

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BİR BİTKİ PATOJEN ADAYI OLAN *Curtobacterium*  
CİNSİNE AİT BAKTERİ İZOLATLARINDA GENOMİK  
KÜTÜPHANE OLUŞTURMA ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA KANLIKAYA

AĞUSTOS 2017

MUĞLA

**T.C.**

**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BİR BİTKİ PATOJEN ADAYI OLAN *Curtobacterium*  
CİNSİNE AİT BAKTERİ İZOLATLARINDA GENOMİK  
KÜTÜPHANE OLUŞTURMA ÇALIŞMALARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEDA KANLIKAYA**

**AĞUSTOS 2017**

**MUĞLA**

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SEDA KANLIKAYA tarafından hazırlanan **BİR BİTKİ PATOJEN ADAYI OLAN *Curtobacterium* CİNSİNE AİT BAKTERİ İZOLATLARINDA GENOMİK KÜTÜPHANE OLUŞTURMA ÇALIŞMALARI** başlıklı tezinin, 24/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Betül BÜRÜN\* (Jüri Başkanı, Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL\*\* (İkinci Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Hakan ALLI

Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Esin POYRAZOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı,  
Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:

İmza:

İmza:

İmza:

BÖLÜM BAŞKANLIĞI VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ ONAYI

Prof. Dr. Hasan Sungur CİVELEK V-

Bölüm Başkanı, Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

İkinci Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

İmza:

İmza:

Savunma Tarihi: 24/08/2017

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin Muğla BAP Projesi çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Seda KANLIKAYA

24/08/2017

(İmza)



## ÖZET

### **BİR BİTKİ PATOJEN ADAYI OLAN *Curtobacterium* CİNSİNE AİT BAKTERİ İZOLATLARINDA GENOMİK KÜTÜPHANE OLUŞTURMA ÇALIŞMALARI**

Seda KANLIKAYA

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

İkinci (Ortak) Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL

Ağustos 2017, 84 sayfa

Bor, dünya ve özellikle de ülkemiz için stratejik olarak önemlidir. Ülkemiz, dünyanın en büyük ve en iyi kalitede bor rezervine sahiptir. Bor; cam ve seramik sektörü, tarım sektörü, kimya, metalurji, malzeme ve demir-çelik sektörleri, orman ürünleri, mobilya ve kağıt sektörleri, sağlık sektörü, enerji sektörü, savunma, havacılık ve uzay sektörleri, tekstil sektörü, çimento ve yapı malzemeleri sektörü, madencilik sektörü gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bor ile biyokimyasal ve moleküler çalışmaları yapabilmek için kullanılacak en uygun organizmalardan biri bakterilerdir. Bu çalışmada, Türkiye'deki Bor madenlerinden izole edilmiş olan *Curtobacterium* cinsine ait bazı bakteri izolatları model organizmalar olarak kullanılmıştır. Bu izolatlar laboratuvarımızda 150–200 mM borik asit içeren besiortamında çoğaltılmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda bor içeren madenlerden izole edilen *Curtobacterium* izolatlarının, bu ortamda yaşayabilmek için kullandıkları gen veya genleri, proteinleri öğrenebilmek mümkündür.

Bu tez çalışmasında, *Curtobacterium* cinsine ait BB872Y ve BB62b2Y olarak kodlanan izolatlarının genomik kütüphaneleri oluşturulmuştur. İlk olarak uygun yöntemler ile bakteri DNA'ları elde edilerek, *MboI* enzimi ile kısmi kesime uğratan genom parçalara ayrılmıştır. Bu genom parçaları plazmid olarak kullanılan pACYCDuet-1 içerisine klonlanarak *Escherichia coli* içerisinde genomik kütüphaneleri oluşturulmuştur. BB62b2Y-1 izolatının genomik kütüphanesi için 1800 koloni, BB62b2Y-2 izolatı için yaklaşık 2400 koloni ve BB872Y izolatı içinse 14000 koloni elde edilmiş ve herbir genomik kütüphane gliserol stoklar halinde dondurucuda saklanmıştır. Ayrıca bu tez kapsamında genomik kütüphane kolonileri bor seleksiyonuna tabii tutulmuştur. Farklı konsantrasyonlar denenerek, bor tolerans seviyeleri araştırılmıştır.

Tolerant olan kolonilerde, BB872Y izolatına ait olan pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c ve pSKB3d plazmidleri; BB62b2Y-1 izolatına ait olan p106 ve p107 ve BB62b2Y-2 izolatına ait olan pCf1 ve pCf3 plazmidleri izole edilmiş ve stokları alınmıştır. Rekombinant plazmidlerin insertlerinde yer alan gen bölgeleri, DNA dizi analizleri sonucunda; hipotetik protein, sinyal iletim histidin kinaz senX3, nitrat redüktaz, ABC taşıyıcı permeaz, klorür kanal proteini, alfa-galaktosidaz, peptid ABC taşıyıcı permeaz, peptidil-prolil cis-trans izomeraz, tip I pantotenat kinaz, pantotenat kinaz proteinleri olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Curtobacterium, Genomik Kütüphane, Bor, Tolerans, Gen, Klonlama



## ABSTRACT

### THE STUDIES TOWARDS CONSTRUCTING GENOMIC LIBRARIES OF BACTERIAL ISOLATES OF A CANDIDATE PLANT PATHOGEN BELONGING TO CURTOBACTERIUM GENUS

Seda KANLIKAYA

Master of Science (M.S.c.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Co-supervisor: Assist. Prof. Dr. Bekir ÇÖL

August 2017, 84 pages

Boron has a strategic importance for the world and particularly our country, which possesses the largest and the best quality boron reserves in the world. Boron is commonly used in many areas such as glass and ceramics industry, agriculture sector, chemistry, metallurgy, materials and iron-steel sectors, forest products, furniture and paper sectors, health sector, energy sector, defense, aviation and space sectors, textile sector, cement and building materials and mining sectors.

Bacteria are one of the most suitable model organisms to investigate the relationship between boron and biochemical and molecular mechanisms. In this study, some bacterial isolates obtained from the boron mines in Turkey and belonging to the Curtobacterium genus were used as the model organisms. These isolates were grown in the medium containing 150-200 mM boric acid in our laboratory. It is possible to find out the genes or proteins that are needed by the Curtobacterium isolates in order to survive in the environments containing high concentrations of boron.

In this thesis study, genomic libraries of the BB872Y and BB62b2Y isolates belonging to Curtobacterium genus were constructed. First, bacterial genomic DNAs were obtained using the appropriate methods and the genomes were fragmented by the partial digestion with *MboI* enzyme. The genome fragments were then cloned into the plasmid pACYCDuet-1 to construct the genomic libraries. For the genomic libraries of BB62b2Y, BB62b2Y-2 and BB872Y, a number of 1800, 2400 and 14000 colonies were obtained, respectively and each genomic library was saved as glycerol stocks in the freezer. Also, the colonies of genomic libraries were subject to boron selection and the levels of boron tolerance for the selected clones were determined by testing under various boron concentrations.

The plasmids pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c and pSKB3d from the genomic library of BB872Y and the plasmids p106, p107, pCf1 and pCf3 from the genomic libraries of

BB62b2Y and BB62b2Y-2 were isolated from the tolerant clones and the strains carrying these plasmids were made into the glycerol stocks.

As a result of DNA sequence analyzes, gene regions within the inserts of the recombinant plasmids were found to be possibly closely related to the following activities: hypothetical protein, signal-transduction histidine kinase senX3, nitrate reductase, ABC transporter permease, chloride channel protein, alpha-galactosidase, peptide ABC transporter permease, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, type I pantothenate kinase and pantothenate kinase.

**Keywords:** Curtobacterium, Genomic Library, Boron, Tolerance, Gene, Cloning





Çok Değerli Aileme,

Babam Orhan KANLIKAYA,  
Annem Selma KANLIKAYA,  
Ablam Selen BUDAK,  
Canım yeğenim Selinay BUDAK'a

Sizi Çok Seviyorum.

## ÖN SÖZ

Projenin yürütülmesi aşamalarında, desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Betül BÜRÜN'e, konunun belirlenmesi ve deneysel aşamalarının yürütülmesinde her şekilde yanımda olan, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e teşekkür ederim.

Proje kapsamında ve yüksek lisans tezim süresince deneysel aşamalarda ve her türlü yanımda olan Merve SEZER'e, Esra DİBEK'e, deneysel aşamalardaki desteklerinden dolayı Begüm Hazar ÇİFTÇİ'ye, Taner KAYNAR'a, Bilge UÇAR'a, Mehmet KARAALİ'ye, diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans, lisans, eğitim- öğretim, yaşamım boyunca bana maddi manevi destek veren canım aileme Babam Orhan KANLIKAYA, Annem Selma KANLIKAYA, Ablam Selen BUDAK, Eniştem Abim Serdar BUDAK'a, bitanecik yeğenim en büyük manevi desteğini aldığım Selinay BUDAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Onu tanıdığımdan bu yana her zaman yanımda olan, bana destek veren Burak KILCI'ya teşekkür ederim.

Bu proje Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 15/229 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteğinden ötürü teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	x
İÇİNDEKİLER.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xviii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Kaynak Özetleri .....	2
1.1.1. Kimyasal ve biyokimyasal açıdan bor .....	3
1.1.2. Bor ve bitkiler.....	4
1.1.3. Bor ve insan sağlığı .....	5
1.1.4. Bor ve bakteriler .....	5
1.1.5. <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> 'in genel özellikleri .....	5
1.1.6. Bakteriyel solgunluk hastalığı.....	6
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>8</b>
2.1. Materyal.....	8
2.2. Yöntem .....	8
2.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	8
2.2.2. Vektör olarak kullanılacak olan plazmidin seçimi ve izolasyonu .....	10
2.2.3. pACYCDuet-1 plazmidinin izolasyonu.....	10
2.2.4. Vektör olarak kullanılacak olan pACYCDuet-1 plazmidinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi .....	11
2.2.5. pACYCDuet-1 plazmidinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesiminin kontrolü.....	11
2.2.6. Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ile kesilen plazmid DNA'sının defosforilasyonu .....	12
2.2.7. Plazmid DNA'sının defosforilasyonunun kontrolü.....	12
2.2.8. Genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kısmi kesimi 13	
2.2.9. Ligasyon.....	13
2.2.10. Isı şoku yöntemi ile <i>E. coli</i> 'ye transformasyon ve seleksiyon .....	14

2.2.11. Rekombinant plazmidlerin stoğa alınması, genomik kütüphane oluşturma	15
2.2.12. Genomik kütüphanenin bor seleksiyonuna tabi tutularak bor toleransına sahip klonların bulunması .....	15
2.2.12.1. Direkt ekim yöntemi ile seleksiyon .....	16
2.2.12.2. Çizgi ekim yöntemi ile seleksiyon.....	17
2.2.12.3. Zenginleştirme (Enrichment) yöntemi ile seleksiyon .....	17
2.2.13. Bor tolerans nokta testi .....	18
2.2.14. Tolerant klonlardan stok oluşturulması .....	19
2.2.15. Rekombinant plazmid izolasyonu .....	19
2.2.16. Rekombinant plazmidlerin insert varlığının ve büyüklüklerinin kontrolü	20
2.2.17. Rekombinant plazmidlerin ve büyüklüklerinin insert varlığının PCR yöntemi ile kontrolü.....	20
2.2.18. Rekombinant plazmidlerin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu insert varlığının kontrolü.....	21
2.2.19. Rekombinant plazmidlerin insert sekanslarının belirlenmesi ve biyoinformatik analizler.....	22
<b>3. BULGULAR VE İRDELEME.....</b>	<b>23</b>
3.1. <i>E. coli</i> pACYCDuet-1 Plazmidini İçeren DH10b Suşunun Bor Tolerans Seviyesinin Belirlenmesi .....	23
3.2. BB62b2Y ve BB872Y İzolatlarının Genomik Kütüphane Çalışmaları .....	24
3.2.1. Genomik DNA izolasyonları.....	25
3.2.2. pACYC Duet-1 plazmidinin izolasyonu .....	26
3.2.3. Vektör olarak kullanılacak olan plazmidin (pACYCDuet-1) restriksiyon endonükleazlar ile kesimi .....	27
3.2.4. BB62b2Y ve BB872Y genomik DNA'larının <i>MboI</i> restriksiyon endonükleaz enzimi ile kısmi kesimi.....	29
3.2.5. Genomik DNA fragmentlerinin pACYCDuet-1 plazmidine klonlanması ve transformasyon .....	31
3.2.6. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA fragmentlerinin pACYCDuet-1 plazmidine klonlanmaları sonucu transformantların seçimi .....	33
3.2.7. Rekombinant plazmidlerin koloni PCR yöntemi ile insert kontrolleri....	35
3.2.8. BB62b2Y ve BB872Y genomik kütüphanesi stoğunun alınması .....	36
3.3. Transformant Kolonilerin Direkt Ekim Yöntemi ile Seleksiyonu .....	36
3.4. Transformant Kolonilerin Zenginleştirme Yöntemi ile Seleksiyonu .....	41
3.4.1. Bor tolerans nokta testi ile seçilen kolonilerin analizi.....	49

3.4.2. Rekombinant plazmidlerdeki insertlerin büyüklüklerinin analizi için PCR yöntemi ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi .....	54
3.5. <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> Türüne ait Genomik Kütüphanesi Oluşturulan İzolatların, Bor Seleksiyonu Sonucu Plazmid İnsertlerinin DNA Dizi Analizi ve Sonuçları .....	62
3.5.1. BB62b2Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen plazmid insert sekanslarının biyoinformatik analizleri .....	64
3.5.2. BB872Y izolatının genomik gütüphanesinden elde edilen plazmid insert sekanslarının biyoinformatik analizleri .....	64
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>66</b>
4.1. Hipotetik Proteinler .....	68
4.2. Histidin Kinaz (HK) Aktivitesi .....	69
4.3. Nitrat Redüktaz Aktivitesi .....	70
4.4. ABC Taşıyıcı Permeaz Aktivitesi .....	70
4.5. Klorür Kanal Proteini Aktivitesi .....	71
4.6. Alfa-Galaktosidaz .....	72
4.7. Peptidil-Prolil Cis-Trans İzomeraz Aktivitesi .....	72
4.8. Pantotenat Kinaz .....	73
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>74</b>
<b>EK A. İnsert Bölgelerinin Sekans Dizileri .....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>84</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. BB62b2Y genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi .....	38
Çizelge 3. 2. BB62b2Y B-1 genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi .....	38
Çizelge 3. 3. BB62b2Y B-2 genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi .....	38
Çizelge 3. 4. BB872Y I-2 genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi .....	39
Çizelge 3. 5. BB872Y I-2 genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonu sonunda borik asit içeren besiortamlarındaki üreme durumlarının takibi .....	47
Çizelge 3. 6. DH10bpDuet (kontrol) suşunun zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonu sonucu borik asit içeren besiortamlarındaki üreme durumlarının takibi .....	48
Çizelge 3. 7. pCf1 ve pCf3 insert içeren plazmidlerinin <i>NcoI-PstI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi .....	57
Çizelge 3. 8. pCf1 ve pCf3 insert içeren plazmidlerinin <i>NcoI-HindIII</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi .....	57
Çizelge 3.9. BB62b2Y insert sekanslarının NCBI-BlastX sonuçları .....	64
Çizelge 3.10. BB872Y insert sekanslarının NCBI- BlastX sonuçları .....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. <i>E. coli</i> pACYCDuet-1 plazmidini içeren DH10b suşunun bor tolerans nokta testi sonucu görüntüsü.....	24
Şekil 3. 2. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının TSB agar besiyortamına ekim sonucunun görüntüsü.....	25
Şekil 3. 3. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA'larının agaroz jel elektroforez analizi görüntüleri .....	26
Şekil 3. 4. pACYCDuet-1 plazmidinin şematik gösterimi (Novagen, Cat. No. 71147-3).....	27
Şekil 3. 5. pACYCDuet-1 plazmid izolasyonu sonucu yapılan agaroz jel elektroforez analizi sonucu görüntüsü .....	27
Şekil 3. 6. <i>Bam</i> HI restriksiyon endonükleaz enzimi kesime uğratılmış ve defosforile edilmiş pACYCDuet-1 plazmidinin agaroz jel elektroforez analiz sonucu görüntüsü.....	28
Şekil 3. 7. Saflaştırılmış pACYCDuet-1 plazmidinin agaroz jel elektroforez analiz sonucu görüntüsü.....	28
Şekil 3. 8. <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika boyunca kesime bırakılmış BB62b2Y izolatının genomik DNA jel görüntüsü.....	29
Şekil 3. 9. <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 dakika boyunca kesime bırakılmış BB872Y izolatının genomik DNA jel görüntüsü.....	29
Şekil 3. 10. <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile 30 dakika boyunca kesime bırakılmış BB62b2Y izolatının EtBr içermeyen %0,8'lik agaroz jeldeki kesim yapıldığı kısmın görüntüsü.....	30
Şekil 3. 11. Genomik DNA'nın <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile kısmi kesim jel görüntüleri .....	30
Şekil 3. 12. <i>Mbo</i> I restriksiyon enzimi ile 35 dakika boyunca kesime bırakılmış BB872Y izolatının genomik DNA'sının %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 3. 13. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA fragmentlerinin ligasyon işlemi ile plazmide klonlanması öncesi ligaz enziminin kontrol deneyi petri fotoğrafları .....	32
Şekil 3. 14. BB872Y izolatının genomik DNA fragmentlerinin ligasyon işlemi için öncesinde yapılmış olan SAP enziminin kontrol deneyi petri fotoğrafları .....	32
Şekil 3. 15. Transformasyonun verimliliğinin kontrolü .....	33

Şekil 3. 16. BB62b2Y genomik kütüphanesi ve ligasyon sonucu petri fotoğraflarından örnekler .....	33
Şekil 3. 17. BB62b2Y-2 genomik kütüphanesi ve ligasyon sonucu petri fotoğraflarından örnekler .....	34
Şekil 3. 18. BB872Y (A, I-1 ve I-2) genomik kütüphanesi ve ligasyon sonucu petri fotoğraflarından örnekler .....	34
Şekil 3. 19. BB62b2Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmidlerin insert içerip içermediklerinin kontrolünün %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 3. 20. BB872Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmidlerin insert içerip içermediklerinin kontrolünün %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 3. 21. BB62b2Y genomik kütüphanesinin çizgi ekim yöntemi ile seleksiyonundan petri fotoğraf örnekleri .....	40
Şekil 3. 22. BB62b2Y genomik kütüphanesinin çizgi ekim ile Bor seleksiyonu sonucu üreme gösteren transformant kolonilerin LB-cm 0 mM besiortamlarındaki canlandırma petri fotoğrafları.....	40
Şekil 3. 23. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonunun şematik gösterimi.....	42
Şekil 3. 24. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu sonucu elde edilen tolerant kolonilerin LB-cm katı besiortamında canlandırıldığı petri fotoğrafı .....	43
Şekil 3. 25. BB62b2Y B-2 genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonunun şematik gösterimi.....	44
Şekil 3. 26. BB62b2Y izolatı genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile bor seleksiyonundan elde edilen kolonilerin ve kontrolün (DH10bpDuet) petri fotoğrafları .....	45
Şekil 3. 27. BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonu sonunda çizgi ekim sonucu katı besiortamlarında üreme gösteren kolonilerin petri fotoğrafları.....	49
Şekil 3. 28. BB62b2Y genomik kütüphanesinin direkt ekim seleksiyon yöntemi ile elde edilen tolerant kolonilerinin DH10bpDuet kontrolü ile birlikte bor tolerans nokta testi petri fotoğrafları .....	51
Şekil 3. 29. BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonuyla belirlenen tolerant kolonileri DH10bpDuet kontrolü ile birlikte 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonuçlarının petri fotoğrafları.....	53
Şekil 3. 30. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonundan elde edilen tolerant kolonilerden DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	55

Şekil 3. 31. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonundan elde edilen tolerant Cfl, Cf3 ve Cf7 klonlarının insert büyüklüklerinin tespiti için T7 promotor ve T7 terminatör primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın %0,8'lik agaroz jel görüntüsü .....	55
Şekil 3. 32. pCfl, pCf3 ve pCf7 plazmid izolasyonunun %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 3. 33. pCfl ve pCf3 insert içeren plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunun %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 3. 34. pCfl ve pCf3 örneklerinin Retransformasyonu sonucu petri fotoğrafları.....	58
Şekil 3. 35. pCfl ve pCf3 örneklerinin 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonucu elde edilen petri fotoğrafları .....	59
Şekil 3. 36. pCfl ve pCf3 plazmidlerinin kalıp olarak kullanılarak DuetUp-DuetDOWN ve T7 Promotor-T7 terminatör primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü .....	59
Şekil 3. 37. pCfl ve pCf3 plazmidlerinin <i>NcoI</i> restriksiyon endonükleaz ile kesiminin %0,8'lik agaroz jel görüntüsü .....	60
Şekil 3. 38. pCfl ve pCf3 plazmidlerinin <i>HindIII</i> restriksiyon endonükleaz ile kesiminin %0,8'lik agaroz jel görüntüsü .....	60
Şekil 3. 39. BB62b2Y B-1 ve B-2 genomik kütüphanesinin 6, 19, 21, 22, 28, 46, 106 ve 107 numaralı tolerant örneklerinden DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	61
Şekil 3. 40. BB62b2Y zenginleştirme ile seleksiyonu sonucu elde edilen tolerant kolonilerden DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.....	61
Şekil 3. 41. BB872Y I-2 genomik kütüphanesinin 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonucu 120 mM borik asite direnç gösteren örneklerin DuetUP-DuetDOWN primerleri ile koloni PCR ürünlerinin %0,8'lik agaroz jeldeki görüntüsü .....	62
Şekil 3. 42. Sekans kromatogram sonuçlarından pCfl insert sekansının bir kısmı .	63
Şekil 4.1. BB62b2Y genomik kütüphanesinden elde edilen p106 ve p107 rekombinant plazmidlerinin insert sekanslarının haritaları.....	67
Şekil 4.2. BB872Y genomik kütüphanesinden elde edilen pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c ve pSKB3d rekombinant plazmidlerinin insert sekanslarının haritaları .....	67

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

cm	Kloromfenikol
DNA	DeoksiriboNükleik Asit
EtBr	Etidyum bromür
gr	Gram
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Borik asit
HK	Histidin Kinaz
LB	Luria Bertani
Lt	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
OD	Optikal Densite
PBS	Fosfat Buffer Saline
PGPR	Bitki gelişimini destekleyen rizobakteri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ppm	Parts per million (Milyonda bir- mikro)
RNA	RiboNükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris-Edta
Tris	Tris-hidroksimetil-aminometan
TSB	Triptik Soy Broth
TSBA	Triptik Soy Broth Agar
UV	Ultraviyole

# 1. GİRİŞ

Bor, tabiatta serbest halde az oranda bulunmasına rağmen birçok sektörde kullanılmakta ve önemi her geçen gün artmaktadır. Bor elementi ülkemiz için çok önemli bir ekonomik değere sahiptir. Dünyada bulunan bor rezervlerinin % 73'üne ülkemizin sahip olması, yapılacak olan çalışmalar açısından bu değeri daha da önemli kılmaktadır. Maden ve Kimya sektörü başta olmak üzere biyolojik önemi açısından yapılan çalışmalar dahil birçok alanda kullanılmaktadır. Biyolojik önemi ele alındığında yapılan çalışmalar az, fakat elde edilen bulgular Bor elementinin önemini ortaya koymaktadır. Moleküler biyoloji yaklaşımları ve bunun yanında model organizma olarak bakteriler kullanıldığında, Bor'un biyolojik öneminin anlaşılabilmesi açısından bir bakış açısı oluşturur. Bu yüzden birçok açıdan irdelenmesi ve araştırılması gereken bir yarı metaldir (Çöl, 2011).

Borik asit, en fazla rastlanan Bor bileşiklerindedir (Çöl, 2011). Borik asit üretimi açısından ülkemizde Bandırma'da tesis kurulmuştur (TMMOB, 2016).

Bakteriler, yaşamlarını ekstrem bor koşullarında da sürdürebilmektedir. Bu koşullardaki mikroorganizmaların tespiti ve direnç mekanizmalarının anlaşılabilmesi, bilim dünyasında giderek önem kazanmaktadır. Yüksek bor içeren bu ortamlarda bakterilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri için farklı gen kaynaklarına ve tolerans mekanizmalarına sahip olmaları gerektiği düşünülmektedir. Bu bilgiyi kullanarak tolerans genler ile transgenik bitkiler oluşturulduğunda bor seviyesi yüksek ortamlarda tarım ilerleyebilecek ve borun biyolojik önemi daha da merak uyandıracaktır (Çöl, 2011).

Bu tez çalışmasında model organizma olarak kullanılacak olan *Curtobacterium* cinsine ait bazı izolatlar; gram pozitif, mezofilik, zorunlu aerobik, hareketli, katalaz pozitif ve spor oluşturan bir bakteri grubunda yer almaktadır. *Curtobacterium* cinsinin, fasulye türlerinde bakteriyel solgunluk hastalığına sebep olduğu bilinmektedir (George vd., 1998).

Curtobacterium cinsine ait bakteri izolatlarının seçilmesinin nedeni bu izolatların borlu ortamda üreyebilmeleri ve aynı zamanda da soya fasulyesini enfekte ediyor olmasıdır.

Çalışmada, 16S rRNA gen dizisine göre %99 oranında *Curtobacterium flaccumfaciens* türüne benzerlik gösteren izolatlar kullanılmıştır. Laboratuvarımızda bulunan BB62b2Y ve BB82a2Y izolatları 200 mM, BB82b2Y, BB852Y, BB872Y ve BB87ü izolatları ise 150 mM Borik asit içeren triptik soy broth besiyortamında yaşayabilmektedir. *Escherichia coli*'ye, Curtobacterium izolatlarından elde edilen, bor tolerans geni olduğu düşünülen gen gönderilerek genomik kütüphane oluşturulmuştur. Genomik kütüphane kolonileri, bor seleksiyonuna tabii tutulmuştur. Ardından yüksek tolerans gösteren kolonilerin plazmid insertleri sekanslanarak genler belirlenmiştir. Bu çalışma, elde edilen gen dizilerinin kodladığı proteinler biyoinformatik veri tabanlarında araştırılarak, ne tür metabolik döngülerde yer aldıkları ve bu döngülerin bor ile ilişkisinin olup olmadığının ortaya konması amacıyla yürütülmüştür.

### **1.1. Kaynak Özetleri**

Dünyadaki önemli bor yatakları Türkiye, Rusya ve ABD'dedir (Bor Sektör Raporu, 2014). Dünya ticari bor rezervleri; ABD Kaliforniya Eyaletindeki "Mojave Çölü", Güney Amerika'da yer alan "And Kemerı", Türkiye'nin de yer aldığı "Güney-Orta Asya Orojenik Kemerı" ve Doğu Rusya olmak üzere 4 bölgede toplanmıştır (Bor Sektör Raporu, 2014). Türkiye, dünya bor rezervlerinin %73'üne sahiptir. Türkiye'deki bor yatakları Bigadiç/Balıkesir, Kestelek/Bursa, Kırka/Eskişehir ve Emet/Kütahya'da bulunmaktadır (Bor Sektör Raporu, 2014).

Bor yatakları yönünden ABD %6, Rusya %8'lik paya sahip iken, Türkiye %73'lük pay ile ilk sırada yer almıştır (Bor Sektör Raporu, 2014). Dünyada bor rezerv miktarı her sene değişebilmektedir. 2013 yılında bilinen bor rezervi 1,3 milyar tondur. Bor'un kullanım alanı genellikle kimyasal açıdan olduğu gibi, doğrudan da kullanılabilir.

