

10.06.2021

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

TAKIM ADI

AGD (Analytics of Genetics and Disquisition)

PROJE ADI

DNA'nın Kehribar İçinde Karmaşık Katmanlarla Depolanması

BAŞVURU ID

37780

KATEGORİ

Proje Kategorisi Üniversite ve Üzeri Seviyesi

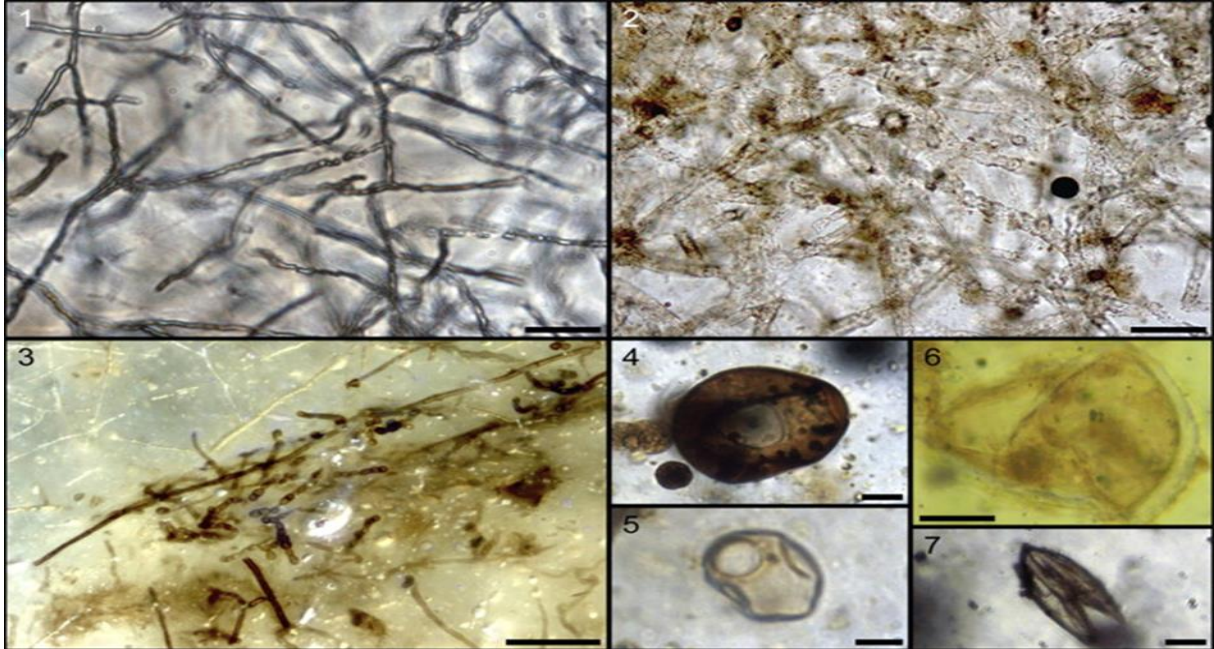
İçindekiler

2. Problem/Sorun:.....	6
3. Çözüm	7
4. Yöntem.....	8
4.1)Dna izolasyonu (bakteri, kan ve bitki) ve PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) uygulaması	8
4.2)Grupları oluşturma	10
4.3)Balmumu hazırlama ve paketlenme	10
4.4)Polimetil akrilat (PMMA) zarı hazırlanması ve kaplanması	10
4.5) Kehribar paketi hazırlama	11
4.6)Sekanslama ve kontrol grubu karşılaştırması	12
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü.....	13
6. Uygulanabilirlik	14
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	14
Tahmini Maaliyet	14
Zaman Planlaması	15
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):	15
9. Riskler	16
10. Kaynaklar	16

TEKNOFEST
HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Jura veya Kretase zamanlarından başlayan ve “biyolojik kriz” olarak bilinen çeşitli jeolojik olaylar üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Bütün bu çalışmalar zayıf bir fosil kaydına dayanmaktadır. Bu bilgi kısıtlılığı, eski mikroorganizmaların çeşitliliği hakkında daha fazla bilgi öğrenildikçe değişiyor. Son yirmi yılda, bunun için yeni bir tür mikropaleontolojik çalışma türü gelişmiştir. Bu çalışmalarda kehribar içinde korunan mikroorganizmaların incelenmiştir. Aslında, ilk çalışmalar on dokuzuncu yüzyılda yapılmış olsa da (Berkeley, 1848; Göppert ve Berendt, 1845; Göppert ve Menge, 1886), kehribardan mikrofosiller çalışması 1990'ların başında hız kazanmıştır. Çalışmalar daha fazla geliştikçe, çeşitli yumuşak gövdeli orman mikroorganizma gruplarının fosil kayıtları hakkında önemli veriler sağlanmıştır. 2003'ten bu yana ise Kretase kehribarının Resim 1'de görüldüğü gibi mikrofosiller açısından son derece zengin olduğu kanıtlanmıştır (Girard, 2010).



