

Biyolojik eřitlilik

Koruma / stoklama teknikleri

Devamlı üretim

Dehidrasyon

Dondurarak saklama

Biyobankacılık

En uygun yöntemin seçimi organizmaya göre yapılmalı
— Mümkünse denemeler gerçekleştirilmeli

Devamlı üreme gerçekleşen yöntemler


Madeni yağ / parafin tabakası altında yaşam 


— Steril parafin tabakası altında sıvı kültür

Oksijen yokluğunda yavaşlamış metabolizma —

15-20°C sıcaklıkta saklama

Çoğu bakteri kültürü 2-4 yıl dayanır.

Mantarlar genellikle daha uzun süre dayanır 

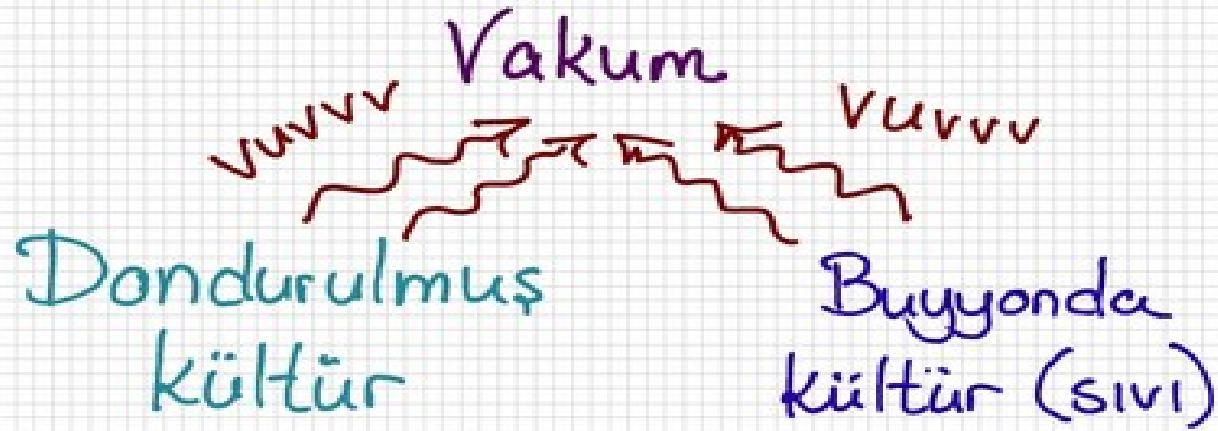
 Bu yöntem ile ilgili sorunlar nelerdir?

Su içinde saklama

Bir başka çok çok yavaş üremeye dayalı teknik (hatta, durma noktasında...)

Küf, maya, fitopatjen bakteriler, aktinomiçetler için uygun

Dehidrasyona dayalı stok teknikleri



Freeze-Dryer
Nasıl Çalışır ?

Skimmed milk + inositol içinde
süspansiyon edilerek dondurulan
hücreler

Destekleyici ortam :
toprak, kum, silika-jel,
porselen, skimmed milk,
inositol, at serumu,
nutrient broth, glukoz

"CRYOPRESERVATION"

Cryoprotective additive

~ Glycerol

~ DMSO

~ ve birçok diğeri...

Doğa kendi koruyucu maddelerini oluşturmuş — Hücrenin dondurulmaya başlamasıyla bunların sentezi indüklenebilir

Soğuma stresi ile başa çıkmada OSMOREGÜLATÖR maddeler !

Konsantrasyon etkisi

Mekanik stres

SOĞUTMA HIZI

Cryoprotectant \times Cooling rate \rightsquigarrow SUCCESS C°

yavaş soğuma \rightarrow hücrede büzülme \leftarrow
hücre dışında buz oluşumu \rightarrow hücreden su kaybı

membran kaybı

Sitoplazma kaybı

Gözündürülen hücreler kaldıkları yerden devam edebilmek için hasarları onarmalı

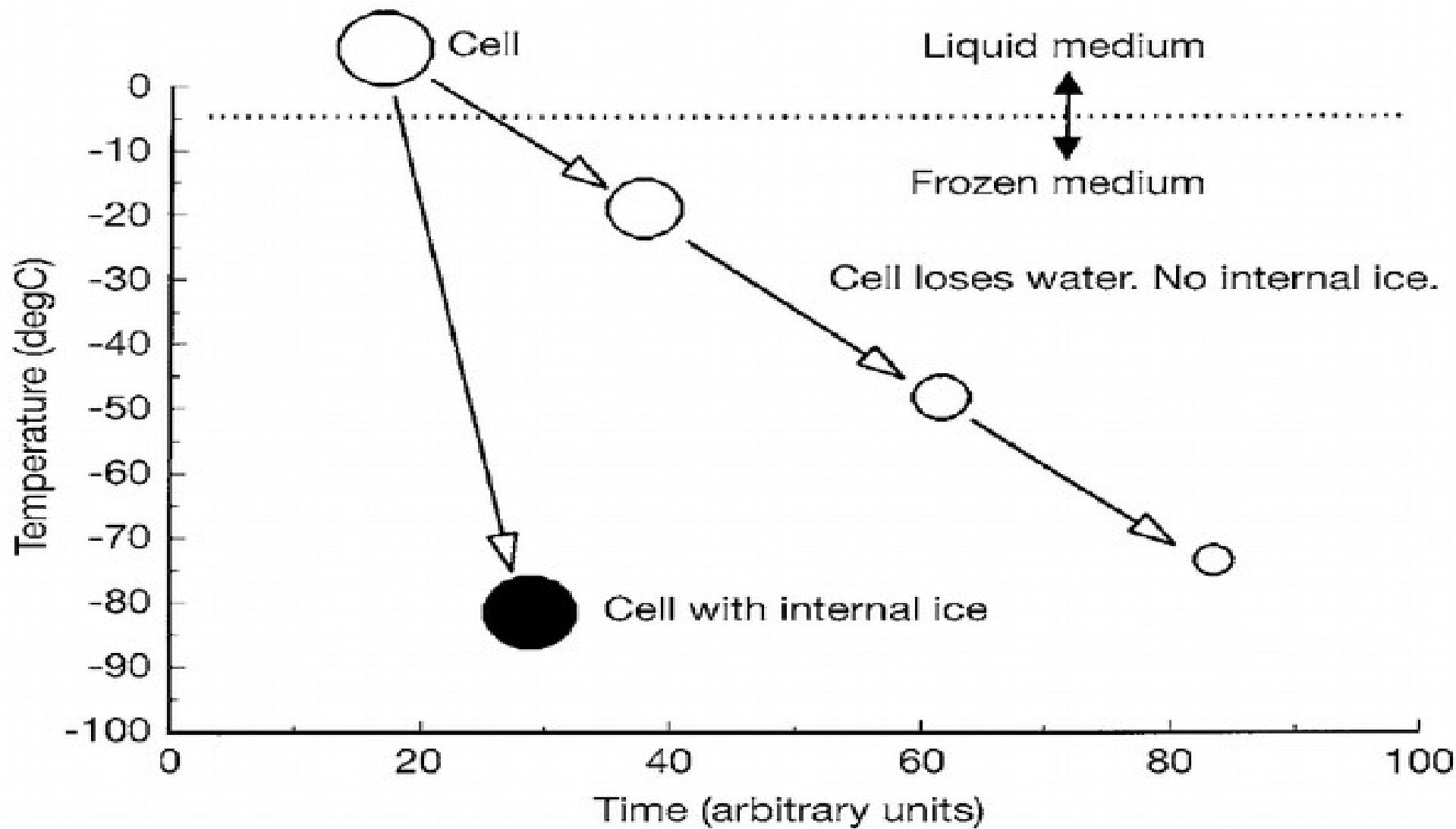
Dondurma işleminden doğabilecek hasarları en aza indirmek için :

