

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ (BAP)
PROJE KESİN RAPORU

| | |
|------------------------------------|--|
| PROJE KODU | 04/2011-41 |
| PROJE ADI | BİYOLOJİK BİLİMLERDE MRNA SEVİYESİNDE EKSPRESYON UYGULAMALARI |
| PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ | Figen (Ünlü) Erkoç |
| PROJE EKİBİ | Yard. Doç. Dr. Tuğba Boyuneğmez Tümer: Araştırmacı Biyolog İlkay Çorumluoğlu: Araştırmacı Yüksek Lisans öğrencisi Bilge Kocayığit: Araştırmacı |
| FAKÜLTE/ENSTİTÜ/YÜKSEK OKUL | Gazi Eğitim Fakültesi |
| BÖLÜM/ANABİLİM/BİLİM DALI | OÖFMAE/Biyoloji Eğitimi |
| RAPOR TARİHİ | 26 Nisan 2013 |

-9- sayfadan oluşan bu rapordaki bilgilerin/belgelerin doğruluğunu kabul ediyorum.

İmza:

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|---|
| 1. PROJE RAPORU..... | 3 |
| 2. PROJE BÜTÇESİ ÖZET BİLGİLERİ..... | 9 |
| 3. PROJE ÇIKTILARI | 9 |
| 4. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ TARAFINDAN YAPILACAK GENEL DEĞERLENDİRME | 9 |
| 5. EKLER..... | 9 |

1. PROJE RAPORU

(Proje raporu aşağıdaki başlıklar dikkate alınarak hazırlanmalıdır)

Özet ve Abstract

(En fazla 1 sayfa olmalıdır.)

ÖZET

BİYOLOJİK BİLİMLERDE MRNA SEVİYESİNDE EKSPRESYON UYGULAMALARI

Kişilerin davranışlarında belli bir zaman diliminde oluşan değişiklikler öğrenmedir ve öğrenme sonundaki değişikliğin “kalıcı izli değişiklik” olması beklenir. Öğretimin kalitesi amaç; amaçlara ulaşılmasının kontrol edilmesi; konuya ve öğrenciye uygun bir ya da birkaç öğretim yönteminin seçilmesi ile sağlanır. Bruner tarafından geliştirilen buluş yoluyla öğretim stratejisi projede metod olarak seçilmiş; öğrencilerin aktif katılımını sağlamaya uygun Laboratuvar Deney Yöntemi kullanılmıştır. Biyolojik bilimlerin farklı alanlarından araştırmacıların deneylerinin bir bölümünde ilgili proteinin ekspresyonunu incelemeleri gerektiğinden, mRNA izolasyonu, saflık kontrolü ve gen ekspresyonu metodları için standardize protokolları kullanmaları gerekmektedir. Proje sonucunda toplam RNA izolasyonu için “hot phenol metodu”, “guanidinium izotiyosiyanat metodu”, ticarî Trizol® (Invitrogen), High Pure RNA Tissue Kit® (Roche) ve RNeasy Mini Kit® (QIAGEN), kullanılmış; bunlardan balık solungaç ve karaciğerinden mRNA izolasyonunda saflık derecesi en yüksek mRNA'nın Qiagen kiti ile hazırlandığı; diğerlerinde protein ve genomik DNA kontaminasyonu olabileceği bulunmuştur. mRNA izolasyonu için hazırlanan kaynak/rehber eğitim materyali deneyin her bir aşamasının detaylandırıldığı laboratuvar föyü olarak proje çıktısıdır. Projenin ülkemizin dahil olduğu çok önemli iki AB süreci için, Bolonya ve Lizbon, harmonizasyon (eşdeğerlik), yeterliklerin tanınması ve kalite güvencesinde moleküler gen ekspresyonu metodlarını kullanan araştırmacılara artan pazar rekabetinde iş bulma avantajı sağlayan yenilikçi yaklaşım sunması beklenmektedir.

ABSTRACT

MRNA LEVEL EXPRESSION APPLICATIONS IN BIOLOGICAL SCIENCES

Behavioral changes forming within a time period of an individual are learning; and permanent reflections are expected at the end. Quality of education is achieved by setting an aim, controlling that the aims are reached and that one or several teaching methods suitable for the topic and characteristics of the student are selected. Learning by discovery strategy as developed by Bruner was selected as the method of choice in the present project with a student centered approach by using active participation of the student in the laboratory experiments. Since mRNA gene expression is a method employed by many researchers from different disciplines of biological sciences, standardized protocols are to be used for mRNA isolation, purity control and gene expression methods. Results of the project showed that “hot phenol method”, “guanidinium isothiocyanate”, commercial kits: Trizol® Kit (Invitrogen), High Pure RNA Tissue Kit® (Roche) and RNeasy Mini Kit® (QIAGEN) were used for total RNA isolation and the highest purity mRNA can be isolated from fish liver and gill tissue by using the Qiagen kit; the others had some level of genomic DNA and protein contamination. The resource education material developed is the product: Laboratory manual, showing all steps of the experiments for mRNA isolation. The project is expected to present a new approach towards the goals of the Bologna Process and the Lisbon Research Agenda of the European Union for harmonisation, recognition of qualifications and quality assurance for smooth recognition procedures and offer advantage to those researchers using molecular gene expression methods in job opportunities in the ever increasing competition in the market.