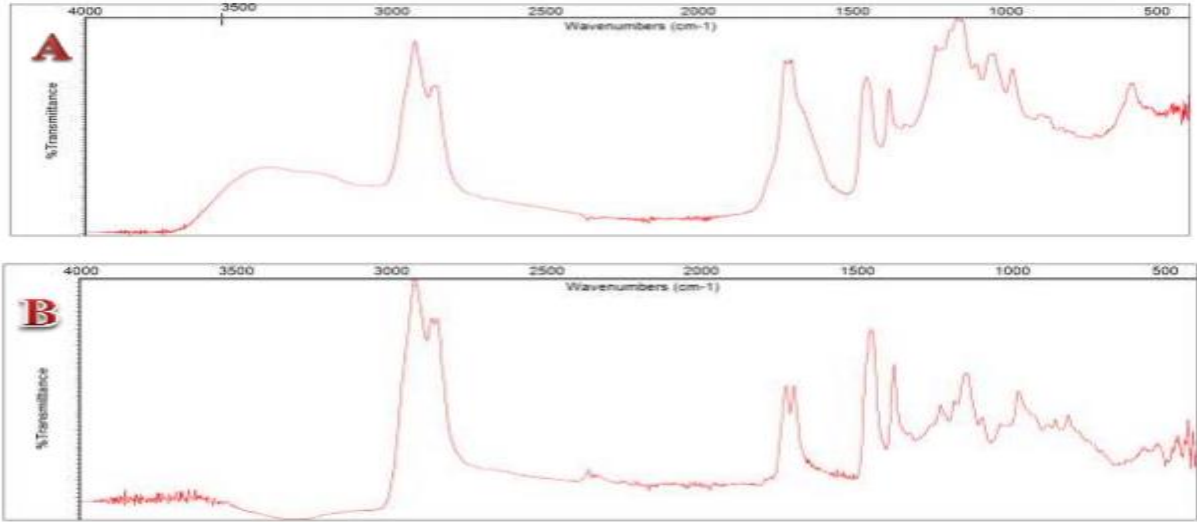
Şekil 1: Fransız orta Kretase kehribarından çeşitli mikroorganizmalar. 1: Actinobacteria indeksi. 2: Palaeocolteronema cenomanensis, Siyanobakteriler. 3: Kladosporoid mantar. 4: bkz. Arcella sp., amip. 5: bkz. Hyalosphenia sp., amip. 6: Siliat indeksi. 7: bkz. Quadrigula sp., yeşil alg. Ölçek çubukları: 5 m (5, 7), 10 m (1, 4), 20 m (6) ve 50 m (2, 3) C. R. Palevol 10 (2011) 189–200

Bu zenginliğin sebebi ise kehribarın içerisindeki fosil örneğini her türlü ısı ve basınçtan koruyarak bozulmasını önler. Öyle ki yapılan çalışmalarda T tarayıcıları kullanarak kertenkeleleri kehribar damlacıklarına zarar vermeden 80 milyon yıllık Orta Kretase sürüngen modelini çıkartarak dijital olarak incelenmiş, 25-40 milyon yıllık bakteri sporlarının identifikasyonun çıkarılmış; 30 ila 60 milyon yıl önce büyüyen kozalaklı ağaçların fosilleşmiş reçineler, 99 milyon yıllık dinazor tüyü ve 100 milyon yıllık kuş ayağı bulunmuştur.(Resim 2)



Şekil 2: (sol)100 milyon yıllık kuşun ayağına yakından bir bakış. F: Xing Lida, (sağ) 1000 milyon yıllık kuşun canlandırması. F: Cheung Chung Tat

Örneklerin sağlanması için doğada kehribar oluşumunun ilk aşaması, bilim insanlarının o dönemde iklim ısınmasıyla ilişkilendirdiği kozalaklı reçinenin bol miktarda boşalmasıdır. Reçine, hücrelerde oluşur ve genellikle bir bitkinin içindeki yuvarlak boşlukları ve uzun kanalları doldurur. Kehribar oluşumunun ikinci aşaması, orman topraklarında reçine birikmesini içerir. Kuru, iyi havalandırılmış toprakta reçine sertleşir ve oksijene maruz kaldığında kimyasal olarak daha kararlı hale gelir. Kehribar oluşumunun üçüncü aşaması, fosilleşmiş ağaç reçinesinin su havzalarına yıkanması, aktarılması ve biriktirilmesiyle gerçekleşir. Reçinenin kehribara dönüşümü olan reçine ise oksijen içeren potasyumla zenginleştirilmiş alkali silt suyu ile kolaylaştırılır. Su reçine ile reaksiyona girerek süksinik asit ve eterlerinin oluşmasına neden olur. Bu sürecin son aşamaları ise yalnızca kehribar değil, aynı zamanda kehribar birikintilerine her zaman eşlik eden bir mineral olan glokonit oluşumunu da içerir. Heterojen karışım haline gelen reçine bibliyografyada (Beck, Gerving ve Wilbur) toplanmıştır 1966/67) ve iki incelemede (Schmid, 1931; Chudoba ve Stutzel, 1933) bulunduğu üzere Mohs ölçeğinde 2 ile 3 arasında bir sertliğe sahip olan süksinik asitle bütünleşmiş ürün olarak son halini alır. Yoğunluğu 1.050 ile 1.095 arasına ulaşır ve kırılma indeksi 1.515 ile 1.545 arasında değişir. Bildirilen erime noktaları (ayırışma aralıkları); 290°C'ye kadar düşük ve 420°C'ye kadar yüksek değerler bulunmuştur. Bu sıcaklıklar önemli derecede çapraz bağlamayla polimerizasyona işaret eder. Çözülme fraksiyonu çözücünün polaritesine bağlı olarak değişir: hidrokarbonlarda %10'a kadar, kloroformda %20'ye kadar ve alkollerde veya eterde %25'e kadar. (Lebez, 1968; Beck ve Liu, 1973, 1974). Süksinit rengi ağırlıklı olarak altın sarısıdır, ancak neredeyse renksiz ile derin kırmızı-kahverengi renklerini alır. Kehribar havaya maruz kaldığında ise koyulaşır. Baltık kehribarı çalışmalarında(Şekil 2-A) OH, CH₂, CH₃, C = C gibi fonksiyonel grupların sayısı, bantlar (cm⁻¹ cinsinden), ve -CO - O ve karşılık gelen titreşim değişikliği türlerine bağlı olarak kızılötesi spektrumu, 1150 ± 15, 995 ± 15 ve 888 ± 1 üç pik modeli karşımıza çıkar. Süksinat ester için karakteristik -CO-O bağları ile ilişkili 1250 ve 1010 cm⁻¹ arasındaki banti ile ülkemizde Bayburt ilinde (Gündoğan ve Yaşar,2020) çıkarılan Bayburt kehribarı ile aynı karakterize özellikler (Şekil 2-B) sergilemektedir.