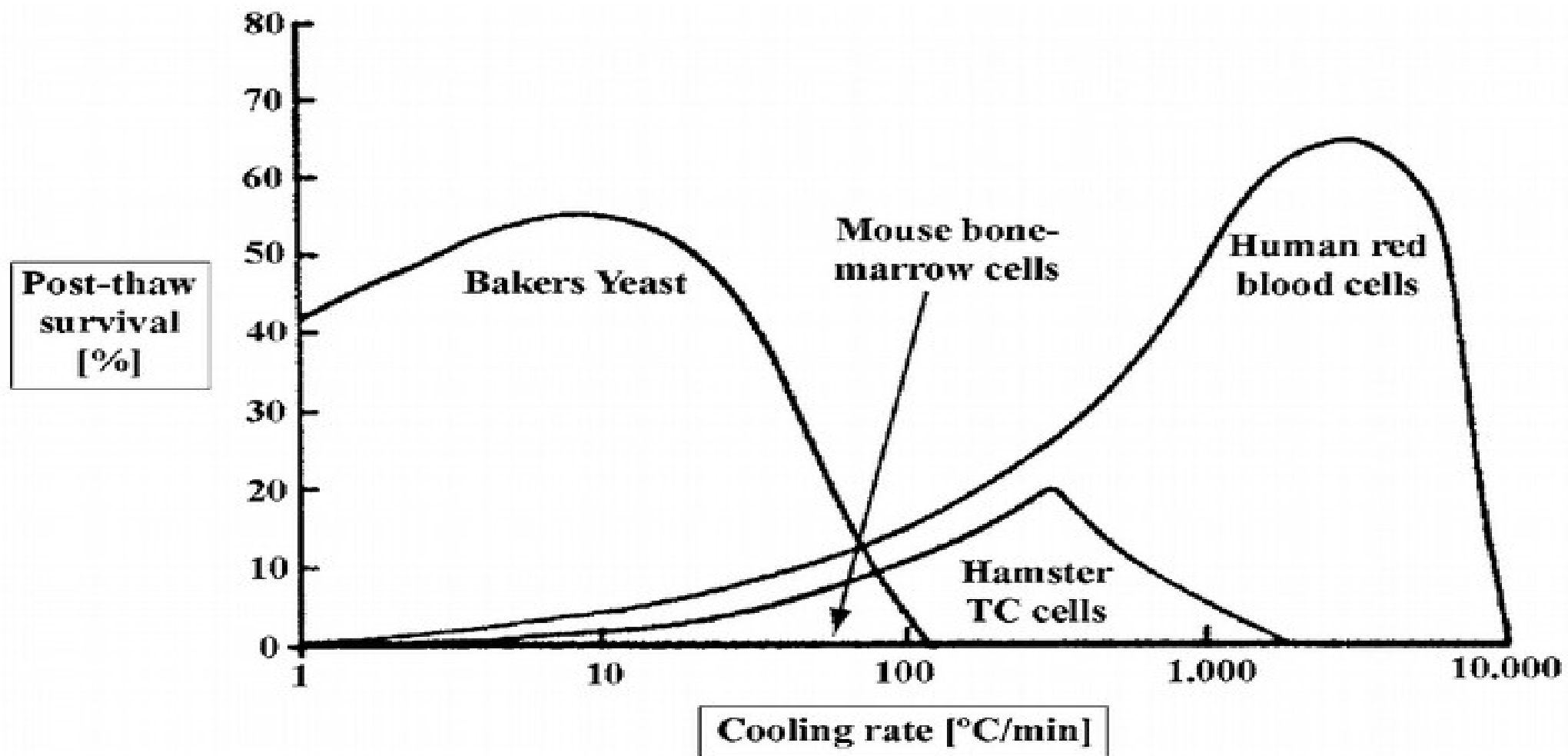
Yavaş dondurulmalı — Hızlı dondurma, hücre içinde buz oluşumuna neden olabilir !!

Suyu taklit eden ve yerini alabilen bir "cryoprotective" ajan kullanmak

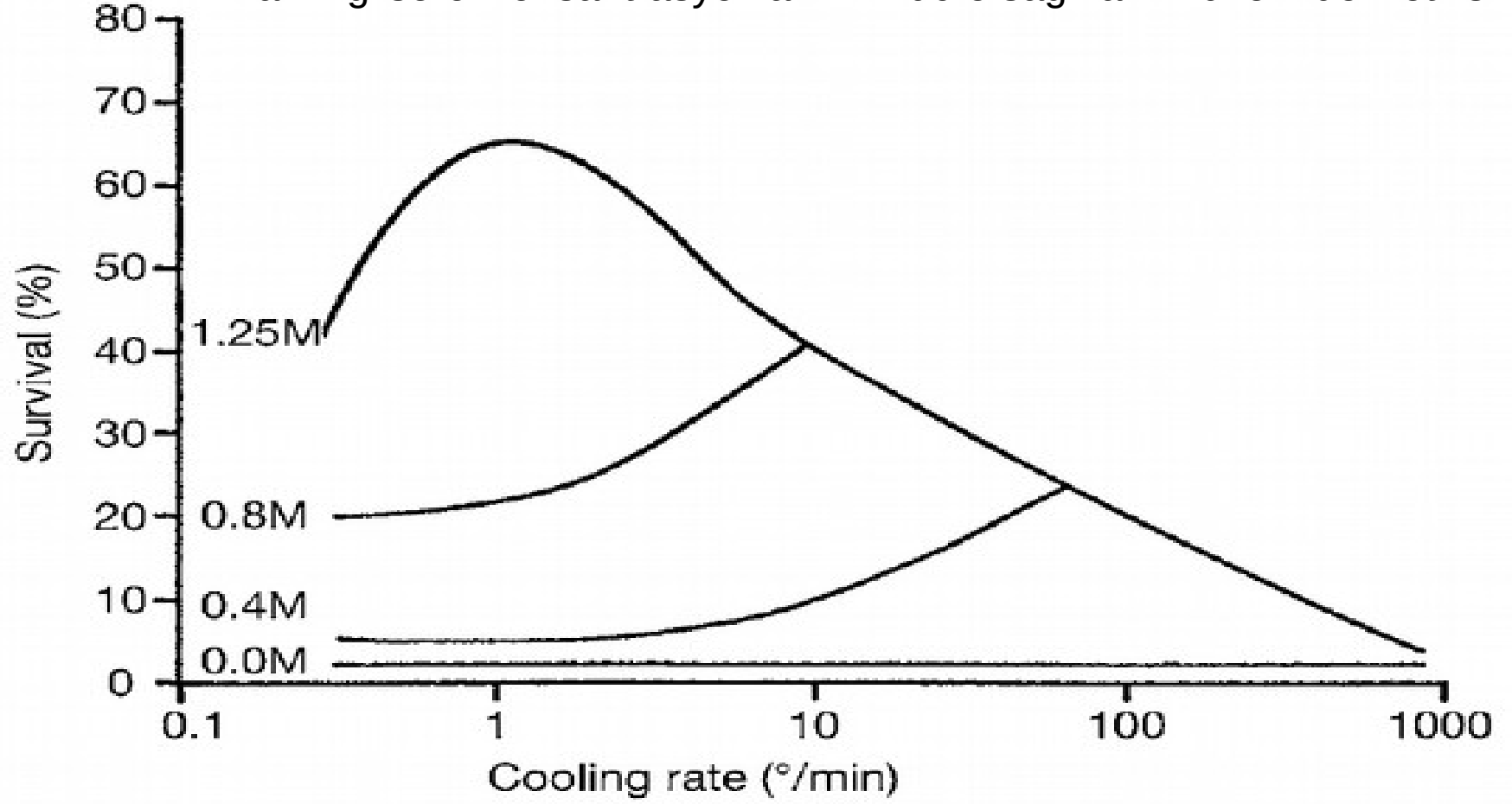
Genel olarak,
yavaş yavaş dondurmalı
hızlı hızlı çözmeliyiz . . .

Örneğin, tüpü doğrudan
37°C'ye atmalıyız,





Farklı gliserol konsantrasyonlarının hücre sağ kalımı üzerindeki etkisi



Ne kadar sıcak ne kadar soğuk ?

-10°C ~ -196°C

Buzdolabı üstü dondurucular

-20 - -35°C derin dondurucular

-80°C derin dondurucular

-140°C ultra derin dondurucular

Sıvı azot

Buralarda bir yerlerde güvenli zon başlıyor

?
Güvenli dondurma sıcaklığı ?
?
?
?