Bor ürünleri; tarım, cam sanayi, kimya ve deterjan sektörü, seramik, elektronik ve iletişim sektörü, uzay ve hava araçları, nükleer uygulamalar, askeri araçlar, yakıtlar ve polimerik malzemeler, nanoteknolojik çalışmalar ve ürünleri, otomotiv ve enerji sektörü, metalurji ve inşaat gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Bor Sektör Raporu, 2014).

Doğada bulunan bor, oksijen içeren boratlar ve borik asit gibi bileşikler halinde olup, canlılar için önemi büyüktür. Fakat bor bileşiklerinin yüksek konsantrasyonları bazı bakteri, böcek ve mantarlar için toksik özellik taşır. Bu yüzden bu bileşikler bakterilere karşı antiseptik olarak da kullanılmaktadır (Kartal vd., 2004).

Bor kaynağının yerine ikamesi olmayan birçok sektör vardır. Bunlardan bazıları; uzay teknolojisi, enerji sektörü, nükleer teknoloji ve savunma sanayileridir (Yenialaca, 2009).

### **1.1.1. Kimyasal ve biyokimyasal açıdan bor**

Bor, periyodik sistemde üçüncü grubun başında yer alır. B simgesi ile gösterilen borun atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81'dir. Bor, metal ile ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Doğada boraks, koleminat, boronatrokalsit ve borik asit şeklinde bulunur (Eren, 2004).

B10 ve B11 adlı iki ayrı kararlı izotoptan oluşmaktadır. B10 izotopu termal nötron tutma özelliğinde olup, bu özellik sayesinde nükleer enerji santrallerinde ve nükleer malzemelerde kullanılabilir. Doğada B10 izotopunun %19,1–20,3 ve B11 izotopunun %79,7–80,9 oranında bulunduğu tespit edilmiştir (Doğan, 2012).

Bor ilk defa 1808 yılında Gay-Lussac, Jacques Thenard ve Sir Humphry tarafından Bor Oksit'in Potasyum ile ısıtılması sonucu elde edilmiştir (TMMOB, 2003).

Yeryüzünde bor; toprakta genel olarak ortalama 10-20 ppm, deniz suyunda 0,5-9,6 ppm, tatlı sularda ise 0,001-1,5 ppm aralığında olup, 51. yaygın element olarak kabul edilmiştir (Çalık, 2016).

Borik asit;  $H_3BO_3$  olarak gösterilir. Beyaz renkte, parlak, altıgen olarak kristalleşen ve suda eriyen bir zayıf asittir. Endüstride en çok kullanılan bor ürünlerinden

birisidir. Boraks'tan, kernitten, kolemanitten, üleksitten ve borasitten çeşitli yöntemler ile elde edilmektedir (TMMOB, 2016).

Boraks ve borik asit antiseptik özelliklerinden dolayı tıp ve eczacılıkta geniş kullanım alanlarına sahiptir. Bir ametal olan bor, tek başına değil, ancak çeşitli metaller ile birlikte sertlik yönünden uygun alaşım ürünlerinin üretilmesinde kullanılmaktadır (Bor Raporu, 2015).

### **1.1.2. Bor ve bitkiler**

Bor bitkilerde; hücre bölünmesi, azot metabolizması, protein formasyonu, tozlaşma ve tohum oluşumu açısından önemlidir. Bütün bu sayılan hayati fonksiyonlar bitkinin büyümesi, gelişmesi, ürün vermesi ve çekirdek oluşmasında etkilidir. Bor, bitki gelişimi için toprakta bulunması gereken bir elementtir (Bor Sektör Raporu, 2015) ve birçok bitkinin mikro besin kaynağıdır (Demirtaş, 2005).

Bundan 94 yıl öncesinde Warrington (1923), bakladaki besin yetersizliğinin kültür ortamında bor elementi ile çözülebildiğini kanıtlamıştır. Bu bilgi bize bor elementinin gerekli bir bitki besin kaynağı olduğu sonucuna ulaştırmıştır.

Bitkiler topraklarda var olan mineraller ile beslenme ihtiyaçlarını karşılayabilmektedirler. Yüksek bitkilerin gelişimi için gerekli olan 16 temel elementten biri olarak bor elementi literatüre geçmiştir. Bu yönüyle bor, bitki fizyolojisi ve gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Doğan, 2012).

Bor, hücre membranlarının yapısal bütünlüğü ve fizyolojik fonksiyonları üzerinde belirleyici rollere sahiptir. Bor noksanlığında, hücre membranlarının stabilitesi bozulmakta ve çok geçirgen bir özellik kazanmaktadır. Bitkilerin bor beslenme durumunun belirlenmesinde genç yapraklarının analizi önem taşır ve bor gereksinimi yüksek olan bitkilerin beslenmesi yeterli olduğunda yaprakların genellikle 25 ile 75 mg/kg arasında bor içerdiği belirtilmektedir (BOREN, 2014).

Bor, oksijen ile bağ yapmaya yatkın olduğu için birçok bor oksijen bileşimleri bulunmaktadır (Doğan, 2012). Aşırı bor, toprakta ve artık sularda bulunur. Bu da canlıların büyümüş gelişmesini engelleyebilir. Aynı zamanda ürünlerin kalitesini ve miktarını azaltır (Çöl, 2011).

### **1.1.3. Bor ve insan sağlığı**

Borlu bileşikler insan sağlığı alanındaki çalışmalarda önemli bir araştırma kaynağıdır. Sağlık sektöründe bor, antiseptik ürünlerde, kemik erimesinde yardımcı, destekleyici olarak kullanılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalara bakıldığında borlu bileşiklerin; antimikrobiyal ürünlerin geliştirilmesinde, kalp krizinde iskemik hasarın azaltılmasında, ağır metal toksitesine karşı, obezite, prostat kanseri tedavisinde, Bor Nötron Yakalama Tedavisinde (BNCT), yara iyileştirme, dermatoloji uygulamalarında, organ preservasyonu vb. alanlarda etkili olduğuna ilişkin bulgular elde edilmiştir. Bor ile ilgili yapılan araştırmalar, hem tedavi edici olarak hem de sağlık sektörüne yönelik malzemelerin geliştirilmesi açısından önemli bir fırsat oluşturmuştur (BOREN, 2017).

### **1.1.4. Bor ve bakteriler**

Ekstremofil olarak adlandırılan; tuz, pH, basınç, sıcaklık ve radyasyonun yüksek olduğu ortamlarda yaşayabilen mikroorganizmalar, birçok ilginç biyolojik özelliklere sahiptir. Aşırı bor ortamında yaşayabilen bakteriler de ekstremofil mikroorganizmalara dahil edilmektedir (Çöl, 2011).

### **1.1.5. *Curtobacterium flaccumfaceins*'in genel özellikleri**

Microbacteriaceae familyasına ait *Curtobacterium* cinsinin üyeleri; peynir tenekelerinden, halı fibrillerinden, topraktan ve birçok bitkiden izole edilebilir (Didienne vd., 2012). *Curtobacterium* ile ilgili bazı suşlar, portakal, kahve, asma ve kavaklardan iç parazit olarak izole edilmişlerdir (Bulgari vd., 2014).

*Curtobacterium flaccumfaceins*; zorunlu aerobik, hareketli, çubuk şeklinde gram pozitif, katalaz pozitif, spor oluşturan bakteri türüdür (Collins vd., 1983). Bu bakteri, koloni büyüklüğü 2-4 mm arasında, mezofilik, polar yada 1 ile 3 lateral flagellaya sahip, Triptik Soy Broth (TSB) agar besiyortamında üreyebilen, koloniler sarı renkte, halkasal, yassı ya da hafif konveks, yarı-opak mikrobiyolojik özelliklerdedir (EPPO, 1990).

Uluslararası ticarete, hastalık bulaşmış fasulye (*Phaseolus*) ve soya fasulyesi tohumları üzerinde hastalık etmeninin taşınması muhtemeldir (Chen vd., 2007). Bu bakterinin bazı suşları da insandan izole edilmiştir, *Curtobacterium flaccumfaciens* suşunun insanları enfekte ettiği de bilinmektedir (Funke vd., 2005).

#### **1.1.6. Bakteriyel solgunluk hastalığı**

*Curtobacterium flaccumfaciens*'in sebep olduğu soya fasulye bakteriyel solgunluğu, ilk kez 1922'de Güney Dakota'da bildirilmiştir. Buradaki yüksek ovalarda yetiştirilen kuru fasulyelerin, bakteriyel solgunluk hastalığından dolayı üretimi ciddi bir problem haline gelmiştir (Harveson vd., 2011). Fabaceae familyasının üyeleri için *Curtobacterium flaccumfaciens* bitki patojeni olarak bilinir (George vd., 1998). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (bitki gelişimini destekleyen rizobakteri) karışımları birçok salatalık patojenlerinin biyolojik kontrolünü artırır. Bu konuda yapılan çalışmalar mevcuttur. Elde edilen bulgulara göre *Curtobacterium flaccumfaciens* PGPR arasında yer almıştır. Sentetik elisitör Aktigard uygulamasının olumlu sonuçları gözlenmiştir. Doğal yolla enfeksiyonu *Vigna* spp., *Glycine max* (L) ve *Pisum sativum* L.'da da görülmektedir. Hastalık semptomları, fide yapraklarında derece derece solgunluk olarak tanımlanmıştır. İlk önce yaprak kenarlarından başlayıp ve içeriye uzanan yaygın düzensiz sarı bölgelerin ortaya çıkması ve sonraki aşama bunu parankimatik dokularda nekrozun izlemesidir. Bakteriyel solgunluk, stres altındaki bitkilerde daha fazla ortaya çıkabilmekte ve çok erken dönemde ölümcül olabilmektedir. Semptomlar gelişmiş bitkilerde hastalığın daha yavaş ilerlemesiyle daha az belirgindir ve bakteri canlı vasküler dokularda da kolonize olabilmektedir. Bulaşık tohumlar renksiz, sarı-yeşil, turuncu ve mor olabilir ama daha çok göze çarpmayan semptomlar görülebilmektedir. *Curtobacterium flaccumfaciens* toprakta ve/veya tohum içerisinde 2 yıl hayatta kalabilme ya da tohumlar uygun koşullarda saklandığında bu süre daha uzun olabilmektedir (George vd., 1998).

*Curtobacterium flaccumfaciens* türünün bir suşu da UCD-AKU'dur. Bu suş, halıdan izole edilmiştir. Halı fibrilleri LB besiyerine yerleştirilmiş ve 37°C de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Buradan alınan koloniler dilüsyonlardan geçirilmiştir. Taze besiyerinde büyütülen kültürden genomik DNA izole edilmiştir.

Bu izolatlar 16S rRNA sekansına göre 1391R ve 27F primerleri kullanılarak PCR yapılmış ve tür tanımlanmıştır. TruSeq DNA Sample Prep v2 kit (Illumina) ve Nextera DNA Sample Prep kit (Illumina) kullanılarak *Curtobacterium flaccumfaciens* türünün kütüphaneleri oluşturulmuş ve 250 bp okuma uzunluğu ile sekanslanmıştır (Flanagan vd., 2013).



## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Balikesir-Bigadiç Bor madenlerinden izole edilen (laboratuvarımızda daha önce çalışıldığından stokları bulunan izolatlar), 16S rRNA sekans analizlerine göre %99 *Curtobacterium flaccumfaciens*'e benzerlik gösteren bu izolatlar gliserol stokları olarak -80°C'de saklanmıştır. *Curtobacterium flaccumfaciens* türüne ait BB62b2Y, BB82a2Y, BB82b2Y, BB852Y, BB872Y ve BB87ü izolatlarının genomik DNA'sı elde edilmiştir. Genomik DNA izolasyonu, fenol-kloroform metodu (Sambrook, 2006) ile gerçekleştirilmiştir. Her bir izolat için genomik kütüphane çalışması denenmiş, *Curtobacterium flaccumfaciens* türü olan BB62b2Y ve BB872Y izolatlarından elde edilen sonuçlar daha verimli olduğu için, bu izolatlar ile çalışılmaya karar verilmiştir.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA elde edilmesi için, gliserol stoklardan alınan bakteri örneklerinin TSB agar besiortamına tek koloni ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan izolatların besi yerlerindeki kontaminasyon durumlarını kontrol etmek ve koloni morfolojilerini incelemek amacıyla faz kontrast mikroskopunda incelemeleri yapılmıştır. Kontrolleri yapılan ve saf olduklarından emin olunan kolonilerden bir tanesine öze ile dokunularak TSB agar besiortamına yayma ekimi yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için yayma ekimi yapılan izolatlar öze ile alınarak 500 µl steril Fosfat Buffer Saline (PBS) içerisinde çözülmüş, vorteks yapılmış ve 13.300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet alınmıştır.

DNA elde edilebilmesi için saf kolonilerden pellet alınması çok büyük öneme sahiptir. Optimize etmek amacıyla ve ligasyon aşamalarının tekrarlanan çalışmaları olmasından dolayı, elde edilecek olan genomik DNA'ların saflıkları ve konsantrasyon değerleri ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) önemlidir. Bu yüzden bol miktarda DNA izolasyonu (fenol-kloroform yöntemi veya kit ile) gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Alınan pelletten genomik DNA izolasyonu, klasik fenol-kloroform metodunun (Sambrook vd., 2006) optimizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Uygulama aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

Hücre pelletlerine 567  $\mu\text{l}$  Tris EDTA (pH 8) eklenerek pipetaj yapılmış ve pelletler çözülmüştür. 10 mg/ml hazırlanan lizozim çözeltisinden 142  $\mu\text{l}$  eklenmiştir. Tüpler alt üst edilerek ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 65  $\mu\text{l}$  %10'luk SDS çözeltisi ve 3  $\mu\text{l}$  20 mg/ml Proteinaz K çözeltisi eklenerek, hafif bir şekilde vortekslenmiştir. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonra 5 M NaCl'den 200  $\mu\text{l}$  ve CTAB/NaCl'den 80  $\mu\text{l}$  eklenip vortekslenmiş, 65°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Eşit hacimde fenol-kloroform:izoamil alkolden (25:24:1) eklenerek alt üst edilmiş ve beyaz renk görülünceye kadar vortekslenmiştir. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 13500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınıp 2. kez eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ile işlem tekrarlanmıştır. Üst faz alınıp, eşit hacimde kloroform-izoamil alkol (24:1) eklenerek ters yüz edilmiş ve beyaz renk görülünceye kadar vortekslenmiştir. Soğutmalı santrifüjde +4°C'de 13500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz alınarak 600  $\mu\text{l}$  izoprapanol eklenmiştir. DNA'nın presipite ettiği (çöktüğü) gözlemlenene kadar alt üst edilmiştir. -20°C'de 40 dakika inkübe edilmiş ve ardından 13500 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant dikkatlice dökülmüştür. DNA pelletleri üzerine 80  $\mu\text{l}$  %70'lik etanol eklenerek, oda sıcaklığında 13500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, DNA yıkanmıştır. Tüpler 37°C'de 10 dakika kurutulmaya bırakılarak alkol uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 50  $\mu\text{l}$  steril distile su eklenerek 56°C'de 45 dakika inkübe edilmiştir. 10 mg/ml RNaz'dan 5  $\mu\text{l}$  eklenerek 37°C'de 45 dk inkübe edilmiş, ardından 65°C'de 20 dakika bekletilmiş ve RNA'lar uzaklaştırılmıştır. Genomik DNA izolasyonu verilerini inceleyebilmek ve yorumlayabilmek için %0,8'lik agaroz jele 3  $\mu\text{l}$  yüklenerek UV cihazında görüntüsü alınmıştır.

### 2.2.2. Vektör olarak kullanılacak olan plazmidin seçimi ve izolasyonu

Laboratuvarımızda pACYCDuet-1 plazmidinin yanı sıra pHY300PLK, pDG1737, pBK-CMV, pUC19, pK-18, pZero, pCDNA4/TO ve diğer bazı vektör sistemleri de bulunmaktadır. Ancak laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarda optimizasyonu gerçekleştirilmiş olan pACYCDuet-1 (Novagen) plazmidinin vektör olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

pACYCDuet-1 plazmidi aynı zamanda, kloromfenikol (cm) antibiyotik rezistans kaseti içermektedir. Öncelikle, pACYCDuet-1 plazmidi haritası incelenmiş, klonlama yapılması için restriksiyon enzimlerine karar verilirken haritaları göz önünde bulundurulmuştur. Genomik DNA'nın kısmi kesimi ile, klonlanacak olan plazmidin uyumlu kesim uçları dikkate alınarak MCS1 bölgesinde bulunan *Bam*HI kesim bölgesinin kullanılmasına karar verilmiştir.

### 2.2.3. pACYCDuet-1 plazmidinin izolasyonu

Plazmid izolasyonu, Qiagen Plasmid Mini Prep Kit veya Fermentas Plasmid Mini Prep Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA'sı izolasyonu için ilk olarak plazmidler, ısı şoku yöntemi kullanılarak *Escherichia coli* DH10b suşuna aktarılmıştır. Transformasyon sonrası, pACYCDuet-1 plazmidi ile transforme olmuş *E. coli* DH10b suşlarını seçebilmek için, plazmidin taşıdığı antibiyotik direnç kasedine göre direnç sağladığı antibiyotikli Luria Bertani (LB)-Agar besiyortamına ekilmiş ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler öze ile alınarak 250 µl PBS içerisinde çözülmüştür. Bu çözülmüş pACYCDuet-1 plazmidini taşıyan DH10b suşu, 13.300 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmış, pellet elde edilmiştir. Alınan pellet ile pACYCDuet-1 plazmid DNA izolasyonu, plazmid izolasyon kitlerinin protokolleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA izolasyon işleminin sonucu, %0,8'lik agaroz jele 3 µl yüklenerek gözlemlenmiştir (Ausubel vd., 2003).

#### **2.2.4. Vektör olarak kullanılacak olan pACYCDuet-1 plazmidinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi**

Vektör olarak kullanılacak olan plazmid pACYCDuet-1, *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile aşağıda belirtildiği gibi kesilmiştir.

Plazmid izolasyonu işleminden sonra; elde edilen plazmid DNA'sı 3 µg olacak şekilde gerekli miktarda (µl) (her DNA için farklı miktarda olabilir) plazmid alınarak, 2 µl *BamHI* Buffer, 1 µl *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimi ve distile su miktarlarına karar verilerek bir tüpte toplam 20 µl olacak şekilde, 3 ayrı tüpte 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 16 saat sonunda tüpler restriksiyon enziminin inaktif hale gelebilmesi için, 65°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 60 µl kesilmiş plazmid DNA'sı 15 µl 6X Dye Loading ile birleştirilerek %0,8'lik agaroz jele yüklenmiştir. UV'de görüntüsü alınarak bistüri ile plazmid DNA'sı jelden kesilmiş, darası alınan 1,5 ml'lik tüplere konulmuştur. Fermentas GeneJET Jel Extraction Kit (#K0691)'i kullanılarak jelden saflaştırma yapılmıştır. 20 µl distile su ile kesilen ve saf hale getirilen plazmid DNA'sı elüsyon edilmiştir. Plazmid DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesim işleminin sonucu, %0,8'lik agaroz jele 1 µl yüklenerek gözlemlenmiştir (Ausubel vd., 2003).

#### **2.2.5. pACYCDuet-1 plazmidinin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesiminin kontrolü**

*BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile olası kesimi yapılarak doğrusal hale getirilmiş, ardından jelden arındırılmış ve pACYCDuet-1 plazmidlerinin tamamının kesilip kesilmediği kontrol edilmiştir. Bunun için jelden arındırma aşamasından sonra elde edilen plazmidlerden 1 µl, kompetent hücre süspansiyonlarına (*E. coli* DH10b suşu) ısı şoku yöntemi ile aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında kloromfenikol (25 µg/ml) içeren LB agar besi yerlerine ekim yapılarak plazmid kesimleri kontrol edilmiştir (Ausubel vd., 2003).

### **2.2.6. Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) ile kesilen plazmid DNA'sının defosforilasyonu**

Plazmid, kesim sonucu doğrusal hale getirilmiş ve ardından defosforilasyon işlemine tabii tutulmuştur. pACYCDuet-1 (pDuet) plazmid DNA'ları optimum koşulda (ortamda ligaz eklenmesi durumunda) tekrar self-ligasyona uğramaması için 1 µl SAP enzimi ile 5'-PO<sub>4</sub> uçları alınmıştır. 3 tüpte *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi yapılan pDuet plazmidini, her tüpe 1 µl SAP enzimi ve 2 µl SAP Buffer eklenerek, 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler, alkalik fosfataz enziminin inaktive edilmesi için 65°C'de 20 dakika bekletilerek, plazmid DNA'sı defosforile edilmiştir. 3 tüp birleştirilerek toplam 60 µl örnek üzerine 15 µl 6X Dye Loading eklenerek büyük kuyucuklara yüklenmiş ve %0,8'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Agaroz jel görüntüsü alındıktan sonra jelde görülen bant kesilerek, UV'de darası alınan tüplere konulmuştur. Tüplerin ölçümleri alınarak Fermentas GeneJET Gel Extraction Kiti (#K0691) protokolüne uygun olarak optimize edilmiştir. Plazmid DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesimi ve jelden saflaştırma işleminin sonucu, %0,8'lik agaroz jele 1 µl yüklenerek gözlemlenmiştir (Ausubel vd., 2003).

### **2.2.7. Plazmid DNA'sının defosforilasyonunun kontrolü**

*Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pACYCDuet-1 plazmidinin SAP enzimi ile tamamının defosforile olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bir tüp içerisine defosforilize edilen plazmidlerden 1 µl alınmış, 1 µl T4 DNA ligaz enzimi, 1 µl T4 DNA ligaz tampon çözeltisi ve 7 µl steril distile su ile toplam 10 µl'ye tamamlanarak, 16°C'de 16 saat boyunca ligasyona bırakılmıştır. Gece boyunca 16°C'de ligasyon gerçekleştirildikten sonra ertesi gün 2 µl ligasyon karışımı, kompetent *E. coli* (DH10b suşu) hücre süspansiyonlarına ısı şoku ile transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası kloromfenikol (25 µg/ml) içeren LB agar besiyerlerine ekim yapılmıştır. Böylelikle plazmidlerin defosforilasyonu kontrol edilmiştir (Ausubel vd., 2003).

### 2.2.8. Genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kısmi kesimi

Öncelikle izole edilmiş olan tüp içerisindeki genomik DNA'nın miktarını belirlemek amacıyla spektrofotometre cihazında absorbans 260 nm'de ölçümü yapılmıştır. Genomik DNA'nın, *MboI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi planlanmış ve öncesinde konsantrasyonunun 10 µg olması gerektiği bilgisine göre büyük insert içeren genomik kütüphaneler elde etmek için genomik DNA kesimi optimize edilmeye çalışılmıştır. Öncelikle genomik DNA'nın 1500 kb–5000 kb arasında olması istenmektedir.

Bir tüp içerisinde miktarı belirlenen genomik DNA, 5 µl *MboI* (1/100 dilüsyon) restriksiyon enzimi, 3 µl *MboI* Buffer ve toplamda 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlanmış ve tüpün ağzı parafilm ile kapatılmıştır. DNA kesimi için uygun süreyi belirleyebilmek amacıyla 37°C'de 5, 10, 15, 20 ve 25 dakika aralıklar ile kesim yapılmıştır. 37°C'deki tüplerin her birinden belirlenen süreler (5, 10, 15, 20, 25 dakika) sonunda 4 µl alınarak tüplerin ağzı parafilm ile kaplanmış ve restriksiyon enziminin inaktif hale gelebilmesi için 65°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler, sırasıyla %0,8'lik agaroz jele yüklenerek, UV cihazında görüntüsü alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 25 dakika kesime karar verilmiştir. 3 ayrı tüpte aynı miktarlarda kesim yapılarak, örnekler birleştirilip 60 µl örnek ve 15 µl 6X Dye Loading %0,8'lik EtBr'süz agaroz jele yüklenmiştir. Marker, EtBr eklenerek yüklenmiş, UV'de jelden kesimi, marker göz önüne alınarak yapılmıştır. Jelden kesimi yapılan örnek Fermentas GeneJet Gel Extraction Kiti (#K0691) protokolü uygulanarak, %0,8'lik agaroz jelde 1 µl görüntü alınmıştır.

### 2.2.9. Ligasyon

*MboI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen genomik DNA ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen plazmid DNA'sı tek tüpte birleştirilerek, T4 DNA Ligaz ile ligasyona bırakılmıştır (Ausubel vd., 2003).

Genomik DNA; *MboI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrusal hale getirilerek saflaştırma yapılmıştır. Genomik DNA ve plazmid DNA'larının, Real-time PCR'da SYBR green ile konsantrasyonları ölçülmüştür.

Konsantrasyonlarına göre plazmid:insert oranı, 1:1, 1:3 ve 1:4 olarak hesaplanarak ligasyon işleminde kullanılacak miktar belirlenmiştir. Defosforile plazmid DNA'sı ve *Curtobacterium* izolatının DNA fragmentleri belirlenen miktarda alınarak, 1 µl T4 DNA Ligaz, 2 µl T4 DNA Ligaz Buffer eklenerek toplamda 20 µl'ye tamamlamak üzere distile su kullanılmıştır. 16°C'de 16 saat boyunca ligasyona bırakılmıştır. Ertesi gün 2 µl ligasyon karışımı, ısı şoku ile *E. coli* DH10b suşuna transforme edilmiştir (Sambrook, 2006). Her izolat için konsantrasyon farklı olduğundan, genomik DNA konsantrasyonu değişmekte ve buna bağlı olarak plazmid oranı da değişmiştir.

### **2.2.10. Isı şoku yöntemi ile *E. coli*'ye transformasyon ve seleksiyon**

Transformasyon için ilk olarak *E. coli* hücrelerinin kompetent hale getirilmesi gerekmektedir. Bu işlem için öncelikle DH10b suşu LB agar besiortamına tek koloni olarak ekilmiş, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün tek düşen koloni, kürdan ile dokunularak 5 ml LB sıvı besiortamında büyütülmüş, 37°C'de 150 rpm çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır. 5 ml LB'de büyüyen hücrelerin turbidimetrede yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. OD değeri 0,5 olana kadar DH10b hücreleri 37°C de 200 rpm çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır. OD 0,5 değerindeki hücrelerden 1 ml alınarak 100 ml'lik LB besiortamına aktarılmıştır. 1 saat sonra spektrofotometrede kör 1 ml LB olmak üzere ölçümü yapılmıştır. Hücreler OD 0,5 olduğunda, 50 ml olarak 2 falkon tüpüne bölünmüş ve +4°C'de soğutmalı santrifüjde 4000x-g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet ile devam edilmiştir. 2 falkon tüpündeki pelletlerin üzerine 5 ml soğuk 0,1 M MgCl<sub>2</sub> eklenerek hafif bir pipetleme yapılmış, sonrasında tek falkon tüpünde birleştirilerek 0,1 M MgCl<sub>2</sub> ile 24 ml'ye tamamlanmıştır. 30 saniye buz üzerinde bekletilerek, +4°C'de soğutmalı santrifüjde 4000x-g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet ile devam edilmiştir. Pellet üzerine 5 ml soğuk 0,1 M CaCl<sub>2</sub> eklenerek hafif pipetleme yapılmış ve 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ile 24 ml'ye tamamlanmıştır. 30 saniye buz üzerinde bekletilerek, +4°C'de soğutmalı santrifüjde 4000x-g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet ile devam edilmiştir. Pellet üzerine 4,3 ml soğuk 0,1 M CaCl<sub>2</sub> ve 700 µl %100 gliserol eklenip pipetleme yapılmıştır, böylece kompetent hücreler hazır hale gelmiştir.