Çizelge 1: Bayburt kehrbarı FTIR analizleri (A,B)

Biz de çalışmalarımızda ülkemize yerli sermaye ve istihdam da sağlaması maksatlarıyla Bayburt kehrbarını taban alıp organik kaplamalarla destekleyen ve hem gelecek nesillere biyolojik örneklerin aktarılmasını, hem de öncelikli DNA olmak üzere biyolojik materyallerin saklanması hedeflemekteyiz. Bunun için üç katmanlı olan BIOMatrush kapsülünün ikinci kaplama maddesi olan balmumunun kökenleri ise Mısır Turizm ve Eski Eserler Bakanlığı'ndan yapılan açıklamaya göre Kahire'nin yaklaşık 20 mil güneyinde yer alan ve aynı zamanda en eski piramit olduğu düşünülen Basamaklı Piramit de dahil olmak üzere dünyanın önde gelen yerlerine ev sahipliği yapan Sakkara'ya dayanmaktadır ve Mumyalama Atölyesi Kompleksi'nde yeni kanıtlar ile ortaya çıkarılmıştır. Arkeologlar eski mumya atölyesinde M.Ö. 664-525'ten kalma yeni bir mezar odası buldular (Şekil 3) ve Mısır devlet medya kuruluşu Al-Ahram Weekly ile yaptığı röportajda, Almanya'nın Tübingen Üniversitesi'nden bir Antik Mısır Bilimcisi olan Ramazan Hüseyin, Didibastett adlı bir kadına ait kötü korunmuş ahşap tabutlar bulmuştur.



Şekil 3: Yeni keşfedilen mezar odası yerin 30 metre altındadır. Kaynak Mısır Turizm ve Eski Eserler Bakanlığı

Bu tabutlarda birçok eski Mısırlı akciğerleri, midesi, bağırsakları ve karaciğerleri dört ayrı kavanozda gömülü olduğu bulundu. Arkeologlar ve kimyagerler ayrıca odanın içinde bulunan seramiklerdeki kalıntıları da test ettiler. İlk sonuçlarda ortaya çıkarılan maddelerde katran, sedir reçinesi ve hayvansal yağlar keşfedildi.

2. Problem/Sorun:

Günümüzde DNA ve hücre gibi biyolojik materyaller Resim 4'teki gibi sadece soğuk zincir ile muhafaza edilebilmektedir. Bu da sürekli bir enerji tüketimi, taşımada güçlük ve herhangi bir kesintisi sırasında tüm materyallerin bozulması gibi sorunlar getirmektedir.



Şekil 4: Soğuk depo muhafazası

Bu sorun protein, DNA, hücre ile çalışan tüm araştırma, üretim ve tahlil laboratuvarları için geçerlidir. Özellikle Covid-19'un 2019 sonrası başlayan pandemi sürecinde aşılarda korunması büyük önem arz etmektedir. Günümüzde Resim 5'teki gibi aşı koruma protokolü için uzun adımlar kat edilmektedir. Ancak; soğuk zincire bir

alternatif yoktur ancak kesinti gibi durumlara karşı sıvı azot içinde depolama kullanılabilir. Bu çözümde sıvı azot maddesi zamanla azaldığı için sürekli yenilenmesi gerektiğinden yetersizdir. Ayrıca mevcut sistemlerin hiçbiri aniden ortaya çıkabilecek ısı ve basınca karşı materyalleri koruyamamaktadır. Üstelik bu koruma vaatleri için ödenen ücretler fahiş fiyatlı olup ortalama olarak şu şekildedir: Yerel firmalara bakıldığında şirket yatırımlarına karşılık yerel olarak genelde gıda sektöründe çözümler sunan az firma bulunmaktadır.

Aşı için soğuk zincir nasıl işliyor?

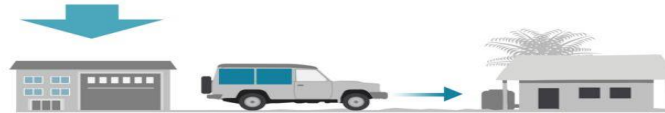
- 1 Aşılar varacakları ülkeye gönderiliyor



- 2 Soğutmalı kamyonlardan soğuk odaya



- 3 Taşınabilir soğutucularla bölge merkezlerine dağıtılıyor



- 4 Elektrikli buzdolabında 2C ve 8C derece arasında saklanıyor



- 5 Taşınabilir soğutucularla aşılamaya için yerel merkezlere götürülüyor



Kaynak: MSF

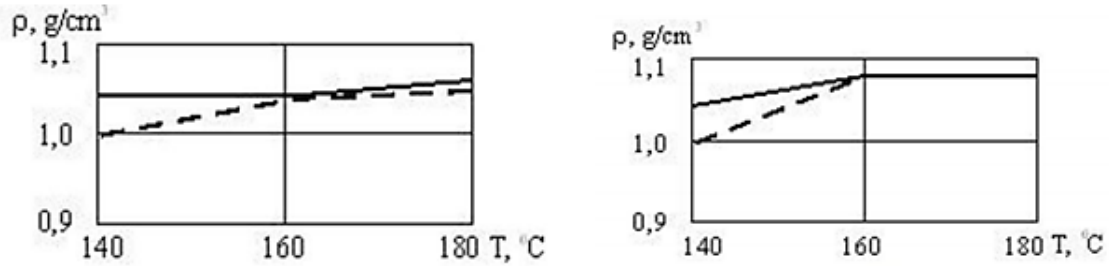
BBC

Şekil 5: Aşı soğuk zincir protokol adımları

Tüm şirketlerin piyasaya sürdüğü çözüm önerileri olan 3500 TL civarı gaz toplama cihazından 58.000-175.000 TL aralığında piyasaya sunulan soğuk hava depolarına kadar fiyat yelpazesi vardır. Tek bir odanın maliyetine artı olarak aylık veya yıllık kiralardan fiyatları 15.000 TL ile 100.000 TL arasında değişmektedir. Dünya genelinde pazar büyüklüğüne bakıldığında tüm firmaların Avrupa ve Amerika'da toplam cirosu 23 Milyar USD'dir ve Orta Doğu ve Afrika'da 8,24 milyar USD'dir. Bu pazarın 2020-2027 aralığında tahmini pazar piyasa oranı ise %9,4 BYYO ile 45,61 milyar USD olması beklenmektedir. Sonuçta tüm bu pazara ayrılan bütçeler yerine alternatif olan BIOMatrush tercih edilerek az maliyetle ürünler çok kolay dünyanın her yerine taşınabilir, onlarca yıldan başlamak üzere istenildiği kadar muhafaza edilebilir ve gelecek nesillere yer bile kaplamadan DNA(sonra diğer biyolojik materyaller) muhafaza edilebilir.

