



***PYROCOCCUS FURIOSUS* KİTİNAZININ
REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE ANALİZİ**

TUĞBA AKSOY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
DOÇ. DR. BİLGE HİLAL ÇADIRCI**

**2016
Her hakkı saklıdır**

T.C.
GAZİSOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***PYROCOCCUS FURIOSUS* KİTİNAZININ REKOMBİNANT
ÜRETİMİ VE ANALİZİ**

Tuğba AKSOY

TOKAT
Kasım, 2016

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2013/86 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tuğba AKSOY tarafından hazırlanan “*Pyrococcus furiosus* Kitinazının Rekombinant Üretimi ve Analizi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 3 KASIM 2015 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

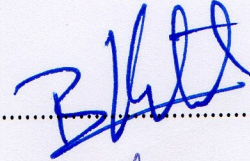
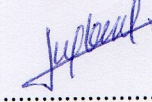
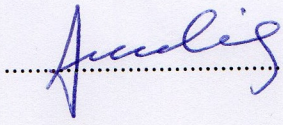
Jüri Üyeleri

İmza

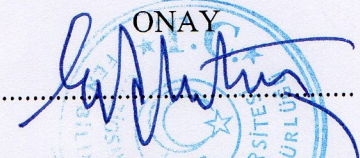
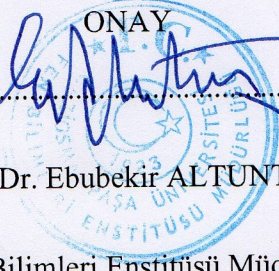
Danışman
DOÇ.DR. BİLGE HİLAL ÇADIRCI
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye
Yrd.Doç.Dr. Tuğba GÜRKÖK
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye
Yrd.Doç.Dr. Kubilay YILDIRIM
Gaziosmanpaşa Üniversitesi


.....

.....

.....

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.


.....
Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

---/---/20--

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Tuğba AKSOY

26.10.2016

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***PYROCOCCUS FURIOSUS* KİTİNAZININ REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE ANALİZİ**

TUĞBA AKSOY

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR. BİLGE HİLAL ÇADIRCI

Kitinazlar (EC 3.2.1.14) kitindeki N-asetil glukozaminler arasında bulunan β -1,4 glikozit bağınyı hidrolizleyebilen enzimlerdir. Arke domaini içinde, genetik ve moleküler bilgi açısından şimdiye kadar sadece 10 öriarkeal kitinaz bulunmuştur. Bunların çoğu bilinen homoloji genom işleme ile belirlenmiştir. *Sulfolobus tokodaii*, *Halobacterium salinarum*, *Thermococcus chitinophagus*, *T. kodakaraensis* KOD1 ve *Pyrococcus furiosus*'un rekombinant teknikler de dahil olmak üzere kitinolitik aktiviteleri üzerine çalışılmış ancak gerçek kitin parçalayabilme yetenekleri henüz ortaya çıkarılamamıştır. *P. furiosus*'un genom veritabanında kitinolitik özellik gösteren iki ORF homoloğu bulunmuştur. *P. furiosus*'un iki bitişik ORF'sinde arada bir adet insersiyon olan, iki kitin bağlama domaini ve iki katalitik domain bulunmuştur. Konu ile ilgili olan en güncel çalışmada rekombinant enzimin kristal kitine karşı aktivitesi incelenmiştir. Enzimin aktivitesi kitin substratının serbest indirgen ucunun ölçümüyle belirlenmiştir ve 1.6 μ mol/mg olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda *P. furiosus* arkesine ait olan kitinaz enziminin aktivitesini arttırmak ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi amacıyla katalitik aktivitesi yüksek olduğu literatürde bildirilen kitin bağlama bölgesi ve ilgili katalitik domain, pET 28a(+) ifade vektörüne aktarıldıktan sonra *Escherichia coli* rosetta (DE3) bakterisinde ifadelendirilmiştir. *P. furiosus* kitinaz ekspresyonu, 0.2 M IPTG varlığında gerçekleşmiş ve protein moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak belirlenmiştir.