1,5 ml'lik tüplere 100'er µl olacak şekilde bölünmüştür. Kompetent hücreler, -80°C'de saklanmıştır. Hazırlanan kompetent hücre süspansiyonlarına 2 µl ligasyon karışımı eklenerek, buz üzerinde 30 dakika bekletilmiş, ardından 42°C'de 1 dakika 45 saniye bırakılmıştır. 1 ml LB besiyetinde 37°C 150 rpm'de 3,5 saat çalkalamalı inkübasyondan sonra 8.000 g'de santrifüj edilerek, süpernatanttan 50 µl çekilerek pellet çözülmüş, uygun antibiyotik (örn; 25 µg/ml kloromfenikol) içeren LB agar besiyetlerine drigalski ile yayma ekim yapılmıştır (Sambrook, 2006).

### **2.2.11. Rekombinant plazmidlerin stoğa alınması, genomik kütüphane oluşturma**

Toplamda 20 µl olan ligasyon karışımından, 2 µl kompetent hücrelere eklenerek transformasyon sonrası koloniler elde edilmiştir. Geriye kalan 18 µl ligasyon karışımı 2'şer µl olmak üzere 9 kompetent hücre süspansiyonlarına ilave edilerek sonuçta binlerce koloni elde edilmiştir. Otoklavlanmış steril 50 ml'lik falkon içerisine, filtreli pipet ucu ile 1,5 ml steril PBS eklenmiştir. Elde edilen koloniler öze ile toplanarak PBS içerisinde hafif pipetleme yapılmış ardından vorteks yapılarak çözülmüştür. Örnek yoğun olduğundan, üzerine 500 µl daha PBS eklenerek tekrar vortekslenmiştir. Son gliserol konsantrasyonu yaklaşık %15-20'ye gelecek şekilde 2 ml %30'luk gliserol eklenerek, pipetleme yapılmış ve stok hazırlanmıştır. İlk olarak 4 adet 1,5 ml'lik steril plastik tüplere 60 µl, kalan stok 3 cryo tüplerine yaklaşık 1 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Plastik tüplere ayrılan genomik kütüphane stokları -80 °C'de saklanmaktadır. Stok tüplerinin üzerinde stok alanın ismi, oluşturulan genomik kütüphanenin ismi ve tarih yazılarak saklanmıştır. Diğer izolatlar için de aynı işlemler yapılarak oluşturulan genomik kütüphane stokları, bor seleksiyon işlemleri için kullanılmak üzere saklanmıştır.

### **2.2.12. Genomik kütüphanenin bor seleksiyonuna tabi tutularak bor toleransına sahip klonların bulunması**

Transformasyondan sonra elde edilen binlerce koloniden bora direnç gösterenlerin seçilebilmesi için farklı seleksiyon yöntemleri denenmiş (direkt ekim ile seleksiyon,

çizgi ekim ile seleksiyon, zenginleştirme ile seleksiyon) ve bu yöntemlerin her biri kendi içerisinde optimize olan yöntemlerdir (Çöl, 2011).

Farklı seleksiyon yöntemleri ile Bor toleransına sahip olarak belirlenen koloniler 'Bor Tolerans Nokta Testi'ne tabii tutulmuştur (Ausubel vd., 2003).

Borun farklı konsantrasyonları (50 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 140 mM) denenerek, her örnek için tolerans eşik değeri bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda bora karşı tolerans gösteren bu klonlardan rekombinant plazmidler izole edilmiştir. Rekombinant plazmidler sekanslanarak, genomik DNA fragmentleri tespit edilmiş, nükleotid dizileri belirlenmiş ve çeşitli biyoinformatik analizler ile değerlendirilmiştir.

Bor tolerans nokta testi öncesinde Bor'a dirençli kolonilerin seleksiyonu 3 farklı yöntem ile yapılmıştır. Bu teknikler, *Direkt ekim yöntemi ile seleksiyon*, *Çizgi ekim yöntemi ile seleksiyon*, *Zenginleştirme (Enrichment) ile seleksiyon* yöntemleridir. Bütün teknikler kendi içlerinde farklı optimizasyon aşamalarından geçirilmişlerdir (Çöl, 2011).

#### 2.2.12.1. *Direkt ekim yöntemi ile seleksiyon*

Elde edilen genomik kütüphane stoklarının her birinin 60 µl'si seleksiyon işlemlerinde kullanılmak üzere ayrılmış idi (bkz 2.11). Bu stok eritilerek, üzerine 500 µl PBS eklenmiştir. Hafif pipetleme ve vorteksleme yapılarak homojen hale getirilmiştir. 100 µl genomik kütüphane stoğunun üzerine 900 µl PBS eklenerek toplamda 1 ml'e tamamlanmış ve kontrol (blank) 1 ml PBS olacak şekilde spektrofotometre cihazında absorbans 600 nm'de ölçümü yapılmıştır. Ölçümü yapılan genomik kütüphane stoğu 1/10 dilüsyon göz önüne alınarak 2,88 bulunmuştur. Başlangıç için istenilen OD 0,5 olmalıdır. Bu yüzden 500 µl'sinde OD 0,5 olabilmesi için genomik kütüphane stoğu 86,80 µl olmalıdır. 500 ul PBS içerisinden 86,80 µl alınıp atılmış, yerine 86,80 µl genomik kütüphane stoğu eklenerek tekrar 500 µl'ye tamamlanmıştır. Farklı bor konsantrasyonlarında (0 mM, 100 mM, 110 mM ve 120 mM borik asit), kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren LB agar besiyerlerine bu stoktan 50 µl olacak şekilde drigalski ile yayma ekim yapılmıştır.

37°C’de inkübasyona bırakılarak, günlük koloni takibi yapılmıştır. İnsert içermeyen DH10b pDuet (*E. coli*) kontrol olarak kullanılmış ve aynı işlemlerden geçirilmiştir (Çöl, 2011).

İnkübasyon sonunda insert içermeyen DH10b-pDuet suşunun üreme göstermediği Bor konsantrasyonu seviyesinde üreme gösteren koloniler seçilmiştir. Seçilen bu koloniler ‘Bor Tolerans Nokta Testi’ne tabii tutularak, Bor tolerans seviyeleri belirlenmiştir.

#### 2.2.12.2. Çizgi ekim yöntemi ile seleksiyon

Bu yöntem, kolonilerin tek başına değerlendirilerek bor tolerans eşik değerlerini bulmaya yöneliktir. Bek alevi yanında çalışılarak, seçilen bir koloniye steril kürdan ile dokunulup, farklı bor konsantrasyonlarında (0 mM, 50 mM, 80 mM, 100 mM, 110 mM ve 120 mM borik asit) kloromfenikol (25µg/ml) antibiyotiği içeren LB agar besiyortamlarına çizgi ekim yapılmıştır. Bakteriler 3 gün boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnsert içermeyen DH10b-pDuet (*E. coli* suşu) kontrol olarak kullanılmış ve aynı işlemlerden geçirilmiştir. İnkübasyon sonunda insert içermeyen DH10b-pDuet suşunun üreme göstermediği bor konsantrasyonu seviyesinde üreme gösteren koloniler seçilmiştir. Seçilen bu koloniler ‘Bor Tolerans Nokta Testi’ne tabii tutularak, tolerans seviyeleri belirlenmiştir.

#### 2.2.12.3. Zenginleştirme (Enrichment) yöntemi ile seleksiyon

Seleksiyon için ayrılan genomik kütüphane stoğundan 30 µl alınıp, kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren bor içermeyen (20 ml) LB besiyortamına ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan örnek, gece boyunca 150 rpm’de 37°C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün OD 0,2 olacak şekilde 100 mM ve 110 mM borik asit konsantrasyonlu, kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren (20 ml) LB besiyortamına ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan örnekler, 16 saat boyunca 150 rpm’de 37°C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, 1 ml alınıp 100 mM ve 110 mM borik asit konsantrasyonlu, kloromfenikol (25µg/ml) antibiyotiği içeren 20 ml LB besiyortamına ekimi yapılmıştır.

Ekimi yapılan örnekler, 16 saat boyunca 150 rpm'de 37°C'de çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır. 5 gün boyunca bu işlemler tekrar edilmiştir. Her gün 1 ml çekilerek, "blank" 1 ml LB olacak şekilde spektrofotometrede OD ölçümleri yapılmıştır. 5. günün sonunda erlenlerdeki 20 ml örnek, otoklavlanmış steril 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılmıştır.

Falkon tüplerindeki örnekler +4°C'deki soğutmalı santrifüj kullanılarak 4000x-g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Ekimi yapılacak petri sayısı kadar, petri başına 50'şer µl olacak şekilde süpernatant alınmış, kalanı dikkatli şekilde atılarak pellet çözülmüş ve 50 µl çekilip 0 mM, 100 mM, 110 mM ve 120 mM borik asit ve kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren LB agar besiortamlarına ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan örnekler 37°C'de inkübasyona bırakılmış ve 7 gün boyunca her gün üreme takibi yapılmıştır. Ayrıca kontrol olarak insert içermeyen DH10b-pDuet (*E. coli* suşu) kullanılmış ve aynı işlemlerden geçirilmiştir. İnkübasyon sonunda insert içermeyen DH10b-pDuet'in üreme göstermediği bor konsantrasyonu seviyesinde üreme gösteren koloniler seçilerek, 'Bor Tolerans Nokta Testi'ne tabii tutulmuş ve bor tolerans seviyeleri belirlenmiştir.

### **2.2.13. Bor tolerans nokta testi**

Üç seleksiyon yöntemi ile seçilen kolonilerin, Bor tolerans eşik değerlerinin belirlenmesi için bor nokta tolerans testi yapılmıştır. Bu üç seleksiyonlardan zenginleştirme ile seleksiyon sonucunda, yüksek borik asit konsantrasyonlarında üreme gösteren koloniler, kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren LB agar besiortamına ekimi yapılmış ve 16 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, koloniler öze ile alınarak, 500 µl steril PBS içerisinde çözülmüş, hafif pipetleme ve vorteksleme yapılmıştır. OD 0,5 olacak şekilde spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Her bir tolerant örnek için ayrı ayrı olmak üzere, 500 µl PBS içerisinden hesaplanan miktarda PBS atılmış, yerine atılan miktarda örnekten eklenerek tekrar 500 µl'ye tamamlanmış ve tüp 1/1 olarak isimlendirilmiştir. Hafif pipetleme ve vorteks yapılmıştır. İçerisinde 250 µl steril PBS bulunan 1,5 ml'lik 4 ayrı tüp sırasıyla 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 olarak isimlendirilmiştir.

1/1 tüpündeki 500 µl içerisinde 250 µl alınıp, 1/2 tüpüne aktarılmış pipetleme yapılarak buradan da 250 µl 1/4 tüpüne aktarılmış ve bu şekilde 1/16 tüpüne kadar gidilerek en son alınan 250 µl dışarıya atılmıştır. Bu işlemlerden geçirilen örnek, farklı bor konsantrasyonlarında (0 mM, 100 mM, 110 mM ve 120 mM borik asit), kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren LB agar besiyortamlarına 5 µl olacak şekilde ekimi yapılmıştır. 3 gün boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılarak gün boyunca üreme takibi yapılmıştır. Kontrol için insert içermeyen DH10b pDuet (*E. coli* suşu) kullanılmış ve aynı işlemlerden geçirilmiştir.

İnkübasyon sonunda insert içermeyen DH10b-pDuet’in üreme göstermediği bor konsantrasyonu seviyesinde üreme gösteren koloniler seçilerek stoklamaya gidilmiştir (Ausubel vd., 2003).

#### **2.2.14. Tolerant klonlardan stok oluşturulması**

‘Bor Tolerans Nokta Testi’nde yüksek bor konsantrasyonlarında üreme gösteren klonlar stoğa alınmıştır. Bu klonların kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren bor içermeyen LB agar besiyortamına öze ile ekimi yapılmış ve 37°C’de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu örnekler, öze ile alınarak 500 µl PBS içerisinde pipetlenmiş ve hafif vorteks yapılarak çözülmüştür. Üzerine %30’luk gliserol eklenerek, son gliserol konsantrasyonu yaklaşık %15-20’ye gelecek şekilde her bir klonun stokları oluşturulmuştur (Ausubel vd., 2003).

#### **2.2.15. Rekombinant plazmid izolasyonu**

Tolerant olarak belirlenmiş olan stok klonların, kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren bor içermeyen LB agar besiyortamına öze ile tek koloni ekimi yapılmış, 16 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün tek düşen koloni, kloromfenikol (25 µg/ml) antibiyotiği içeren bor içermeyen LB agar besiyortamına yayma ekilmiş ve 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi günü üreme gösteren koloniler öze ile toplanarak, 500 µl PBS içerisinde pipetlenmiş ve hafif vorteks yapılarak çözülmüştür. Ardından 13300 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmış, pellet ile izolasyona devam edilmiştir.

Rekombinant plazmid izolasyonu Biomiga Plasmid Miniprep Kit (PD1211-01, PD1211-02) protokolü izlenerek gerçekleştirilmiştir. % 0,8'lik agaroz jele 3 µl örnek yüklenerek, UV cihazında görüntüsü alınmıştır.

#### **2.2.16. Rekombinant plazmidlerin insert varlığının ve büyüklüklerinin kontrolü**

Rekombinant plazmidlerin içerdiği insertlerin varlığı ve büyüklükleri; *PCR yöntemi* ve *restriksiyon endonükleaz enzimleri* ile kesimi sonucu belirlenmiştir (Çöl, 2011).

#### **2.2.17. Rekombinant plazmidlerin ve büyüklüklerinin insert varlığının PCR yöntemi ile kontrolü**

Klonlardan izole edilen rekombinant plazmidlerin içerdiği insertlerin varlığı ve büyüklükleri *Klasik PCR Yöntemi* ve *Koloni PCR Yöntemi* kullanılarak tespit edilmiştir.

Klasik PCR yönteminde, klonlardan izole edilen rekombinant plazmidler, PCR için kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

Koloni PCR yönteminde ise bir koloniye öze ile dokunularak 50 µl distile su içerisinde çözülmüş ve 15 dakika kaynar suda bekletilerek hücreler patlatılmıştır. Ardından hafif vorteks yapılarak 13300 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Pellete dokunulmadan alınan 5 µl süpernatant, kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Primer olarak; ACYCDuet-UP (5'-GGATCTCGACGCTCTCCCT-3') ve ACYCDuet-DOWN (5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3') primer çifti ile T7 promotor (5'-TAATACGACTCACTATA-3') ve T7 terminatör (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') primer çiftleri denenmiştir. Primer çiftleri, plazmid içerisindeki insertün bulunduğu kesim bölgelerini çoğaltacak şekilde seçilmiştir.

Koloni PCR yönteminde patlatılan hücrelerin süpernatantından alınan 5 µl kalıp DNA kullanılmış ve çalışılacak örnek sayısı kadar PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

PCR reaksiyonunun karışımı (mix) bir örnek için 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisinde; 5 µl 10X Taq buffer, 4 µl MgCl<sub>2</sub> (10 mM), 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl reverse primeri (T7 terminatör veya ACYCDuetUP (10 pmol), 1 µl forward primeri (T7 promotor veya ACYCDuetDOWN) (10 pmol), 0,5 µl Taq DNA polimeraz karışımına ddH<sub>2</sub>O eklenerek 45 µl'ye tamamlanmıştır, bu karışım buz üzerinde hazırlanmıştır. Koloni PCR'da patlatılan hücrelerin süpernatantından 5 µl PCR tüplerine konulmuş, hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 45 µl ile toplamda 50 µl'ye tamamlanmıştır (Sezer, 2013).

Çoğaltma işlemi Eppendorf marka PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Eppendorf PCR cihazında daha önce laboratuvarımızda optimize edilmiş program kullanılmıştır. Bu programda reaksiyon dereceleri ve süreleri; ilk denatürasyon basamağı 95°C'de 10 dakika, bunu takiben 35 döngü olacak şekilde 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 54°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama şeklinde, son olarak bir kez 72°C'de 10 dakika uzama basamağıyla, 4°C'de bekletilecek şekilde belirlenmiştir. Hazırlanan örnekler, PCR termal cycler cihazına ('Eppendorf Netheler-Hinz GmbH 22331-Hamburg') koyularak hazırlanan programda çalıştırılmıştır (Sezer, 2013).

#### **2.2.18. Rekombinant plazmidlerin restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi sonucu insert varlığının kontrolü**

Rekombinant plazmidlerinin insert varlığı ve büyüklükleri, pACYC-Duet1 plazmidinin MCS bölgesinde yer alan *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesimi ile kontrol edilmiştir. Klonlardan elde edilen rekombinant plazmidlerden 10 µl alınarak, 1 µl *NcoI* restriksiyon enzimi, 1 µl *HindIII* restriksiyon enzimi, 2 µl 10X restriksiyon endonükleaz enzim bufferı ve 6 µl steril ddH<sub>2</sub>O eklenerek tüp içerisinde birleştirilmiştir. Toplam 20 µl'lik reaksiyon çözeltisi 37°C'de 16 saat boyunca kesime bırakılmıştır.

Ertesi gün reaksiyon çözeltisi, restriksiyon endonükleaz enzimlerinin inaktif hale gelmesi için 65°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon çözeltisinin tamamı %0,8'lik agaroz jele yüklenerek kesilmiş olan plazmidlerin içerdikleri insert DNA'ları görülmüş ve değerlendirilmiştir.

İnsert varlığının görülmesi durumunda örneklerin UV ile gözlemlenerek, jelden kesimi yapılmış ve darası alınan tüplere konulmuştur. Tüplerin ölçümleri dikkate alınarak, örnekler Fermentas GeneJET Gel Extraction Kiti (#K0691) protokolüne uygun elde edilmiştir. Rekombinant plazmidinin MCS bölgesinde yer alan *NcoI* ve *HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesimi ve jelden arındırılması işleminin sonucu %0,8'lik agaroz jele 1 µl yüklenerek gözlemlenmiştir.

### **2.2.19. Rekombinant plazmidlerin insert sekanslarının belirlenmesi ve biyoinformatik analizler**

Bakteriye bora tolerans fenotipini kazandıran gen bölgelerinin biyoinformatik analizi sonucunda elde edilen aktivitelerin değerlendirilmesi için tolerant kolonilerde yer alan rekombinant plazmidlerin insert bölgelerinden elde edilen PCR ürünleri, ACYCDuetUP ve ACYCDuetDOWN primer çiftleri ile sekanslamaya gönderilmiştir. Hizmet alımı ile DNA dizileri belirlenmiştir (Macrogen, Hollanda). Genomik kütüphanenin yüksek bor konsantrasyonu içeren klonlarının seleksiyonu sonucunda elde edilen rekombinant plazmidlerin taşıdıkları gen dizileri, insertlerdeki klonlanan genlerin açığa kavuşturulması için BlastN, BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) programları kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR VE İRDELEME

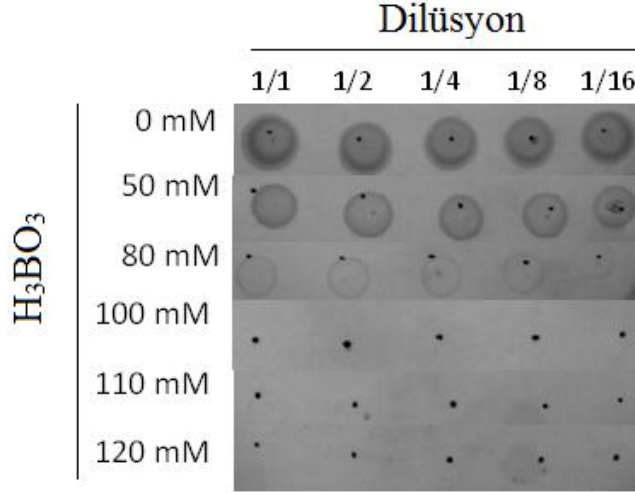
Bu tez çalışmasında Çöl (2011) tarafından daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan ve Balıkesir-Bigadiç Bor madenlerinden izole edilen bakteri izolatları kullanılmıştır. 16S rRNA gen dizisine göre identifikasyonları yapılan ve *Curtobacterium flaccumfaciens* olarak belirlenen bu türe ait 8 izolatın her biri ile genomik kütüphane denemeleri yapılmış ve BB872Y, BB62b2Y izolatları ile çalışılmaya karar verilmiştir. *Curtobacterium flaccumfaciens* türüne ait bu izolatlardan önce genomik DNA izolasyonları yapılmış, aynı zamanda seçilen plazmidin de DNA'sı izole edilmiştir. Genomik DNA ve plazmid DNA'sı istenilen fragmentlerde uygun restriksiyon endonükleazlar ile kesilmiştir. Genomik DNA fragmentleri ile kesilen plazmidler, ligasyon işlemine maruz bırakılmış ve *E. coli* bakterisinin suşu olan DH10b içerisine transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu koloniler stok alınarak genomik kütüphaneler elde edilmiştir. Bor tolerans seviyelerini belirlemek amacıyla elde edilen genomik kütüphane stokları taze besiortamında canlandırılarak seleksiyon işlemlerine gidilmiştir. Seleksiyon işlemleri sonrasında 'Nokta Bor Tolerans Testi' ile son kontroller yapılmıştır. Toleranslı olan rekombinant plazmidin içerdiği gen ya da genleri tespit etmek amacı ile sekanslama yoluna gidilmiştir.

#### 3.1. *E. coli* pACYCDuet-1 Plazmidini İçeren DH10b Suşunun Bor Tolerans Seviyesinin Belirlenmesi

Bor tolerans seviyesinden söz etmek için, boş plazmidin (pDuet) bor toleransı ile klonlanması yapılan rekombinant plazmidin (insert içeren plazmid) bor toleransının karşılaştırılması gerekmektedir. Bunun için öncelikle klonlama yapılmadan önce kullandığımız DH10bpDuet (pDuet plazmidini içeren DH10b) suşunun bor tolerans seviyesi, "Bor tolerans nokta testi" adı verilen metot ile belirlenmiştir.

Kloromfenikol (cm) antibiyotikini içeren ve belirlenen konsantrasyonlarda (0, 50, 80, 100, 110, 120 mM) borik asit içeren LB-cm agar besiortamları hazırlanmıştır.

DH10bpDuet suşunun LB-cm agar besiortamında tek koloni ekimi yapılmış, saf kolonilere dokunularak, takibinde 'Bor Tolerans Nokta Testi' uygulanmıştır (Şekil 3.1.).



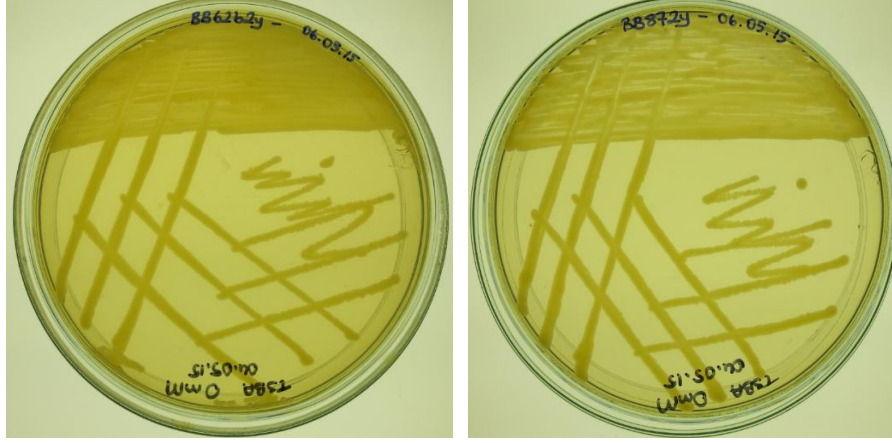
Şekil 3. 1. *E. coli* pACYCDuet-1 plazmidini içeren DH10b suşunun bor tolerans nokta testi sonucu görüntüsü

DH10bpDuet suşunun 0, 50 ve 80 mM borik asit içeren LB-cm agar besiortamlarında yaşayabildiği fakat 100 mM ve üzeri borik asit içeren LB-cm agar besiortamlarında yaşayamadığı görülmüştür (Şekil 3.1.).

### 3.2. BB62b2Y ve BB872Y İzolatlarının Genomik Kütüphane Çalışmaları

*Curtobacterium flaccumfaciens* türüne ait izolatlardan her birinin genomik DNA'sı elde edilmiş ve her biri için genomik kütüphane çalışması denenmiştir. BB62b2Y ve BB872Y izolat kodlaması yapılan izolatlar ile çalışılmasına karar verilmiştir.

16S rRNA gen dizisine göre *Curtobacterium flaccumfaciens* olduğu görülen BB62b2Y ve BB872Y izolatları Balıkesir- Bigadiç Bor madeninden izole edilmiş bir bakteriye ait izolatlardır (Şekil 3.2.). BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının bor tolerans testleri yapıldığında, bora toleranslarının 200 mM borik asit olduğu görülmüştür.



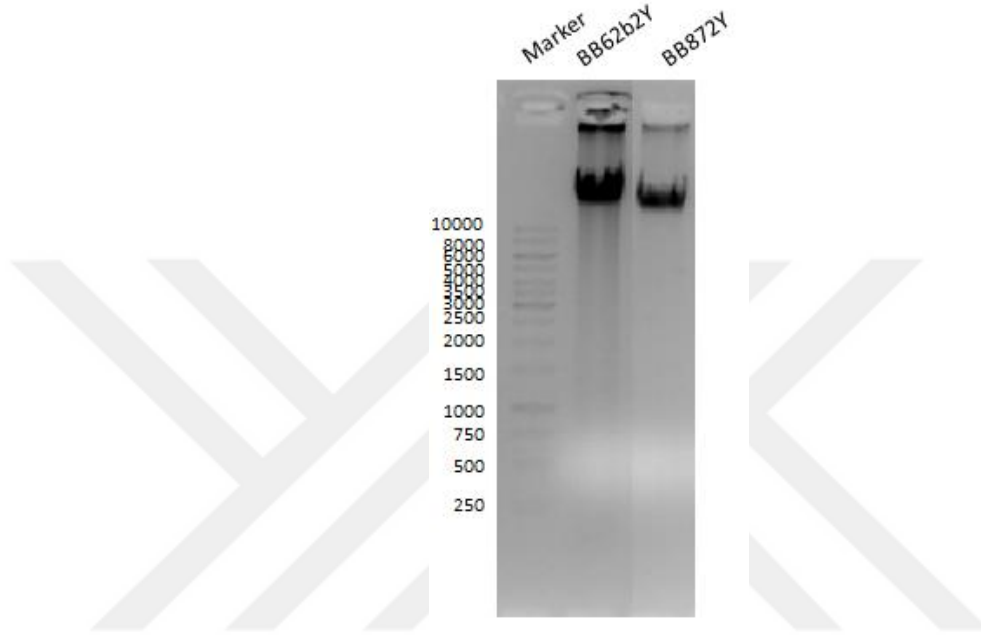
Şekil 3. 2. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının TSB agar besiortamına ekim sonucunun görüntüsü

Bu tez çalışmasında, genomik kütüphane elde edilmesi için ilk olarak BB62b2Y ve BB82b2Y izolatlarından genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra bu DNA'ların *Mbo*I restriksiyon endonükleaz ile kısmi kesimleri yapılmış ve genom küçük DNA fragmentleri haline getirilmiştir. Diğer taraftan klonlanma çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen pACYCDuet-1 plazmidi izole edilmiştir. Bu plazmid *Bam*HI restriksiyon endonükleaz ile kısmi kesime uğratarak kontrolleri yapılmış ve klonlanmaya hazır hale getirilmiştir. Elde edilen genom DNA fragmentleri ligasyon işlemi ile pACYCDuet-1 plazmidine klonlanarak, *E. coli* bakterisinin DH10b suşuna ısı şoku yöntemi ile transforme edilmiştir. Buradan elde edilen klonlar artık bizim için genomik kütüphanedir. Genomik kütüphaneden stok alınarak, klonların bora olan tolerans seviyeleri seleksiyon yöntemleri ile ölçülmüştür. Seleksiyon sonunda tolerant klonlar '*bor tolerans nokta testi*'ne tabii tutularak, bor tolerans seviyeleri belirlenmiştir. Bora tolerans gösteren klonlarda yer alan rekombinant plazmidler izole edilerek, bor ile ilgili gen veya genlerin, proteinlerin değerlendirilmeleri yapılmıştır.