3. Çözüm

A. S. Vikhareva vd., 2016 çalışmasında doğal kehribarın ince fraksiyonundan büyük ürünler üretme yöntemi çalışmalarında belirli ısınma süreleri sonunda bükme gücü, yoğunluk ve basınç karşılaştırmalarında ilk konulan kehribar numuneleriyle son çıkan kehribar örnekleri karşılaştırıldığında kehribar yoğunluğunun artan ısı distorsiyon sıcaklığı ile arttığını, ancak numunenin renginin koyulaştığını göstermiştir. Sonuçta; kehribar doğal özelliklerinde değişimler olmamıştır.(Çizelge 3 ve 4)



Çizelge 3: Kehribar yoğunluğunun bozulma sıcaklığına bağlılığı ısıtma süresi: 1 saat (sol), 2 saat (sağ) (A. S. Vikhareva vd., 2016)

SSCB sertifika No. 1283106, (1987), RF patent No. 2200093(2003) ve RF patent No. 2173258 patentli yöntem çalışmalarında görülmüştür ki işlemler sırasında sıkıştırılmış gazla kalıbın dışından elastik kabuk üzerindeki etkiden dolayı preslenerek gerçekleştirilmesinden dolayı matrisin şekillendirme boşluğunun hacminin aynı anda basınç tahliyesi ile sabitlenmesi ve kalıbın boşaltılmasının ve ardından soğutulmasının durdurulması (patent RF No. 2240925, yayın 2004) kehribarın işlenmesi sırasında tahrip olmasına sebep olmuştur. Bu yöntemler, kehribardan dayanıklı ve kaliteli sonuçlar elde etmeye izin vermez. Fakat; bu sorunların hepsine çözüm olan Chernokhatskij vd, (2002) bulduğu yöntem ışığında tasarlanmış prototipimiz hem kehribarın doğal özelliklerini korurken hem de balmumu kaplama polimetil akrilat entegrasyonuna uyum sağlar. Sonuçta, prototip ve yöntemlerle beraber sonuçta çıkacak BIOMatrush kapsülü(Şekil 6) daha önce de belirtildiği dünyada tüm laboratuvarların soğuk zincir hatları sorunlarına, gönderim hattında oluşabilecek süre aşımalarına ve kontaminasyon risklerine karşı korumuş olacaktır.



Şekil 6: Uzaktan BIOMatrush kapsülü temsili resmi

Ayrıca, gelecek nesillere aktarılmak üzere Svalbard buzullarının üzerine Norveç'te 2008 yılında inşa edilen tüm insanlığın umudu olarak ifade edilen 'Kıyamet Ambarı' adlı 2 milyar 250 milyon tohum kapasiteli tesisin içinde şu an 500 milyona yakın tohum muhafaza edilmektedir. En çok tohum gönderen ülkeler arasında Türkiye 15. sırada yer alıyor. Plataberget Dağı'nın yaklaşık 120 metre içerisinde yer alan mahzene en çok tohum gönderen ülkeler arasında Türkiye 7 milyon 616 bin 532 tohum örneğiyle 15. sırada yer almaktadır. Ancak, yakın zamanda küresel ısınmanın ile mahzenin üzerini kaplayan buzul tabakası aşırı sıcaklar nedeniyle erimiştir ve giriş kapısına sızmıştır. BIOMatrush ise tüm bu sorunların oluşumuna alternatif bir teknolojidir.



Şekil 7. Norveç Kıyamet Ambarı dışı(sol) ve içerisi (sağ)

4. Yöntem

4.1) Dna izolasyonu (bakteri, kan ve bitki) ve PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu) uygulaması

4.1.a. Önceden hazırlanan DNA izolatları kullanılabilir.

4.1.b.1: DNA PCR teknolojisi ile "TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning, with One Shot™ TOP10 chemically competent E. coli cells" kit kullanılarak çoğaltılır ve sekans

dizileme işlemi TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing, with One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. Coli kit ile yapılarak sıralaması doğrulanabilir.

4.1.b.2.1.1: Bakteri izolasyonu protokolü izlenebilir:

Gram pozitif bakterilerden Staphylococcus sp., Gram negatif bakterilerden ise Escherichia coli'ye ait birer suş kullanılır. Triptone Soy Agar'a pasajlanan bakteri suşları 37° C'de 18 saat inkübe edilir. Fosfat buffer solüsyonu (PBS) ile 10-7, 10-8, 10-9 sulandırmaları yapılarak koloni sayma metodu ile bakteri sayımı yapılır. Bakteri süspansiyonları 2x10⁷/ml olacak şekilde sulandırılır ve bu süspansiyonlardan 5'er ml (~10⁸ / ml bakteri) DNA ekstraksiyonunda kullanılır. Her bir suştan 20 kez sonikasyon, dondurma-çözme ve kaynatma yöntemleri ile DNA ekstraksiyonu yapılır. Sonikasyon ile DNA ekstraksiyonu; PBS'te sulandırılmış olan bakteri süspansiyonundan 5ml (~10⁸ /ml bakteri) alınarak 5 dakika sonikatörde, 25 Hz'de tutularak parçalanır. Daha sonra 10 dk 13500 rpm de santrifüj edilerek üst sıvı toplanır. Dondurma-çözme ile DNA ekstraksiyonu; PBS'te sulandırılmış olan bakteri süspansiyonundan 5ml (~10⁸ /ml bakteri) alınarak üç kez hızlı bir şekilde dondurulup, hızlı bir şekilde çözdürülür. Santrifüjlenerek parçalanmış bakteriler uzaklaştırılır. Kaynatma ile DNA ekstraksiyonu; PBS'te sulandırılmış olan bakteri süspansiyonundan 5ml (~10⁸ /ml bakteri) alınarak 10 dk kaynatılır. Santrifüjlenerek hücre kalıntıları uzaklaştırılır. DNA miktarları spektrofotometre (SHIMADZU 1700) ile ve yönergesine uygun olarak 260nm'de okutularak belirlenir. Santrifüj sonrası tüplerin pelet kısımlarından bir öze dolusu alınarak preparat hazırlanır. Preparatlar, kurutulup, alevden üç kez geçirilerek tespit edilir. Metilen mavisi ile 8 dk. boyanır ve hafif akan suda yıkanır. Mikroskop ile parçalanmamış bakteri varlığı aranır.