Projenin Amacı, Önemi, Kapsamı ve Yapılan Çalışmaların Belirtilmesi (En fazla 1 sayfa olmalıdır.)

Günümüzde radyoizotopların yerini büyük ölçüde biyokimya ve moleküler biyoloji yöntemlerinin alması ve moleküler seviyedeki mekanizmaları açığa kavuşturabilmesinden dolayı giderek daha çok tercih edildiği bilinmektedir. Farmakoloji, fizyoloji, bitki biyokimyası, biyoteknoloji, kanser araştırmaları, biyokimya gibi bazı örnekler verilen alanlarda gen ekspresyonu ile indüklenen proteinlerin araştırıldığı ve mRNA kullanılarak yapılan real-time PCR yönteminin Western blotlamaya göre daha hassas ve kısa sürede tamamlanan bir yaklaşım olduğundan, projede farklı disiplinlerden araştırmacıların araştırmalarının bir aşamasında söz konusu yöntemleri kullanabilmeleri için standard protokollara dayalı mRNA izolasyonu ve RT-PCR yapmaları gerekmektedir. Ancak, lisans düzeyinde pek detaylı, hatta bazı eğitim kurumlarında hiç uygulaması yapılmayan ve/veya öğretilmeyen bu metodları araştırmacılar kullanmak zorunda kaldıklarında zorluklarla karşılaşmakta; asıl araştırmaları sekteye uğramakta hatta bazan başarısızlıklar ortaya çıkmaktadır. mRNA'nın total RNA izolasyonu kadar kolay olmaması, çok hızlı yıkılması ve tek zincirli olması da izolasyonunu total RNA'ya göre daha da zorlaştırmaktadır. Proje kapsamında geleneksel fenol-kloroform yöntemi, buna dayanılarak hazırlanan Trizol® ticari kiti ve diğer iki ticari kit kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Doku olarak etik kurul gerektirmeyen, kollajen miktarı az olduğu için dokuların deneye hazırlanması kolay olan balık solungaç ve karaciğeri kullanılarak deneyler geliştirilmiştir. Metodların karşılaştırılmaları yapılmış ve mRNA izolasyonunda karşılaşılan zorluklar tek tek açıklanmış, yapılabilecek hatalar görsel materyal ile gösterilmiştir.

Amaç: Proje kapsamında deney föyü halinde özellikle izolasyon sırasında hızlı ve kolay yıkıldığı, ortamdaki genomik DNA'larla kolay kontamine olduğu için izolasyonu zor olan mRNA'nın izolasyonu için **biyologlar, biyoloji öğretmenleri ve biyolojik bilimlerin diğer bilim dallarından olup da moleküler biyoloji uzmanı olmayan kişilerin** rahatlıkla temin edebileceği standardize deney protokolları hazırlanmıştır. Yeni öğretim yöntemleri kullanılarak hazırlanan rehber/eğitim materyalleri uzaktan öğretim, bilgisayar destekli öğretim ve web tabanlı öğretim yaklaşımlarına uyarlanabilecek ve böylece geniş bir araştırmacı, öğretim elemanı ve öğrenci grubunun erişimine açık olacağından, çok çok değişik eğitim kurumlarında, yaygın olarak, kullanılabilir.

Projenin daha geniş, Avrupa ve uluslar arası rekabetteki boyutu/durumu: Bologna Sürecinin oluşturmayı hedeflediği Avrupa Yükseköğretim Alanı (AYA, <http://bologna.yok.gov.tr/?page=yazi&i=3>) içinde yer alan ülke vatandaşları, yükseköğrenim görmek ya da çalışmak amaçları ile Avrupa'da kolayca dolaşabileceklerdir. Böylece Avrupa, gerek yükseköğretim ve gerekse iş imkanları açısından dünyanın diğer bölgelerinden kişiler tarafından tercih edilir hale gelmektedir. Avrupa Yükseköğretim Alanında ulaşılacak istenen temel hedef, üye ülkelerin eğitim sistemlerinde çeşitlilik ile birlik arasında bir denge kurularak; tek tip yükseköğretim sistemi haline getirilmesidir. Amaç, yükseköğretim sistemlerinin kendilerine özgü farklılıkları korunarak birbirleriyle karşılaştırılabilir olması ve uyumlu hale getirilmesinden ibarettir. Bu şekilde, bir ülkeden veya yükseköğretim sisteminden bir diğerine geçişin kolaylaşması ve böylece öğrenciler ve öğretim görevlilerin hareketliliği ve **istihdamının artırılması planlanmaktadır**. Ülkelerin "Ulusal Yeterlik" sistemlerinin "Avrupa Yeterlik Çerçevesi" ile uyumlu hale getirilmesiyle **kalite güvencesi sağlanacaktır**.

Avrupa ülkeleri, Türkiye'nin de dahil olduğu bu iki önemli sürecin (Bologna ve Lizbon) sunmuş olduğu ortak anlayış, ilke ve yaklaşımlar çerçevesinde yüksek öğretim sistemlerini yeniden gözden geçirmekte ve yeniden yapılandırmakta; yeni yeterliklerin tasarlanabilmesi için önemli içerik değişimleri ve öğretim yaklaşımlarına yönelmektedir. Böylece "Ulusal Yeterlik" sistemlerine dahil olan yüksek öğretim ile mesleki eğitim ve öğretimin "Avrupa Yeterlik Çerçevesi" ile ilişkilendirilmesiyle eğitim ve öğretimde kalite güvencesinin teşvik edilmesi ve uygulanması benimsenmiştir.