### 3.2.1. Genomik DNA izolasyonları

Genomik DNA elde edilmesi için, gliserol stoklardan gelen bakteri örneklerinin TSB agar besiortamına tek koloni ekimleri yapılmış ve buradaki saf kolonilere dokunulup pellet alınmıştır.

Optimize ve ligasyon aşamalarının tekrarlanabilir çalışmaları olması gerekliliğinden dolayı, elde edilecek olan genomik DNA fragmentlerinin saflıkları, konsantrasyonları ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ve bol miktarda DNA izolasyonu (fenol-kloroform yöntemi veya kit ile) gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Genomik DNA izolasyonu, klasik fenol-kloroform metodunun optimizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonu %0,8'lik agaroz jele 3  $\mu\text{l}$  yüklenerek UV cihazında görüntüsü alınmıştır (Şekil 3.3.).

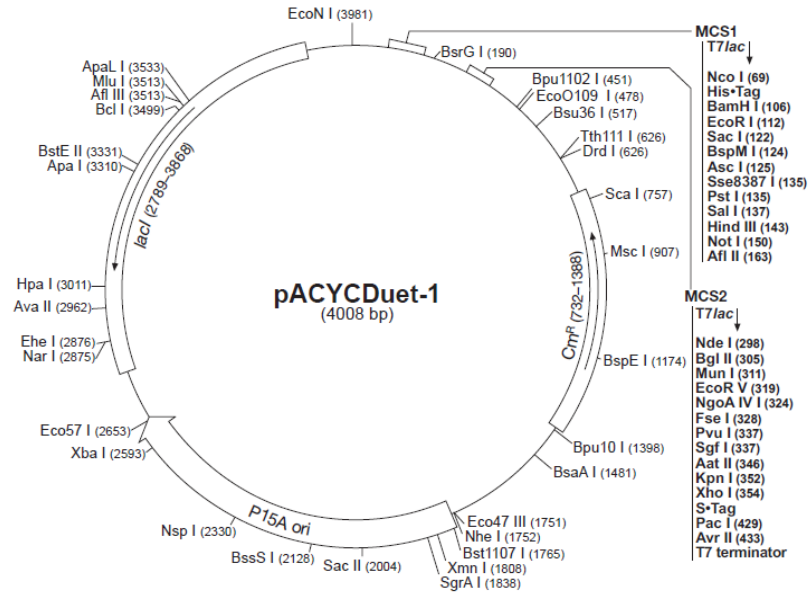


Şekil 3. 3. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA'larının agaroz jel elektroforez analizi görüntüleri

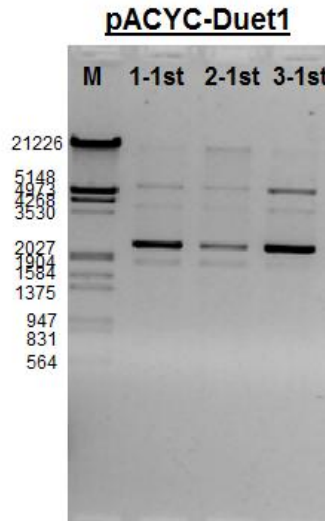
### 3.2.2. pACYC Duet-1 plazmidinin izolasyonu

Klonlamada vektör plazmid olarak pACYCDuet1 kullanılmıştır (Şekil 3.4.). Plazmid DNA'sı Qiagen ve Fermentas kiti kullanılarak izole edilmiştir.

Plazmid DNA'sı izolasyonu için ilk olarak plazmidler ısı şoku yöntemi kullanılarak DH10b (*E. coli*) içerisine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası, pACYCDuet-1 plazmidinin transforme olduğu DH10b (*E. coli*)'leri seçebilmek için, plazmid izolasyon kitlerinin protokolleri uygulanarak pACYCDuet-1 plazmidleri elde edilmiştir. Plazmid DNA izolasyon işleminin sonucu %0,8'lik agaroz jele 3  $\mu\text{l}$  yüklenerek gözlemlenmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3. 4. pACYCDuet-1 plazmidinin şematik gösterimi (Novagen, Cat. No. 71147-3)

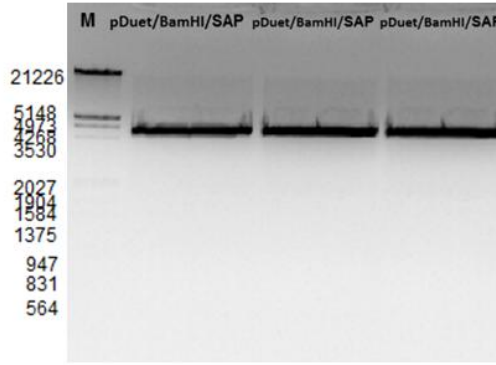


Şekil 3. 5. pACYCDuet-1 plazmid izolasyonu sonucu yapılan agaroz jel elektroforez analizi sonucu görüntüsü

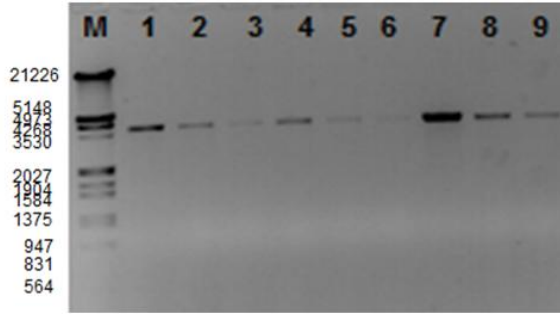
### 3.2.3. Vektör olarak kullanılacak olan plazmidin (pACYCDuet-1) restriksiyon endonükleazlar ile kesimi

Vektör olarak kullanılan pACYCDuet1 plazmidini, *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile gece boyunca inkübe edilerek kesime uğratılmıştır. Daha sonra, *Bam*HI enzimi inaktif edilmiştir.

Doğrusal hale getirilmiş plazmid DNA'sının tekrar kendi kendine ligasyona uğramaması için, serbest 5'-PO<sub>4</sub> grupları yok edilmiştir. Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) enzimi ve enzim tamponu ile muamele edildikten sonra, kesimi yapılan tüpler birleştirilip %0,8'lik agaroz jele 60 µl yüklenip yürütülmüş, plazmidin jelden saflaştırma yapılmıştır (Şekil 3.6.). Ligasyon aşamalarının tekrarlanabilir çalışmaları olmasından dolayı, elde edilen plazmid DNA fragmentlerinin belli saflık ve konsantrasyonlarda (µg/µl) elde edilmesi gerekmektedir. Kesilmiş saf plazmid DNA'sı %0,8'lik agaroz jele 1 µl yüklenerek gözlemlenmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3. 6. *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi kesime uğratılmış ve defosforile edilmiş pACYCDuet-1 plazmidinin agaroz jel elektroforez analiz sonucu görüntüsü

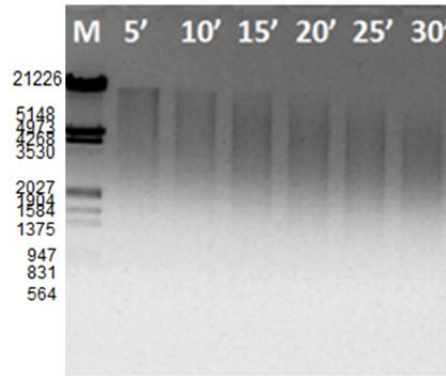


Şekil 3. 7. Saflaştırılmış pACYCDuet-1 plazmidinin agaroz jel elektroforez analiz sonucu görüntüsü

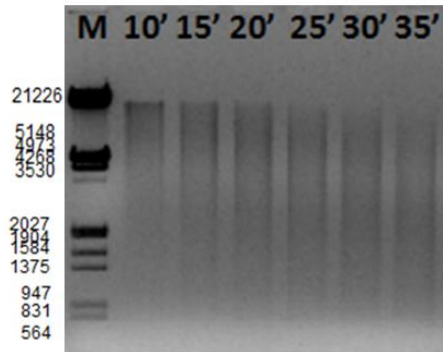
1, 4 ve 7 numaralı kuyucuklar: pDuet/BamHI/SAP/saf ilk elüsyon. 2, 5 ve 8 numaralı kuyucuklar: pDuet/BamHI/SAP/saf ikinci elüsyon. 3, 6 ve 9 numaralı kuyucuklar: pDuet/BamHI/SAP/saf üçüncü elüsyon

### 3.2.4. BB62b2Y ve BB872Y genomik DNA'larının *MboI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kısmi kesimi

Klonlama için hedeflenen büyüklükte genomik DNA fragmentleri elde edilmesinde kısmi kesimde kullanılacak *MboI* restriksiyon enziminin uygun dozu ve reaksiyon süresi belirlenmiştir. Hedef genomik DNA fragment büyüklüğü 1500-5000 bp arasındadır. 10 µg DNA ve 1/100 dilüsyona uğratılmış *MboI* restriksiyon enzimi içeren 25 µl'lik reaksiyon tüplerinden 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakikalık inkübasyonlardan sonra, 4'er µl alınmış ve %0,8 agaroz jele yüklenmiştir ve örneklerin jelde oluşturdukları görünüm DNA ladder ile karşılaştırılarak, kısmi kesim için uygun *MboI* dozunun 1/100 dilüsyon ile ne kadar süre kesime bırakılacağına karar verilmiştir. Jel görüntüleri değerlendirilerek, BB62b2Y izolatının genomik DNA'sının 30 dakika (Şekil 3.8.), BB872Y izolatının genomik DNA'sının da 35 dakika (Şekil 3.9.) kesime bırakılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3. 8. *MboI* restriksiyon enzimi ile 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika boyunca kesime bırakılmış BB62b2Y izolatının genomik DNA jel görüntüsü

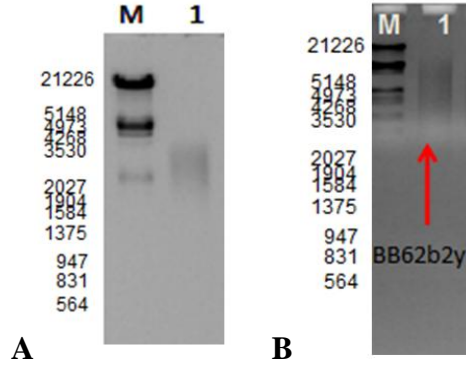


Şekil 3. 9. *MboI* restriksiyon enzimi ile 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 dakika boyunca kesime bırakılmış BB872Y izolatının genomik DNA jel görüntüsü

Genomik DNA'nın *MboI* enzimi ile kesiminin optimizasyonu sonunda BB62b2Y izolatı için kesimler 30 dakikada ve 3 ayrı tüpte yapılmıştır. Ardından tüpler birleştirilip %0,8'lik EtBr içermeyen agaroz jele yüklenerek (Şekil 3.10.), EtBr eklenerek yüklenen marker ile karşılaştırılıp, UV ışığı altında görüntüleme sonucu, istenilen 1500-5000 bp aralığındaki jel bölgesi steril bistüri ile kesilmiştir. Ticari kit kullanılarak jelden saflaştırma yapılmıştır. Kesilmiş saf genomik DNA izolasyon işleminin sonucu, %0,8'lik agaroz jele 1 µl yüklenerek gözlemlenmiştir (Şekil 3.11.). Kesilmiş genomik DNA izolasyon işleminin sonucu %0,8'lik agaroz jele 4 µl yüklenerek gözlemlenmiştir. (Şekil 3.12.).

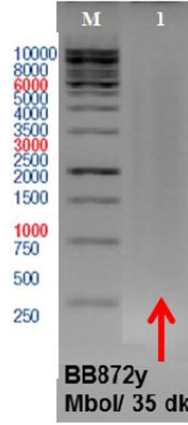


Şekil 3. 10. *MboI* restriksiyon enzimi ile 30 dakika boyunca kesime bırakılmış BB62b2Y izolatının EtBr içermeyen %0,8'lik agaroz jeldeki kesim yapıldığı kısmın görüntüsü



Şekil 3. 11. Genomik DNA'nın *MboI* restriksiyon enzimi ile kısmi kesim jel görüntüleri

- A. M: Marker, 1: 1/100 dilüsyonlu *MboI* restriksiyon enzimi ile 30 dakika boyunca kesime bırakılmış BB62b2Y izolatının saf genomik DNA'sının %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.
- B. M: Marker, 1: 1/100 dilüsyonlu *MboI* restriksiyon enzimi ile 30 dakika boyunca kesime bırakılmış BB62b2Y izolatının (jelden kesimi yapılmamış ve pürifikasyon kiti ile saflaştırılmamış) genomik DNA'sının %0,8'lik agaroz jel görüntüsü.

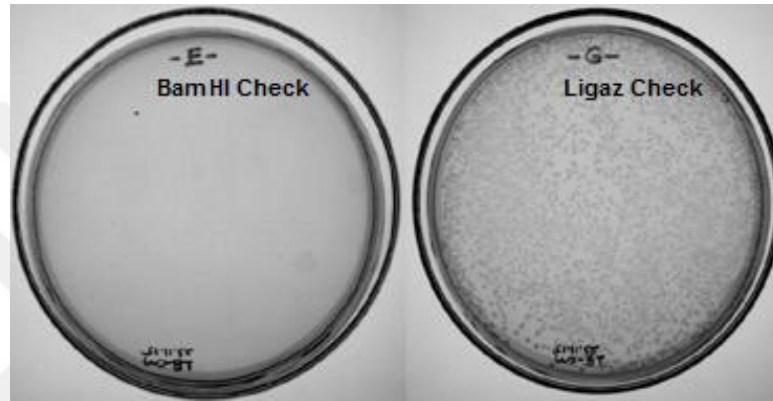


Şekil 3. 12. *MboI* restriksiyon enzimi ile 35 dakika boyunca kesime bırakılmış BB872Y izolatının genomik DNA'sının %0,8'lik agaroz jel görüntüsü

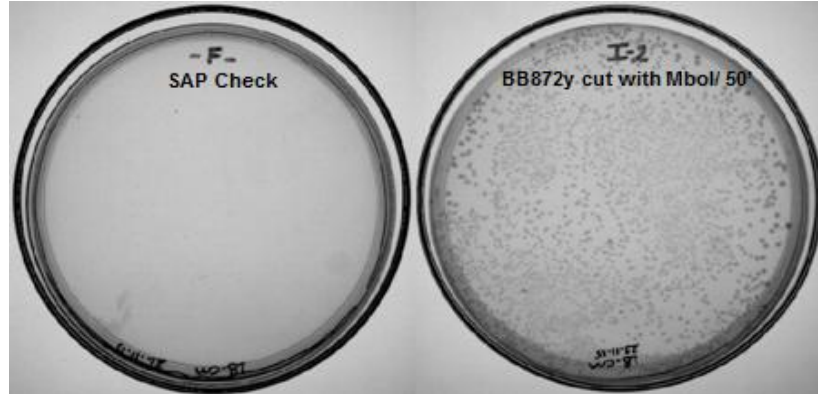
### 3.2.5. Genomik DNA fragmentlerinin pACYCDuet-1 plazmidine klonlanması ve transformasyon

Ligasyon aşaması için plazmid DNA'sı ve genomik DNA fragmentleri bir tüp içerisinde birleştirilmiştir. BB62b2Y izolatının iki farklı şekilde genomik kütüphanesi oluşturulmuştur. Bunlardan birinde, %0,8'lik agaroz jelden kesimi yapılarak saf hale getirilen ve hedeflenen 1500-5000 bp aralığındaki genomik DNA fragmentleri kullanılmıştır. Diğerinde ise, BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA'ları, kesim optimizasyonunda 1500–5000 bp aralığı için belirlenen zaman dilimi seçilerek kesilmiştir. Bu tüp içerisindeki genomik DNA fragmentleri, direkt ligasyon işlemi için kullanılmıştır. Bu durumda ligasyon ve transformasyon sonunda çok fazla sayıda koloni elde edilmiştir. Küçük insert içeren plazmidler de var olacağından büyük insert içeren plazmidleri ayırmak zaman alacak bir işlemdir. Ligasyon reaksiyonu için genomik DNA'dan 10 µg, pACYCDuet-1 plazmid DNA'sından 3 µg olması gerekmektedir (Ausubel vd., 2003). Bunun için ilk olarak defosforile edilmiş pACYCDuet-1 plazmid DNA'sı ve genomik DNA fragmentleri 1:3 oranında olacak şekilde birleştirilerek, Qiagen PCR pürifikasyon kiti (Cat. No: 28106) ile saf hale getirilmiştir. Buradaki amaç, plazmid ve genomik DNA'nın saf olarak elde edilerek, ligasyon aşamasında ligaz enziminin optimum seviyede çalışmasını sağlamaktır.

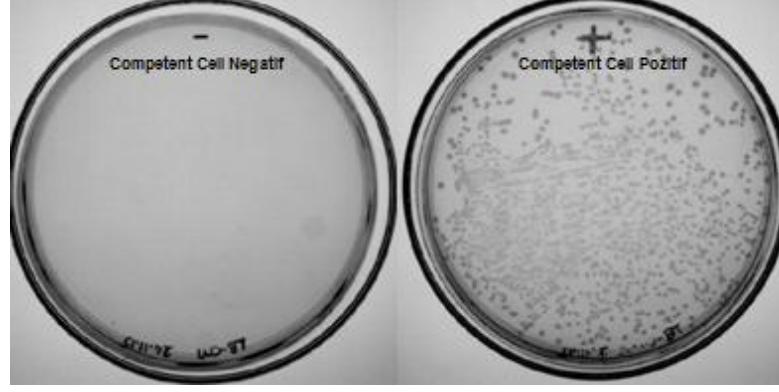
Ligasyonda plazmid insert oranı,  $\mu\text{g}$  olarak, 1:3 oranında, defosforile edilmiş plazmid DNA'sı ve bakteri izolatının genomik DNA fragmentleri, T4 DNA ligaz enzimi ve uygun tampon ile  $16^{\circ}\text{C}$ 'de, PCR cihazı (Eppendorf Mastercycler Gradient) içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Gece boyunca  $16^{\circ}\text{C}$ 'de ligasyon gerçekleştirildikten sonra, ertesi gün 2-3  $\mu\text{l}$  ligasyon karışımı, ısı şoku transformasyon yöntemi ile DH10b (*E. coli*) hücrelerine transforme edilmiştir. Yapılan her bir çalışma için, transformasyon öncesinde ligaz enziminin çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.13.). Ayrıca, bunun haricinde defosforilasyon işleminin kontrolleri (Şekil 3.14.) ve transformasyonun verimliliği de (Şekil 3.15.) kontrol edilmiştir.



Şekil 3. 13. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA fragmentlerinin ligasyon işlemi ile plazmide klonlanması öncesi ligaz enziminin kontrol deneyi petri fotoğrafları



Şekil 3. 14. BB872Y izolatının genomik DNA fragmentlerinin ligasyon işlemi için öncesinde yapılmış olan SAP enziminin kontrol deneyi petri fotoğrafları

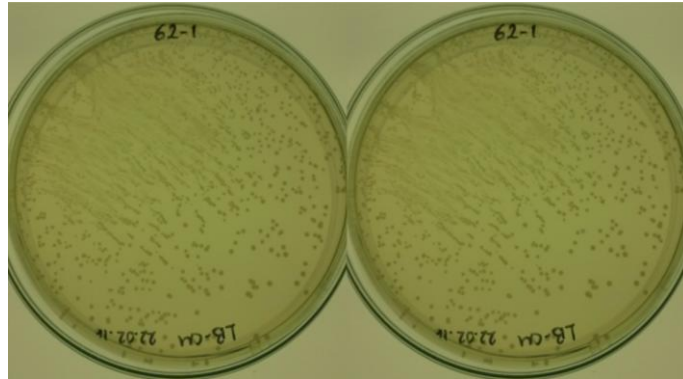


**Şekil 3. 15. Transformasyonun verimliliğinin kontrolü**

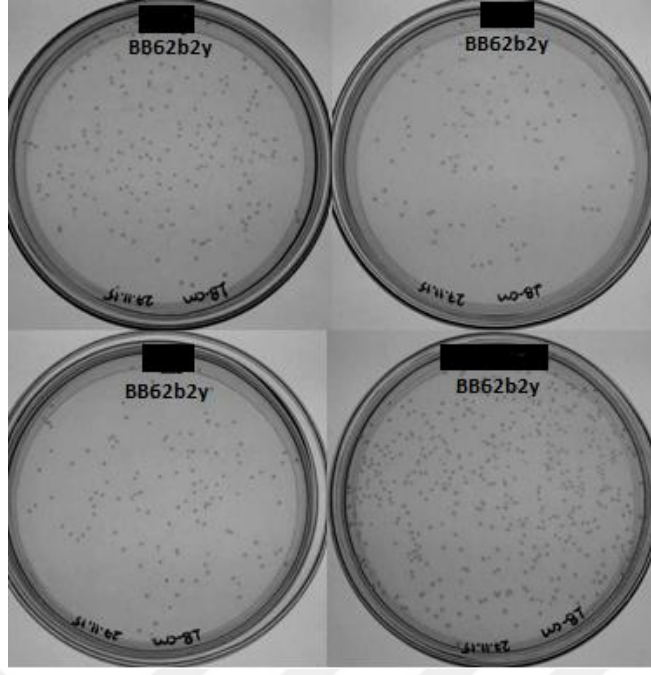
Sağdaki petride *E. coli*'nin DH10b suşuna, 1 µl kesilmemiş pACYCDuet-1 plazmidini kullanılarak transformasyon sonucu elde edilen koloniler görülmektedir (pozitif kontrol), soldaki petride ise transformasyon negatif kontrolü görülmektedir.

### **3.2.6. BB62b2Y ve BB872Y izolatlarının genomik DNA fragmentlerinin pACYCDuet-1 plazmidine klonlanmaları sonucu transformantların seçimi**

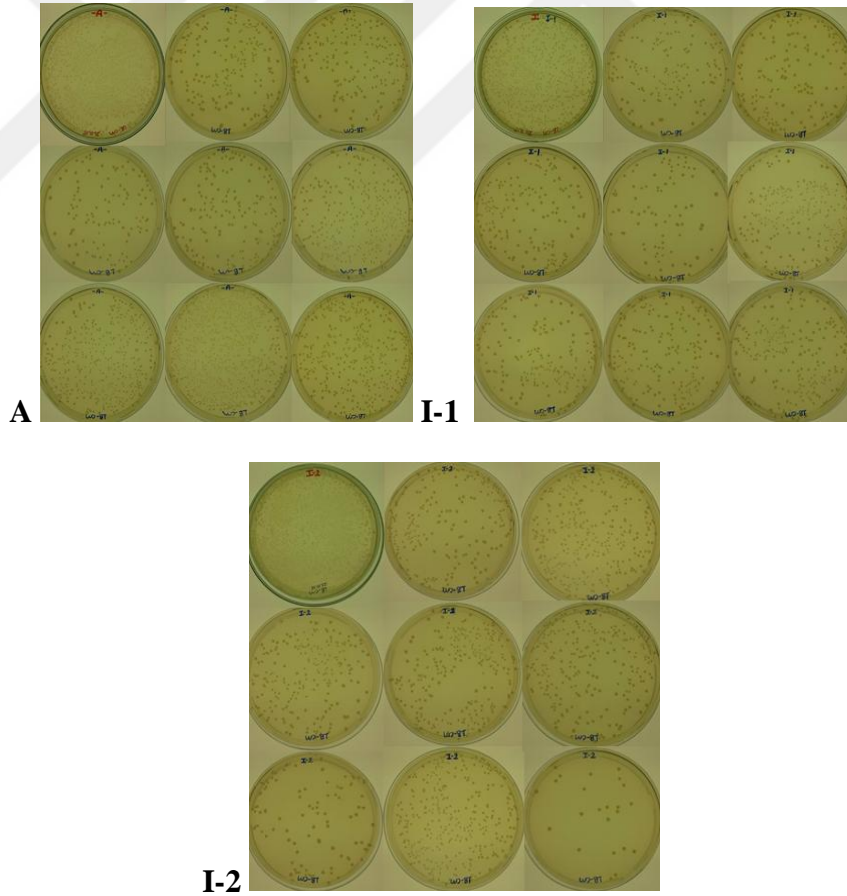
Transformasyon sonucu BB62b2Y-1 örneği için yaklaşık 1800 koloni (Şekil 3.16.), BB62b2Y-2 örneği için yaklaşık 2400 koloni (Şekil 3.17.) ve BB872Y örneği için yaklaşık 14000 koloni (Şekil 3.18.) görülmüştür.



**Şekil 3. 16. BB62b2Y genomik kütüphanesi ve ligasyon sonucu petri fotoğraflarından örnekler**



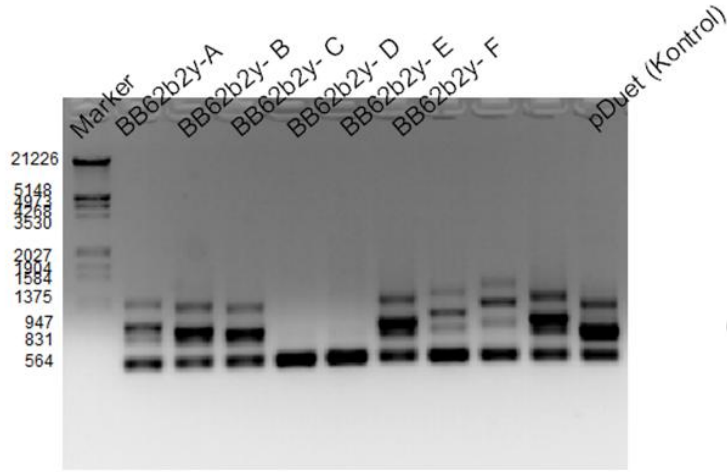
Şekil 3. 17. BB62b2Y-2 genomik kütüphanesi ve ligasyon sonucu petri fotoğraflarından örnekler



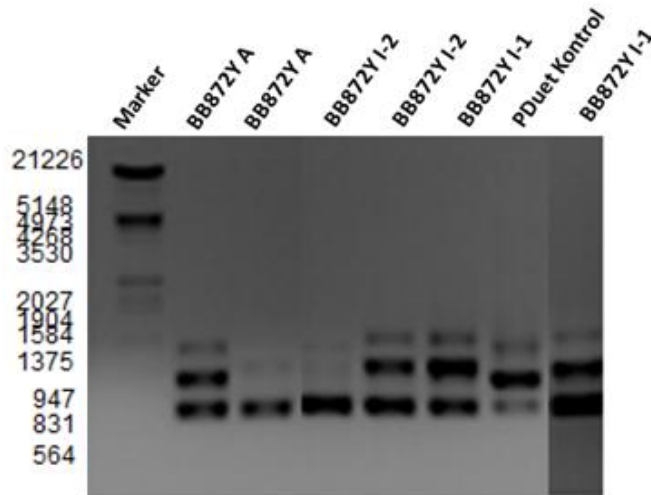
Şekil 3. 18. BB872Y (A, I-1 ve I-2) genomik kütüphanesi ve ligasyon sonucu petri fotoğraflarından örnekler

### 3.2.7. Rekombinant plazmidlerin koloni PCR yöntemi ile insert kontrolleri

Transformant kolonilerin insert içerip içermediklerini kontrol etmek amacı ile koloni PCR yapılmıştır. Kontrol olarak, DH10bpDuet (pDuet plazmidini içeren DH10b, insert içermeyen plazmid) suşu kullanılmıştır. Kontrol ile karşılaştırılarak, kolonilerin içerisindeki plazmidlerin insert içerdikleri görülmüştür (Şekil 3.19., Şekil 3.20.).