4.1.b.2.1.2.: Bitki izolasyonu protokolü izlenebilir:

Yaprak dokusu mekanik ezme yöntemi olan porselen havan-tokmak ile ezilip ependorfa alınır, Edward tamponu eklenir. 3 dk vortex ardından 2 dk santrifüj uygulanır. Süpernatantı alındıktan sonra soğuk izopropanol/%100 etanol uygulanır, 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edilip 5 dk santrifüjlenir. Pellet alınıp kurumaya bırakılır, dH₂O'da çözdürülüp RNAz eklenir ve 5 dk santrifüjlenir. dH₂O'da çözdürülüp da sıcaklığında 12 saat inkübe edilir.

4.1.b.2.1.3.: Kandan DNA izolasyonu izlenebilir:

RBC Liziz Çözelti konulan ependorf tüpüne kan eklenip 2-3 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir. Santrifüj sonrası plazma (trambositl.) ve parçalanmış eritrosit kalıntılı süpernatant uzaklaştırılır, kalan lökositli pellet vortexlenip üzerine Hücre Liziz Çözeltisi eklenip 2 dk. vortex sonrası 5 dk. inkübe edilir. Protein Çöktürme Çözeltisi eklenip kırmızı renkteki protein parçalanıp çöktüğü gözlemlenir. Santrifüj sonrası alınan süpernatant temiz ependorf tüpüne alınıp üzerine %100 izopropanol eklenir. 2 dk. santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp %70 etanol eklenerek santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılır. Tüpler kuruma kağıdında kurutulup TE tamponuna eklenerek 2 saat 55°C'de inkübe edilir.

4.1.b.2.2 : PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) uygulaması

10xBuffer + dNTP + Primer F + Primer R + Taqpolimeraz + DNA ekstratı + dH₂O 50 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyon karışımından 49 µl alınıp DNA içeren ependorf tüpe eklenir. İyice karıştırılıp Thermalcycler aletine

yerleştirilerek PCR programı (Denatürasyon, Annealing, Extension(Uzama)) başlatılır. PCR sonrası amplifikasyon ürünleri %1,5'luk agaroz jelde kontrol edilir.

4.2)Grupları oluşturma

Örnekler 18 (4a+4b+4c+4d+1e+1f) gruba ayrılır.

4a: 4 örnek balmumu paketleme ile kaplandıktan sonra koruma oranı ölçülmek üzere sırasıyla 1 hafta,2 hafta, 1 ay, 4 ay bekletilir.

4b: 4 örnek balmumu paketleme sonrası polimetil akrilat zar ile kaplandıktan sonra koruma oranı ölçülmek üzere sırasıyla 1 hafta,2 hafta, 1 ay, 4 ay bekletilir.

4c: Tüm paketlemeler bittikten sonra kehribar ile kaplanıp örnekler koruma oranı ölçülmek üzere sırasıyla 1 hafta,2 hafta, 1 ay, 4 ay bekletilir.

4d:(Kontrol grubu): : Hiç kaplama yapılmadan örnek -12 °C'de her kaplama örneğini karşılaştırmak için bekletilir.

4.3)Balmumu hazırlama ve paketleme

Sarı organik balmumu, balmumu eritme kazanında 15 CW ve pH: 6.50 olan emülsiyonda 3-5 sn. arasında 62-64 °C'de tutulur. Yaklaşık 3-4 cm kalınlığında olması beklenir. Örnek büyüklüğü kadarki kısmı alınarak karanlık ortamda 0-5 °C arasında 3-4 sn beklenir. Bu süre zarfında DNA izolatı içine 10 µm'lik mikro pipet yardımıyla enjekte edilir. Tamamen donduğunda aynı anda polimetil akrilat zar hazırlama kısmına geçilir. Kaplama sonucunda çıkan koruma verileri Çizelge 5'te verilmiştir.

KAPLANAN MADDE	ÖLÇÜM ÇEŞİDİ	KORUNMA ZAMANI	KORUNMA YÜZDESİ
ÇİLEK	Gözlemlenebilir çürüme	3 ay	%70
GUVA MEYVESİ	CO ₂ seviyesi	14 gün	%100
İTALYAN SALAMI	Oksijen mevcudiyeti	7 ay	%90

Çizelge 5: Trevisani vd., 2017 ışığında çıkan sonuçlar

4.4)Polimetil akrilat (PMMA) zarı hazırlanması ve kaplanması

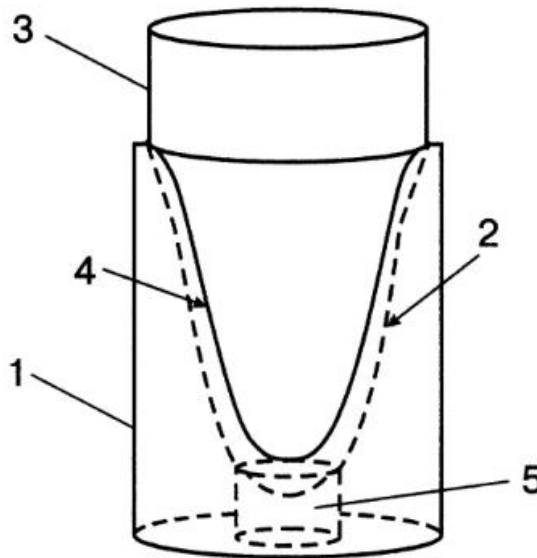
PMMA yapısındaki monomerin kovalent C = C bağlarını kopararak uzayan polimer zincirlerine bağlanmalarına izin veren serbest radikaller oluşturan PMMA 1.7 x 10¹⁴ ila ısı üretimi denk olup su emme oranı %0,3-0.4'tür ve enjeksiyonla kalıplama işlemi %0,1 nem altında, genellikle %0.04 olmalıdır. Bu yüzden 2 saat 80-90°C'de etüvde kurutulur. Havadan havaya enjeksiyon yöntemiyle 210-270 °C'de 8-10 dk. eritilir. 100°C'ye soğuduktan sonra aerosol haline gelmiş PMMA(Şekil 7) 1 dk. içerisinde çok havalı enjeksiyonla yavaşça püskürtülür. (gerekirse ; %8 PMMA 'nın karbon tetraklorid veya kloroformdaki dispersiyonu kullanılarak yapıştırılır.