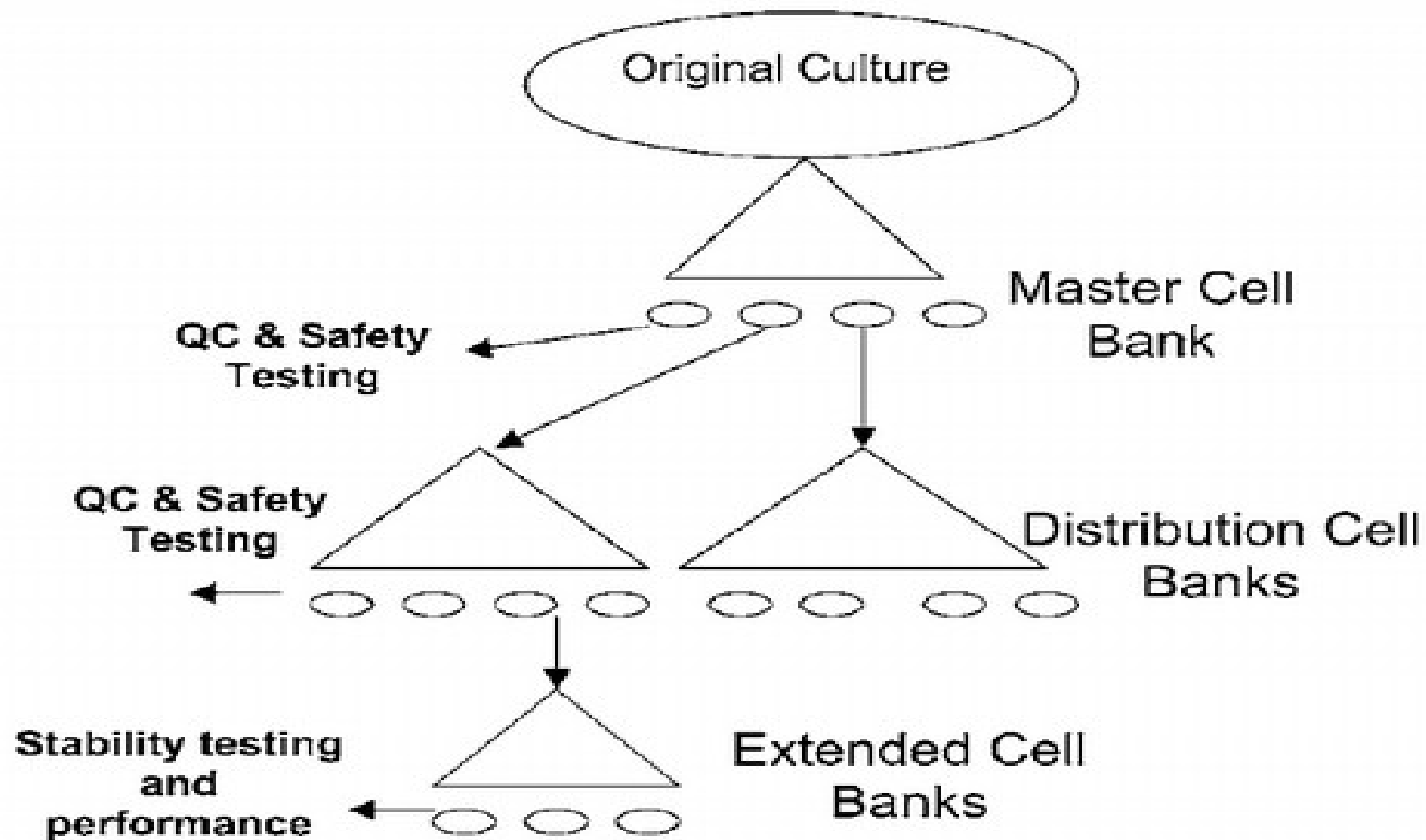
? Su aktivitesi ?
?
?
?

TABLE 2: Some commonly used methods used to assess strain stability following cryopreservation.

Method	Test
Anatomical	Microscopical observation of anatomical structures. For example, spores, conidia, flagella, plastids, and hyphal form.
Culture characters	Analysis of culture morphology in plate culture. For example, pigmentation, abundance of sporulation, presence or absence of sectors, or abnormal growth
Growth rate	Measurement of radial growth of fungi and other mycelial organisms in plate culture [9]
Cell density	Cell counts at set time points using microscopical counting methods, flow cytometry or spectrophotometric approaches
Molecular integrity	PCR fingerprinting approaches (ISSR, AFLP) which assess the whole genome [10, 11]
Viability of cells	The use of chromatogenic or fluorogenic viability indicators. Many available, commonly used ones for fungi and bacteria include fluorescein diacetate (FDA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [12] <i>fluorescein isothiocyanate (FITC)</i> , FUN-1 viability staining
Enzymic capacity	APIZYM utilisation of naphthyl-bound substrates that yield a chromatogenic change [13, 14] 4-methylumbelliferone [15–17]
Metabolic stability	High performance liquid chromatography (HPLC) of secondary metabolites [18] Thin layer chromatography (TLC) of secondary metabolites [18, 19]
Pathogenicity	The target organisms are inoculated onto test media with the potential control strain (or metabolite/protein extract from the control strain)/or directly onto a plant or animal, and the extent of pathogenicity and mortality are recorded.

TABLE 3: Validation of fungal cryopreservation protocols.

Criterion	Requirement	Reference
Select optimal growth conditions	To produce healthy material spores, mycelium	[20]
Measure and record baseline data for stability checks	Apply a unique identifier/strain number; select criteria to be measured: Morphological characteristics Sequence ITS region of the genome Growth rates Photomicrographs Metabolic data Genome fingerprinting techniques	[8]
Select the most appropriate preservation protocol	Optimised for organism type	[20]
Select cryoprotectant	Appropriate for the cell type	[8]
Select most appropriate cooling rate	Thermometer calibrated to a standard	[8]
Select most appropriate storage temperature	Temperature below -140°C , monitored and recorded	[21, 22]
Select most appropriate thawing protocol	A rate appropriate to cell type in calibrated and controlled equipment	[8]
Prepare master and distribution stocks	High recovery No contamination Authentic: morphology; phenotypic and molecular integrity	[23]
Method validation		
Performing blind tests	Central laboratory sends unknown organism to collections with limited data and results after above the process compared	Example of such a system is in the public health laboratories for diagnostics
Reproducibility check	Comparing results of the same method at different times Comparison of results obtained with different methods Comparison of results obtained with different operators	[23]
Equipment calibration	All equipment must be regularly serviced and gauges and meters calibrated to recognised standards	[23]
Record keeping	Daily records of temperature readings of incubators and cryostorage units	[23]



KAYNAKLAR

1. Smith D, Ryan M. Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. ScientificWorldJournal [Internet]. 2012 May 2 [cited 2014 Apr 1];2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353557/>
2. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. FEMS Microbiology Reviews. 2005 Nov 1;29(5):897–910.
3. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols [Internet]. [cited 2014 Oct 30]. Available from: <http://www.springer.com/life+sciences/biochemistry+%26+biophysics/book/978-1-58829-377-0>
4. Malik KA. Freeze-drying of micro-organism using a simple apparatus. DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, Federal Republic of Germany: UNESCO / WFCC - Education Committee; Report No.: 7.

Genetik kodu bilmek her zaman önemli olmuştur:

Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol. 70, No. 12, Part I, pp. 3581-3584, December 1973

The Nucleotide Sequence of the *lac* Operator

(regulation/protein-nucleic acid interaction/DNA-RNA sequencing/oligonucleotide priming)

WALTER GILBERT AND ALLAN MAXAM

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138

Communicated by J. D. Watson, August 9, 1973

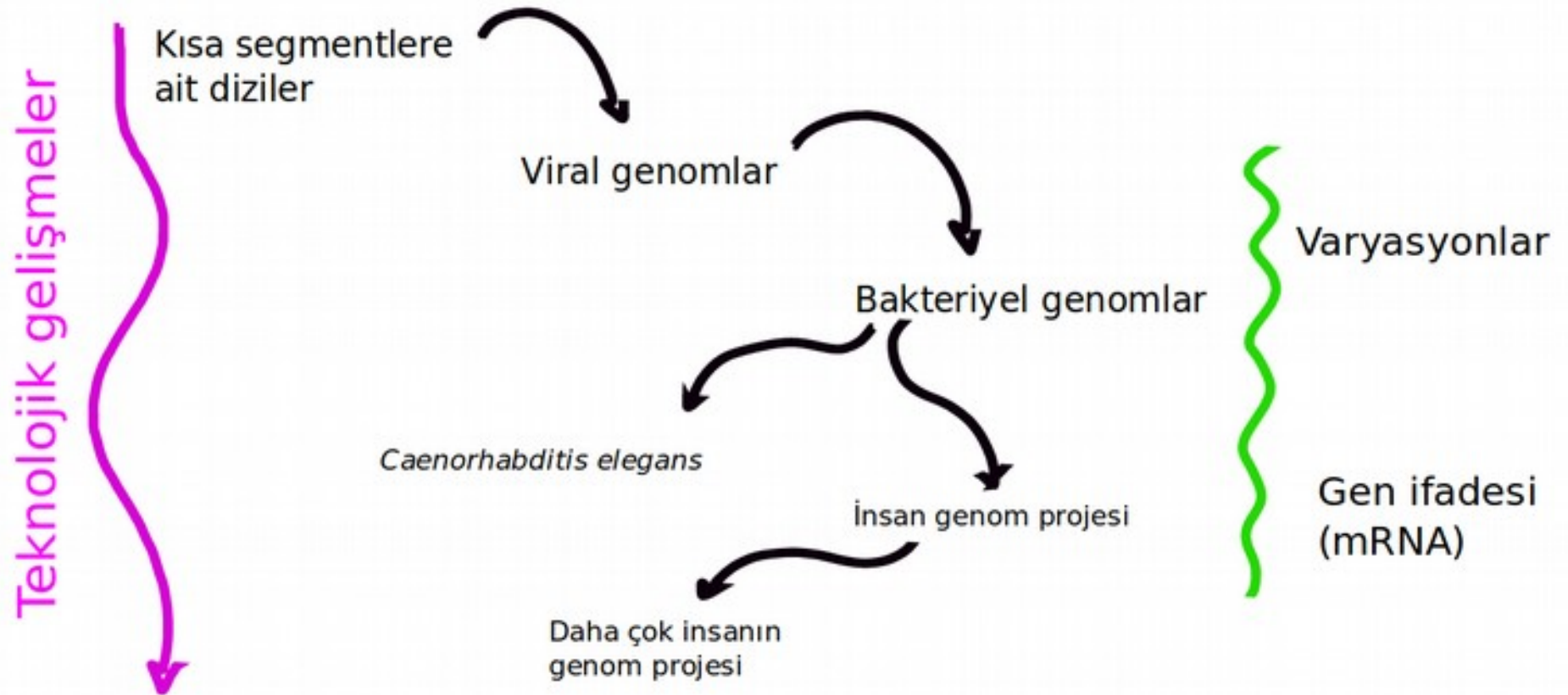
ABSTRACT The *lac* repressor protects the *lac* operator against digestion with deoxyribonuclease. The protected fragment is double-stranded and about 27 base-pairs long. We determined the sequence of RNA transcription copies of this fragment and present a sequence for 24 base pairs. It is:

5'--T G G A A T T G T G A G C G G A T A A C A A T T 3'
3'--A C C T T A A C A C T C G C C T A T T G T T A A 5'

The sequence has 2-fold symmetry regions; the two longest are separated by one turn of the DNA double helix.

3'--ACCTTAACA CTCGCCTATTTGTTAA5'

The sequence has 2-fold symmetry regions; the two longest are separated by one turn of the DNA double helix.



Uçsuz, bucaksız DNA molekülünün neresinden başladınız, sekanslamaya?!#@

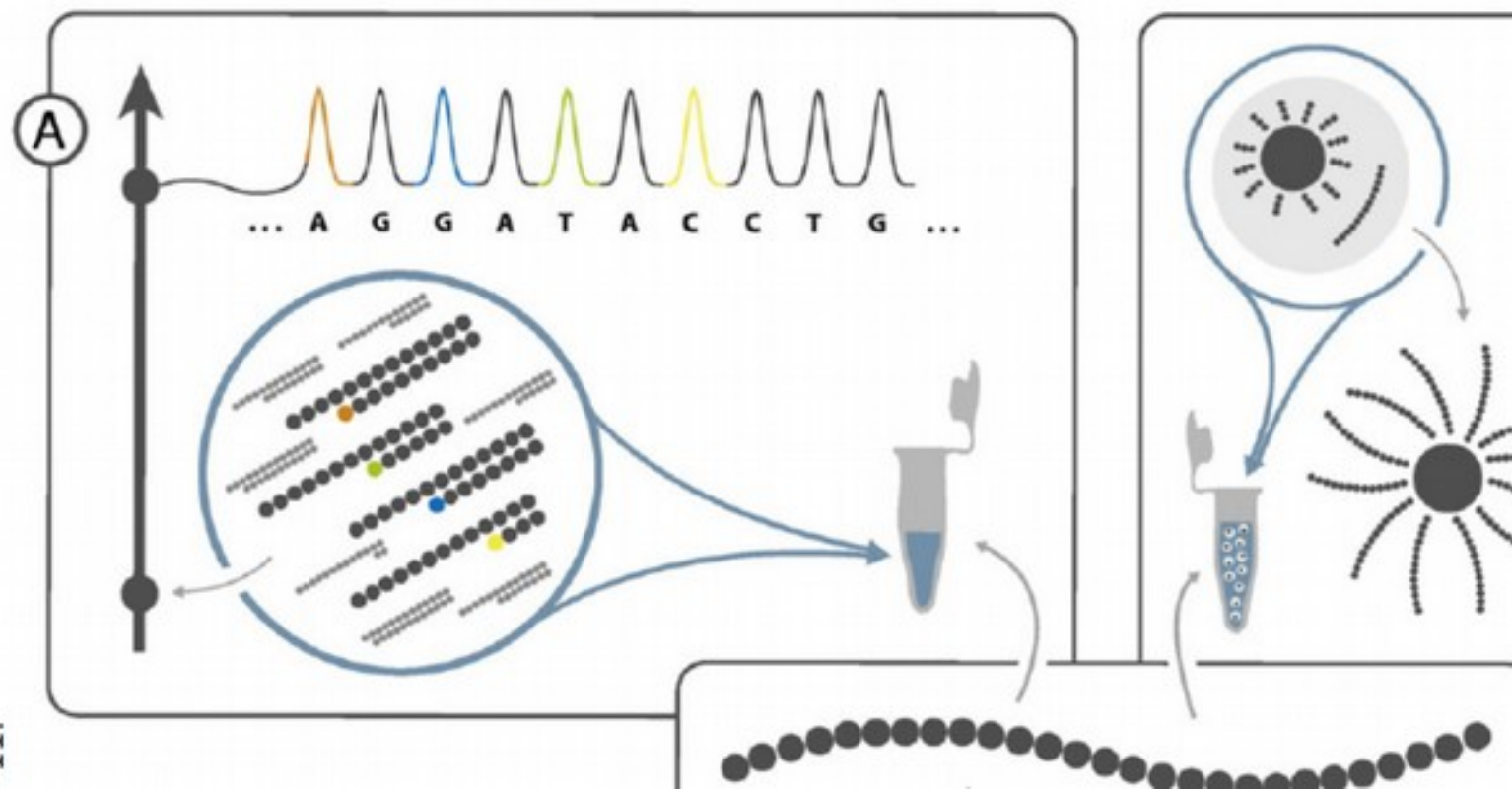
DNA extraction

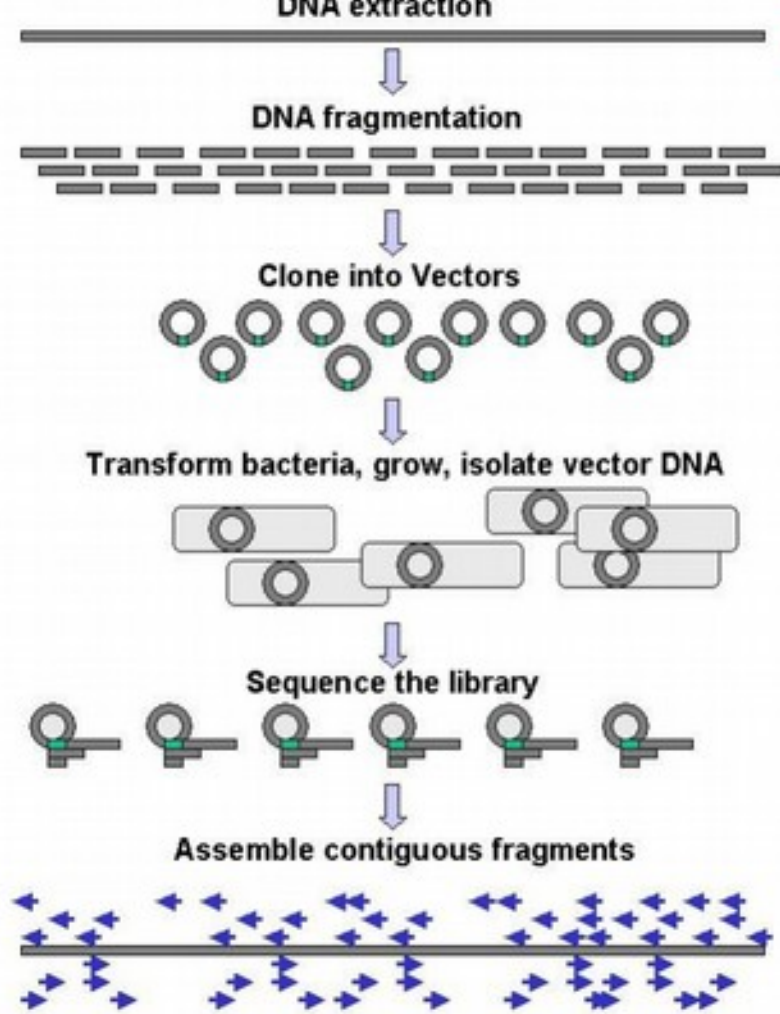
Tüm genom/transkriptom ebadında analiz için "kütüphane" oluşturulması gerekli...