2016, 47 SAYFA

ANAHTAR KELİMELEER: *Pyrococcus furiosus*, Kitinaz, Rekombinant enzim, Arkea

ABSTRACT

M. SC. THESIS

PRODUCTION AND ANALYSIS OF RECOMBINANT CHITINASE FROM *PYROCOCCUS FURIOSUS*

TUĞBA AKSOY

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND
APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. BİLGE HİLAL ÇADIRCI

Chitinase (EC 3.2.1.14) the enzymes which are capable of hydrolyzing the β -1,4 bonds between N-acetyl glucosamines in chitins. In archaea domain, in terms of genetic and molecular information it has been found so far only 10 euryarcheal chitinase. Most of them have been identified similarities between known genes by the genome mining. Investigations are mostly focused on *Sulfolobus tokodaii*, *Halobacterium salinarum*, *Thermococcus chitinophagus*, *T. kodakaraensis* KOD1 and *Pyrococcus furiosus* chitinases including recombinant techniques, but the ability to break down the actual chitins has not yet been revealed. Two homologous ORF which showed chitinolytic activity was found in *P. furiosus* genome database. *P. furiosus* two adjacent ORFs in combination with one insertion, were binding domain of the two continents and two catalytic domains. In the latest study, the recombinant enzyme activity against the crystal chitins were examined. The enzyme activity was determined by measuring the free reducing end of the chitin substrate and calculated as 1.6 $\mu\text{mol/mg}$. In our study, in order to increase the activity of the *P. furiosus* chitinase and determine the properties, the claimed molecular chitin binding region and the corresponding catalytic domain according to the literature, were transferred into pET 28b (+) expression vector and expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). *P. furiosus* chitinase was expressed in the presence of 0.2 M IPTG and protein molecular weight was determined approximately 55 kDa.

2016, 47 PAGES

KEYWORDS: *Pyrococcus furiosus*, Chitinase, Recombinant Enzyme, Archaea

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım süresince konu seçimimde, çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışmanım Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI'ya teşekkür ederim. Çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan başta Arş. Gör. Gözde ÇITIR KASIM hocama ve diğer ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem Nafiye AKSOY ve babam Hüseyin AKSOY başta olmak üzere tüm aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Tuğba AKSOY

Kasım 2016

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGE VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Kitin	3
2.1.1. Kitinin kimyasal yapısı	3
2.1.2. Kitinin kristal yapısı	4
2.1.3. Kitinin kimyasal eldesi	4
2.1.4. Kitinin kullanım alanları	5
2.2. Kitinazlar	6
2.2.1. Kitinazların sınıflandırılması	7
2.2.2. Glikosid hidrolaz familyası 18	8
2.2.3. Glikosid hidrolaz familyası 19	10
2.2.4. Kitinin enzimatik hidrolizi	10
2.3. Endüstriyel açıdan kitinaz	11
2.4. Kitinaz üreten organizmalar	12
2.5. Arke domaini	13
2.5.1. Yapısal özellikleri	13
2.5.2. Fonksiyonel özellikleri	14
2.5.3. Moleküler özellikleri	14
2.5.4. Arke domainin taksonomisi	15
2.6. Arke kitinazları	16
2.6.1. <i>P. furiosus</i> kitinazı	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Kullanılan besiyerleri	20
3.1.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Primer dizaynı	22
3.2.2. DNA izolasyonu	24
3.2.3. Farklı DNA polimerazlar ile kitinaz geninin amplifikasyonu	25
3.2.4. Plazmit izolasyonu	27
3.2.5. Plazmit ve PZR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesimi	29
3.2.6. Ligasyon	30
3.2.7. Transformasyon ve plazmit seçilimi	31