Şekil 7: aerosol haline gelmiş sıcak PMMA

4.5) Kehribar paketi hazırlama

Bayburt kehrbarı potansiyel yüzey kontaminantlarını kontrol etmek için, 1 g bloğun yüzeyi 48 saat %2 glutaraldehide, 24 saat %10 ağartıcıya ve 24 saat %70 alkole daldırılarak sterilize edilir. Blok daha sonra 14 gün süreyle otoklavlanmış 0,1 ml triptikaz süspansiyonu alikotları (TSB) 37°C inkübe edilmek üzere yerleştirilir. Bayburt kehrbarı önce %25'lik eterde ve %20'lik kloroform karışımında çözdürüldükten sonra 290-320° C aralığında etüvde eriyene kadar bırakılır. Sterile edilmiş kehrbar, Şekil 8'deki ilham alman patentli tekniği uygulamak üzere yaklaşık 1,5-2.00 gr ağırlığı ve 5-10 mm kalınlığındaki arasındaki parametrelere uygun olacak şekilde preslenir.:



Şekil 8: 1) Silindirik bir matris içerir, üretilen ürünlerin dış yüzeyinin şeklini tanımlayan iç duvardır. 2) cam ve pres konfigürasyonu sağlar. 3) dış yüzeyidir. 4) Ürünün iç yüzeyi şeklinde yapılmıştır. 5) Matrisin alt kısmında, silindirik bir alt ektir ve ters tarafından sağlanır. (© RussianPatents.com - patent search, 2012-2021)

Önceden ısıtılmış 160-230°C'deki hazırlanmış olduğumuz kalıp bloğuna yüklenir.(Çizim aşamasındadır.)

Hidrolik prese yerleştirilir ve zımba kalıbı pres tarafından 30-40 s içinde durdurulur. Kalıbın kapatılmasından ve ham maddenin parçalanmasından sonra, kalıp zımbası bir tutma mekanizması ile kilitlenerek şekil oluşturan kalıp bloğunun hacmi korunur. Kalıp, bir dinamometre ile pres kuvvetini kontrol ederken mekanik bir vidalı pres kullanılarak 31,8 MPa veya 63,7 MPa basınca maruz bırakılır. 2-3 saat aralığında sonlara doğru kaplanan pakete belirlenen şekilde etrafına sarılır ve soğumaya bırakılır. Sonuçta çıkan kehribarların ilk konulduğu haldekiyle karşılaştırması Şekil 9'daki gibi olmalıdır:

	Sıcaklık Derecesi	Basınç	Isınma Süresi	Bükme Gücü (Mpa)	Yoğunluk
Cilalı	140	31,8	1 saat	5,90	1,03
			2 saat	4,32	1,02
	160	31,8	1 saat	5,16	1,08
			2 saat	5,08	1,05
	180	31,8	1 saat	9,99	1,08
			2 saat	9,19	1,06
Cilasız	140	31,8	1 saat	2,11	1,01
			2 saat	2,47	1,03
	160	31,8	1 saat	3,26	1,07
			2 saat	2,17	1,04
	180	31,8	1 saat	6,73	1,08
			2 saat	6,12	1,05

Çizelge 4: Kehribar patentli yöntem sonrası işlenen veriler

Soğutmanın tamamlanmasının ardından numuneler, çapları, kütleleri ve yükseklikleri ölçmek için kalıptan alınır. Sonuçta Şekil 10'daki kapsüller elde edilir.



Şekil 9: BIOMatrush temsili kapsül resmi

4.6) Sekanslama ve kontrol grubu karşılaştırması

Tüm gruplar için genetik karakterizasyon belirlemede 16S rRNA geninin bir fragmanının Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu için bir şablon olarak

kullanılır (gerekli izolasyon protokolleriyle oluşturulmuş sekanslama sonuçları). Her paket enjektörle delinerek içinden alınmış izolatların PCR ürünleri BLAST araştırması (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) yoluyla GenBank'ta bilinen tüm diğer DNA dizileriyle karşılaştırılır. Kehribar izolatlarının 16S rRNA dizileri daha sonra diğer bakterilerle hizalanır ve MEGA2.1 (<http://www.megasoftware.net>) ile bir Kimura iki parametrelili mesafe matrisi ile komşu birleştirme yöntemi kullanılarak bir filogen oluşturulur. Sonuçlar yaşlandırma testlerine tabi tutulmak üzere Akdeniz Üniversitesi bağımsız Akreditasyon testlerine raporlanmak üzere gönderilir. Aynı şekilde, pH metre de kalibrasyonlar yapıldıktan sonra tüm gruplar 4d gruplarıyla karşılaştırılarak raporlanır.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

BIOMatrush biyolojik materyallerin saklanması için dünyada hep önümüze çıkan soğuk zincir ürünlerine bağlı kalmayıp yeni nefes getirmektedir. Üstelik biyolojik materyallerin soğuğa aşamalı geçişi sağlanmak zorundadır. Herhangi bir kesinti durumunda ya da düzenleme gibi sebeplerle dondurucu kapağının açık kalmasıyla oluşabilecek birkaç derecelik yükseliş bile depolanan tüm materyallerin bozulmasına sebep olabilmektedir. Bizim sunduğumuz teknoloji ile biyolojik materyaller çok enerji tüketen büyük soğutuculara gerek olmadan oda sıcaklığında muhafaza edilebilecektir. Bunlar göz önüne alındığında sağladığımız teknoloji alan, enerji ve koruyuculuk açısından rakip teknoloji olan soğuk depolamaya göre üstündür.