Sanger yöntemi:
ddNTP ile zincir sonlandırma
Otomatize sistemlerde ~700 baz

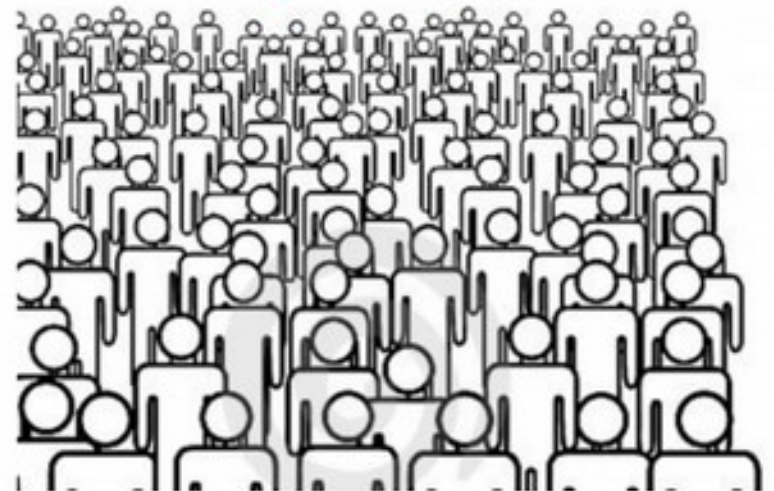
"Minyatür"
Pikolitre hacim
~400 baz okunabilir
>100 MBaz

Evolution of sequencing
-11.





Tüm genom/transkriptom ebadında
analiz için "kütüphane" oluşturulması
gerekli...



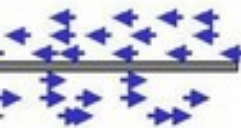
Küt
en



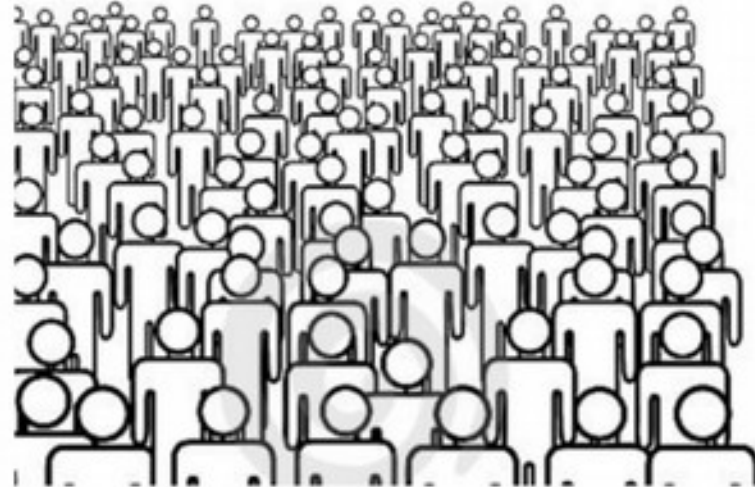
te vector DNA



gments



om ebadında
oluşturulması



Kütüphane oluşturmak en masraflı basamak!