Şekil 3. 19. BB62b2Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmidlerin insert içerip içermediklerinin kontrolünün %0,8'lik agaroz jel görüntüsü



Şekil 3. 20. BB872Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen rekombinant plazmidlerin insert içerip içermediklerinin kontrolünün %0,8'lik agaroz jel görüntüsü

### **3.2.8. BB62b2Y ve BB872Y genomik kütüphanesi stoğunun alınması**

Transformasyon sonucunda PCR ile insert kontrolleri de yapıldıktan sonra, elde edilen koloniler öze ile alınarak 500 µl PBS (Phosphate Buffer Saline) içinde çözülerek, cryo tüpü içerisinde %15 konsantrasyonda gliserol çözeltisi eklenerek tekrar çözülmüş ve -80°C'ye kaldırılmıştır. BB62b2Y-1, BB62b2Y-2 (jelden kesilmiş) ve BB872Y genomik kütüphanelerinin stokları bu şekilde alınmış ve laboratuvarında bulunan genomik kütüphane stoklarına kazandırılmıştır.

Direkt ekim yöntemi ile seleksiyon için alınan her bir stoktan (cryo tüplerine alınan solüsyon) 60 µl çekilerek ependorf tüplere ayrılmış, -80°C'ye kaldırılmıştır. Stoğu alınan genomik kütüphanelerdeki bora direnç gösteren klonların tespit edilmesi için direkt ekim, çizgi ekim ve zenginleştirme yöntemleri kullanılmıştır. Transformant binlerce koloniden bu yöntemler ile bora direnç gösterenlerin seleksiyonu yapılmıştır. Bora tolerans gösteren koloniler isimlendirilerek elde edilen bu rekombinant plazmidlerin insert sekansları değerlendirilmiştir. Rekombinant plazmidlerdeki insertlerin, bakteriye sağladıkları bor direncinin hangi gen ya da genler tarafından gerçekleştiği ve bu genlerin özellikleri hakkında bilgiler elde edilmiştir.

### **3.3. Transformant Kolonilerin Direkt Ekim Yöntemi ile Seleksiyonu**

Transformant kolonilerden alınan stoklardan 60 µl direkt ekim için ayrılmıştır. Ayrılan bu stoklar eritilerek üzerine 500 µl PBS eklenerek çözülmüş ve OD değerleri ölçülmüştür. OD 0,5 olacak şekilde 0, 100, 110 ve 120 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> içeren LB-cm besiortamlarına yayma ekimi yapılmıştır. Bu ekim sonucu petriyeler 7 gün boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0, 100, 110 ve 120 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> içeren LB-cm besi yerlerinde üreme gösteren kolonilerin canlı olup olmadıklarını kontrol etmek, bu kolonilerden daha fazla örnek alabilmek ve ikinci bir seleksiyondan geçirebilmek için borik asit içermeyen LB-cm besiortamına kürdan ile ekimleri yapılmıştır.

BB62b2Y (jelden kesilmiş) genomik kütüphanesinin (Çizelge 3.1.), BB62b2Y B-1 (Çizelge 3.2.) ve B-2 (Çizelge 3.3.) genomik kütüphanesinin ve BB872Y genomik kütüphanesinin (Çizelge 3.4.) direkt ekim deneylerinde üremeleri takip edilmiştir. BB62b2Y ve BB872Y genomik kütüphaneleri için zenginleştirme ile seleksiyon yöntemi kullanılmıştır.



**Çizelge 3. 1. BB62b2Y genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi**

LB-cm Besiortamı	BB62b2Y Genomik Kütüphanesi	DH10b pDuet (Kontrol)
0 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Yoğun üreme	Yoğun üreme
100 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	15 koloni	Üreme yok
110 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 koloni	Üreme yok
120 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6 koloni	Üreme yok

**Çizelge 3. 2. BB62b2Y B-1 genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi**

LB-cm Besiortamı	BB62b2Y B-1 Genomik Kütüphanesi	DH10b pDuet (Kontrol)
0 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Yoğun üreme	Yoğun üreme
100 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120 koloni	Üreme yok
110 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	95 koloni	Üreme yok
120 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 koloni	Üreme yok

**Çizelge 3. 3. BB62b2Y B-2 genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi**

LB-cm Besiortamı	BB62b2Y B-2 Genomik Kütüphanesi	DH10b pDuet (Kontrol)
0 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Yoğun üreme	Yoğun üreme
100 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	12 koloni	Üreme yok
110 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2 koloni	Üreme yok
120 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Üreme yok	Üreme yok

**Çizelge 3. 4. BB872Y I-2 genomik kütüphanesinin direk ekim ile seleksiyonun üreme takibi**

LB-cm Besiortamı	BB872Y I-2 Genomik Kütüphanesi	DH10b pDuet (Kontrol)
0 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Yoğun üreme	Yoğun üreme
90 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	92 koloni	Üreme yok
100 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	51 koloni	Üreme yok
110 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 koloni	Üreme yok
120 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2 koloni	Üreme yok
140 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 koloni	Üreme yok

BB62b2Y genomik kütüphanesi için borik asit içermeyen LB-cm katı besiortamında canlandırılıp çoğaltılan kolonilerin (115 koloni) 0, 100, 110, 120 mM borik asit içeren LB-cm katı besi yerlerine çizgi ekimleri yapılmıştır (Şekil 3.21.).

LB-cm bor içermeyen besiortamında kontaminasyon meydana gelmiştir. Bu örnekleri canlandırılmak, çoğaltılmak ve bor tolerans nokta testinde kullanılmak üzere borik asit içermeyen LB-cm besiortamına tekrar ekilmiştir. Buradan seçilen 6, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 46, 106 ve 107 isimleri verilen 10 adet bor toleransına sahip örnek çoğaltılarak, bor tolerans seviyeleri 'Bor tolerans nokta testi' ile belirlenmiş, koloni PCR yöntemi ile de bu tolerant kolonilerin insert varlıkları ve büyüklükleri tespit edilmiştir (Şekil 3.22.).

LB-CM 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

LB-CM 110 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

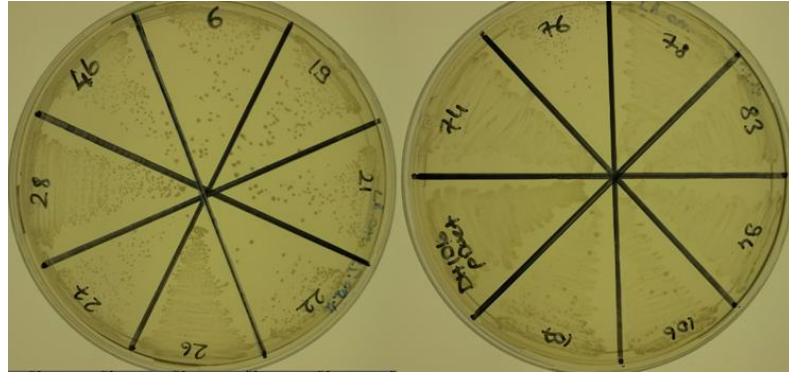


LB-CM 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

LB-CM 120 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>



Şekil 3. 21. BB62b2Y genomik kütüphanesinin çizgi ekim yöntemi ile seleksiyonundan petri fotoğraf örnekleri

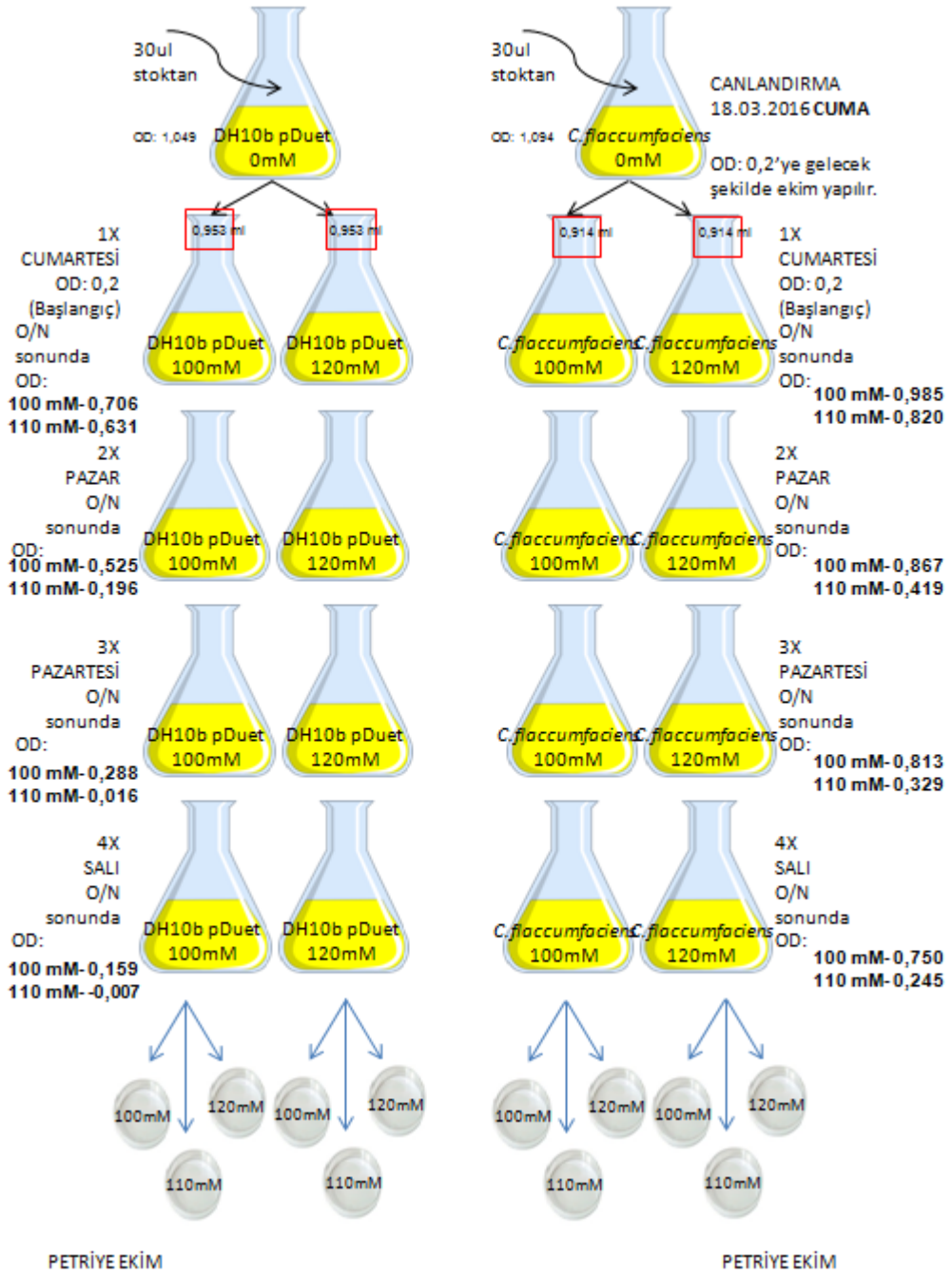


Şekil 3. 22. BB62b2Y genomik kütüphanesinin çizgi ekim ile Bor seleksiyonu sonucu üreme gösteren transformant kolonilerin LB-cm 0 mM besiyortamlarındaki canlandırma petri fotoğrafları

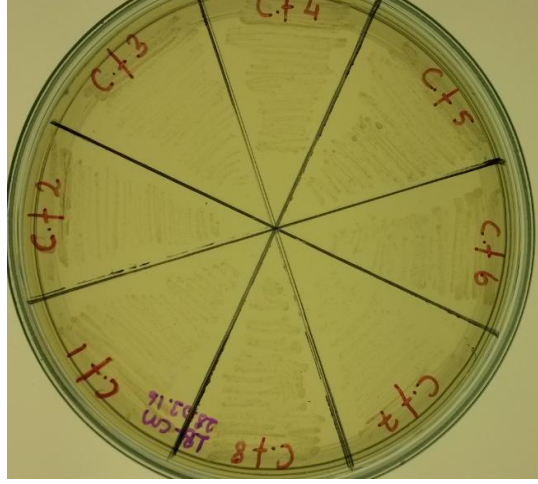
### 3.4. Transformant Kolonilerin Zenginleştirme Yöntemi ile Seleksiyonu

Zenginleştirme ile seleksiyon yönteminde genomik kütüphanesi oluşturulan bakteriler borik asit içermeyen LB-cm besiortamında 37°C’de 24 saat çalkalamalı inkübatörde 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üreyen bakteriler 100 mM ve 110 mM borik asit içeren LB-cm sıvı besiortamlarına inoküle edilmiştir. Bu yöntemde genomik kütüphane 5 gün boyunca 100 mM ve 110 mM borik asit içeren LB-cm sıvı besiortamlarında seleksiyona uğratılmıştır. Paralel olarak DH10bpDuet kontrol suşu aynı işlemlere maruz bırakılmıştır. 5. gün sonunda, sıvı besiortamlarından, 100 mM, 110 mM ve 120 mM borik asit içeren LB-cm agar besiortamlarına ekimler yapılmıştır. Bu besiortamları 5-7 gün boyunca 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

BB62b2Y (jelden kesilerek hazırlanan) genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonunda (Şekil 3.23.) 7 gün sonra, 100 ve 110 mM borik asit içeren LB-cm agar besiortamlarında üreme gösteren 8 koloni gözlemlenmiştir. Bu örnekler “Cf1, Cf2, Cf3, Cf4, Cf5, Cf6, Cf7 ve Cf8” olarak adlandırılarak, borik asit içermeyen LB-cm agar besiortamında çoğaltılmış (Şekil 3.24.) ve ‘*Bor Toleransı Nokta Testi*’ ile tolerans seviyeleri tespit edilmiştir. Canlandırılmaları yapılan örneklerin insert varlıkları ve büyüklükleri koloni PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

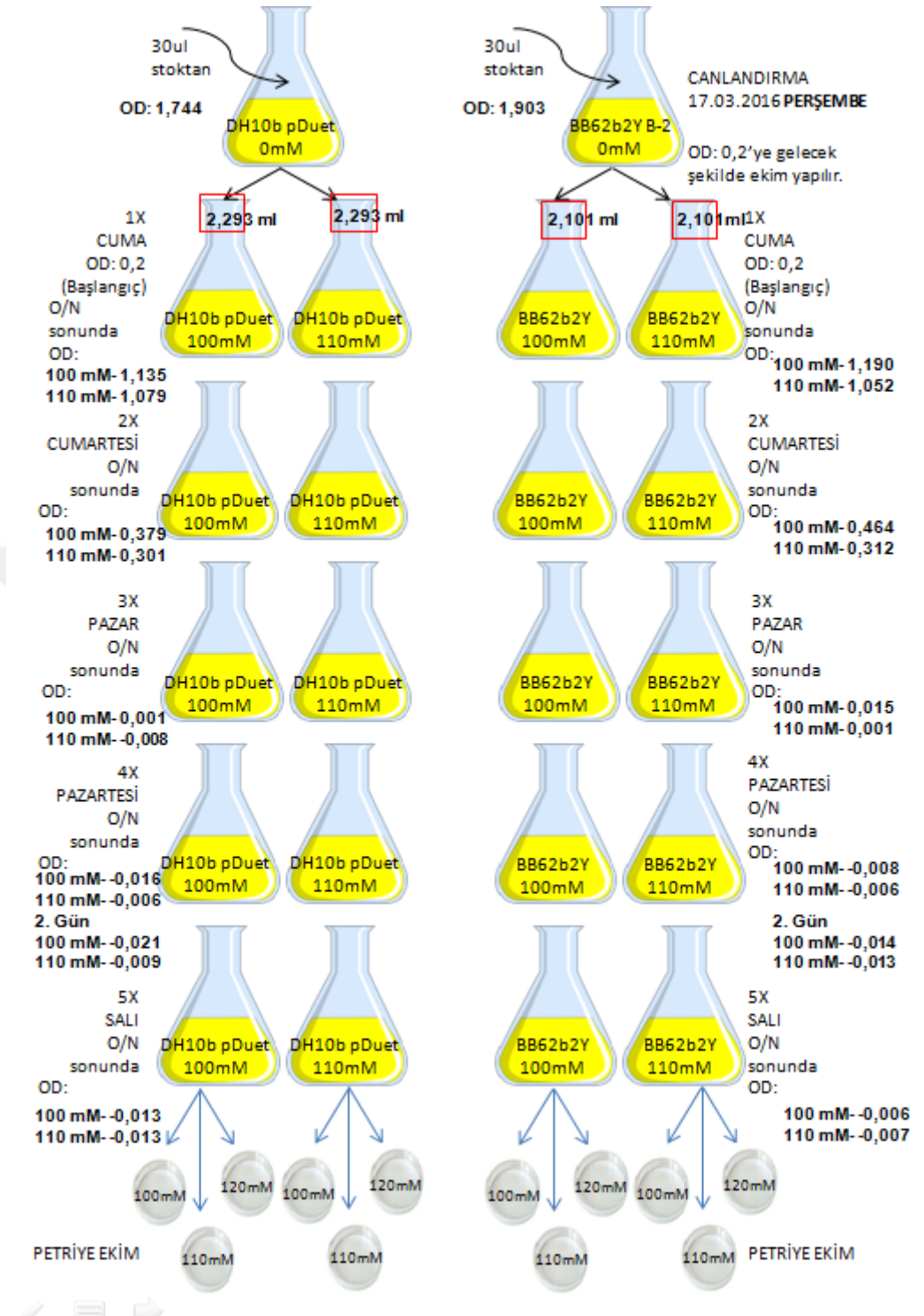


Şekil 3. 23. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonunun şematik gösterimi

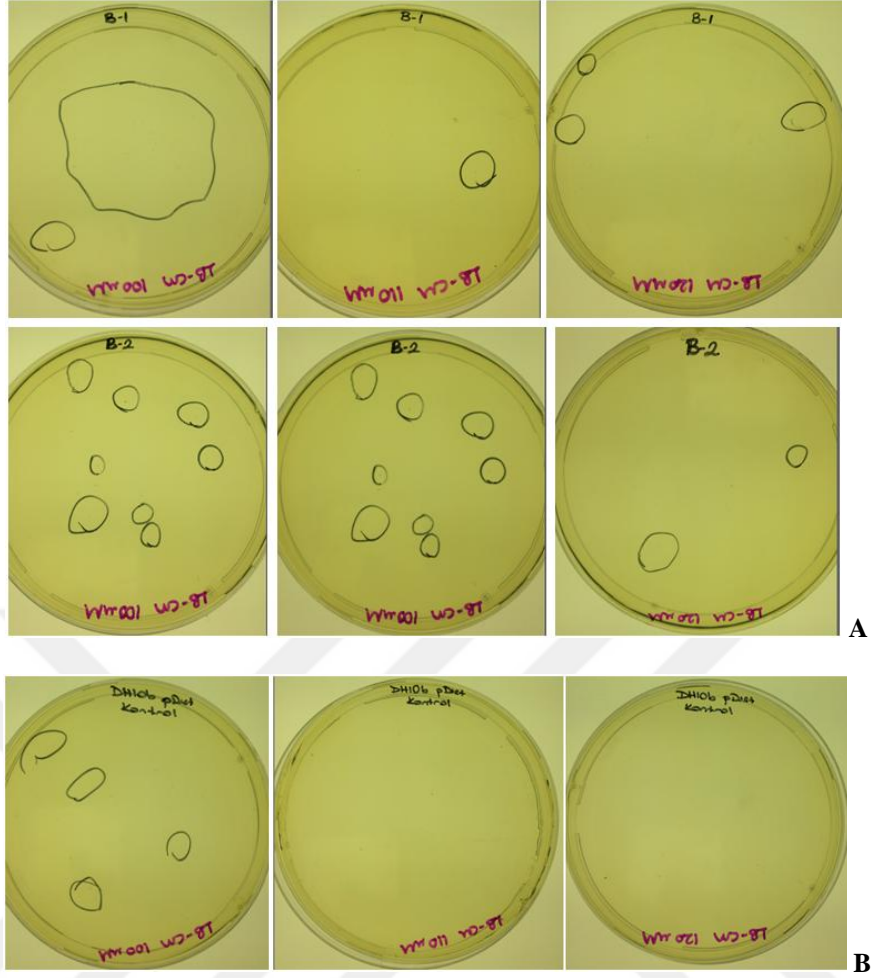


**Şekil 3. 24. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu sonucu elde edilen tolerant kolonilerin LB-cm katı besiortamında canlandırıldığı petri fotoğrafı**

BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu (Şekil 3.25.) sonunda 7 gün sonra 100 ve 110 mM LB-cm katı besiortamlarında üreme gösteren 5 koloni gözlemlenmiştir (Şekil 3.26.). Bu örnekler “A, B, C, D ve E” kodlaması ile isimlendirilerek, borik asit içermeyen LB-cm agar besiortamında çoğaltılmış ve ‘*Bor Toleransı Nokta Testi*’ ile toleransları tespit edilmiştir.



Şekil 3. 25. BB62b2Y B-2 genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonunun şematik gösterimi



**Şekil 3. 26. BB62b2Y izolatu genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile bor seleksiyonundan elde edilen kolonilerin ve kontrolün (DH10bpDuet) petri fotoğrafları**

A. BB62b2Y B-1 ve B-2 genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile bor seleksiyonu sonucu gelen kolonilerin petri fotoğrafları ve büyüyen koloniler işaretlenerek gösterilmiştir.

B. Kontrol olarak kullanılan ve seleksiyondan geçirilerek ekimi yapılan DH10bpDuet'in petri fotoğrafları gösterilmiştir.

BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu sonunda 7 gün sonra, 100 ve 110 mM LB-cm katı besiyortamlarında üreme gösteren 18 koloni gözlemlenmiştir ve gün gün üremeleri takip edilerek değerlendirilmiştir (Çizelge 3.5.). Bunun yanında DH10bpDuet kontrol olarak kullanılmış olup, üreme takibi yapılmıştır (Çizelge 3.6.).

Bu örnekler “SKB1a, SKB1b, SKB1c, SKB1d, SKB1e, SKB1f, SKB1g, SKB1h, SKB1j, SKB1k, SKB1m, SKB2a, SKB2b, SKB2c, SKB3a, SKB3b, SKB3c ve SKB3d” olarak isimlendirilerek, borik asit içermeyen LB-cm katı besiortamında çoğaltılmış ve ‘*Bor Tolerans Nokta Testi*’ ile tolerans seviyeleri tespit edilmiştir.

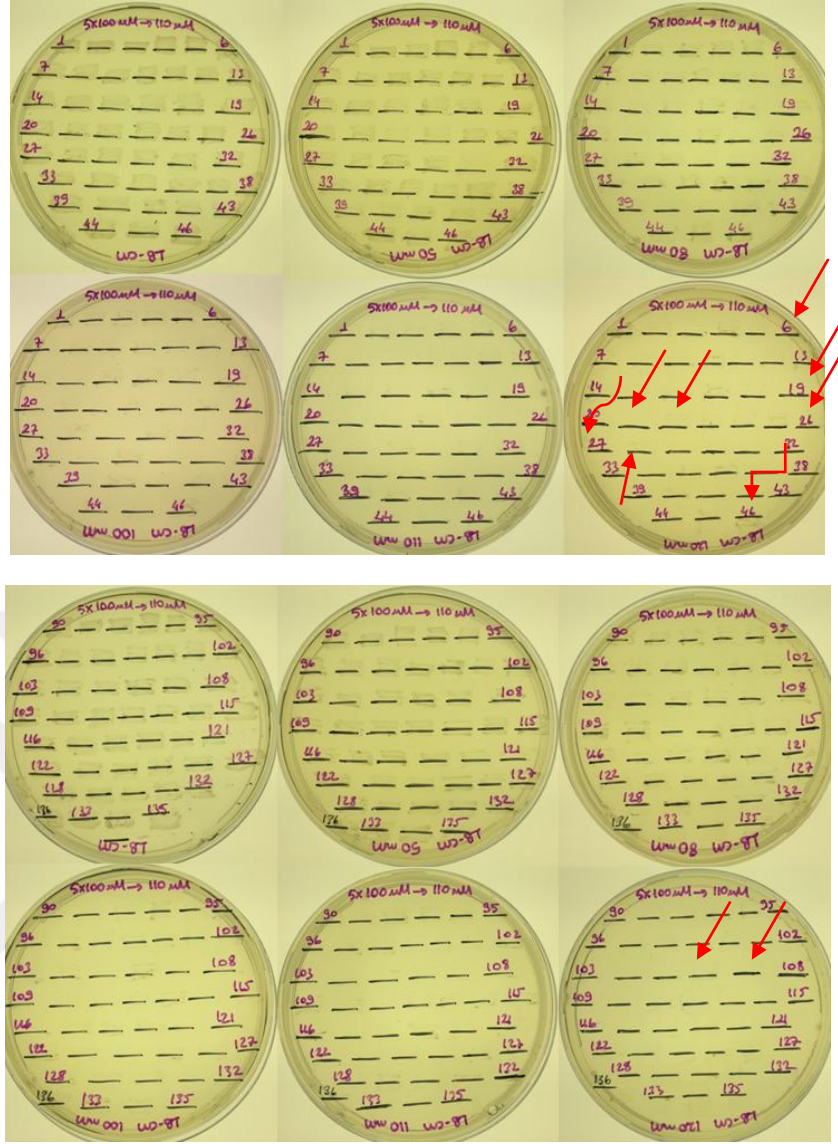
BB872Y izolatının genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile bor seleksiyonu sonucunda tolerans değerlendirilmesi yapılacak 18 örnek elde edilmiştir. Ayrıca zenginleştirme ile seleksiyonun 4. gününde 110 mM borik asit içeren LB-cm sıvı besiortamından 80 mM borik asit içeren LB-cm katı besiortama ekimi sonucunda 26 koloni, 5. gününde 100 mM borik asit içeren LB-cm sıvı besiortamından 110 mM borik asit içeren LB-cm katı besiortama ekimi sonucunda yaklaşık 136 koloni gözlemlenmiştir. Bu örnekler 0, 50, 80, 100, 110 ve 120 mM borik asit içeren LB-cm besiortamında çizgi ekim ile değerlendirilip, göreceli olarak yüksek bor toleransına sahip klonlar seçilmiştir (Şekil 3.27.).