3.2.8. Etanol ile presipitasyon	34
3.2.9. Agaroz jel elektroforezi	34
3.2.10. Kitinaz ekspresyonu	34
3.2.11. <i>E.coli</i> BL21(DE) pLysE hücrelerinin parçalanarak eksprese edilen kitinazın belirlenmesi	35
3.2.12. Kitinazın ekstraksiyonu	36
3.2.13. Kitinaz aktivitesinin belirlenmesi	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1. pET28:CD2AD2 füzyon proteininin ekspresyonu	41
5. SONUÇ.....	43
6. KAYNAKLAR	45
7. EKLER	48
8. ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

μl	mikrolitre
μm	mikrometre
μmol	mikromol
bp	baz çifti
dk	dakika
g	gram
L	litre
M	molar
mg	miligram
ml	mililitre
ng	nanogram
rpm	dakikadaki devir sayısı
rxn	reaksiyon
v/v	hacim/hacim

Kısaltmalar

Açıklama

DMSO	Dimetilsülfoksit
IPTG	İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid
MBTH	3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu
PIPES	piperazin-N,N'-bis-2-etansulfonik acid
SDS	sodyum dodesil sülfat
VSM	Vent <i>Sulfothermophiles</i> Medium

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kitin monomeri	3
Şekil 2.2. Kitin ve selülozun karşılaştırması	4
Şekil 2.3. Deniz hayvan kabuklarından kitin eldesi	5
Şekil 2.4. TIM-Barrel	9
Şekil 2.5. Kitin katabolik yolizi	11
Şekil 2.6. Canlıların moleküler temellere göre sınıflandırılması	13
Şekil 2.7. <i>P. furiosus</i> genomunda TKChiA ve TKChiB ile homolog olan PF1233–1234 genlerinin dizilişi	19
Şekil 3.1. TK-ChiA ve PF-ChiA kitinazlarının kitin bağlama domaini ve aktif domainlerinin karşılaştırılması	23
Şekil 3.2. <i>P. furiosus</i> kitinazı gen dizilişi	23
Şekil 3.3. <i>P. furiosus</i> kitinazı protein dizilişi	24
Şekil 3.4. pET28a(+) vektör sistemi	28
Şekil 4.1. PZR ürünü Agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 4.2. EcoRI ve XhoI ile kesilmiş PZR ürünü ve vektörün jel kesiminden önceki agaroz jel görüntüsü	38
Şekil 4.3. pET28b-CD2AD2 konstraktının Serial Cloner programı ile gösterimi	38
Şekil 4.4. Doğrudan jele yüklenen kolonilerin gösterilmesi	39
Şekil 4.5. Seçilen plazmitin doğruluğunun gösterilmesi	39
Şekil 4.6. Dizi analiz kromatogramları	40
Şekil 4.7. IPTG konsantrasyonunun kitinaz ekspresyonuna etkisi	41

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Arkel kitinazlar	12
Çizelge 2.2. <i>T. kodakaraensis</i> ile <i>P. furiosus</i> 'un homolojisi	16
Çizelge 3.1. <i>P. furiosus</i> kitinazının çoğaltılması için tasarlanan primerler	24
Çizelge 3.2. <i>P. furiosus</i> kitinazının Taq polimeraz ile çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı	25
Çizelge 3.3. <i>P. furiosus</i> kitinazının Taq polimeraz ile çoğaltılması için PZR koşulları	25
Çizelge 3.4. <i>P. furiosus</i> kitinazının Pfu polimeraz ile çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı	26
Çizelge 3.5. <i>P. furiosus</i> kitinazının Pfu polimeraz ile çoğaltılması için PZR koşulları	26
Çizelge 3.6. <i>P. furiosus</i> kitinazının Phire DNA polimeraz ile çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı	26
Çizelge 3.7. <i>P. furiosus</i> kitinazının Taq polimeraz ile çoğaltılması için PZR koşulları	26
Çizelge 3.8. pET28a(+) vektörü ve CDAD2'nin XhoI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesimi için kullanılan reaksiyon karışımı	30
Çizelge 3.9. pET28a ve CDAD2 genlerinin ligasyonu için kullanılan reaksiyon karışımları	31