Teknolojimiz özgün olduğu için bu konu ile birebir ilişkili literatür olmamasına karşın yöntem ve yaklaşımımızın başarı ihtimalinin yüksek olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Balmumunun biyolojik dokular üstündeki koruyucu etkisi antik zamanlardan beri mumyalama, yiyeceklerin korunması gibi işlemlerde biyolojik örnekleri korumada kullanıldığından bilinmektedir. 2017 yılında yayınlanan bir makalede oksijen, ışık ve nem için bir bariyer oluşturan balmumunun su kaybını ve oksidasyonu engelleyerek protein içerikli İtalyan salamını altı aya kadar koruduğu gösterilmiştir. A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA el kitabında da aynı şekilde sentetik balmumu kaplama çalışmaları gösterilmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi'nde yapılan yüksek lisans tez çalışması "Antibakteriyel Hibrit Kaplamaların Hazırlanması Ve Karakterizasyonu", "Ayrıntılı Akrilik (PMMA) Enjeksiyonlu Kalıplama İşlemi", "Alternatif yapılarda polimer kullanımı" ve polimetil akrilatın ilaç kaplaması, kontakt lensler gibi birçok materyalin kaplamasında bulunan biyolojik yapılarla etkileşiminin onlara zarar vermediği gösterilmiş bir plastik cam olduğunu kanıtlar nitelikteki onlarca çalışmadan biri olan "Polimetil metakrilat kemik çimentosunun modern ortopedik cerrahideki rolü", teknolojimize ışık tutmaktadır. DNA örneklerinin kehribar içinde binlerce korunup PCR ile çoğaltılabildiği de Bölüm G.1'de gösterilmiştir. Ayrıca; 120 milyon yıllık İsrail (Lübnan lode) kehribarından gelen bakteri kültüründen yirmi yedi izolat, yağ asidi profilleri (FAME) ve / veya 16S rRNA dizilimi ile karakterize edilebilmiştir.

6. Uygulanabilirlik

Bölüm 3’te belirtilen tüm maliyet ve sorunların önüne geçmek için alternatif olan, hizmetini kendi oluşturduğumuz web sitesiyle BIOMatrush ürünümüz ve satışı yapılmak üzere şirket kurulmasını hedeflemekteyiz. Güvenilir web sitesi ve izolasyon sağlayan aynı zamanda depolanabilir bilgi alt yapısı, canlı destekler, deneme sürümleri ve geri dönüşler sayesinde firmamızı öne çıkartmayı hedeflemekteyiz.

Ürün teminatlarında müşteri isterse korumak istediği biyolojik ürünü ortak olduğumuz laboratuvara gelerek izolasyonu sağlanıp kaplamak üzere bize gönderilmesi için teslim edebilir veya izole edilmiş biyolojik materyali ikamet ettiği şehirdeki şubemize getirerek kaplandığı zaman bizden alabilir veya anlaşmalı olduğumuz kargo firmalarından yararlanarak kaplama sonrası ekspres kargo sayesinde gün içerisinde gönderimi sağlanabilir. Tüm bu kriterler ücrete dahil olacaktır BIOMatrush ürünümüz şu anda patent başvuru aşamasındadır. Müşterinin istediği biyolojik örneğe yönelik korumanın süre isteği, korumak istediği biyolojik ürünün adedi ve tehlikeli olup olmadığı kıstaslarından yola çıkılarak basamaklı fiyatlandırma öngörülmektedir.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması

Projeye yönelik tahmini maliyet ve zaman planlaması tabloları ayrıntılı bir şekilde aşağıda verilmiştir:

Tahmini Maliyet

Sıra no	Alet/Teçhizat/ Yazılım/Yayın Adı	Teknik Özellik	Kullanım Amacı	Birim Fiyatı (TL)	Toplam Tutarı (TL)
1	Balmumu eritme kazanı	Sürekli kullanım	Balmumu paketi hazırlama	582,00	582,00
2	Etüv+inkübatör	Sürekli kullanım	Steril koşul gereksinimi	5.185,00	5.185,00
3	Otoklav	Sürekli kullanım	Steril koşul gereksinimi	8.170,00-16.130,00	12.140,00
4	Santrifüj cihazı	Sürekli kullanım	Madde ayrımı	570,00	570,00
5	1 adet DNA isolation kit for blood/bone marrow/tissue (Roche)	10 ürün için	İzolasyon aşaması	5.274,00 +kargo	5.274,00
6	1 adet High Pure PCR Template Preparation Kit (sigma aldrich)	10 ürün için	PCR aşaması	2.695,00 +kargo	5.274,00
7	Dentreal Distile Saf Su Damıtma ve İmbik Cihazı Tds	Aylık Yenileme	Saf su karşılanması	1.395,00	1.395,00
8	Hot Plate	Sürekli kullanım	Stand koyma	743,00-2.360,00	1.520,00
9	pH metre	Sürekli kullanım	Ölçüm yapma	5.600,00-8.200,00	6.900,00
10	Buzdolabı	Sürekli kullanım	Soğuk saklama	4.000,00-7.000,00	5.500,00
12	Sekanslama programlarına uyumlu masaüstü bilgisayar	Sürekli kullanım	Sekanslama ve programlar	30.000,00-40.000,00	35.000,00
13	Baltık doğal kehribar	84 gr	Kehribar kaplama	32,00	2.688,00

14	Dna izolasyon kit	10 adet	Dna izolasyonu	145,30	1.453,00
15	Balmumu	1 kg	İç kaplama	100	100
16	Otoklavabilir mikropipet (20'lik, 200'lük ve 1000'lik ve uçları	3 adet	Enjeksiyon	997	3.135,00
18	Polimetil akrilat	1 kg Ürün Başına 0,5 gr 0,85 tl	Polimetil akrilat zar kaplama	1.715,00	1.715,00
19	100'lü plastik pipet damlalık	1 adet (3 Ayda bir yenileme)	Sıvı aktarımı	29,98	29,98
20	Jojeler, damlalık, erlen ve beherler, ependorf ve falcon tüpleri ve standı	1 adet(3 Ayda bir yenileme)	Temel laboratuvar ekiomanları	115,00-147,00	832,00
21	Dijital Hassas Terazi Hassasiyet: 0.001 Max: 300 gr	Sürekli kullanım	Hassas tartım	1.548,00	1.548,00
22	200'lü Psa Tartım Kabı 41 x 41 mm 10 ml	1 Adet	Hassas tartım kabı	214,21	214,21
23	Etanol,aseton ve bilimüm temizleyiciler	1'er Adet	Laboratuvar sterilazyonu	250,00-300,00	250,00
24	Sülsinik asit, izopropanol, SD Svb solisyonlar	1'er Adet	Temel solisyonlar	5.000,00	5.000,00
25	Prototip tasarlama ve danışmanlık ücreti	1 kere	Tasarım	5.000,00	5.000,00
TOPLAM		101.305,00,24TL			