Projede son yıllarda tercih edilen yeni pedagojik stratejilerin uygulandığı dinamik ve öğrenci merkezli, öğrenme ortamı hedeflenmiştir. Bu proje ile "real learning process" hedefine yönelik, öğrenci merkezli (üniversitelerin tıp, eczacılık, diş hekimliği, veteriner hekimlik, biyoloji, kimya, gıda mühendisliği, çevre mühendisliği, orman mühendisliği, ziraat mühendisliği, sağlık bilimleri fakültelerinin farklı bölümleri ile yüksek okulların ilgili bölümlerinin lisans ve lisansüstü öğrencileri ve araştırmacılar için), esnek moleküler biyoloji mRNA izolasyon deney protokolları geliştirilmiştir.

Projenin Yöntemi

(En fazla 3 sayfa olmalıdır.)

Materyal ve Metod

Solungaç ve karaciğer dokusundan total RNA (RT-PCR çalışmalarına uygun mRNA'ların yıkılmadan elde edilmesi sağlanarak) üç değişik yöntem ile izole edilmiştir. Materyal olarak piyasadan temin edilmiş sazan ve alabalık kullanılmıştır.

RNA izolasyonu için kullanılacak bütün malzemeler önceden %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edilir; sonra otoklav veya Pastör fırınında steril edilir. Havanlar sterilizasyondan sonra bir gece -80°C'da derin dondurucuda bekletilir. Yüzde 70'lik, %75'lik ve %96'lık etil alkol (ETOH) şişeleri yarım olacak şekilde otoklavlanır. Çalışma alanı %70'lik ETOH veya %10'luk çamaşır suyu ile dezenfekte edilir.

Balıklar laboratuvara getirildikten sonra buz anestezisi altında, önceden steril edilmiş makas, pens, bistüri ve spatula ile disekte edilmiştir. Önceden steril edilmiş, soğutulmuş petri kabına alınan solungaç ve karaciğer dokusu Carl Zeiss marka (Stemi DV4 model) stereo mikroskop kullanılarak etrafındaki bağ dokudan ve solungaçlar kırıldıktan oluşan yaydan temizlenmiştir. Temizlenen dokular önce steril distile su ile sonra %1.15 KCl ile yıkanır. Karaciğer ve solungaç lamelleri porsiyonlanır; ependorf mikrotüplerde -80°C'da (derin dondurucuda) saklanır.

Dokuların üzerini kaplayacak şekilde sıvı azot dökülür ve şoklama dondurma yapılır, üzerine sürekli sıvı azot dökülüp nemlenmesi engellenerek, havanda pulverize edilir. İçine 500 µL monofazik bir fenol, guanidinium izotiyosiyanat karışımı olan TRIzol® (Ambion) konulmuş steril ependorf tüpe, özel düzenek yardımı ile, darası alınmış hassas terazide 0.05 g (50 mg) doku tartılır ve Trizol'e eklenir. Eğer doku 50 mg'ın üzerinde ise her mg doku için 10 µL Trizol daha eklenir. Karışım alt-üst edilerek karıştırılır. Bir solungaç dokusundan 150 mg doku alınmıştır. Geriye kalan dokular ependorflara tartılarak porsiyonlanıp -80°C'ye kaldırılır. Kontaminasyonu önlemek için bu aşamada ve izolasyonun ilk aşamalarında konuşulmamalıdır! Ticari "Qiagen® RNeasy Total RNA extraction from tissue" kiti (kat. no. 74104) ve "Roche® High Pure RNA Tissue" kiti (kat. no. 12033674001) kullanıldığında 30-50 mg doku, üretici firmaların protokolları takip edilerek kullanılmıştır (<http://www.flemingtonlab.com/Protocols/TotalRNAprep.pdf> ve <http://mbb.rutgers.edu/315-NP/315-10Lab2.pdf>).