Çizelge 3. 5. BB872Y I-2 genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonu sonunda borik asit içeren besiortamlardaki üreme durumlarının takibi

Zenginleştirme yönteminde 4. ve 5. gün H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> konsantrasyonları	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> konsantrasyonu	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
4X 100 mM	90 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
4X 100 mM	100 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
4X 100 mM	110 mM	0	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
4X 100 mM	120 mM	0	0	0	0
4X 110 mM	50 mM	0	34	34	34
4X 110 mM	80 mM	0	3	26	26
4X 110 mM	90 mM	0	0	1	1
4X 110 mM	100 mM	0	0	0	0
4X 110 mM	120 mM	0	0	0	0
5X 100 mM	90 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
5X 100 mM	100 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
5X 100 mM	110 mM	0	136	136	136
5X 100 mM	120 mM	0	0	0	0
5X 100 mM	140 mM	0	0	0	0
5X 110 mM	90 mM	0	1	1	1
5X 110 mM	100 mM	0	3	3	3
5X 110 mM	110 mM	0	4	4	4
5X 110 mM	120 mM	0	0	0	0
5X 110 mM	140 mM	0	0	0	0

**Çizelge 3. 6. DH10bpDuet (kontrol) suşunun zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonu sonucu borik asit içeren besiortamlarındaki üreme durumlarının takibi**

Zenginleştirme yönteminde 4. ve 5. gün H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> konsantrasyonları	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> konsantrasyonu	1. gün	3. gün	5. gün	8. gün
4X 100 mM	90 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
4X 100 mM	100 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
4X 100 mM	110 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
4X 100 mM	120 mM	0	0	0	0
4X 110 mM	50 mM	0	13	13	13
4X 110 mM	80 mM	0	12	12	12
4X 110 mM	90 mM	0	14	14	14
4X 110 mM	100 mM	0	1	1	1
4X 110 mM	120 mM	0	0	0	0
5X 100 mM	90 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
5X 100 mM	100 mM	0	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni	Yüzlerce koloni
5X 100 mM	110 mM	0	0	0	0
5X 100 mM	120 mM	0	0	0	0
5X 100 mM	140 mM	0	0	0	0
5X 110 mM	90 mM	0	4	4	4
5X 110 mM	100 mM	0	0	0	0
5X 110 mM	110 mM	0	0	0	0
5X 110 mM	120 mM	0	0	0	0
5X 110 mM	140 mM	0	0	0	0



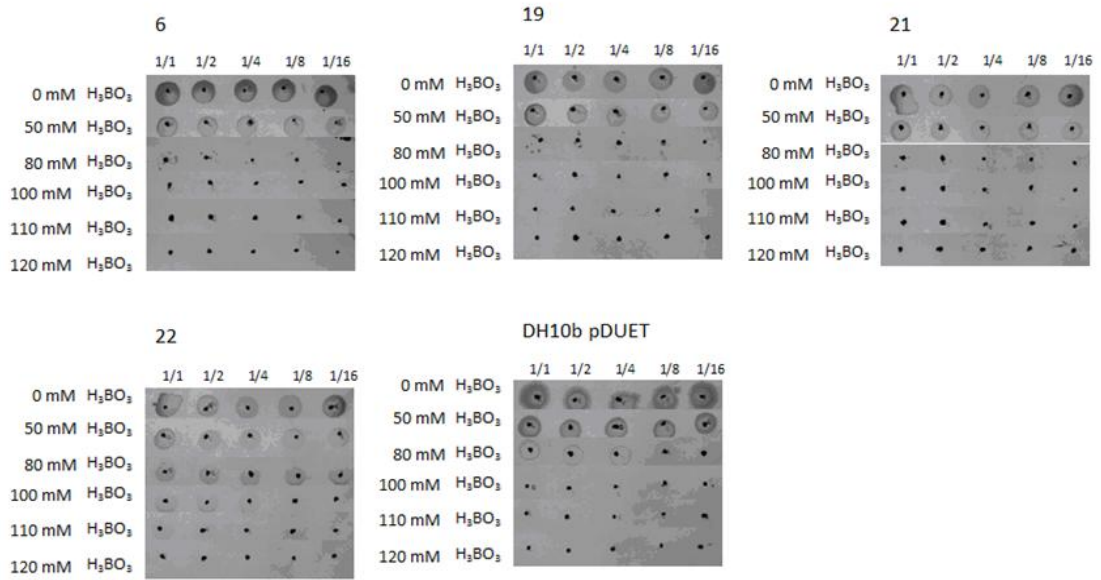
Şekil 3. 27. BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonu sonunda çizgi ekim sonucu katı besiyortamlarında üreme gösteren kolonilerin petri fotoğrafları

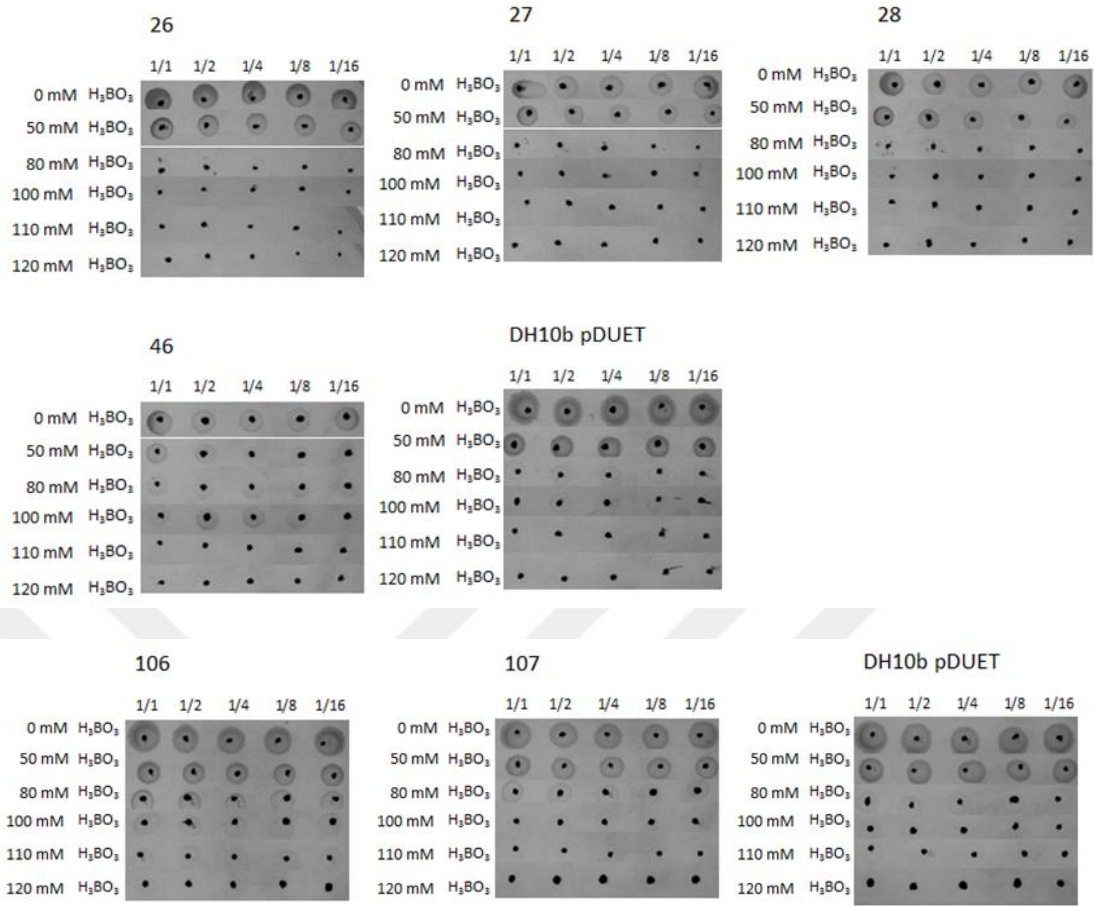
### 3.4.1. Bor tolerans nokta testi ile seçilen kolonilerin analizi

Oluşturulan genomik kütüphanelerden seleksiyon ile bora toleranslı olduğu düşünülen transformant kolonilerin içerdiği plazmidlerdeki insert bölgelerindeki gen veya genlerin *E. coli*'ye ne kadar bor toleransını sağladığını bulabilmek ve emin olabilmek için bor tolerans nokta testi uygulanmıştır. Bu testte ilk olarak her bir transformant koloninin bor tolerans eşik seviyeleri belirlenmiş, OD 0,5 olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Kontrol olarak insert içermeyen plazmid DH10bpDuet suşu kullanılmıştır.

Kontrol DH10b suşu her test serisinde negatif kontrol olarak eklenmiş ve tolerant örnekler ile karşılaştırılmıştır. 0, 50, 80, 100, 110 ve 120 mM borik asit içeren LB-cm agar besiyortamlarına 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dilüsyona uğratarak nokta ekimleri yapılmıştır.

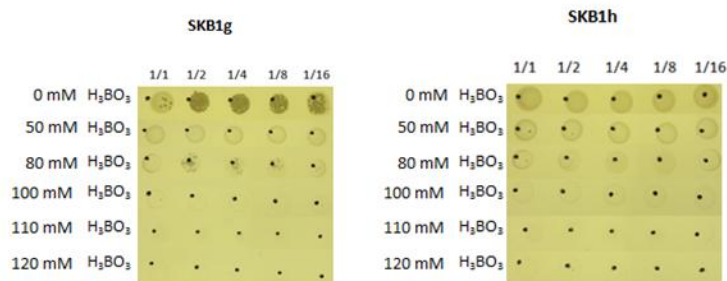
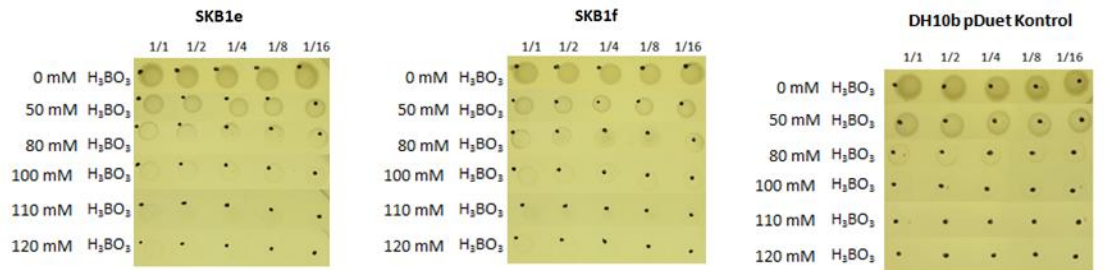
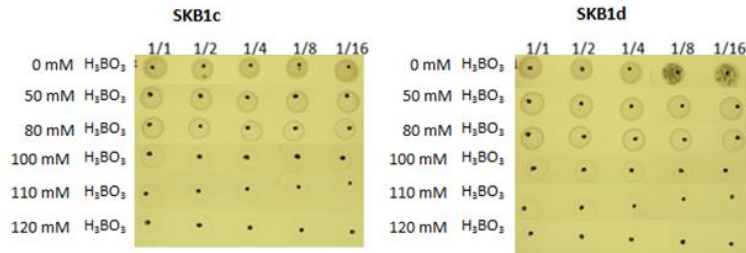
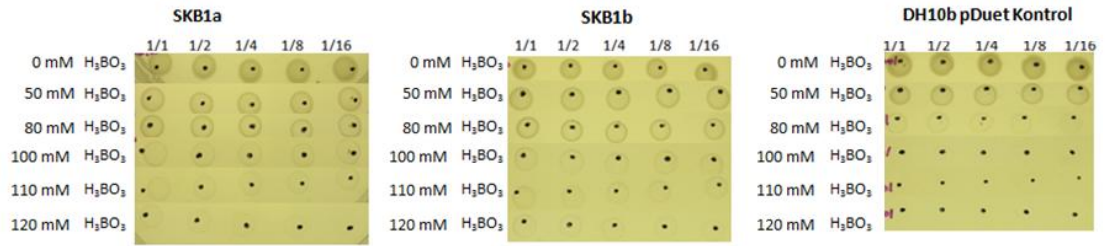
BB62b2Y genomik kütüphanesinin direkt ekim ile seleksiyonu sonucu üreme gösteren kolonilerin çizgi ekimleri yapılmıştır. Buradan canlandırmaları yapılan 6, 19, 21, 22, 26, 27, 28, 46, 106 ve 107 olarak isimlendirilen 10 adet tolerans gösteren koloninin 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonucunda, 106 ve 107 nolu örneklerin 110 mM borik asit içeren LB-cm katı besiyortamında üreme gösterdiği görülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan DH10bDuet suşu ile bor tolerans seviyeleri karşılaştırılmış ve bor toleransı gösteren kolonilerin bor tolerans seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 3.28.).

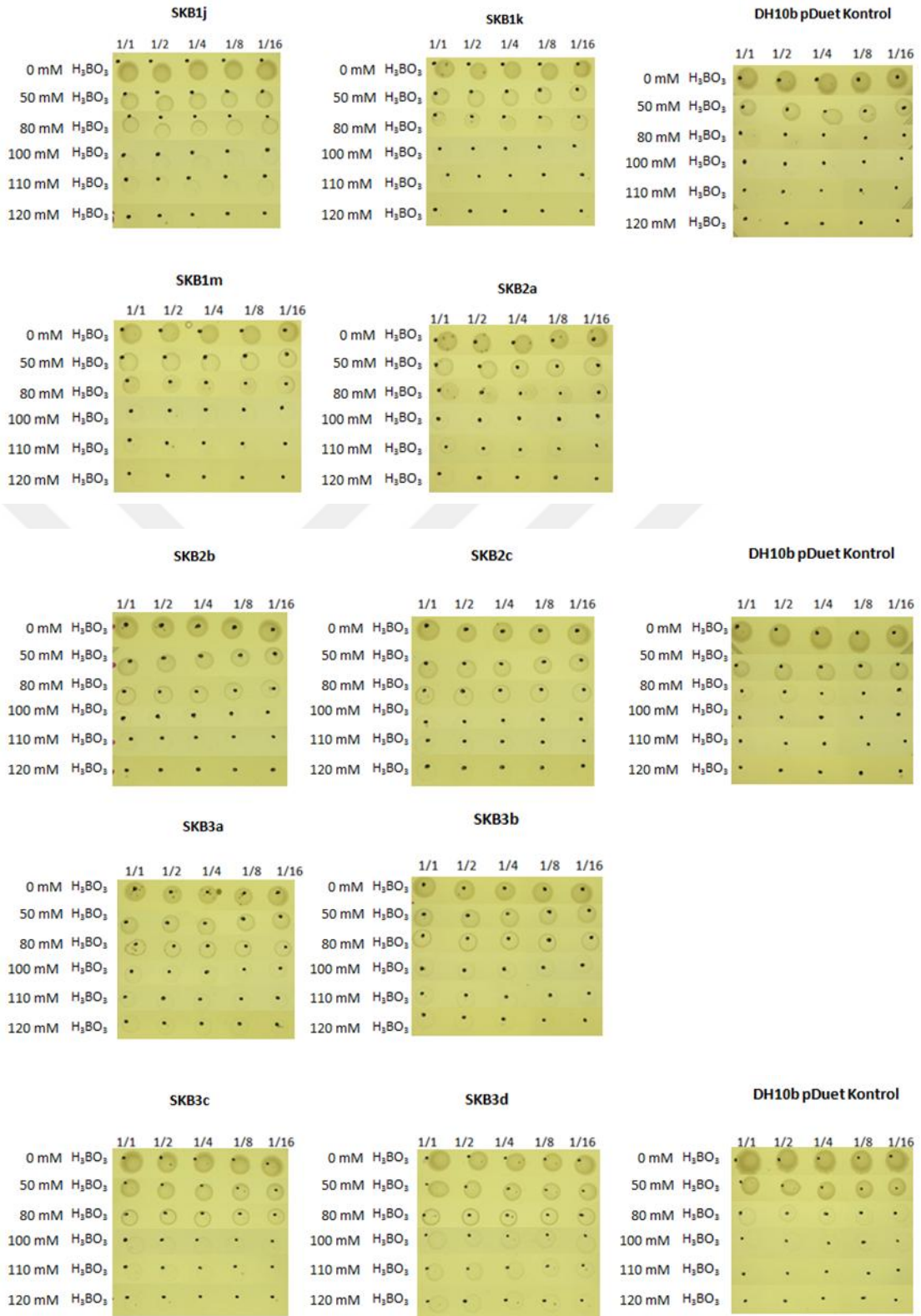




**Şekil 3. 28. BB62b2Y genomik kütüphanesinin direkt ekim seleksiyon yöntemi ile elde edilen tolerant kolonilerinin DH10bpDuet kontrolü ile birlikte bor tolerans nokta testi petri fotoğrafları**

BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyon sonucu elde edilen ve aktiveleştirilen SKB1a, SKB1b, SKB1c, SKB1d, SKB1e, SKB1f, SKB1g, SKB1h, SKB1j, SKB1k, SKB1m, SKB2a, SKB2b, SKB2c, SKB3a, SKB3b, SKB3c ve SKB3d olarak isimlendirilen bora tolerans gösteren 18 adet örnek belirlenmiştir. Bu örneklerin 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonucunda 15'i (SKB1a, SKB1b, SKB1c, SKB1d, SKB1e, SKB1f ve SKB1h, SKB1j, SKB1m, SKB2a, SKB2c, SKB3a, SKB3b, SKB3c ve SKB3d) 120 mM borik asit içeren LB-cm agar besiyortamında üreme göstermiştir (Şekil 3.29.).





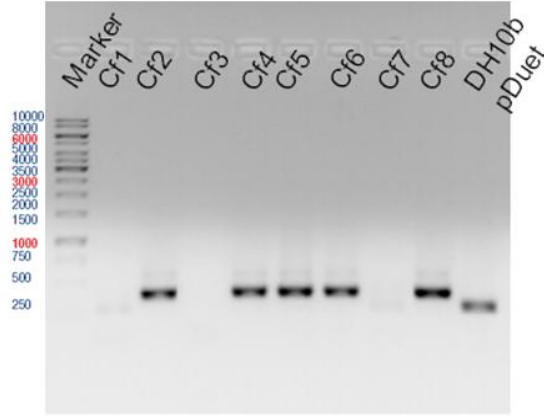
**Şekil 3. 29. BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonuyla belirlenen tolerant kolonileri DH10bpDuet kontrolü ile birlikte 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonuçlarının petri fotoğrafları**

Direkt ekim, çizgi ekim ve zenginleştirme ile seleksiyon sonucunda elde edilen 110 ve 120 mM borik asite tolerans gösteren transformant kolonilerdeki rekombinant plazmidlerin içerdiği insertleri tespit etmek için iki ayrı yöntem uygulanmıştır. Bunlardan birincisi PCR yöntemi, diğeri ise restriksiyon endonükleazlar ile kesim yöntemidir. BB872Y ve BB62b2Y genomik kütüphanelerinin ‘Bor Tolerans Nokta Testi’ sonucunda 110 ve 120 mM borik asite tolerans gösteren örneklerin PCR ile analizleri yapılmıştır. BB62b2Y genomik kütüphanesindeki tolerant kolonilerin plazmid ve insert içeriklerinin kontrolleri için, ilk olarak transformant kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ise PCR ve restriksiyon endonükleazlar ile kesimleri yapılarak plazmidlerin insert içerikleri analiz edilmiştir.

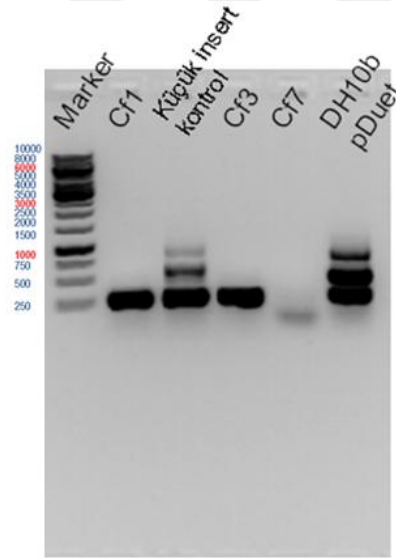
#### **3.4.2. Rekombinant plazmidlerdeki insertlerin büyüklüklerinin analizi için PCR yöntemi ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi**

Rekombinant plazmidlerin değerlendirilmesinde ilk olarak plazmidlerdeki insert bölgelerini çoğaltabilmek, insert varlıkları ve büyüklüklerini kontrol edebilmek için PCR yöntemi kullanılmıştır. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu sonucunda 8 adet tolerant koloni bulunmuş ve bu koloniler borik asit içermeyen katı besiyortamında canlandırılmış ve DuetUP ve DuetDOWN primerleri ile koloni PCR’ı yapılmıştır (Şekil 3.30.). Koloni PCR sonucunda Cf1, Cf3 ve Cf7 numaralı örnekler hariç, diğer bütün örnekler DH10bpDuet kontrolüne bakılarak karşılaştırıldığında örneklerin yaklaşık 400 bp küçük insert içerdikleri sonucuna varılmıştır. Bu örnekler sekanslanmamıştır. Çünkü elimizde daha önce sekanslanmış olan küçük insert içeren plazmid DNA stoklarımız mevcuttur. Bu örnekler sekansa gönderilmeden stok alınarak laboratuvarımızda saklanmaktadır. Cf1, Cf3 ve Cf7 numaralı örneklerin DuetUP ve DuetDOWN primerleri ile yapılan koloni PCR’ı çalışmamıştır. Bu örnekler (Cf1, Cf3 ve Cf7 örnekleri) diğerlerinden farklı olarak incelemeye alınmıştır. DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan bu PCR sonucunda ürün görülmemesinin sebebinin bu primerlerin ürünü çoğaltmadığı, bu sebeple de Cf1, Cf3 ve Cf7 numaralı örneklerin büyük insert içerdiği düşünülmektedir.

T7 Promotor ve T7 Terminatör primerleri ile tekrar koloni PCR yapılmıştır. %0,8'lik agaroz jele yüklenerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.31.).



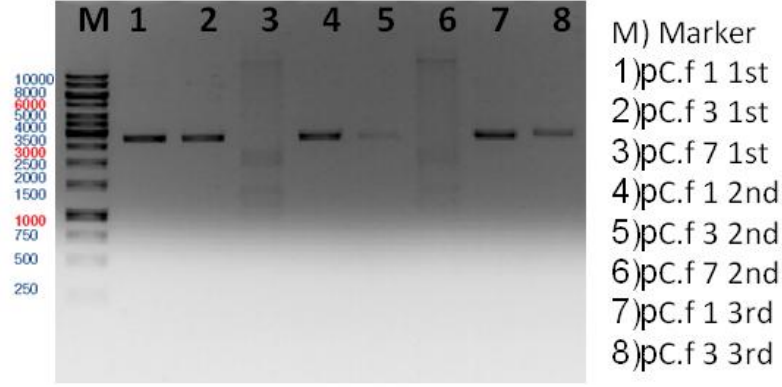
Şekil 3. 30. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonundan elde edilen tolerant kolonilerden DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın %0,8'lik agaroz jel görüntüsü



Şekil 3. 31. BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme yöntemi ile seleksiyonundan elde edilen tolerant Cf1, Cf3 ve Cf7 klonlarının insert büyüklüklerinin tespiti için T7 promotor ve T7 terminatör primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın %0,8'lik agaroz jel görüntüsü

T7 Promotor ve T7 Terminatör Primerleri ile yapılan koloni PCR'ının görüntüsüne bakılarak elimizdeki Cf1 ve Cf3 örneklerinin büyük insert içerdikleri sonucuna varılmıştır. Cf7 isimli örnekte bant görülmemesinin sebebinin, insert içeren plazmidin olmaması, plazmid olmaması, PCR'ın ürünü çoğaltamaması veya boş koloni olabileceği düşünülmüştür.

Buradan büyük insert içerdiği düşünölen Cf1, Cf3 ve Cf7 örnekerinin borik asit içermeyen LB-cm agar besiyortamına tek koloni ekimleri yapılmış ve ertesı günü tek bir kolonıye dokulunularak yayma ekimleri yapılmıştır. Rekombınant (insert içeren) plazmidler, Biomıga Mini Prep. plazmid izolasyon kiti ile izole edilmiştir (Şekil 3.32.).



Şekil 3. 32. pCf1, pCf3 ve pCf7 plazmid izolasyonununun %0,8'lik agaroz jel görüntüsü

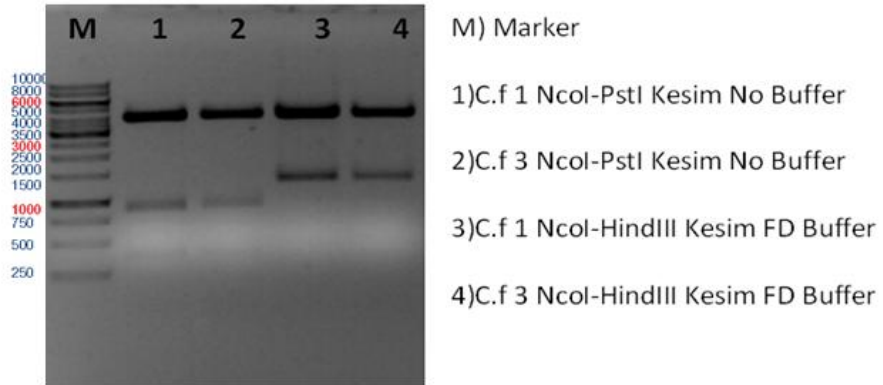
pCf7 örneğinin plazmid izolasyonu sonucu agaroz jel görüntüsüne bakıldığında bant görölmemiştir. Bu örneğın DuetUP-DuetDOWN primerleri ve T7 Promotor-T7 Terminatör primerleri ile yapılan PCR'ında da ürün görölmemiştir. Cf7 isimli örneğın boş koloni olduğu düşünölmektedir. pCf1 ve pCf3 örnekerinin, insert büyüklüğünü görebilmemiz ve klonlama yapılabilmesi için *NcoI-PstI* (Çizelge 3.7.), *NcoI-HindIII* (Çizelge 3.8.) restriksiyon endonökleazları ile kesimleri yapılmıştır. Kesimi yapılan plazmidler, 37°C'de 15 saat inkübe edilmiştir. Ardından 65°C'de 20 dakika inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Tüpler birleştirilerek 40 µl örnek %0,8'lik agaroz jele yüklenerak görüntüsü alınmış ve UV cihazında jelden kesimi yapılarak Fermentas Jelden Pürifikasyon kitinden geçirilmiştir (Şekil 3.33.).

**Çizelge 3. 7. pCf1 ve pCf3 insert içeren plazmidlerinin *NcoI-PstI* restriksiyon enzimleri ile kesimi**

	pCf1 (µl)	pCf3 (µl)
Plazmid DNA 2nd	7	7
Buffer 0	2	2
Plazmid DNA 1st	9	9
PstI	1	1
NcoI	1	1
	20*4	20*4

**Çizelge 3. 8. pCf1 ve pCf3 insert içeren plazmidlerinin *NcoI-HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesimi**

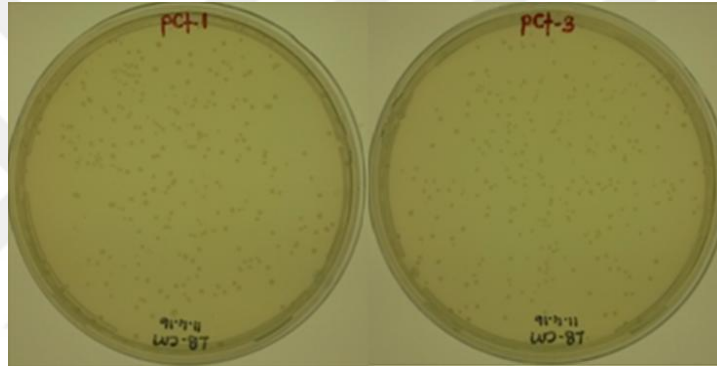
	pCf1 (µl)	pCf3 (µl)
Plazmid DNA 2nd	7	7
FD Buffer	2	2
Plazmid DNA 1st	9	9
HindIII	1	1
NcoI	1	1
	20*4	20*4



**Şekil 3. 33. pCf1 ve pCf3 insert içeren plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunun %0,8'lik agaroz jel görüntüsü**

pCf1 ve pCf3 insert içeren plazmidin, *NcoI*- *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu plazmid ve insert birbirinden ayrılmıştır. Kesim sonucu değerlendirildiğinde; pDuet plazmidi 4000 bp, insert ise 1500 bp büyüklüğündedir. *NcoI*-*PstI* restriksiyon enzimleri plazmid ve insertü birbirinden ayırmış, fakat insertü iki ayrı yerden kesmiştir. Bunlar ise 1000 bp ve 500 bp büyüklüğündedir. Subklonlama için kullanılacak restriksiyon enzimleri *NcoI*- *HindIII* olarak belirlenmiştir.