Zaman Planlaması

Proje adımları	Süre Toplam	1-3.a y	3-5.a y	5-7.a y	7-9.a y	9-11.a y	12.ay-sonras
DNA izolasyonu veya izolatların tedarigi	10 ay						
Balmumu içinde paketleme	4 ay						
Balmumu + polimetil akrilat içinde paketleme	4 ay						
Polimetil akrilat zar + Kehribar kaplama	6 ay						
Sekanslama,raporlama ve ürün haline getirme	12 ay						

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar):

M. Aytekin vd. ,2009 verilerine bakılacak olursa o zaman için Türkiye'de bulunan toplam hastane bazında ruhsatlı laboratuvar sayısı ise 1787 iken günümüzde genetik testleri ve tanısı yapan laboratuvar sayısı 738 hastaneye bağlı 200'ün üzerinde genetik tanı laboratuvar bulunmaktadır. Özel kök hücre ve genetik tanı merkezleri ise her geçen gün 50'yi geçmekte ve sayı hızla yükselmektedir. Dünyadaki sayı ise on binlerle ifade edilebilmektedir. Bu verilerdeb de yola çıkarak hedef kitemizin temel büyüklüğü için ilk başta Doğu bölgelerimizdeki kehribar

maden yataklarına olan yatırımla istihdam artacağından yerel soğuk zincir firmalarına müşterilerine daha kolay ulaşmayı ve yatırım almalarına önayak etmiş oluyoruz. Genelde sadece gıda sektöründe ve özel laboratuvarlara tedarik sağlayan yerel kargo firmalarına yeni bir fırsat getiriyoruz. Hedef kitlemiz Soğuk Hava Ecza Depoları ve tedariklerini sağladıkları mikroorganizma, genetik ve kök hücre, dünyadaki tüm devlet ve özel laboratuvarları ile ihracatta yüksek potansiyel hedefliyoruz.

9. Riskler

Projenin tek riski tüm sekanslamalar sonucu rapordaki istenen %100 koruma değerinin çıkmasıdır. Bu durumda B planı olarak yöntemde iyileştirilmelere gidilecektir.

10. Kaynaklar

Geomicrobiology Journal, 26:21–30, 2008 Copyright c Taylor & Francis Group, LLC ISSN: 0149-0451 print / 1521-0529 online DOI: 10.1080/01490450802599268 Contamination of Amber Samples by Recent Microorganisms and Remediation Evidenced by Mid-Cretaceous Amber of France

Vincent Girard,1 Didier N´eraudeau,1 G´erard Breton,1 Simona Saint Martin,2 and Jean-Paul Saint Martin3 1Laboratoire Geosciences Rennes, Universit ´e d ´e Rennes 1, UMR CNRS 6118, Rennes (France) 2Museum National d’Histoire Naturelle, UMR CNRS 5143, Paris (France) Universitatea din Bucuresti, ´ Facultatea de Geologie si Geofizica, Bucuresti (Romania) 3Museum National d’Histoire Naturelle, UMR CNRS 5143, Paris (France)

Micrococcus luteus - Survival in Amber C.L. Greenblatt1 , J. Baum1 , B.Y. Klein1 , S. Nachshon1 , V. Koltunov1 and R.J. Cano2 (1) Kuvim Centre for the Study of Infectious and Tropical Disease, The Hebrew University—Hadassah School of Medicine, P.O. Box 12272, Jerusalem 91120, Israel (2) Biological Sciences Department, California Polytechnic State University, San Luis Obispo, CA 93407, USA Received: 3 July 2003 / Accepted: 27 August 2003 / Online publication: 28 May 2004

Forgeries of Fossils in “Amber”: History, Identification and Case Studies David A. Grimaldi Alexander Shedrinsky Andrew Ross Norbert S. Baer First published: December 1994

Maniatis, T., Sambrook, J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, USA. (1989).

Newton, C.R. PCR Essential Data. John Wiley and Sons LTD. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO 19, 1UD, UK. (1995).

S Ü Fen Ed Fak Fen Derg Sayı 27 (2006) 73- 76, KONYA Hızlı Bakteriyel DNA Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması Emine Arslan1 , U. Sait UÇAN Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

Kandan Dna İzolasyonu Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2017-2018 Güz Dönemi Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler Laboratuvarı-I İstanbul Kültür Üniversitesi Arş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN Bartın Üniversitesi Dr.Öğr.Üyesi Fahriye ZEMHERİ Arş.Gör. Ayşe Hale Güçkır 04.2018

Diversity of Microorganisms Isolated from Amber C.L. Greenblatt,1 A. Davis,2 B.G. Clement,2 C.L. Kitts,2 T. Cox,2 R.J. Cano2 1 Kuvim Centre and Department of Parasitology, Hebrew University, Jerusalem, Israel 2 Environmental Biotechnology Institute, California Polytechnic State University,

San Luis Obispo, CA 93407, USA Received: 14 December 1998; Accepted: 16 March 1999

Trevisani, M., Cecchini, M., Siconolfi, D., Mancusi, R. & Rosmini, R. Effects of beeswax coating on the oxidative stability of long-ripened Italian salami. *J. Food Qual.*, (2017).

Ayrıntılı Akrilik (PMMA) Enjeksiyonlu Kalıplama İşlemi Jun 05, 2019

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi Antibakteriyel Hibrit Kaplamaların Hazırlanması ve Karakterizasyonu Belkız Çoşkun Danışman Prof. Dr. Atilla Evcin Nanobilim ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı Ocak 2021

J Bone Joint Surg Br 2007 Jul;89(7):851-7. doi: 10.1302/0301-620X.89B7.19148. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery J C J Webb 1, R F Spencer

Dokuz Eylül Üniversitesi İnşaat Mühendisliği Bölümü - Alternatif Yapı Malzemeleri - 4. Yapılarda polimer kullanımı - Burak Felekoğlu

A.M.Günay(2021)beyinsizler.net/antik-misirda-mumyalama-icin-kullanilan-malzemeler-ortaya-cikti/