Trizol metodunda üretici firma protokoluna göre ependorf tüpler donması için sıvı azota koyulur; çıkarılır oda sıcaklığında inkübe edilir. Bir iki defa dondurma-çözme işlemi tekrarlanır. Ependorfların sıvı azotta 10 dakikadan fazla kalmamasına dikkat edilir.! Elli mg doku için 100 µL kloroform (steril kahverengi şişede) eklenir. RNA'nın kırılmamasına dikkat edilerek düşük hızda 1 dak. vortekslenir. Alt-üst edilerek de karıştırılabilir. Önce 5 dak. oda sıcaklığında bekletilir, sonra 5 dak. buzda soğutulur, 13000 rpm'de 15 dak, 4°C'da, santrifüj edilir. Ependorfta santrifügasyon ile oluşan üç katmanın üst sıvı fazında RNA; ortadaki fazda (kırmızı ve yoğun görünümde) DNA; en altta ise protein bulunur. Sıvı faz (üst faz) yeni steril ependorf tüpüne transfer edilir. Sıvı fazı pipetlerken orta faza dokunmamaya özen gösterilmelidir (DNA kontaminasyonunu engellemek için). Buna 100 µL kloroform eklenir. Yukarıdaki gibi tekrar santrifüj edilir; bu aşamada alt fazı daha kıvamlı olan iki ayrı ve şeffaf faz oluşur. İki tüpten 200 µL kadar alınır. RNA izolasyonu sonrası RCR uygulanacak ise bu kademede DNase ile muamele edilir. Sonra genel prosedüre devam edilir. Toplanan faza 200 µL isopropanol (-20°C'da soğutulmuş) eklenir. Alt-üst ederek nazikçe karıştırılır. Eğer DNA kontaminasyonu varsa bu aşamada bulutlu bir görünüm oluşur. Oda sıcaklığında 10 dak. bekletilir. Yukarıdaki gibi tekrar santrifüj edilir. Mikropipet ile süpernatant çekilir ve atılır. Pipetleme yaparken pelete dikkat edilmelidir! Ependorfun dibinde oluşan süt beyazı pelet izole RNA'yı içerir; buna 1000 µL (1 mL) %75 ETOH eklenir. Alt-üst edilerek yıkanır ve karıştırılır. Peletin yerinden sökülüp tüp içinde serbest dolaşması yeterlidir. 7500 rpm'de 5 dak., 4°C'da santrifüj edilir; süpernatant mikropipete çekilir. İzole RNA pelettedir; ependorfun ağzı açık şekilde ters çevirerek bir yere dayandırılarak kurutulur. Kurutma alanı steril olmalıdır! Kurutma için bunsen beki de kullanılabilir (yaklaşık 35 dak.). Kurduğunu kontrol etmek için ependorfun dibine parmakla vurulur. Eğer etrafa dağılan küçük damlacıklar varsa kurumamıştır. Çok fazla kurutmamaya da dikkat edilmelidir, zira bir sonraki basamakta çözünmeyebilir. Pelete 75 µL formazol (DEPC-Q water) eklenir 50°C'da 10-15 dak. ısıtıcı blokta çalkalanır; süt beyazı görünümünü kaybeder. Tamamen çözünmesi sağlanır ve kontrol edilir. Eğer çözülüyse kısa süre 2500 rpm'de 5 dak. santrifüj edilir, bu da tüm sıvıyı aşağı toplamak için yeterlidir. İzole RNA -80°C'da derin dondurucuda saklanır.

Sıcak fenol ile RNA izolasyonu ("hot phenol RNA isolation"): Havanda yukarıdaki şekilde pulverize edilen dokunun 50 mg'ı tartılır ve içinde 700 µL TE tamponu pH 8.0 olan ependorfa aktarılır. Buna 7 µL %10 SDS eklenir, 65°C'da su banyosunda 1-2 dak. bekletilir. Yetmiş yedi µL 1 M sodyum asetat ve 850

μL (65°C 'da) sıcak suyla doyurulmuş fenol (rengi pembeleşince bozulmuştur) eklenir, 10 kere alt-üst edilir. Altı dak. 65°C 'da su banyosunda bekletilir. Bu esnada 60 sn tüp alt-üst edilir. On dak. 4°C 'da 21000 xg (7538 rpm)'de santrifüj edilir. Bu aşamada üç faz oluşur. Üstte şeffaf ortada beyaz altta ise sarımsı ve tortu şeklinde görülmektedir. Alınacak üst fazda RNA, orta fazda DNA alt fazda ise protein ve hücre ekstraları bulunur. Üst fazı alırken orta faz da alınır saf RNA elde edilemez; DNA kontaminasyonu görülür. Üst faz pipetle alınarak içinde 850 μL kloroform olan ependorfa konur, ara sıra alt-üst edilir. Kloroform eklendikten sonra şeffaf iki faz belirginleşir. On dak. 4°C 'da 21000 xg (7538 rpm)'de santrifüj edilir. 250 μL 'lik üst kısım alınır ve yeni bir santrifüj tüpüne koyulur. Üst faz 250 μL 'den fazla çıkarsa kalan 250 μL de diğer ependorfa aktarılır. Her bir tüpe 800 μL soğuk absolü etil alkol, 35 μL 3 M sodyum asetat eklenir, ependorflar -80°C 'da en az 2 saat; en fazla 1 gece süre ile tutulabilir. İki saatlik soğukta bekletmenin ardından izolasyona devam edilir. Yirmibeş dak. 4°C 'da 21000 xg (7538 rpm)'de santrifüj edilir, dikkatli bir şekilde süpernatant çekilerek atılır. Bir mL soğuk %80 etil alkol eklenerek, RNA peleti pelet yerinden oynayana kadar yıkanır. Onbeş dak. 4°C 'da 21000 xg (7538 rpm)'de santrifüj edilir. Soğuk %80 etil alkol ve soğukta 15 dak. santrifüj işlemleri tekrarlanabilir. Otuz μL RNA peleti steril dislite su içinde süspansiyon edilir, bunun 10 μL 'si alınır ve 490 μL steril distile su eklenir. Aşağıda anlatıldığı şekilde saflık kontrolü ve miktar tayini yapılır, -80°C 'de saklanır.