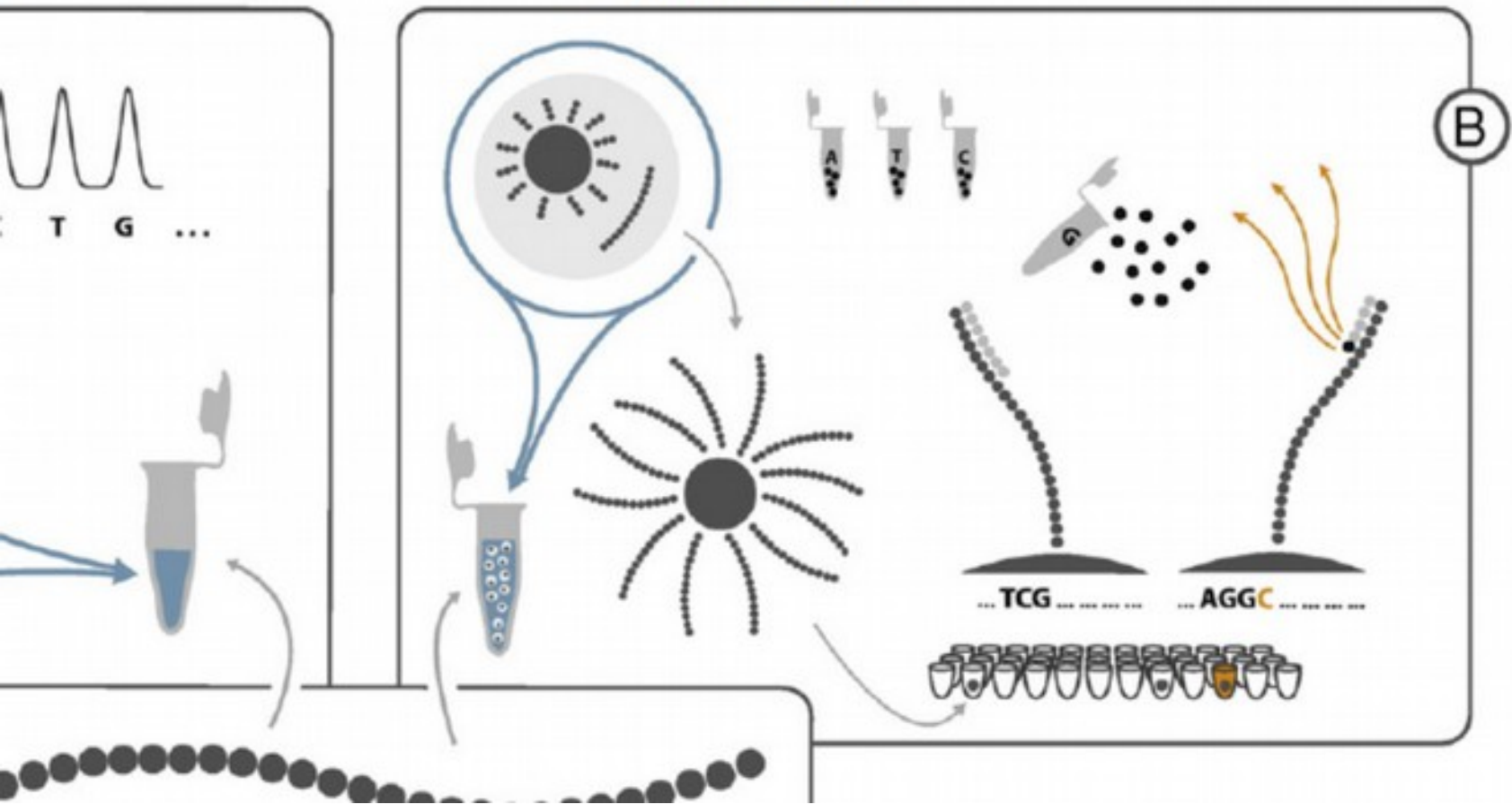
Nanoteknoloji - Otomasyon

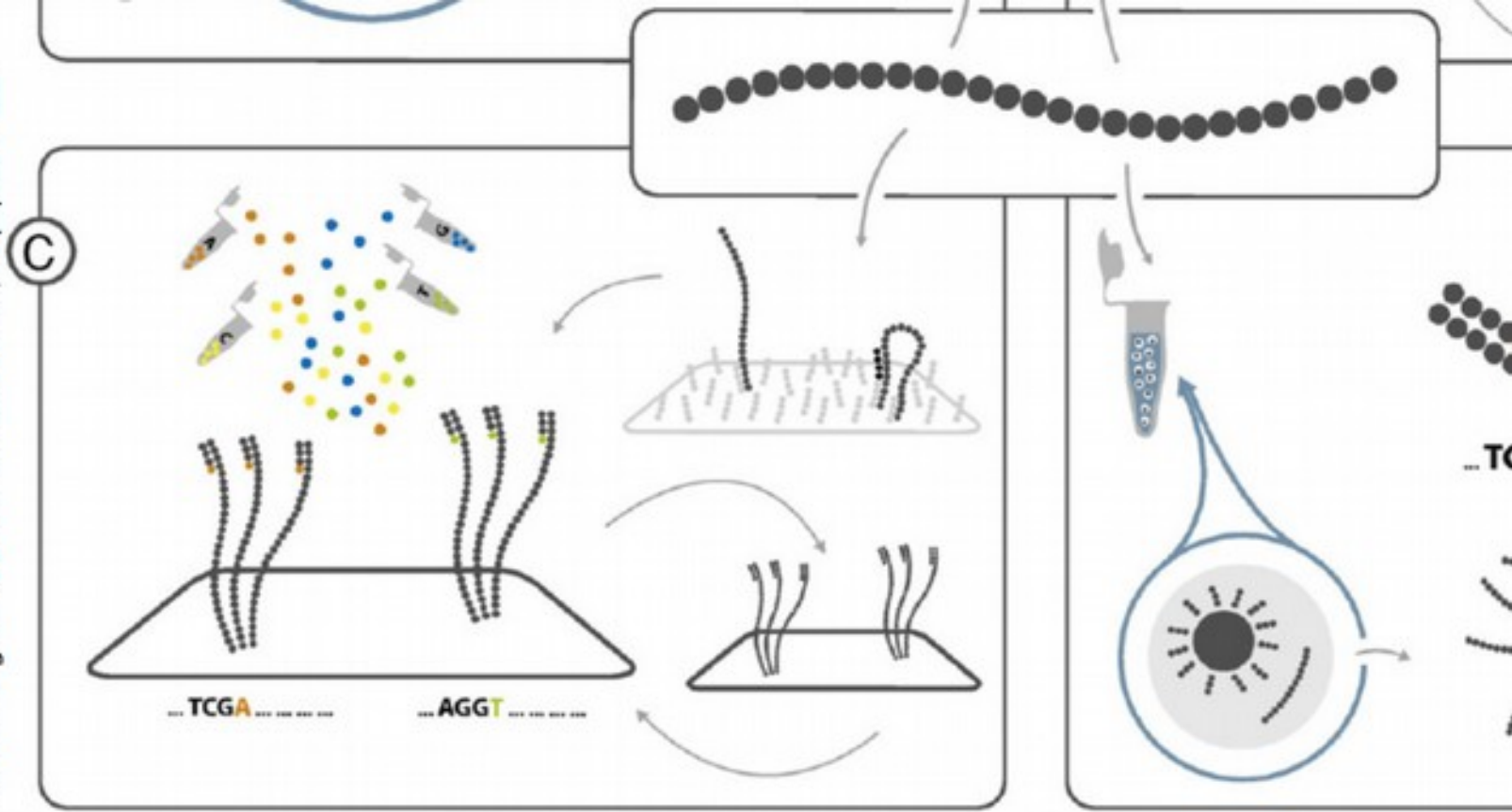
Kütüphaneyi nanofludik / robotik sistemler kullanarak hazırlasak ciddi bir tasarruf

"Minyatür" pirosekanslama
Pikolitre hacimde, masif paralel...
~400 baz okuma uzunluğu
>100 MBaz sekans

Kütüphane
boncuklar
üzerinde

baz



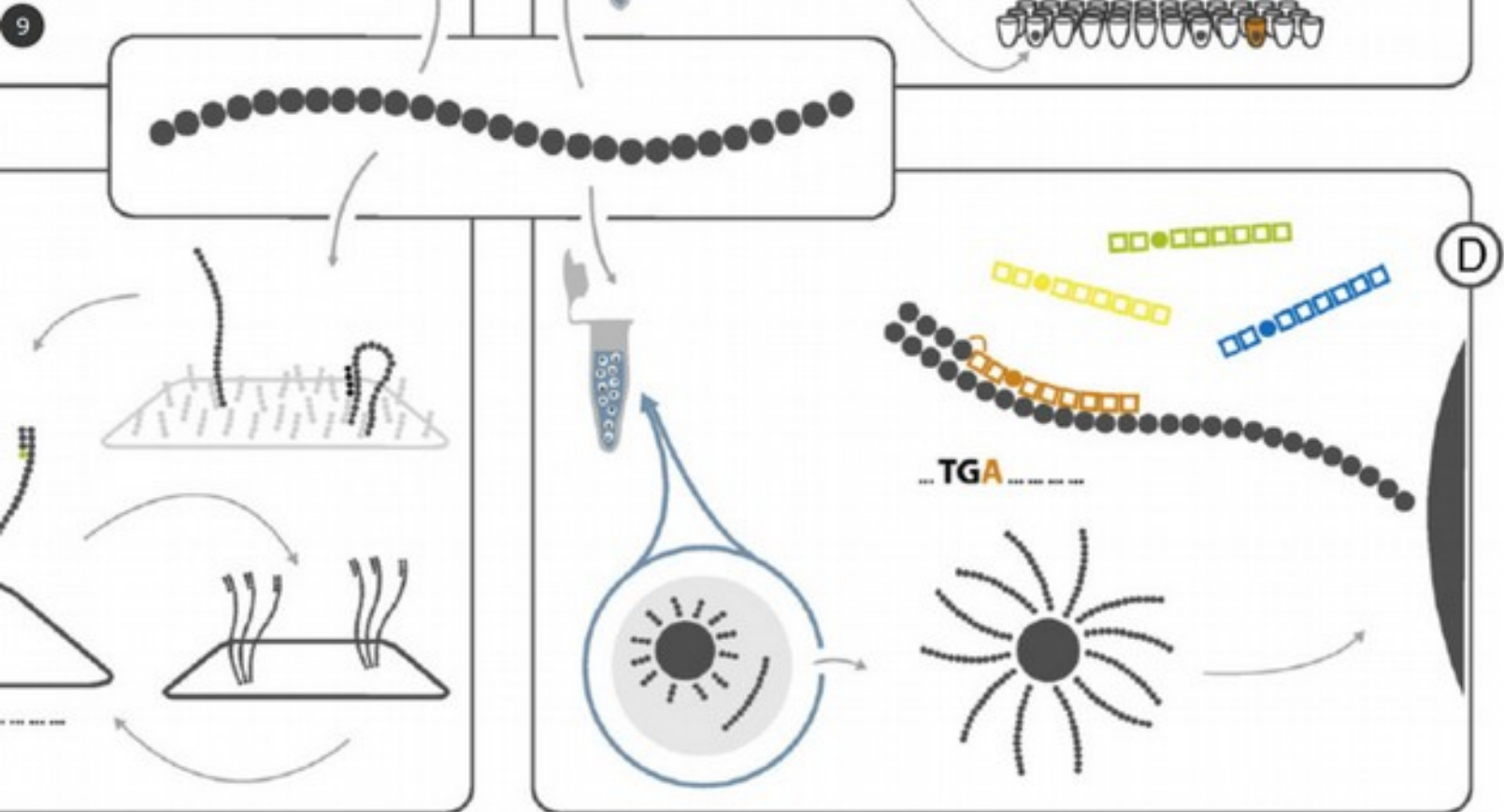


Ters terminasyon - köprü amplifikasyon
Floresan işaretli geri dönüşümlü terminatörler
ile sentez...

