirli bir genom tarafından ifade edilen proteinleri bütünsel ve birbiriyle etkileşimlerini dahil ederek inceleyen araştırma alanıdır. Bu alan, protein düzeyinde, gen ifadesi örüntüleri protein ve genom ilişkileri, protein-protein etkileşimlerini, protein modifikasyonlarını vs. incelemektedir.

Soru 3: DNA microarray tekniğinin çalışmasını açıklayınız

Cevap3: Mikroarray binlerce mikroskobik DNA oligonükleotit noktalarına sahiptir. Her bir nokta,features, prob denilen özel bir DNA sekansının pikomollerini içerir.Prob-hedef hibritleşmesi genelde hedefteki nükleik asitlerin miktarını belirlemek için florofor etiketli hedeflerin belirlenmesiyle ölçülür ve saptanır. Bir array binlerce prob içerebildiğinden dolayı, bir mikroarray deneyi pek çok genetik testlerin sonucunu verebilir.

Soru4: Agaroz Jel Hazırlanması (1% w/v) Prosedürünü yazınız.

Cevap4:

- 0.4 gr agaroz tartılır ve 40 ml 1X'lik TAE tampon çözeltisinde dökülür
- Hazırlanan karışım ısıtılır.
- Jel'in biraz soğuması beklendikten sonra (50-60 °C) ve taraklar kalıba yerleştirildikten sonra kalıba dökülür.
- Nükleik asit örnekleri, 6X yükleme tamponu ile karıştırılır (örnek: tampon çözelti, 1:5), örneklerle birlikte, nükleik asit uzunluk referans cetveli (ladder), jeli yüklenir
- Hazırlanmış olan jel elektroforez tankına aktarılır, ve jeli kapatacak şekilde, 1X'lik TAE tampon çözeltisi eklenir
- 90 Voltluk bir akımla 1 saat çalıştırılır

Soru5: Gram-pozitif bakterilerde transformasyon süreci aşamalarını belirtiniz.

Cevap5:

1. Kompetans faktör adı verilen küçük bir proteinin salgılanması ile kompetans geliştirilmesi
2. Çift zincirli DNA'nın bakteriye bağlanması
3. Tek zincirli DNA'nın hücreye alınması
4. Tek zincirli DNA'nın nükleaz degradasyonundan korunması için özel proteinlerle sarılması (eklips kompleks oluşumu)
5. Rekombinasyonla DNA zincirinin alıcı kromozoma entegrasyonu
6. Entegre olmuş DNA parçasının replikasyonu ve yeni fenotipin diğer nesillere aktarılması

Soru6: Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması Prosedürünü yazınız.

Cevap6:

1. Hücreler her zaman büyütüldükleri ortam ve serumda logaritmik faza kadar büyütülür.
2. Canlı hücre sayımı yapılır. Dondurulacak hücrelerin %20'sinden fazlasının ölü olmamasına dikkat edilir.
3. Ne kadar hücreye ve ampüle ihtiyaç duyulacağına karar verilir. Her ampül, 1ml ortam içinde 1×10^7 (ya da 4×10^6 ile 2×10^7 hücre arası) hücre alabilir.
4. Dondurma ortamı her tüpte 1ml artı %10 olacak şekilde hazırlanır. Dondurma ortamı genelde normal kültür ortamı, %10-20 serum ve %5-10 gliserol ve DMSO içerir. Eğer hangi dondurma ortamı kullanılacağına karar verilemiyorsa hücreler %20 serum ve %10 DMSO'da dondurulabilir.
5. Pelet, dondurma ortamında pipetaj yapılarak çözülür.
6. Hücreler, her ampüle 1ml düşecek şekilde ampüllere dağıtılır ve buzda tutulur.
7. Ampüller buzlukta saklanacak bir kutuya yerleştirilir ve -60°C veya daha düşük bir sıcaklıktaki dondurucuda 16 ile 24 saat arası bekletilir.
8. Bir buz kovaşına bir miktar sıvı azot dökülür ve tüpler, sıvı nitrojen tankına aktarılmadan önce burada tutlur.
9. Tüpler yerleştirildikten sonra nereye koyuldukları kaydedilir.