(http://microgen.ouhsc.edu/protocol_home.htm)

Tek basamaklı guanidinium izotiyosiyanat-fenol-kloroform ekstraksiyonu ile RNA izolasyon metodu:

Sıvı azot ile pulverize edilen her 100 mg taze doku için 1 ml denatüre edici solüsyondan (orijinal yöntemde solüsyon D) eklenir (denatüre edici solüsyon: 4 M guanidinium izotiyosiyanat, 25 mM sodyum sitrat.2H₂O, %0.5 sodyum lauril sarkozinat (w/v), 0.1 M β -merkaptotanol). Lisatin 1 ml'sine sırasıyla 0.1 mL 2 M sodyum asetat, pH 4.0, eklenir (alt-üst edilerek karıştırılır); 1 mL suyla doyurulmuş fenol eklenir ve alt-üst edilerek karıştırılır; 0.2 mL kloroform/izoamil alkol (49:1) eklenir ve güçlü bir şekilde 10 sn. vortekslenir. Not: 50 mg doku kullanıldığı için üçüncü basamaktaki çözeltilerin miktarlarının yarısı alınmalıdır. Örnekler 15 dak. buz üzerinde tutulur. Yirmi dak. 10000 xg (5202 rpm) 4°C 'da santrifüj edilir. NOT: RNA'nın DNA ve proteinlerden ayrılmasını sağlamak için asidik pH kritik faktördür. Bu sebeple hiçbir zaman suyla doyurulmuş fenol yerine tamponlu fenol kullanılmamalıdır, iyice karıştırarak asidik sulu faz ile organik fazın iyice karıştığından emin olunuz. Karıştırırken ve çalkalarken kapakların sıkıca kapalı olduğundan ve çeker ocak içinde çalışıldığından emin olunmalıdır. Dikkatli bir şekilde pipet kullanarak içinde çoğunlukla RNA'nın bulunduğu üstteki faz temiz ependorflara aktarılır. Ara fazda hapsedilmiş DNA'nın kontaminasyonunu önlemek için sulu fazın en alt kısmını almayınız. Ekstrakte edilen RNA'yı çöktürmek için sıvı faza eşit hacimde izopropanol (genellikle 1 mL) eklenir, iyice karıştırılır ve örnekler en az 1 saat -20°C 'da inkübe edilir (bir gece de bekletilebilir); hatta -20°C 'da bir süre daha saklanabilir; prosedürün kalan kısmına sonra devam edilebilir. Otuz dak. 10000 xg'de 4°C 'da santrifüj edilir ve süpernatant atılır; RNA çöktürülür. Genellikle RNA'nın çökmesi santrifüjden önce pek görülmez, RNA pelet gibi jel formunda olmalıdır. İzopropanolü dikkatlice dökünüz ("decant") ve RNA peletini 0.3 mL denatüre edici solüsyonda (ilk basamakta kullanılan her bir mL'si için) çözünüz. Sıvı fazı alırken DNA ve RNA'nın içinde çokça bulunduğu düşük organik faza ve interfaza dokunmadığınızdan emin olunuz. Almanız gereken sıvı fazın hacmi başlangıçtaki solüsyon D'nin hacmiyle hemen hemen eşit olmalıdır. Peletler kolayca kaybedilebilir. Süpernatantı dökerken yeni bir tüpe dökünüz ki peleti kontrol edene kadar zayıf olmamış olsun. Çözeltiyi ependorfa aktarınız, 10 defa alt-üst ederek nazikçe karıştırınız (veya parmak ucuyla tüpün dibine 10-15 defa tıklama şeklinde nazikçe vurunuz). RNA'yı 1 hacim izopropanol ile bir saat -20°C 'da çöktürünüz. Maksimum hızda santrifüj ile RNA'yı toplayınız, RNA peletini 0.5-1 mL %75 etil alkol ile iki defa yıkayınız, tekrar santrifüj ediniz kalan etil alkolü pastör pipeti ile alarak uzaklaştırınız, tezgah üzerinde ependorfu birkaç dakika açık tutarak etanolün uçmasını sağlayınız; ancak peletin tamamen kurumasına izin vermeyiniz. 50- 100 μL DEPC-ile-muamele edilmiş distile su ekleyerek RNA çözeltisini -70°C 'da saklayınız. Aşağıdaki şekilde miktar tayini ve saflık kontrolü yapılır.

Roche® High-Pure RNA Preparation Tissue Kit ile Total RNA Ekstraksiyonu: Hücre kültürü gibi az miktarda total RNA'ların izolasyonunda kullanılmaktadır. Kit, kan, bakteri, maya ve diğer dokular için de uygundur. DNaz sindirme kademesi ile rezidüel genomik DNA'nın RNA'yı kontamine etmesi engellenir. On mg doku parçası havan ve tokmak ile, sıvı azot kullanılarak pulverize edilir ve steril tüpe alınır. 400 μL Lizis/Binding tampon eklenir ve bir kaç saniye vortekslenir. Lizat 2 dak. maksimum hızda santrifüjlenir. Süpernatant başka bir 1.5 mL'lik santrifüj tübüne alınır ve üzerine 200 μL absolü etil alkol eklenerek karıştırılır. High pure filter tübü ve toplama tübü iç içe geçirilir, süpernatant filtrelili tübün içerisine pipetlenir. Otuz saniye maksimum hızda santrifüjlenerek filtrenin kuru olmasına özen gösterilir.