Kütüphane katı faza
tutundurulmuş durumda

Ligasyon ile sekansla
PZT ile çoğaltılmış D

Kütüphane
üzerinde



amplifikasyon
ışıklı terminatörler

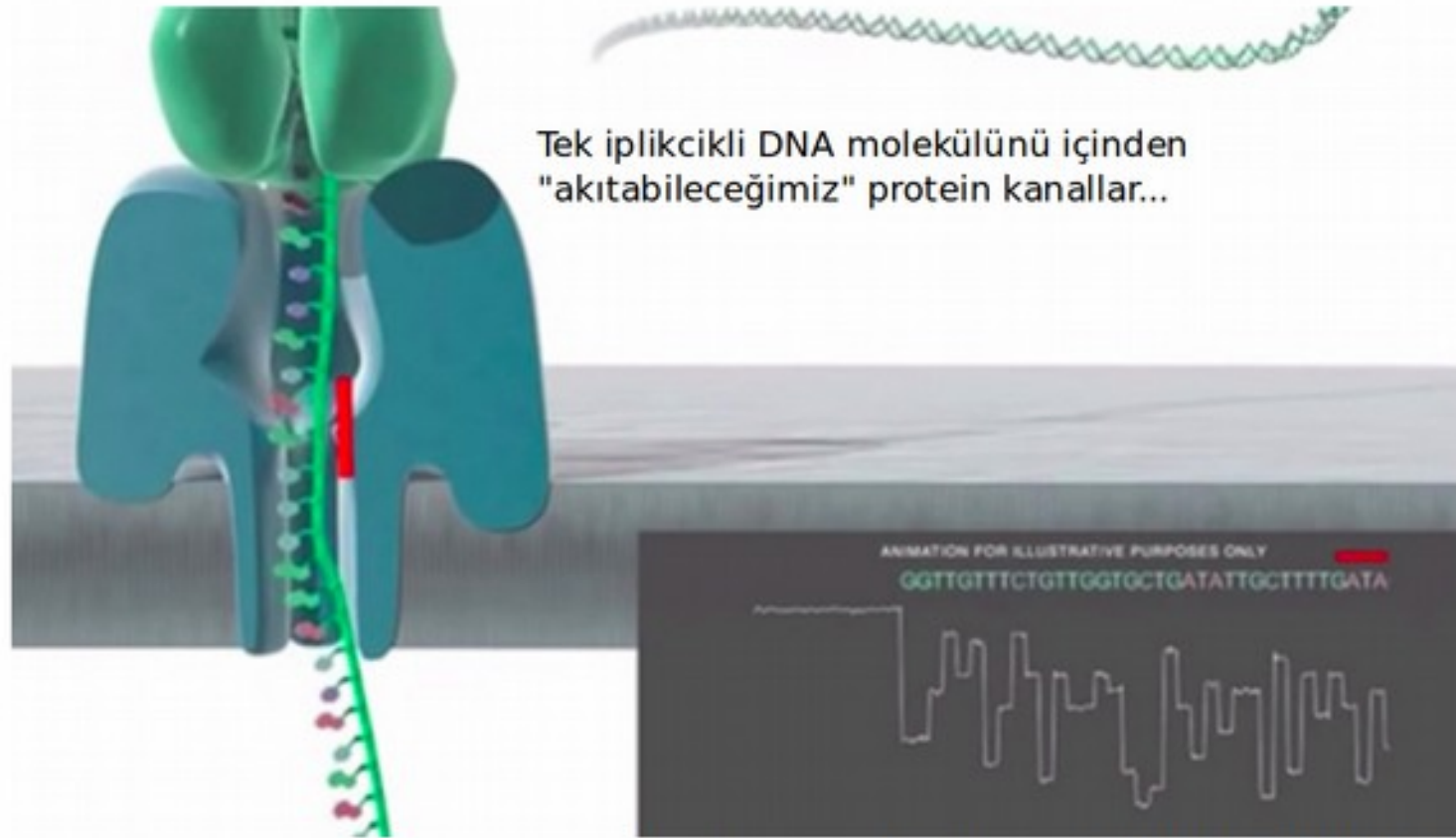
katı faza
nuş durumda

Ligasyon ile sekanslama
PZT ile çoğaltılmış DNA segmentlerine prob hibridizasyonu

Kütüphane boncuklar
üzerinde...

Kütüphane oluşturmada yeni nesil dizileme mümkün mü?

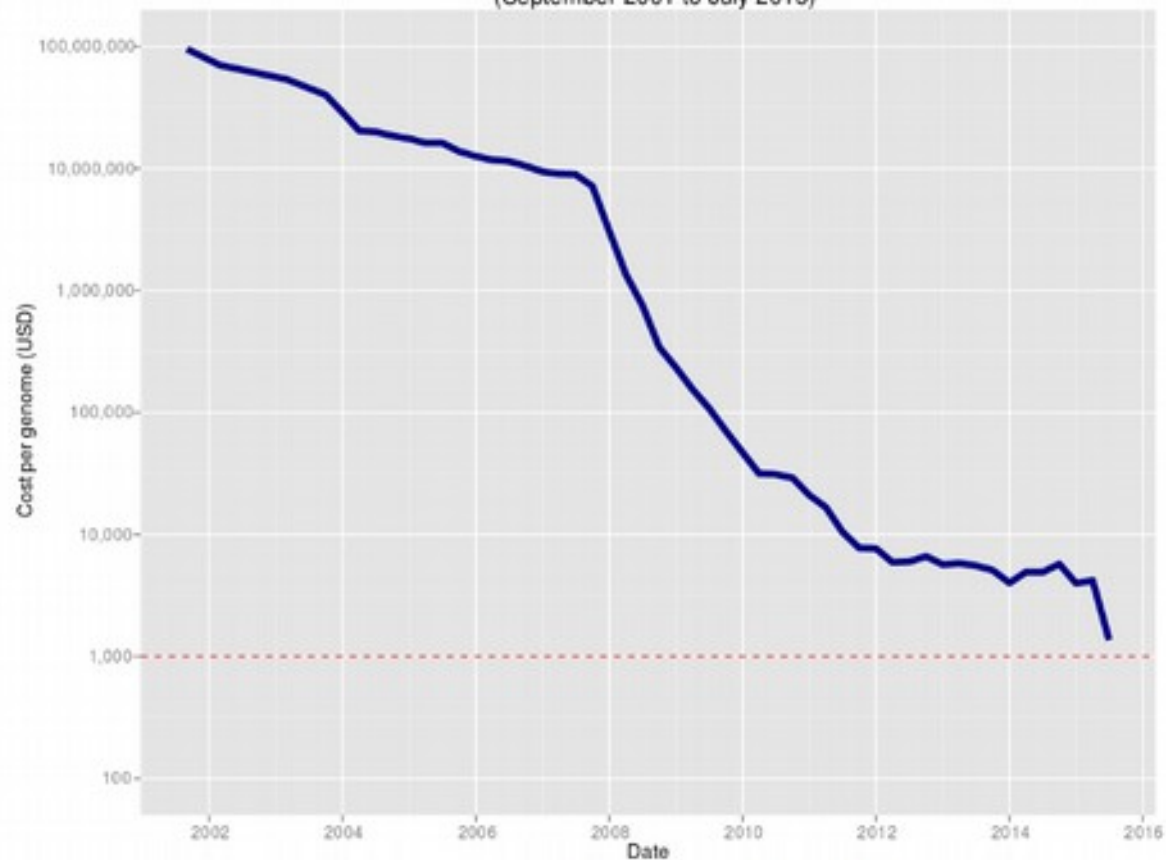
nanopor dizileme



Potansiyel farkı ~ Nükleotid dizisi

Bir insan genomunun maliyeti

Cost to sequence a human genome as estimated by NHGRI
(September 2001 to July 2015)



Teknolojik gelişmeler

*Aferim bize!
Genomik veri bir kenarda bulunsun. Bir gün kesin işe yarar...*

Aslında,

Veri toplama ve depolama alışkanlıklarımız değişmekte...

internet



VS



Global Information Storage Capacity
in optimally compressed bytes

2007 ANALOG

19 exabytes

- Paper, film, audiotape and vinyl: 6 %
- Analog videotapes (VHS, etc): 94 %
- Portable media, flash drives: 2 %