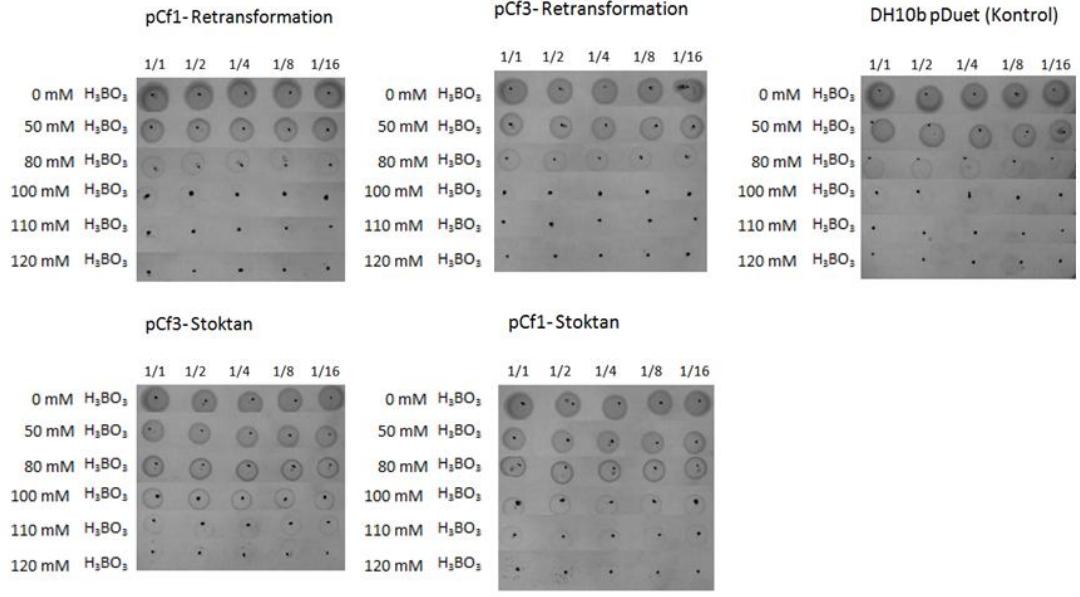
pCf1 ve pCf3 örnekleri, ısı şoku transformasyon yöntemi ile DH10b (*E. coli*) hücrelerine 0,5 µl transforme edilmiştir. Retransformasyon sonucu pCf1 örneğinde yaklaşık 540 koloni ve pCf3 örneğinde yaklaşık 520 koloni görülmüştür (Şekil 3.34.).



Şekil 3. 34. pCf1 ve pCf3 örneklerinin Retransformasyonu sonucu petri fotoğrafları.

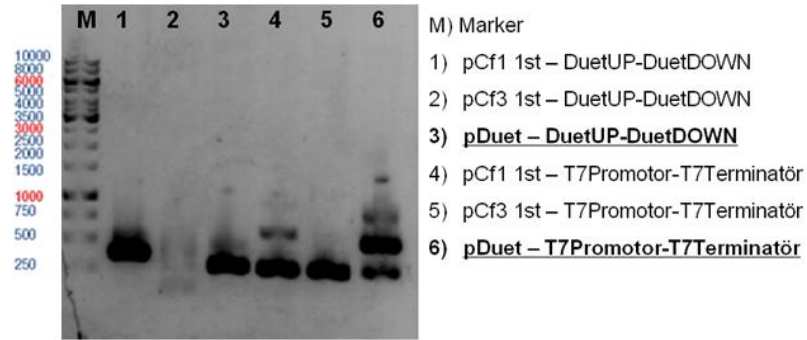
pCf1 ve pCf3 örneklerinin retransformasyonu sonucunda petrilere bir koloniye dokunularak LB-cm besiyortamında canlandırmaları yapılmıştır.

Canlandırma sonrasında 'Bor Tolerans Nokta Testi' (0, 50, 80, 100, 110 ve 120 mM borik asit içeren LB-cm besiyortamında) ile seleksiyona gidilmiştir. Kontrol olarak DH10bpDuet bir de zenginleştirme sonunda 120 mM borik asit içeren besiyortamında üreme gösteren stoklardan alınan pCf1 ve pCf3 kullanılmıştır. 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonuçları değerlendirilmiştir (Şekil 3.35.).



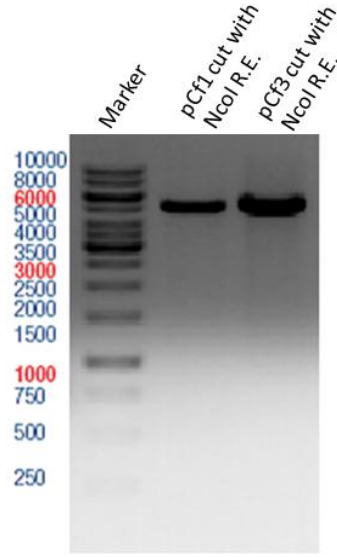
Şekil 3. 35. pCf1 ve pCf3 örneklerinin ‘Bor Tolerans Nokta Testi’ sonucu elde edilen petri fotoğrafları

Daha önce kolonilere dokunulup buradan DuetUP- DuetDOWN ve T7 Promotor-T7 terminatör primerleri ile PCR’ı gerçekleştirilen Cf1 ve Cf3 örnekleri, bu defa plazmid izolasyonu gerçekleştirilen pCf1 ve pCf3 tüplerinden aynı primerler ile PCR’ı yapılmıştır. %0,8’lik agaroz jel ile analiz edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.36.).

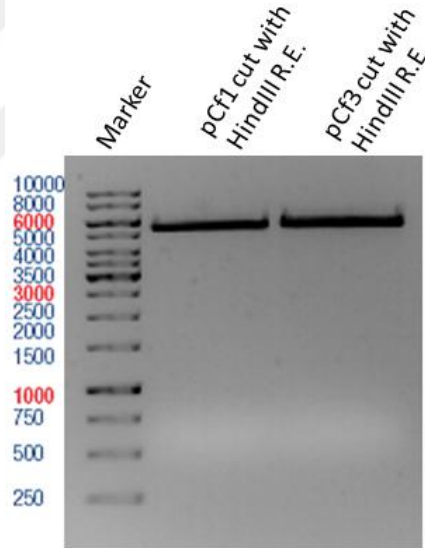


Şekil 3. 36. pCf1 ve pCf3 plazmidlerinin kalıp olarak kullanılarak DuetUp- DuetDOWN ve T7 Promotor-T7 terminatör primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Sekanslamada kullanılmak üzere, pCf1 ve pCf3 plazmidlerinin sadece *NcoI* restriksiyon endonükleaz (Şekil 3.37.) ve sadece *HindIII* restriksiyon endonükleaz ile kesimleri yapılmıştır (Şekil 3.38.).



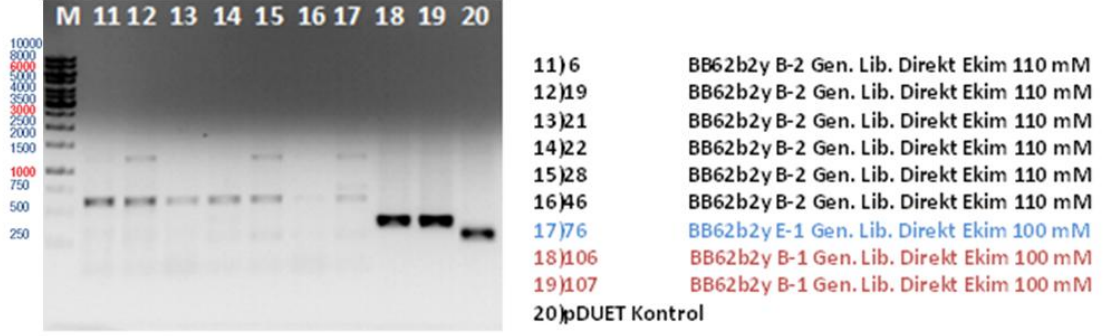
Şekil 3. 37. pCf1 ve pCf3 plazmidlerinin *NcoI* restriksiyon endonükleaz ile kesiminin %0,8'lik agaroz jel görüntüsü



Şekil 3. 38. pCf1 ve pCf3 plazmidlerinin *HindIII* restriksiyon endonükleaz ile kesiminin %0,8'lik agaroz jel görüntüsü

BB62b2Y genomik kütüphanesinin direkt ekim ile seleksiyonu sonucunda 10 adet tolerant koloni bulunmuştur. Bu koloniler borik asit içermeyen LB-cm agar besiyortamında canlandırılmış ve DuetUP ve DuetDOWN primerleri ile koloni PCR'ı yapılmıştır (Şekil 3.39.).

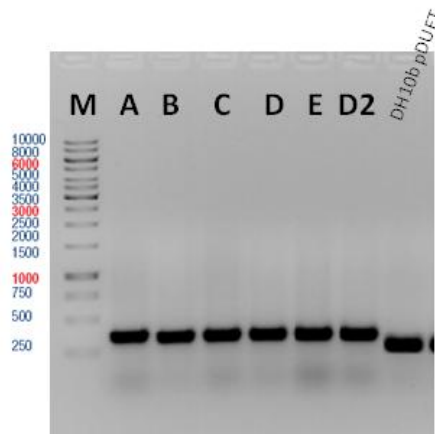
Koloni PCR sonucunda, DH10bpDuet kontrolüne bakılarak karşılaştırılma yapıldığında, 106 ve 107 numaralı örneklerin yaklaşık 400 bp büyüklüğünde insert içerdikleri, diğer örneklerin çalışmadığı görülmüştür. 106 ve 107 nolu plazmidlerin insert bölgeleri sekanslanmıştır.



Şekil 3. 39. BB62b2Y B–1 ve B–2 genomik kütüphanesinin 6, 19, 21, 22, 28, 46, 106 ve 107 numaralı tolerant örneklerinden DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü

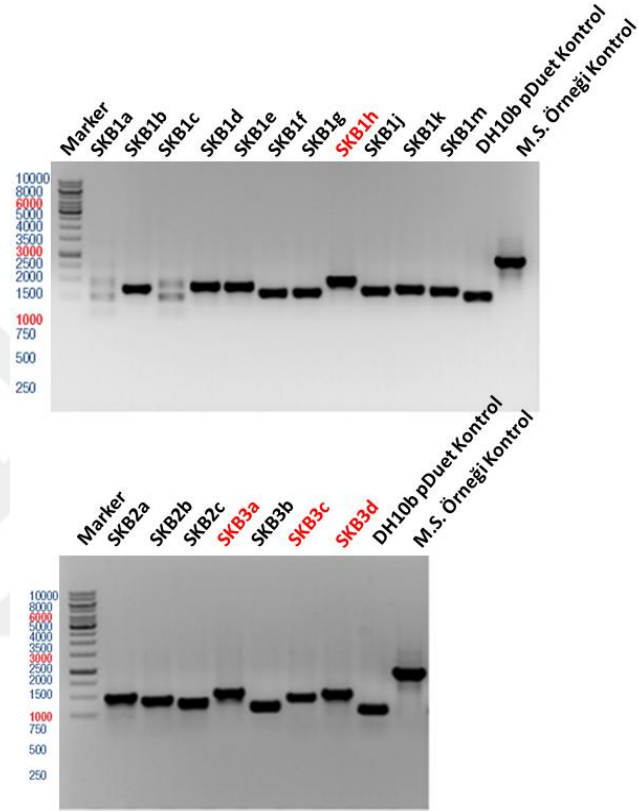
BB62b2Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu sonucunda 5 adet tolerant koloni bulunmuştur. Bu koloniler borik asit içermeyen LB-cm agar besiyortamında canlandırılmış ve DuetUP ve DuetDOWN primerleri ile koloni PCR'ı yapılmıştır (Şekil 3.40.).

Koloni PCR sonucunda, DH10bpDuet kontrolüne bakılarak karşılaştırılma yapıldığında A, B, C, D ve E örneklerinin yaklaşık 100 bp çok küçük insert içerdikleri görülmüştür. Örnekler sekanslanmamıştır.



Şekil 3. 40. BB62b2Y zenginleştirme ile seleksiyonu sonucu elde edilen tolerant kolonilerden DuetUP ve DuetDOWN primerleri kullanılarak yapılan PCR'ın %0,8'lik agaroz jel görüntüsü

BB872Y genomik kütüphanesinin zenginleştirme ile seleksiyonu sonucunda 18 adet tolerant koloni bulunmuştur. Bu koloniler borik asit içermeyen LB-cm agar besiyortamında canlandırılmış ve DuetUP ve DuetDOWN primerleri ile koloni PCR'ı yapılmıştır (Şekil 3.41). Koloni PCR sonucunda, DH10bpDuet kontrolüne bakılarak karşılaştırılma yapıldığında SKB1h, SKB3a, SKB3c ve SKB3d örneklerinin yaklaşık 400 bp büyüklüğünde insert içerdikleri görülmüştür. Bu örnekler sekanslanmıştır.

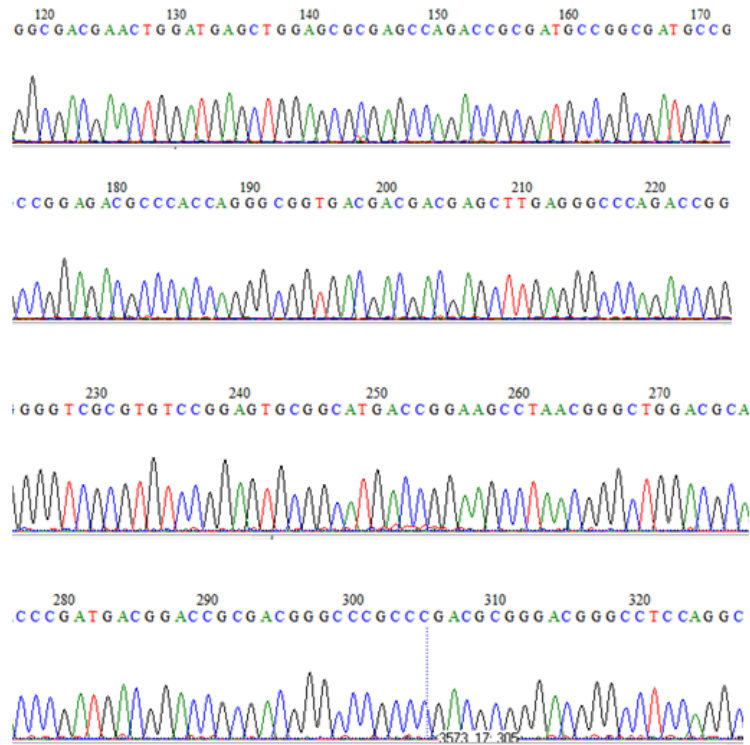


Şekil 3. 41. BB872Y I-2 genomik kütüphanesinin 'Bor Tolerans Nokta Testi' sonucu 120 mM borik asite direnç gösteren örneklerin DuetUP-DuetDOWN primerleri ile koloni PCR ürünlerinin %0,8'lik agaroz jeldeki görüntüsü

### 3.5. *Curtobacterium flaccumfaciens* Türüne ait Genomik Kütüphanesi Oluşturulan İzolatların, Bor Seleksiyonu Sonucu Plazmid İnsertlerinin DNA Dizi Analizi ve Sonuçları

Genomik kütüphanesi oluşturulan izolatların, bor tolerans seviyeleri tespit edildikten sonra bakteriye bu tolerans fenotipini kazandıran gen dizilerinin biyoinformatik analizleri yapılmıştır.

Bor seleksiyon sonrasında elde edilen tolerant kolonilerden pCf1 ve pCf3 rekombinant plazmidlerin izolasyonu yapılmıştır. Diğer tolerant kolonilerin pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c, pSKB3d, p106 ve p107'nin koloni PCR'ı yapılmıştır. İnsert içeren plazmidler için, ACYCDuetUP1 (5'-GGATCTCGACGCTCTCCCT-3') ve ACYCDuetDown1 (5'-GGATTATGCGGCCGTGTACAA-3') sekans primerleri kullanılmıştır. İnsert içeren plazmidlerin hizmet alımı ile DNA dizileri belirlenmiştir (Macrogen, Hollanda) (Şekil 3.42.). DNA dizi analizlerinin belirlenmesi sonucu, insertlerdeki klonlanan gen bölgelerinin analizleri için BlastN, BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ve BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) veri tabanları kullanılmıştır. Böylece *E. coli*'ye bor toleransı kazandıran insert DNA'sı içerisinde yer alan, aday genler veya proteinler tespit edilmiştir.



Şekil 3. 42. Sekans kromatogram sonuçlarından pCf1 insert sekansının bir kısmı

### 3.5.1. BB62b2Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen plazmid insert sekanslarının biyoinformatik analizleri

BB62b2Y genomik kütüphanesinin bor seleksiyonu sonucu elde edilen p106, p107 ve pCf1 plazmidlerinin NCBI- BlastX analizi sonucunda eşleşen gen dizileri Çizelge 3.9.'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. BB62b2Y insert sekanslarının NCBI-BlastX sonuçları

Plazmid Adı	Yaklaşık İnter Büyüklüğü	Plazmid İçeren Koloninin Borik Asit Toleransı	İnter Sekansının BlastX Sonucu Benzerlik Gösteren Gen veya Proteinler, Benzerlik Yüzdeleri
p106	200	120 mM	→ hipotetik protein [ <i>Curtobacterium</i> sp.] - % 95 → sinyal iletim histidin kinaz senX3 - %89
p107	200	120 mM	→ sinyal iletim histidin kinaz senX3 - %89 → nitrat redüktaz [ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ] - % 100 → ABC taşıyıcı permeaz [ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ] - % 100 → hipotetik protein [ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ] - % 89
pCf 1 (NcoI insert)	612	110 mM	→ alfa-galaktosidaz [ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ] - % 92 → hipotetik protein [ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ] - % 97 → klorür kanal protein [ <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ] - % 95

### 3.5.2. BB872Y izolatının genomik kütüphanesinden elde edilen plazmid insert sekanslarının biyoinformatik analizleri

BB872Y genomik kütüphanesinin bor seleksiyonu sonucu elde edilen pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c ve pSKB3d plazmidlerinin NCBI- BlastX analizi sonucunda eşleşen gen dizileri Çizelge 3.10.'da verilmiştir.

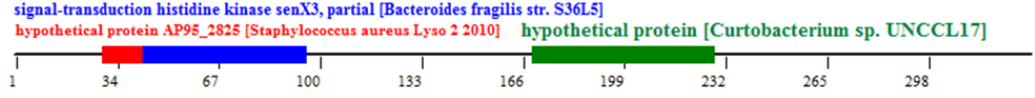
Çizelge 3.10. BB872Y insert sekanslarının NCBI- BlastX sonuçları

Plazmid Adı	Yaklaşık İncert Büyüklüğü	Plazmid İçeren Koloninin Borik Asit Toleransı	İncert Sekansının BlastX Sonucu Benzerlik Gösteren Gen veya Proteinler, Benzerlik Yüzdeleri
pSKB1h	350	120 mM	→ pantotenat kinaz [Curtobacterium sp.] - % 100 → tip I pantotenat kinaz [Curtobacterium flaccumfaciens]- % 95 → sinyal iletim histidin kinaz senX3 - % 89
pSKB3a	360	120 mM	→ peptit ABC taşıyıcı permeaz [Curtobacterium sp.] - % 100 → peptidil-prolil cis-trans izomeraz [Curtobacterium flaccumfaciens] - % 93 → hipotetikal protein [Curtobacterium flaccumfaciens] - % 84
pSKB3c	250	120 mM	→ hipotetikal protein - % 93 → sinyal iletim histidin kinaz senX3- % 89
pSKB3d	380	120 mM	→ tip I pantotenat kinaz [Curtobacterium sp.] - % 100 → pantotenat kinaz [Curtobacterium flaccumfaciens UCD-AKU] - % 95 → hipotetikal protein - % 93 → sinyal iletim histidin kinaz senX3 - % 89

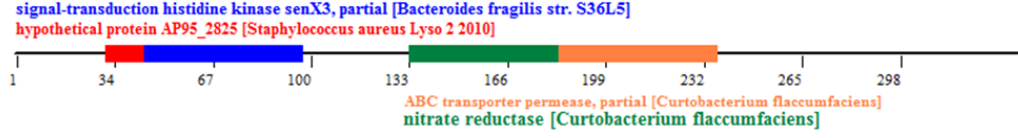
#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, binlerce koloniyi içeren BB62b2Y-1, BB62b2Y-2 (jelden kesilerek hazırlanan) ve BB872Y genomik kütüphaneleri elde edilmiş ve stoklanarak çalışmalarda kullanılmak üzere laboratuvarında saklanmıştır. Elde edilen bu 3 genomik kütüphanede Bor'a tolerans gösteren klonların tespit edilebilmesi için, borik asit içeren ortamlarda farklı seleksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Genomik kütüphanesi oluşturulan *Curtobacterium flaccumfaciens* türüne yakın olan bu üç izolatta bulunan, yüksek konsantrasyonda borik asite tolerans sağlanmasında görevli olabilecek aday genlerin bulunabilmesi için sekans analizleri yapılmış ve BioEdit programı ile insert haritaları çıkartılmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). BB62b2Y genomik kütüphanesinden seleksiyonlar sonucu elde edilen p106 ve p107 plazmidlerin bulunduğu klonların yaklaşık 120 mM borik aside direnç gösterdiği saptanmıştır. Bu plazmidlerde bulunan insert DNA dizilerinin, hipotetik protein, sinyal iletim histidin kinaz senX3, nitrat redüktaz, ABC taşıyıcı permeaz aday genlerine benzerlik gösterdiği görülmüştür. BB62b2Y-2 genomik kütüphanesinin, 110 mM borik aside direnç gösteren kolonilerinde bulunan pCf1 ve pCf3 kodlu plazmidlerin insert bölgelerindeki DNA dizilerinin, klorür kanal proteini ve alfa-galaktosidaz gen bölgelerine benzer oldukları tespit edilmiştir. BB872Y genomik kütüphanesinden elde edilen ve 120 mM borik aside dirençli oldukları düşünülen toleran kolonilerdeki pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c ve pSKB3d kodlu plazmidlerde peptit ABC taşıyıcı permeaz, peptidil-prolil cis-trans izomeraz, tip I pantotenat kinaz ve pantotenat kinaz aktivitelerine benzer gen bölgeleri belirlenmiştir.

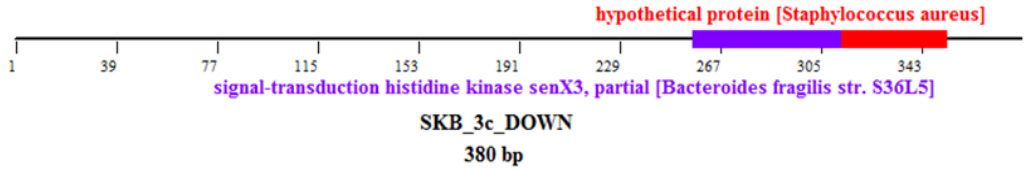


**106\_UP**  
331 bp

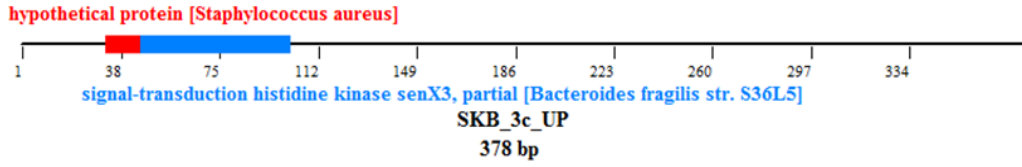


**107\_UP**  
337 bp

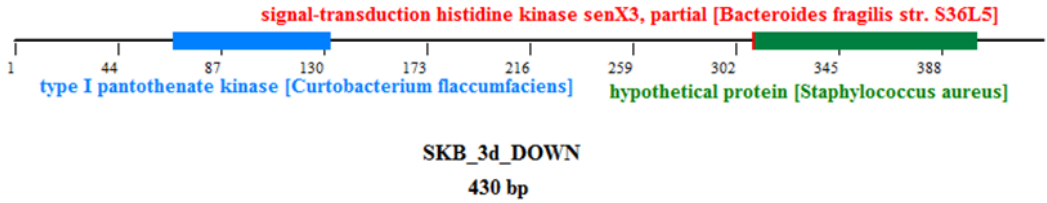
Şekil 4. 1. BB62b2Y genomik kütüphanesinden elde edilen p106 ve p107 rekombinant plazmidlerinin insert sekanslarının haritaları



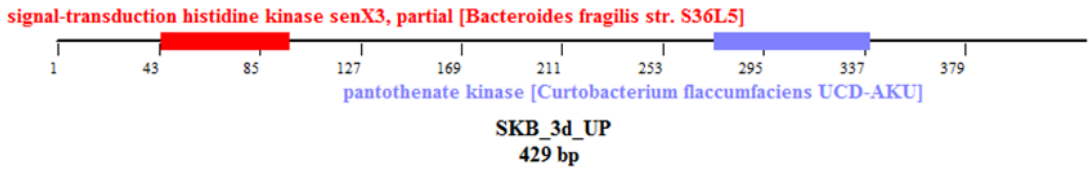
**SKB\_3c\_DOWN**  
380 bp



**SKB\_3c\_UP**  
378 bp



**SKB\_3d\_DOWN**  
430 bp



**SKB\_3d\_UP**  
429 bp

Şekil 4. 2. BB872Y genomik kütüphanesinden elde edilen pSKB1h, pSKB3a, pSKB3c ve pSKB3d rekombinant plazmidlerinin insert sekanslarının haritaları

Bu çalışmada bulunan aday gen aktivitelerinin bor toleransı ile ilgili ilişkilerini ispat edebilmek için daha fazla ve kapsamlı deneylere ihtiyaç vardır. Bunlar arasında mutant oluşturma çalışmaları ve yabancı tip ile fenotip açısından karşılaştırmalar ve gen ekspresyon analiz çalışmaları sayılabilir. Bunun yanında bazı protegenomik çalışmalar da gerekebilir. Bu tür çalışmaların bundan sonraki projelerde yapılması ve olası bulguların bu tezin bulguları ile örtüşmesi ve geliştirilmesi sonucu, elde edilen aday bor genleri için fonksiyon atfetmede daha kesin ve etkili yorumlar ve mekanizma açısından bağlantılar önerilebilir. Ancak bu aşamada yapılabilecek olan, bu aday aktivitelerin genel olarak görevleri veya fonksiyonlarını literatüre başvurarak belirtmektir.

#### **4.1. Hipotetik Proteinler**

Hipotetik proteinler; biyokimyada, varsayımsal bir protein, varlığı tahmin edilen ancak in vivo olarak ifade edildiğine dair deneysel kanıt bulunmayan proteinlerdir. Yüzlerce genomun dizilimi sonucunda, işlevlerin kolayca atanamayacağı, çok sayıda öngörülen açık okuma çerçevesinin önerilmesine neden olmuştur. Varsayımsal proteinler olarak bilinen bu proteinler, her yeni dizilenen genomda kodlanan proteinlerin yaklaşık % 20-% 40'ını oluşturmaktadır. Bazı durumlarda gen ürününün, kütle spektrometresi gibi tekniklerle ifade edildiğine dair yeterli kanıt olabilsede dahi, açıklamalı biyokimyasal fonksiyon eksikliğinden dolayı bazı protein dizilerine spesifik bir fonksiyon atamak zordur. Günümüzde çoğu protein dizisi, genomik DNA dizisinin hesaplamalı analizleri sonucu çıkarılmaktadır. Hipotetik proteinler genetik analiz sırasında gen tahmin yazılımıyla oluşturulmaktadır. Ayrıca, hipotetik proteinlerin fonksiyonlarını açıklama yaklaşımları, bu proteinlerin 3 boyutlu yapısının belirlenmesini, prostetik grubunun/metal iyon bağlanmasının doğasını ve biçimini anlama, bilinen fonksiyonların diğer proteinleri ile benzerlik katlama ve muhtemel katalitik bölgeye not vermeyi içermektedir. Çeşitli substratların taranmasıyla biyokimyasal fonksiyon değerlendirmesi ile yapı öngörüsü, fonksiyona açıklama yapmak için umut vadeden bir yaklaşımı oluşturmuştur (Eisenstein, 2000). Bu tez çalışmasında bulunan spesifik hipotetik proteinin bor toleransı ile olan olası ilişkisi literatüre ek bir bilgi sağlamıştır.