Doksan µL DNase inkübasyon tampon ile 10 µL DNase karıştırılarak filtreli tübün içine pipetlenir. Onbaş dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. 500 µL wash buffer I solüsyonundan filtreli tübün içerisine pipetlenir ve 15 saniye 8000 xg’de santrifüj edilir. Alt tüpte biriken atık sıvı boşaltılır. Wash Buffer II solüsyonundan filtreli tübün içine pipetlenir ve 15 saniye 8000 xg’de santrifüj edilir. Alt tüpte biriken atık sıvı boşaltılır. 300 µL Wash Buffer II solüsyonundan filtreli tübün içine pipetlenir ve 2 dak. maksimum hızda santrifüj edilir. Filtreli tüp yeni bir toplama tübüne yerleştirilir ve 100 µL elüsyon tampon filtreli tübün içerisine pipetlenir. Bir dakika 8000 xg’de santrifüj edilir. Alttaki tüp saf RNA’yı içermektedir; aliquotlanarak -80°C’da saklanır.

Qiagen® RNeasy Total RNA extraction from tissue kit ile Total RNA ekstraksiyonu: Bu kit hayvan dokusu, maya, bakteri, hayvan hücresi ve RNA’nın temizlenmesi için kullanılabilir. Özellikle az miktarda başlama materyaline uygundur. Silika bazlı bağlanma membranı ile spin kolon özelliği kullanılarak toksik maddeli fenol-kloroform metodlarındaki tehlikeyi bertaraf etmektedir. Otuz mg doku parçası havan ve tokmak ile, sıvı azot kullanılarak pulverize edilir ve steril tüpe alınır. 600 µl RLT tampon eklenir ve bir kaç saniye vortekslenir. Lizat 3 dak. maksimum hızda santrifüjlenir. Süpernatant başka bir 1.5 mL’lik santrifüj tübüne alınır ve üzerine 600 µL absolü etil alkol eklenerek karıştırılır. High pure filter tübü ve toplama tübü iç içe geçirilir, karışımdan 700 µL alınarak filtreli tübün içerisine pipetlenir. Onbeş saniye 8000 xg’de santrifüjlenerek filtrenin kuru olmasına özen gösterilir. 70 µL DNase inkübasyon tampon ile 10 µL DNase karıştırılarak filtreli tübün içine pipetlenir. 15 dak. oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. 700 µL RWI solüsyonundan filtreli tübün içerisine pipetlenir ve 15 saniye 8000 xg’de santrifüj edilir. Alt tüpte biriken atık sıvı boşaltılır. Buffer RPE solüsyonundan filtreli tübün içine pipetlenir ve 15 saniye 8000 xg’de santrifüj edilir. Alt tüpte biriken atık sıvı boşaltılır. 500 µl Buffer RPE solüsyonundan filtreli tübün içine pipetlenir ve 2 dak. maksimum hızda santrifüj edilir. Filtreli tüp yeni bir toplama tübüne yerleştirilir ve 50 µL elüsyon tampon filtreli tübün içerisine pipetlenir. Bir dak. 8000 xg’de santrifüj edilir. Alttaki tüp saf RNA’yı içermektedir; aliquotlanarak -80°C’da saklanır.

İzole edilen RNA’nın saflık kontrolü: Saf nükleik asit örnekleri 230-320 nm dalga boyu arasında karakteristik bir absorbansa sahiptir. İzole RNA’nın saf olarak elde edilip edilmediğini anlamak için UV bölgede ölçüm yapma özelliğinde spektrofotometrede 260 ve 280 nm’de Absorbans (A, O.D.) kuvartz küvetlerde okutularak (steril DEPC’li distile suya karşı) A_{260}/A_{280} oranı hesaplanır. Okumalar 10 µL numune, 490 µL distile su ile sulandırılarak yapılır.

Nükleik asitlerin UV ışığını absorbe etme yeteneğiyle okuma belirlenir. Max. absorbans değeri 260 nm dir. Aşağıdaki oranların dışındaki değerler kontaminasyonu gösterir. Absorbans değeri 1 ise bu yaklaşık 40 µg/ml of tek-zincir RNA’ya tekabül eder. RNA Absorbans değeri 2.1’e kadar sorun yoktur.

$RNA \mu g/mL = A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40$

Saf RNA numunesi için: $A_{260}/A_{280} = 1.8 \pm 0.1$ ve < 2.0 ; $A_{260}/A_{230} = > 2.00$ ve < 2.4

Elektroforezde RNA fraksiyonlarının izlenmesi: Spektrofotometredeki değerleri kullanarak yatay elektroforezde yaklaşık 100 mA, 80 V’da yürütülür. Elektroforez için %1’lik agaroz jel hazırlanır: 1 g agaroz 100 mL 1X TAE (tris-asetik asit-EDTA) eklenerek erlen kaynama noktasına kadar mikrodalga fırında tamamen erimesi için tutulur. Ara sıra çıkartılıp karıştırılır. Soğuk su banyosunda birkaç dakika tutulur. Donmadan soğuk su banyosundan alınır.