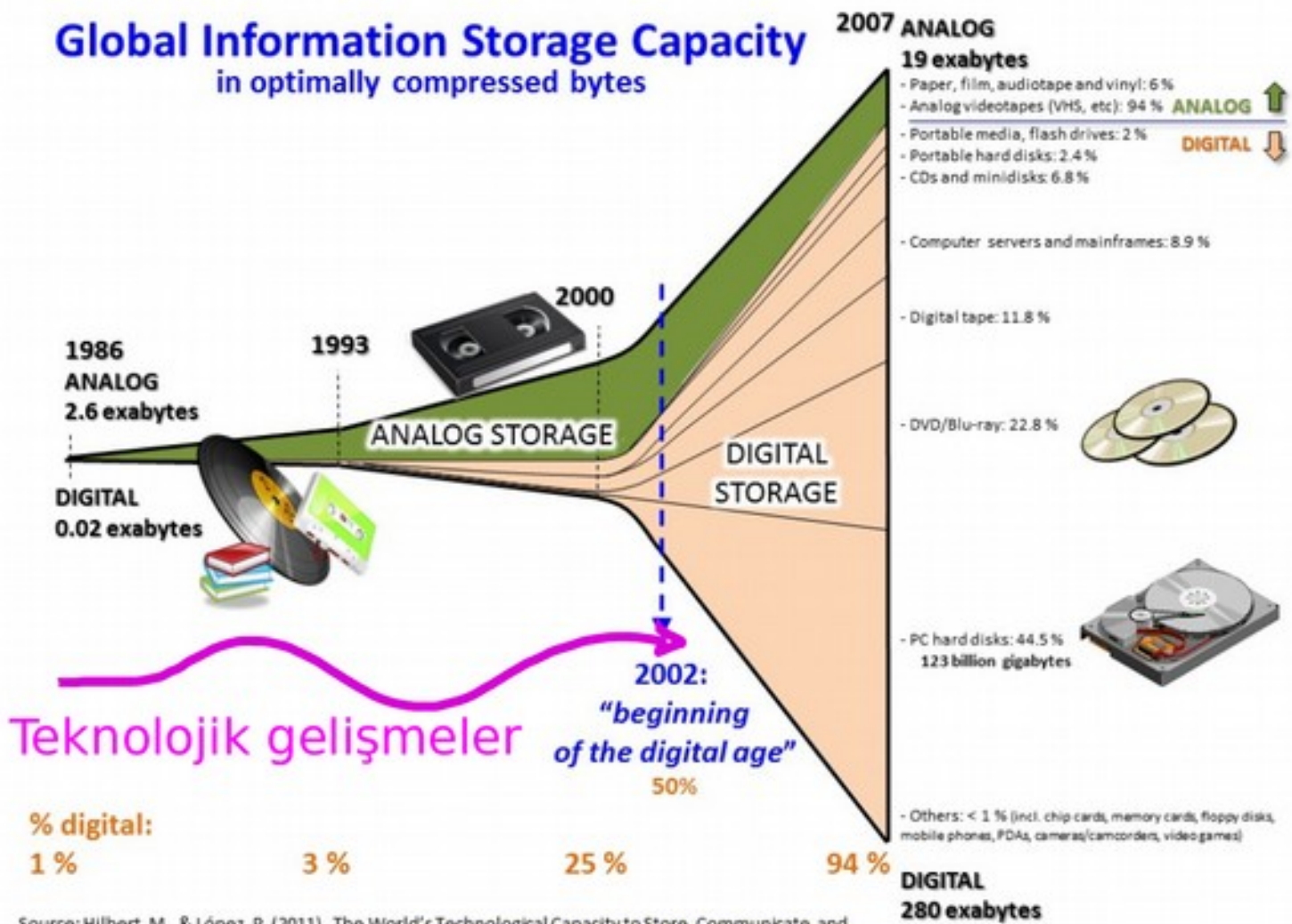
ANALOG



DIGITAL



Global Information Storage Capacity in optimally compressed bytes



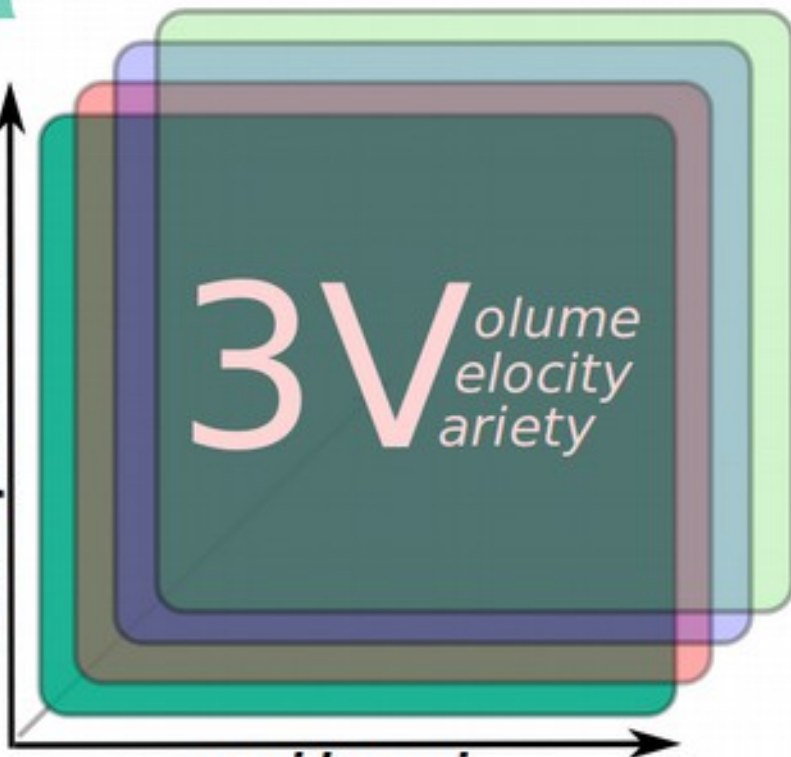
Source: Hilbert, M., & López, P. (2011). The World's Technological Capacity to Store, Communicate, and Compute Information. *Science*, 332(6025), 60 –65. <http://www.martinhilbert.net/WorldInfoCapacity.html>

big data

Çektığımız fotoğrafları
anında sosyal medyada
paylaşabiliriz.

"Big data"
çoğunlukla
eş zamanlıdır

veri toplama hızı



veri hacmi

Rastladığımız her "enteresan" yerin
önünde sınırsızca ve yüksek çözünürlükte
"selfie" çekebiliriz...

"Big data" örneklem değildir.
Gözlemin tamamıdır.

veri
çeşitliliği

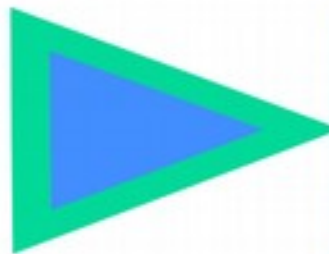
Ses ve konum gibi
bilgileri de ekleyebiliriz

"Big data" verilerin
füzyonunu sağlar.

"Big data" örneklem değildir.
Gözlemin tamamıdır.

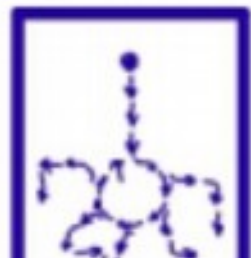


redüksiyonizm



holizm

Peki ya ama,
biyolojik "big data"?



OMİKL

Ge

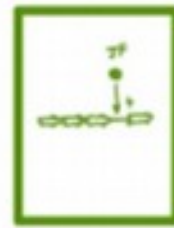
Peki ya ama, biyolojik "big data"?



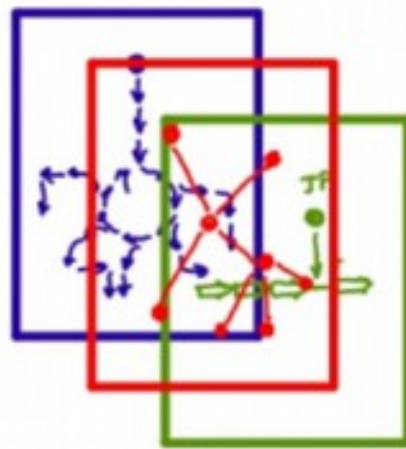
Metabolik
Yolaklar



Protein-Protein
Etkileşimleri



Gen
Regülasyonu



Parçaları birleştirip büyük
resmi oluşturduğumuzda...

...ama NASIL?

Genom

Proteom

Kesintisiz
Eş zamanlı
Katmanların füzyonu

OMİKLER

Genom

Transkriptom

Proteom

interaktom

Metabolom

Kesintisiz
Eş zamanlı
Katmanların füzyonu

in

a"?



ilasyonu

irip büyük

Sist



Sisten
Dün
kompl

internet



Genom projesi

Genom projesi



Genom projesi

Genom projeleri: konak & patojen

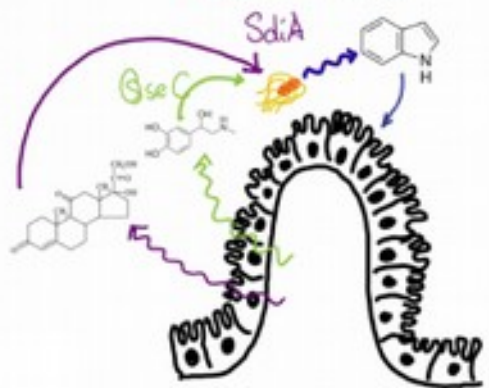


Genom ebadında modellerden organizmaların sahip olduğu **gen repertuarının** belirlenmesi



"System in action"

Transkriptomik Metabolomik
Konak Patojen(ler)



Mikrobiyal çeşitlilik

Fizyoloji

Patoloji

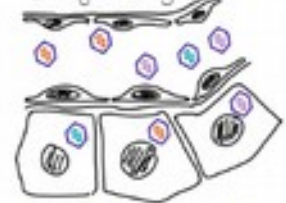
Bağırsaktaki sınırdan bir gün...

Biyoloji çeşitliliğinin belirlenmesi:

"Cast"



Bir diğer senaryo:



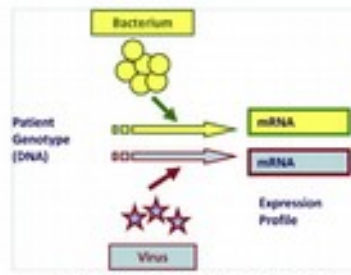
SORULAR:

- Kıs. farklı varyant?



- ve her birinden kaç tane?

veri



1. Mejias A, Ramilo O. Transcriptional profiling in infectious diseases: ready for prime time? J Infect. 2014 Jan;68 Suppl 1:594-9.