Soru7: Kontaminasyonu Nasıl Tanırız?

Cevap7:

Makroskopik olarak: Kültür şişesini veya kabını ışığa tutularak şunlara dikkat edilerek incelenir:

- *Bulanıklık.* Kültür yoğun olsa bile, ortamın rengi bulanık değil, net bir şekilde görünmelidir. Ortamdaki bulanıklık ve kısım kısım hareket eden renk tonu farklılıkları dikkatle incelenmelidir. Bazı mantarlar ortamda yüzen koloniler oluşturabilirler.
- *Ortamdaki renk değişikliği.* Fenol kırmızısının etkisiyle kırmızı renkli olan kültür, asidik koşullarda sarıya, bazik koşullarda ise mora döner. Bakteriyel kontaminasyon ortamı sarıya, mantar kontaminasyonu ise pembeye dönüştürür.
- *Koku.* Şişenin kapağı açılmadan burun şişeye yaklaştırılır. Birçok kontaminasyonun fark edilebilir bir kokusu vardır.

Mikroskopik olarak: Kültür şişesi öncelikle 10X mikroskopta şunlara dikkat edilerek incelenir:

- *Diğer organizmalar.* Düşük büyütme gücünde, mantar miselleri uzun zincirler olarak gözlenir. Bu büyütmede mayalar da küçük toplar halinde, bazen de tomurcuklu bir şekilde görülebilirler.
Yüksek büyütme gücünde bakteriler gözlenebilir. Bakteriler çubuk, kok, tek veya zincirlenmiş öbekler halinde olabilirler.
- *Zarar görmüş hücreler.* Enfeksiyon, hücreleri öldürebilir. Her hücrenin parçalanmasına ve/veya hücre tabakasının yüzeyde kalkmasına sebep olabilir. Çoğu zaman hücreler normalde olduklarından daha garip görünürler. Daha küçük veya daha büyük ya da koyu renk granüllü olabilirler.

Soru8: Sığır Serum Albümin (Bovine serum albumin – BSA) Tamponunun Hazırlanmasını özetleyiniz.

Cevap8:

- 1) 5 mg BSA küçük bir kaptan tartılır.
- 2) 1000µl fosfat çözeltisi (pH=7.4) eklenip karıştırılır.
- 3) Kap BSA stok tamponu olarak işaretlenir.
- 4) Örneğin absorbansı UV spektrometre ile ölçülür. Ölçülen absorbans çok yüksek olduğundan bu solüsyon seyreltilmelidir.
- 5) Stok çözeltiden 200 µl BSA alınır.
- 6) Üzerine 800 µl fosfat çözeltisi eklenir. (200 µl BSA + 800 µl fosfat çözeltisi). Bu şekilde BSA seyreltilmiş olacaktır.

Soru9: Spektral Analiz kaç basamağa ayrılır, her basamağı özetleyiniz.

Cevap9: Elde edilen spektrumlar üzerinde uygulanacak olan spektral analiz iki basamağa ayrılabilir. İlk basamakta bant genişliği, sinyal şiddeti ya da bant alanı ve bant frekans değerlerinin belirlenmesini içeren kantitatif analiz yer alır. Bu analizde original ham data kullanılır. İkinci basamakta yer alan kalitatif analiz ise spektrumların gösterimi için gerçekleştirilmektedir. Bu analizin temelini yapılan normalizasyon oluşturmaktadır.

Soru10: Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı (scanning) Elektron Mikroskobu (SEM) 'nun kullanım ve avantajlarını belirtiniz.

Cevap10:

TEM: Kullanım: Hücre içindeki yapıları detaylı incelenmesini sağlar

Avantajları: Yüksek çözünürlük. Konumlama çalışmaları için immünojenik işaretleme yöntemi ile birleştirilerek kullanılması mümkündür

SEM:

Kullanım: Hücre dışındaki bileşenleri ayrıntılı olarak incelememizi sağlar

Avantajları: Yüksek çözünürlük. (Çözünürlük TEM'e göre daha düşüktür)