Bu esnada 0.5 µL etidyum bromür (EtBr) eklenir. **NOT:** Etidyum bromür, son konsantrasyon 0.5 µg/mL olacak şekilde kaynamış agaroz 5 µL) eklenir. Böylece elektroforez bittiğinde RNA bantlarının görüntüsü rahatça alınır. EtBr ışıktan etkilendiğinden alüminyum folyo ile sarılması veya karanlıkta tutulması gereklidir. Görüntülemek için SYBR GREEN de kullanılabilir; ancak SYBR GREEN keskin bantların şekillerine müdahale ettiğinden elektroforez işlemi tamamlanmadan önce eklenmemelidir. SYBR-GREEN ile daima elektroforez sonrası boyanır. Agaroz jel polimerleşmeden önceden steril edilmiş yatay elektroforez tepsisine bir ucundan dökülür; kuyucukları oluşturacak tarak tepsiye yerleştirilir. Donması için 30 dak. bekletilir,, tüpün dibinde toplamak için 2 dak. düşük devirde santrifüj edilir. Elektroforeze 10 µg’a kadar numune yüklenebilir. Miktar 10 µg’dan fazla ise, tuz veya SDS (sodyum dodesilsülfat) varsa “smear” yapabilir, bantlar net görülemeyebilir. RNA Ladder’ları (RNA “size markers”): 2, 1 ve 0.5 kb büyüklüğünde kullanılmıştır. Beş µg RNA 10 µL steril distile su ile veya TE (tris-EDTA tamponu) ile seyreltilmelidir. Bir µL 10X “loading buffer” eklenir. Eğer seyreltilirken formaldehit ve formamid ekleniyorsa 2 µL Loading buffer eklenmelidir. Hazırlanan numuneleri

yüklerken, kuyucuklara zarar vermemeye dikkat ediniz! Jelin üzerine örtecek miktarda 1X TAE tamponu tanka doldurulur. Tampon miktarı elektroforez tankının büyüklüğüne göre değişebilir. Bu proje deneylerinde yaklaşık 900 mL tampon kullanılmış; elektroforez 80 V'da yürütülmüştür.

Projenin Sonuçları/Bulguları

(En fazla 5 sayfa olmalıdır.)

Öğrenme, “İnsanın eğilimlerinde belli bir zaman diliminde oluşan bir değişme ve pekiştirme sonucunda davranışta ya da potansiyel davranışta oldukça sürekli bir değişme meydana gelmesidir”; kişilerin öğrenmelerine bağlı olarak hayata ilişkin tavrının da değişmesi ve farklılaşması beklenir. Öğrenmenin kalıcı izli değişiklikler oluşturması beklenir. Öğretimin kalitesi amaç; amaçların kontrol edilmesi; konuya ve öğrenciye uygun stratejiler ve öğretim yöntemlerinin seçilmesi ile sağlanır. Bu stratejilerden biri Bruner tarafından geliştirilen Buluş Yoluyla Öğretim Stratejisi'dir. Bireyin kendi deneyimleri yoluyla yaparak, yaşayarak öğrenmesi ilkesine dayanır. Buluş yoluyla öğrenmede öğretmen, örnekler sunar, öğrenci ise konunun yapısını, fikirler arasındaki temel ilişkileri, ilkeleri, özellikleri keşfedinceye kadar örneklerle çalışır. Buluş yolu stratejisinin hedefleri doğrultusunda kullanılan Laboratuvar Yönteminde öğrenciler deneylerle yaparak yaşayarak öğrendikleri için akademik başarıları yükselmektedir.

Moleküler biyoloji deneysel bir bilim dalıdır; teorik dersi ve buna bağlı moleküler biyoloji laboratuvarı uygulamaları ülkemizde farklı fakülteler ve meslek yüksek okullarında öğretilmektedir. Biyolojik bilimlerdeki gelişme eğiliminin bilimsel araştırmaların bir safhasında moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak gen ekspresyonunun tespitini gerektirdiği bilinmektedir. Örnek vermek gerekirse biyokimya, farmakoloji/toksikoloji, fizyoloji, genetik, biyoteknoloji, gıda mühendisliği, agronomi, nanobilim, tarım ve çevre mühendisliği gibi alanlarda yapılan çalışmalarda hem sinyalleşme yollarında hangi proteinlerin indüklendiği; hem de çevre toksikolojisi gibi multidisipliner alanlarda çevre kirlenmelerinin hücre seviyesinde hangi hedef molekülleri etkilediği gen ekspresyonu çalışmaları ile gösterilmektedir.

Proteinlerin indüksiyonunu doğrudan gösteren Western Blot tekniği de kullanılabilirle beraber, bu teknik için pahalı monoklonal antikorlar gerekmede; antikorun temin edilemeyen proteinlerin kalitatif indüksiyonunu göstermek mümkün olamamaktadır. Metodun temeli hücre patlatıldıktan sonra elde edilen ham protein karışımından istenilen proteini (enzim aktivitesi olan proteinler için kantitatif tayin metodları unite (U)/mg protein cinsinden reaksiyon hızı ile hesaplanabilmektedir) önce elektroforetik bir yöntem olan SDS-PAGE yöntemiyle ayrıştırılmasına, daha sonra da çeşitli blotlama teknikleri kullanılarak (elektro-, veya kapiller blotlama) ince bir nitroselüloz veya diğer adsorban malzemeye proteinleri aktararak, burada çok spesifik primer ve sekonder antikorlar ile çöktürülerek gösterilmesine dayanır. Diğer taraftan metod, teknik uzmanlık gerektiren elektroforez ve blotlama sistemlerinin kullanılmasına dayandığından, sınırlı laboratuvarında bulunmakta; bunu da ancak eğitimli personel kullanabilmektedir. Araştırmada yaygın bulunan ve üretilen sazan balığı ve alabalıktan izole edilecek mRNA deneysel eğitim materyali halinde (föy olarak) geliştirilmiş; eğitim/öğretimde uygulanabilecek halde proje çıktısı olarak sunulmuştur. Laboratuvar ortamında hazırlanan deneyler biyolojik bilimlerin öğretiminde tercih edilen “yaparak, yaşayarak öğrenme” yaklaşımını amaçlamaktadır. En iyi sonuç Qiagen® kiti ile elde edilmiştir (Şekil 1).

