

## TEKNİK ŞARTNAME

Bu hizmet alımı 33 adet saf bakteri kültürünün tür tanımlaması ve filogenetik ağaç oluşturma hizmeti alımı ile ilgili olup aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

### A. Genel Şartlar

1. Tüm hizmetler eksiksiz bir şekilde ve teklif edilen ücrete dahil olarak yapılmalıdır. Hiçbir ek ücret talep edilmemelidir.
2. Bakterilerin hizmet sağlayıcı firmaya uygun şekilde ulaştırılması firmanın kendi sorumluluğundadır.
3. Tüm analizler elektronik ortamda uygun formatta teslim edilmelidir.
4. Biyoinformatik analizler sonucunda oluşturulan şekil, grafik ve tablolar yüksek çözünürlüklü formatta teslim edilmelidir. Talep edilmesi halinde firma şekil, grafik ve tablolarda gerekli revizyonları ücretsiz yapmalıdır.
5. Analiz sonucunda elde edilen ve tür tanımlamasında kullanılan her bir türe ait DNA dizileri de raporla birlikte elektronik ortamda verilmelidir.

### B. DNA İzolasyonu

1. Hizmet kapsamında DNA izolasyon kit kullanılarak firmaya gönderilecek olan kültürden saf DNA örneği elde edilmelidir.
2. DNA izolasyonu işleminde hücre parçalama tamponu ile birlikte proteinaz K ve lizozim enzimleri kullanılmalıdır.
3. Bakteri üzerinden tür tayininde örneklerin DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti kullanılmalıdır.
4. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm yapılmalıdır.
5. Konsantrasyonu 10 ile 50 ng/ul olmalıdır ve jel görüntülemesi verilmesi gerekir.
6. Düşük kalite ve konsantrasyondaki örneklerden ücretsiz tekrar DNA izolasyonu yapılmalıdır.

### C. PCR ve DNA Dizi Analizi

1. Bakteri tür seviye de tanımı için 16S rRNA veya ITS geni universal primerleri ve özel primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmalıdır. Multiplex PCR yapılabilir.
2. PCR (kyratec thermocycler) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE (New Bioscience markalı ürün ile) tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülüp ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmalı ve proje yürütücüsü ile paylaşılmalıdır.
3. Floresan boyalar, ROX, VIC, NED, TAMRA, YAKIMA YELLOW, TEXAS RED ile primer sentezi yapılmalıdır.
4. PCR çalışmaları için optimizasyonu yapılmalıdır ve her uygulamada pozitif, negatif ve blank kontrol örnekleri kullanılmalıdır.
5. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmelidir.
6. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılmalıdır.
7. Sanger Dizileme örneklerimiz için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmalıdır. (Applied Biosystems, Foster City, CA).
8. Elde edilen PCR ürünleri ile DNA saflaştırma işleminden sonra çift yönlü Sanger DNA dizi analizi gerçekleştirilmelidir.
9. Tek yön okuma uzunluğu en az 1100bp olmalıdır.
10. Çıkmayan sonuçlar için ücretsiz baştan örnek gönderilerek çalışma en baştan tekrar edilmelidir. Firma sonuçlar çıkana kadar ücretsiz tekrar hakkı sunulmalıdır.
11. Elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmeli. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmalıdır.

12. Elde edilen DNA dizi analiz sonuçlarından hizalama ve BLAST analizi yapılarak örneklerin türü belirlenmelidir.
13. Hizmetin eksiksiz yerine getirilmesi için gerekli olan her türlü sarf malzeme ve teçhizat Firma tarafından temin edilmelidir.
14. Firmanın kendi Araştırma moleküler biyoloji laboratuvarı ve alt yapısı olmalıdır ve burada analizleri gerçekleştirmelidir.
15. İhale aşamasında teknik şartnameye madde madde cevap verilmiş ve tüm maddelere uygun olmalıdır.
16. Projede çalışan ekip deney süresince her aşamayı laboratuvara giderek izleyebilmelidir.
17. Örnekler elden teslim alınacaktır, kargo kabul edilmeyecektir.
18. Konuyla ilgili her türlü dokümantasyon proje ekibine eksiksiz olarak teslim edilmelidir.
19. Ödeme işlemi tamamlanınca ve gerçekleşen hizmetler üzerinden yapılacaktır.
20. Örnek teslimi tarihi itibaren çalışmanın 15 gün içerisinde tamamlanıp sonuçların rapor halinde teslim edilmelidir.

#### **D. Filogenetik Ağaç Şartnamesi**

1. Dizi hazırlanması (alignment) temeline dayanarak hesaplara dizi çiftleri arasındaki farkların miktarına dayanarak hazırlanmalıdır.
2. Geniş veri kümeleri analizi Neighbor- Joining Yöntemi ile yapılmalıdır.
3. Filogenetik analizler MegaX yazılımı kullanılarak yapılmalıdır.
4. UPGMA Metodu ile filogenetik ağaçta dalların uzunluğu ağaçta görülmelidir.
5. Analizler en az 1000 Bootstrap tekrar metodu ile yapılmalıdır.
6. Evrimsel mesafe Maximum Composite likelihood metodu ile hesaplanmalıdır.
7. Belirsiz nükleotidler dizilerden pairwise-deletion metodu ile çıkartılmalıdır.
8. Örnekler arası genel mesafe değeri ikili şekilde yapılmalıdır.
9. Örnekler arası ve gruplar arası ortalama çeşitlilik hesaplanmalıdır.
10. Ödeme işlemi tamamlanınca ve gerçekleşen hizmetler üzerinden yapılacaktır.
11. Örnek teslimi tarihi itibaren çalışmanın 15 gün içerisinde tamamlanıp sonuçların rapor halinde teslim edilmelidir.