## 4.2. Histidin Kinaz (HK) Aktivitesi

Bu tez çalışmasında bulunan bir diğer aday aktivite olan, sinyal dönüştürücü histidin kinazlar, mikroorganizmalardaki gelişimin başlatılması gibi karmaşık işlemleri kontrol eden iki komponentli sinyal iletim sistemlerinde anahtar unsurlardır. Histidin kinaz için yaygın örneklerden, osmoregülasyonda merkezi bir rol oynayan EnvZ ve kemotaks sisteminde merkezi bir rol oynayan CheA verilebilir. Histidin kinazlar genellikle bir N-terminal ligand bağlama alanına ve bir C-terminal kinaz alanına sahiptir, ancak diğer alanlar da mevcut olabilir. Kinaz bölgesi, histidinin ATP ile otofosforilasyonundan, kinazdan tepki regülatörünün bir aspartatına fosfotransferinden ve aspartil fosfattan ADP'ye veya suya fosfotransferinden sorumludur (Bhate vd., 2015).

Histidin kinazlar (HKs), bakteriyel sinyallemede önemli oyuncularlardır. Sinyallerin bu ailenin protein yapılarına iletiildiği ve bu yapılar boyunca iletiildiği mekanizmalar hakkında bilgi vermek için HKs yapıları analiz edilmiştir. Bilinen enzimolojik veriler; dimer arayüzündeki asimetriğin HKs'deki sinyal iletiminin anahtar bir özelliğinin nasıl olduğunu göstermek için yeni yapısal veriler bağlamında yorumlamalar yapılmış ve sinyal iletiminde, kataliz sırasında farklı HK alanlarının asimetrik-simetrik geçişleri nasıl geçirdikleri tartışılmıştır. Bu çeşitli özellikleri içeren bir sinyal iletimi için termodinamik bir çerçeve sunulmakta ve zayıf termodinamik bağlamanın sonuçları tartışılmaktadır. Enzimoloji, yapısal biyoloji, protein mühendisliği ve termodinamik gözlemlerin sentezi histidin kinaz sinyal iletiminin daha derin bir moleküler anlayışının yolunu açmıştır (Bhate vd., 2015).

Bu spesifik aktivite ile bor tolerans arasında olası bir ilişki bulunması ilginç bir bulgudur ve borun hücre tarafından algılanmasında rolü olup olmayacağını daha detaylı ve farklı çalışmalar ile test edilmesini önermekteyiz.

### 4.3. Nitrat Redüktaz Aktivitesi

Nitrat redüktazlar; nitrat nitrite indirgeyen molibdo enzimlerdir. Bu reaksiyon çoğu tarım bitkisinde protein üretimi için kritiktir. Çünkü nitrat, toprakta azot kaynağıdır. Ökaryot nitrat redüktazlar, molibdo enzimlerin sülfid oksidaz ailesinin bir parçasıdır. Elektronları NADH veya NADPH'den nitrata aktarırlar. Prokaryot nitrat redüktazlar, molibdoenzimlerin DMSO redüktaz ailesine aittir ve asimilat nitrat redüktazları (Nas), solunum nitrat redüktaz (Nar) ve periplazmik nitrat redüktazları (Nap) olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Blasco vd., 1990). Bu spesifik aktivite ile bor toleransı arasında doğrudan bir ilişki için hipotez kurmak, eldeki verilerle henüz mümkün değildir. Bu aktivitenin bor toleransı ile ilişkisi ya yoktur ya da dolaylı bir yoldan olabilir.

### 4.4. ABC Taşıyıcı Permeaz Aktivitesi

ABC taşıyıcı permeaz; 76 ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı sistemi, entegre membran permeazlar (bilinen ve tahmin edilen) *E. coli* K-12'de bulunduğu bilinmektedir. Çoğunlukla Pfam PF00528 ailesindeki 50 üye tarafından tanımlanırlar. PF1032 (FecCD) [COG0609, COG4139, COG4779] ailesinden ilave olarak 6 tane permeaz vardır: FecC, FecD, FepD, BtuC, FhuB, FepG; 4 permeaz, PF01061/COG0842 (ABC2\_membran) familyasından gelmektedir: YadH, YbhR, YbhS, YhhJ; 6 permeaz/ATP'ye bağlanan füzyon proteinleri: MdlA, MdlB, MsbA (COG1323); CydC (COG4987); CydD (COG4988); Yoji (COG4615). RbbA, permeaz/ATP'ye bağlanan füzyon proteinlerine (COG1123) homologdur. ABC taşıyıcıları, ATP bağlayıcı proteinler veya trafik ATPaz olarak da bilinen çözünebilir sitoplazmik ATPaz altbirimleri olarak adlandırılmaktadır. İç membran translokasyonu, ilişkili permeaz altbirimleri veya alanlar tarafından kolaylaştırılmaktadır (Schneider vd., 1998).

İç membran ABC taşıyıcıları, permeaz ve periplazmik bağlayıcı protein alt birimlerini içerebilir. Dış membran ABC taşıyıcıları, TolC gibi dış zar faktörü (OMF) proteinleri ve spesifik zar-füzyon proteinleri ile çalışan permeaz proteinleri veya domainleri içerebilmektedir. Çoğu ABC ailesinden ATP'ye bağlanan proteinlerin, çok bileşenli ABC taşıyıcılarının ABC permeazlarına enerji sağlayan ATPaz olduğu gösterilmiştir; bazı ABC ailesi ATPazlar, nakil dışı işlemler için enerji sağlamaktadır (Davidson vd., 2008).

Bor toleransı ile ABC proteinleri arasında, borun hücrelerarası, içi veya dışı translokasyonunda bir ilişkinin olduğu ihtimali yüksektir ve söz konusu aday aktivite ileriki çalışmalar için önemlidir.

#### **4.5. Klorür Kanal Proteini Aktivitesi**

Klorür kanal proteini, klorid kanalları olarak bilinen, klorür için spesifik anlaşılmış iyon kanallarının süper aileleridir. Bu kanallar birçok farklı iyonu idare edebilir. Bu yüzden belki borun farklı formları ile ilişkisi olabilir. Ancak bu aktivite, *in vivo* konsantrasyonu diğer anyonlardan çok daha yüksek olduğu için klorür olarak adlandırılmıştır. Voltaj kapılı kanalların ve ligand kapılı kanalların (örneğin CaCC aileleri) bazı aileleri insanlarda da karakterize edilmiştir (Jentsch vd., 2002).

Voltaj kapılı klorür kanalları, pH, hacim homeostasi, organik çözünen taşınım, hücre göçü, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi çeşitli fizyolojik ve hücre rolere sergilemektedir. Dizi homolojisine dayanarak, klorür kanalları bir takım gruplara ayrılabilir. Voltaj kapılı klorür kanalları hücre dinlenme membranı potansiyelinin ayarlanması ve uygun hücre hacminin korunması için önemlidir. Bu kanalların yapısı diğer bilinen kanallara benzemez. Çünkü klorürün yanı sıra  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{SCN}^-$  ve  $\text{NO}_3^-$  gibi diğer anyonlar için de rol alabilir. Klorür kanal altbirimleri 1 ila 12 transmembran segmenti içerir. Bazı klorür kanalları sadece gerilimle aktive edilirken diğerleri  $\text{Ca}_2^+$ , diğer hücre dışı ligandlar veya pH ile aktive edilebilir. CLC (klorür kanal) grubu ailesi, 10 veya 12 transmembran heliks içerir.

Her protein tek gözenek oluşturur. Bu ailenin bazı üyelerinin homodimerler oluşturduğu gösterilmiştir. Primer yapı açısından, bilinen katyon kanalları veya diğer anyon kanalları türleriyle ilgisi yoktur. Klorid kanalları, bitki hücrelerinde güvenli iyon konsantrasyonlarının korunması için de önemlidir (Jentsch vd., 2002).

#### **4.6. Alfa-Galaktosidaz**

Alfa-galaktosidaz hayvanlarda ve bitkilerde yaygındır. *Escherichia coli*'den alfa-galaktozidaz (alfa-Gal), karmaşık karbonhidratların ve glikoproteinlerin indirgeyici olmayan ucundan alfa 1,3-bağlı ve alfa 1,6-bağlantılı galaktozidlerin çıkarılması için kullanılır. Alfa-Gal, bir alfa-D-galaktosil-sükroz olan rafinozu etkili bir şekilde D-galaktoz ve sükroza hidroliz eder. Enzim aynı zamanda melibiyoz, stakyoza, verbaskoz ve galaktinol gibi diğer alfa-galaktozidleri de hidrolize edebilir. Enzim laktoz gibi beta bağlantılı galaktozu parçalamaz (Schmid vd., 1976). Bu spesifik enzim ile bor stresi veya diğer stres türleri arasındaki ilişki daha fazla araştırılmalıdır.

#### **4.7. Peptidil-Prolil Cis-Trans İzomeraz Aktivitesi**

Peptidil-prolil cis-trans izomeraz; PPIaz proteinlerin katlanmasını hızlandırır. Oligopeptidlerdeki proline imidik peptid bağlarının cis-trans izomerleşmesini katalizler. İnsan siklofilinin bir homologu olan "rotamaz" olarak adlandırılan prokaryot peptidil-prolil cis-trans-izomeraz, *Escherichia coli*'de tanımlanmıştır (Liu vd., 1990) Bu aktivitenin bor toleransı ile ilişkisini araştırmak için, ortolog mutantların fenotipleri araştırılabilir.

#### 4.8. Pantotenat Kinaz

Pantotenat kinaz (EC 2.7.1.33, PanK; CoaA) Koenzim A biyosentetik yolundaki ilk enzimidir. Adenozin trifosfat (ATP) molekülü 4'-fosfopantotenat oluşturmak için pantotenatı (vitamin B5) fosforile eder. CoA'nın biyosentezinde hız sınırlayıcı adımdır. CoA tüm canlı organizmalarda gerekli bir kofaktördür. Sitrik asit döngüsü (trikarboksilik asit döngüsü) ve yağ asidi metabolizması gibi birçok önemli hücre prosesinde ana asil grup taşıyıcısı görevi görür. Sonuç olarak, pantotenat kinaz CoA biyosentetik yolunda anahtar düzenleyici bir enzimidir (Liu vd., 1990). Bu enzim ile bor toleransı arasındaki ilişki bazı gen ekspresyon deneyleri ile araştırılabilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında, *Curtobacterium* cinsine ait bazı bakteri izolatlarında bor toleransı veya stresinde görev alabilme ihtimali olan aday genler bulunmuştur. Bu aday gen bilgilerinin bundan sonraki çalışmalar için kullanılması önerilmekte ve literatür için katkı ve yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Antonio C. M. ve Renata C.C. (2006) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* Detection in Bean Seeds Using a Semi-Selective Culture Medium Brazilian Journal of Microbiology, 37:451-455 ISSN 1517-8382.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. (2003) Current Protocols in Molecular Biology, ISBN:047150338X.

Bhate M., Molnar K., Goulian M. ve Degrado W. (2015) Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures, Jun 2; 23(6):981-994, PMID: PMC4456306.

Blasco F., Iobbi C., Ratouchniak J., Bonnefoy V. ve Chippaux M. (1990) Nitrate Reductases of *Escherichia coli*: Sequence of the Second Nitrate Reductase and Comparison with that Encoded by the narGHJI operon, 222 (1): 104–11, PMID 2233673.

‘Bor Raporu’ TMMOB Maden Mühendisleri Odası Dergisi, Cilt: IX, Sayı: 2-3.

‘Bor Sektör Raporu’ Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Mayıs 2014.

‘Bor Sektör Raporu’ Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Mayıs 2015.

BOREN Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (2014), [www.boren.gov.tr](http://www.boren.gov.tr)

BOREN Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (2017), Stratejik Plan Raporu, [www.boren.gov.tr](http://www.boren.gov.tr)

Bruel L., Sulzenbacher G., Tison M. C., Pujol A., Nicoletti C., Perrier J., Gelinier A., Ropartz D., Fons M., Pompeo F. ve Giardina T. (2011),  $\alpha$ -Galactosidase/Sucrose Kinase (AgaSK), a Novel Bifunctional Enzyme From the Human Microbiome Coupling Galactosidase and Kinase Activities The Journal of Biological Chemistry, Nov 25; 286(47): 40814-40823.

- Bulgari D., Minio A., Casati P., Quaglino F., Delledonne M. ve Bianco P. A. (2014) *Curtobacterium* sp. Genome Sequencing Underlines Plant Growth Promotion-Related Traits, Genome Announc. 2(4):e00592-14. doi:10.1128/genomeA.00592-14.
- Chen, Y. F., Yin, Y. N., Zhang X.M., ve Guo J. H. (2007) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola*, a New Pathovar of Pathogens in Sugar Beet Plant Dis. 91:677-684.
- Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*, Data Sheets on Quarantine Pests, Prepared by CABI and EPPO for the EU under Contract 90/399003
- Çalık A. (2016) Türkiye'nin Bor Madenleri ve Özellikleri, S.D.Ü. Teknik Eğitim Fakültesi Makina Eğitimi Bölümü, Cilt: 43, Sayı: 508.
- Collins M. D. ve Jones D. (1983) Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsem'ae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov., Journal of General Microbiology 129, 3545-3548.
- Çöl B. (2011) Bor ve Bakteri İlişkisinin Moleküler, Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Yaklaşımlarla Araştırılması, TÜBİTAK Proje Rapor No: 107T796.
- Davidson A., Dassa E., Orelle C. ve Chen J. (2008) Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems Microbiol Mol Biol Rev., Jun;72(2):317-64, doi: 10. 1128/MMBR.00031-07.
- Demirtaş A. (2005), Bitkide Bor ve Etkileri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 36 (2), 217-225, ISSN: 1300-9036.
- Didienne R, Defargues C, Callon C, Meylheuc T, Hulin S, Montel MC (2012) Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ("gerles") in PDO Salers cheese, Int. J. Food Microbiol. 156:91–101.
- Doğan M. (2012) Farklı Bor Uygulamalarının *Capparis* L. spp. ve *Carthamus* L. spp. Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 16-2, 154-161.

- Dutzler R., Campbell E. B. ve MacKinnon R. (2003) Gating the Selectivity Filter in ClC Chloride Channels *Science (Journal)*, 300 (5616): 108–12. DOI:10.1126/science.1082708. PMID 12649487.
- Eisenstein E. (2000) Biological Function Made Crystal Clear-Annotation of Hypothetical Proteins Via Structural Genomics *Curr Opin Biotechnol*, 11(1):25–30, PMID 10679350.
- Eren M. (2004) Bor'un Biyolojik Önemi ve Metabolizma Üzerine Etkileri Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(1) 55-59s.
- EPPO (1990) Specific quarantine requirements. *EPPO Technical Documents* No. 1008.
- Funke G., Aravena-Roman M. ve Frodl R. (2005) First Description of *Curtobacterium* spp. Isolated From Human Clinical Specimens *J. Clin. Microbiol.*43:1032–1036.
- Flanagan J. C., Lang J. M., Darling A. E., Eisen J. A. ve Coil D. A. (2013) Draft Genome Sequence of *Curtobacterium flaccumfaciens* Strain UCD-AKU (Phylum *Actinobacteria*) Genome Announc. 1(3):e00244-13. doi:10.1128/genomeA.00244-13.
- Georg S. R. ve Joseph W. K. (1998) Department of Plant Pathology, Alabama Agriculture Experiment Station, and Biological Control Institute, Auburn University, AL 36849-5409.
- Harveson R. M. Ve Urrea C. A. (2011) Bacterial Wilt of Dry Beans in Western Nebraska, University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources (NebGuide) G1562.
- Jentsch T. C., Thomas J., Stein V., Weinreich F. ve Zdebik A. A. (2002) Molecular Structure and Physiological Function of Chloride Channels *Physiological Reviews*, 82 (2): 503–568, PMID 11917096.
- Kartal S. N. ve Unamura Y. (2004) Borlu Bileşiklerin Emprenye Maddesi olarak Ağaç Malzeme ve Kompozitlerde Kullanımı, *Ü. Uluslar arası Bor Sempozyumu*, 23-25 Eylül, Eskişehir.

- Liu J. ve Walsh C. T. (1990) Peptidyl-Propyl Cis-Trans Isomerase From *Escherichia coli*: Periplasmic Homolog of Cyclophilin that is not Inhibited by Cyclosporin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Jun;87(11):4028-32.
- Robert M. H., Carlos A. U. ve Howard F. S. (2011) Bacterial Wilt of Dry Beans in Western Nebraska, NebGuide, G1562.
- Sambrook J. ve Russell D. W. (2006) The Condensed Protocols From Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Cold Spring Harbor, New York.
- Schneider E. ve Hunke S. (1998) ATP-Binding-Casette (ABC) Transport Systems: Functional and Structural Aspects of the ATP-Hydrolyzing Subunits/Domains FEMS Microbiol Rev., Apr;22(1);1-20.
- Sezer M. (2013) *Yüksek Bor Toleransı Gösteren Bacillus ve Staphylococcus Cinsine Ait Bazı İzolatların Genomlarının Fragmentize Edilerek Kısmi Klonlanması ve Bor Direnci İle İlgili Genlerin Araştırılması* Muğla SK Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Kurt S. and Rüdiger S. (1976) Raffinose Metabolism in *Escherichia coli* K12 Eur. FEBS Journal, 95-104.
- Tegli S., Sereni A. ve Surico G. (2002) PCR-Based Assay for the Detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in Bean Seeds Letters in Applied Microbiology, 35, 331–337.
- TMMOB Türk Mühendis ve Mimar Odaları Birliği Bor Raporu (2016), ISBN 978-605-01-0883-5.
- TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Bor Raporu (2003), [https://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi134/d134\\_1158.pdf](https://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi134/d134_1158.pdf).
- Yang K., Eyobo Y., Leisl A., Martynowski D., Tomchick D., Strauss E. ve Zhang H. (2006) Crystal Structure of a Type III Pantothenate Kinase: Insight into the Mechanism of an Essential Coenzyme a Biosynthetic Enzyme Universally Distributed in Bacteria Journal of Bacteriology, 188(15):5532–5540, PMC1540032, PMID 16855243.

Yenialaca Ç. (2009) *Bor ve Kullanım Alanları* Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Anabilim Dalı Fizik Eğitimi Bilim Dalı, Ankara, 35.

Zirai Karantina Yönetmeliği, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Resmi Gazete, 2009, Sayı: 27137.

Warrington K. (1923), The Effect of Boric Acid and Borax on the Broad Bean and Eertain Other Plants, *Annals of Otany*, 37, 457-466.



## **EK A. İnsert Bölgelerinin Sekans Dizileri**

### **>p106-UP**

CTCTAGTATATACGACTCACTATAGGGGATTGTGAGCGGATAACAATTCC  
CCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGGCA  
GCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCAGGGACACAAGCACCA  
CGGCGAGCACGATCAGCGATGTGCTGTCGAACCCCTTCACGGCGGCCCCG  
GCGAGCGCCATCACGCCAATCGGCGCGAGGATCCGAATTCGAGCTCGGC  
GCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACA  
GAAAGTAATCGTATTGTACACGCCCGCATAATCA

### **>p107-UP**

CTCCAAGCCATATACGACTCACTATAGGGGATTGTGAGCGGATAACAATT  
CCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGG  
CAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCGGTCTGCCGGACTTC  
ACCGCTCCCGCCTTCGACCCGTCCCAGCTCCCGATCATGTAGCGGATCGA  
CGAGTCGAGGCTCAGCAGGGTGAGCCCGTTCGAGATCCGAATTCGAGCT  
CGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGA  
ACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGCCCGCATAATCA

**>pCf1- NcoI\_ DuetDOWN**

CATCCCGTTTTGAATTAGCATTATGCGGCCGCAAGCTTGTCGACCTGCAG  
GCGCGCCGAGCTCGAATTCGGACGATGCGTCGGCGGCCTCGAGGTGCC  
GCCGAACCCGTACCCGAAGGCGACGAACTGGATGAGCTGGAGCGCGAGC  
CAGACCGCGATGCCGGCGATGCCGCCGGAGACGCCACCAGGGCGGTGA  
CGACGACGAGCTTGAGGGCCAGACCGGGGTCGCGTGTCCGGAGTGCGG  
CATGACCGGAAGCCTAACGGGCTGGACGCACCCGATGACGGACCGCGAC  
GGCCCCGCCGACGCGGGACGGGCCTCCAGGCCGGGAGCCCCGACCACC  
CGCCGTCAGACGGCCGTCAGCCGGAACGGCACCCAGTCGGCCGGCA  
TGAGCGGCGGCTGCAGGCCGACGGTGCCGAGCACCCGGCCGCTGAACAC  
CCGCGGGCCGGACCACCAGTCCGGTCGCACCAGGTCGTGGCCGTCGCCG  
ATGACCACCGGGTCGACGCGGTACGCCGTGTCGGGGTCGAGGTGCGCGA  
AAGGTGACCCGGCCGGTGCCGGAGACCTCGGAGCGGCCGATGCTGGCGA  
GGAAGAAGACGGCCTGCCGCCGGTCCGGCGCGACCGTGCCGTACACGAG  
TCGTGCGTCGTCGACTTCGTCCGAGCGCACCCAGGTCGCCGCCGTGCAGGA  
GCGGGCGGGAGCTTCGCGGTACAGCGCG

**>pSKB1h- DuetDOWN**

CATCGCTCGATTAGCATTATGCGGCCGACGCTTGTCGACCTGCAGGCGCG  
CCGAGCTCGAATTCGGATCTCGGTCTCGGTGAGCGACAGGTGCTCCTTCG  
GGCGAGCTGGGACCACTCGTCACGAGGGATCGGCCTCGGCACCTACAT  
GGGTGGCTGGCGGATCGGGGTCGAGCCCGACGTGACGTCCGAGTCCGAC  
GACGACGACCCGGACGACACCAGTGCCGGCGACAGCGCGAGCATCCGCA  
GCAGGGTCAGCGACCCGGAACACGATCCTGGCTGTGGTGATGATGGTGAT  
GGCTGCTGCCATGGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAACAAAATTATTTCT  
ACAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA  
TTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGG

**>pSKB1h- DuetUP**

CCTCCTTAGCATTATACGACTCACTATAGGGGATTGTGAGCGGATAACAA  
TTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCAT  
GGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCGTGTTCGGTCCG  
TGACCCTGCTGCGGATGCTCGCGCTGTCGCCGGCACTGGTGTCTCCGGG  
TCGTCTGCTCGGACTCGGACGTCACGTCGGGCTCGACCCCGATCCGCCA  
GCCACCCATGTAGGTGCCGAGGCCGATCCCTCGTGACGAGTGGTCCCAGC  
TCGCCCCGAAGGAGCACCTGTCGCTCACCGAGACCGAGATCCGAATTCG  
AGCTCGGCGCGCCTGCAGGTGCACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAG  
TCGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGCC

**>pSKB3a- DuetDOWN**

CATCCGATGGACTAGCATTATGCGGCCGCAGCTTGTCTGACCTGCAGGCCG  
GCCGAGCTCGAATTCGGATCCTCGGGGTGCTCCTCGGCGTCTGGAACGCG  
GTCCGGCAGTACCGCACCTCCGACCAGGTGTCGACGTACCTGTCCTTCGC  
GGTGTCTGCCACCCCGACCTTCGTCATCGCGGTCGTGCTGATGATCTCCA  
CACTCGCAGCCTGCGGTGCCTTCGCACCGTCCAGCTCGATGCCGAGGTCC  
ATGCTCTTGTTGAGCGTGAGGCTGCCGGTCCAGGTGCGGCCCTTCGCGAT  
CCTGGCTGTGGTGATGATGGTGATGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTT  
ATTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTACAGGGGAATTGTTATCCGCTCACA  
ATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCCCTAATGCAGGAGTCGCATAAG  
GGAGAGG

**>pSKB3a- DuetUP**

CCTCCTAGGCATTATACGACTCACTATAGGGGATTGTGAGCGGATAACAA  
TTCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATG  
GGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCGCGAAGGGCGCG  
ACCTGGACCGGCAGCCTCACGCTCAACAAGAGCATCGACCTCGGCATCG  
AGCTGGACGGTGCGAAGGCACCGCAGGCTGCGAGTGTGGAGATCATCAG  
CACGACCGCGATGACGAAGGTCGGGGTGGCGAGCACCGCGAAGGACAG  
GTACGTGACACCTGGTCGGAGGTGCGGTACTGCCGGACCGCGTTCCAGA  
CGCCGAGGAGCACCCCGAGGATCCGAATTCGAGCTCGGCGCGCCTGCAG  
GTCGACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATC  
GTATTGTACACGCC

**>pSKB3c- DuetDOWN**

CCTCCGCTCGATTAGCATTATGCGGCCGCAGCTTGTCGACCTGCAGGCGC  
GCCGAGCTCGAATTCGGATCTCGGTATGAGCATCAGCGCCACCAGAAGG  
CGTCGACCCACGTCATGACCACCTCCGCTCGCTCGTTCTCCTGCGGGATC  
GCGGCCGAGAGCCCGCTGACGCTGCCGACGGACAGGTGCATCTCACCGA  
GCAGCAGCACGAGGACGATGCCGATCCTGGCTGTGGTGATGATGGTGAT  
GGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTATTAAGTTAAACAAAATTATTTCT  
ACAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAA  
TTTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGG

**>pSKB3c- DuetUP**

CCTCTTAAGGTTATACGACTCACTATAGGGGATTGTGAGCGGATAACAAT  
TCCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGG  
GCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCGGCATCGTCCTCGT  
GCTGCTGCTCGGTGAGATCGACCTGTCCGTCGGCAGCGTCAGCGGGCTCT  
CCGCCGCGATCCCGCAGGAGAACGAGCGAGCGGAGGTGGTCATGACGTG  
GGTCGACGCCTTCTGGTGGCGCTGATGCTCATACCGAGATCCGAATTCGA  
GCTCGGCGCGCCTGCAGGTGCACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGT  
CGAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACCC

**>pSKB3d- DuetDOWN**

CCTCGGATTGCTTAGCATTATGCGGCCGCAGCTTGTCGACCTGCAGGCGC  
GCCGAGCTCGAATTCGGATCTCGGTCTCGGTGAGCGACAGGTGCTCCTTC  
GGGGCGAGCTGGGACCACTCGTCACGAGGGATCGGCCTCGGCACCTACA  
TGGGTGGCTGGCGGATCGGGGTCGAGCCCGACGTGACGTCCGAGTCCGA  
CGACGACGACCCGGACGACACCAGTGCCGGCGACAGCGCGAGCATCCGC  
AGCAGGGTCAGCGACCGGAACACGATCCTGGCTGTGGTGATGATGGTGA  
TGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTATTAAGTTAAACAAAATTATTTTC  
TACAGGGGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCCCTATAGTGAGTCGTATTA  
ATTCCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGG

**>pSKB3d- DuetUP**

CGTCCTAGCATATACGACTCACTATAGGGGATTGTGAGCGGATAACAATT  
CCCCTGTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAATAAGGAGATATACCATGGG  
CAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCGTGTTCCGGTCGCTG  
ACCCTGCTGCGGATGCTCGCGCTGTCCGGCACTGGTGTCGTCCGGGTC  
GTCGTCGTCGGACTCGGACGTCACGTCGGGCTCGACCCCGATCCGCCAGC  
CACCCATGTAGGTGCCGAGGCCGATCCCTCGTGACGAGTGGTCCCAGCTC  
GCCCCGAAGGAGCACCTGTCGCTCACCGAGACCGAGATCCGAATTCGAG  
CTCGGCGCGCCTGCAGGTCGACAAGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTC  
GAACAGAAAGTAATCGTATTGTACACGCC

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Seda KANLIKAYA  
Uyruk : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi: Çanakkale 18.08.1992  
Medeni Hali : Bekar  
Telefon : 0 542 294 26 94  
E-posta : sedakanlikaya@gmail.com

### Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Eceabat Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi	2010
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2014
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2017

### Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma	X		
Anlama	X		
Okuma		X	

### Bilimsel Faaliyetler

1. Symposium on EuroAsian Biodiversity, Antalya, 23- 27 Mayıs 2016, Araştırmacı.
2. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi III. Fen Bilimleri Sempozyumu, Muğla, 5 Mayıs 2016, Araştırmacı.
3. International Symposium On Boron in Agriculture, Ankara, 15- 18 Kasım 2016, Araştırmacı.