Moleküler biyolojinin disiplinler arası özelliği, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, fizyoloji, nanobilim ve gen mühendisliği ile çok yakın ilişkili olması, temel biyoloji ve kimya kavramlarına yer yer dayanması ve son yıllarda moleküler biyoloji, moleküler genetik ve nanobilim ile giderek alanını genişletmesi, moleküler biyoloji ve moleküler biyoloji laboratuvarı eğitiminde yeni yaklaşımları gündeme getirmiş ve güncel uygulamaların kolay temin edilebilir malzeme, olanaklar ve standardize edilmiş DNA, RNA, protein izolasyon protokolları ile öğretilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Yukarıda bahsedildiği gibi pek çok bilimsel araştırmada proteinlerin indüksiyonu, yani gen ifadesinin tespiti istendiğinden, moleküler biyoloji konusunda uzmanlaşmış kişilere bağımlı ve ortak çalışmak gerekmektedir.

2. PROJE BÜTÇESİ ÖZET BİLGİLERİ

| Proje Süresi: 18 (onsekiz) Ay | | | | |
|-------------------------------|--------------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| Başlama Tarihi | Bitiş Tarihi | Ek Süre (Ay) | Ek Süre Dahil Bitiş Tarihi | Toplam Proje Süresi (Ay) |
| 10.10.2011 | 10.10.2013 | yok | yok | 18 |

| Proje Bütçesi: 7,992.00 TL | | |
|----------------------------|------------|----------|
| Harcanan | Kalan | Ek Bütçe |
| 7,990.00 TL | 2 (iki) TL | yok |

3. PROJE ÇIKTILARI

Proje çıktıları RNA izolasyonu için laboratuvarında her bir safhayı detaylı anlatan deney föyü halinde (bakınız Projenin Yöntemi bölümü) kaynak/rehber materyaldir.

Proje Konusu Olarak Yüksek Lisans veya Doktora Konusu Olan Tezler

Proje Gazi Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü, OÖFMAE Bölümü, Biyoloji Eğitimi Bilim Programı Yüksek Lisans öğrencisi Bilge Kocayığıt'in: "BİYOLOJİK BİLİMLERDE MRNA SEVİYESİNDE EKSPRESYON UYGULAMALARI" adlı tezi ile aynı konudur.

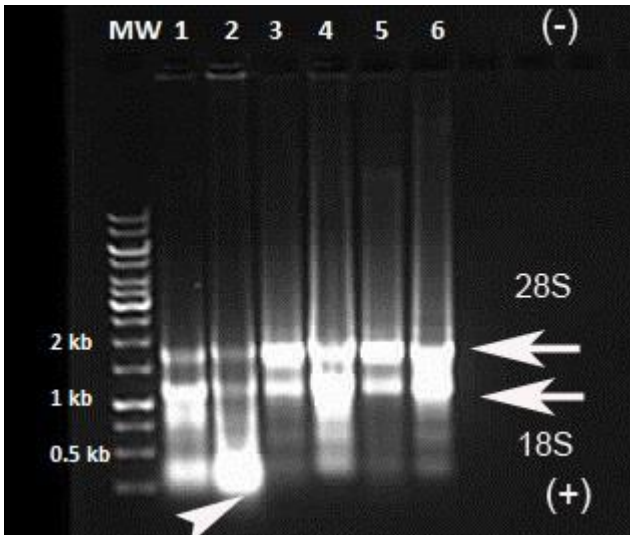
Üniversiteye, Ülkeye ve/veya Bilime Sağlanan Katkılar

Bu bölüme proje faaliyetleri neticesinde elde edilen yararlar eklenmelidir

Bakınız sayfa 8, son paragraf.

4. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ TARAFINDAN YAPILACAK GENEL DEĞERLENDİRME

5. EKLER



Şekil 1: MW: Molekül Ağırlık Markeri; 1: Trizolle izole edilmiş solungaç RNA'sı; 2: Trizolle izole edilmiş karaciğer RNA'sı; 3: Qiagen kitiyle izole edilmiş solungaç RNA'sı; 4: Qiagen kitiyle izole edilmiş karaciğer RNA'sı; 5: Roche kitiyle izole edilmiş solungaç RNA'sı; 6: Roche kitiyle izole edilmiş karaciğer RNA'sı. Oklar 28S ve 18S ribosomal RNA'ları göstermektedir. Ok ucu degrade RNA'ları göstermektedir.