1. GİRİŞ

Kitinazlar [E.C 3.2.1.14] kitindeki N-asetil glukozaminler arasında bulunan glikozidik β -1,4 bağıını hidrolizleyebilen enzimlerdir. Biyokütledeki selülozdan sonra ikinci en önemli polisakkarit olan kitin, glikanların büyük bir familyasını oluşturur. Yüksek fungi duvarları, böcek iskeletleri, eklem bacaklılar gibi birçok omurgasız gruplarında ve bazı bakterilerin ekstrasellüler polimerlerinde bulunur. Kitin, ham kitin (koloidal kitin) ve kristal kitin olmak üzere iki formu vardır. Kristal kitin, çeşitli böceklerin ve kabuklu canlıların yapısında bulunurken koloidal kitin kristal kitinden türevlendirilmektedir.

Endüstriyel ölçekte, kitinin kullanımı başırlanamamıştır. Çünkü hidroklorik asit ile ön işlem uygulamadan kristal kitindeki β -1,4 bağıını hidrolizlemek için uygun bir enzim yoktur (Oku ve Ishikawa, 2006). Bu nedenle endüstriyel alanda kullanmak için kitinaz enzimi seçilmiştir.

Yeni gen kaynaklarının bulunması ile ilgili çalışmalar son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Özellikle yeni birçok enzime ve proteine kaynak olan, Arkea'lar bu konuda dikkat çekmektedir.

Oku ve Ishikawa'nın 2006'da yaptığı çalışmada *P. furiosus* rekombinant kitinaz enziminin koloidal kitine karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ama kristal kitine karşı aktivite rapor edilmemiştir. Bunun gibi yararlı bir kitinaz bulmak için hipertermofilik arke den hipertermostabil kitinaz genleri araştırılmıştır. Bir hipertermofilik arke olan *T. kodakaraensis*'te (TK-ChiA) kitinaz enzim geni rapor edilmiştir (Oku ve Ishikawa, 2006).

P. furiosus'un genom veritabanında TK-ChiA olan iki ORF homoloğu bulunmuştur. TK-ChiA ile sekans benzerliği hakkında, *P. furiosus*'un iki bitişik ORF'sinde iki kitin bağlama domaini ve iki katalitik domain bulunmuştur (Oku ve Ishikawa, 2006). PF1233 ve PF1234 numaraları ile gösterilen genler aynı yönde ifadelenmektedir ve ters yönde ifadelenen PF1232 ve PF1235 genleri arasında bulunmaktadır.

Kristal kitin stabil olarak doğada bol miktarda bulunmaktadır. Endüstride kullanmak için kristal kitine karşı kitinaz aktivitesi önemlidir. Bu yüzden, yapılacak olan bu çalışmayla üretilen rekombinant enzimin, kitin israfının büyük miktarının

azaltılmasının ve tekrar kullanımının yanı sıra kitin oligomerlerinin üretimi için kristal kitinin endüstriyel hidrolizinde kullanışlı olması beklenilmektedir.

Oku ve Ishikawa'nın yapmış olduğu ve konu ile ilgili olan en güncel çalışmada rekombinant enzimin kristal kitine karşı aktivitesi incelenmiştir. Enzimin aktivitesi kitin substratının serbest indirgen ucunun ölçümüyle belirlenmiş ve 1-6 ($\mu\text{mol/mg}$) olarak hesaplanmıştır (Oku ve Ishikawa, 2006).

Çalışmamızda *P. furiosus* arkesine ait olan kitinaz enzimini rekombinant olarak, bakterilerin üreme hızları arkelere göre daha fazla olduğu için bakteride ifade ettirilmesi tercih edilmiştir. Ayrıca kopyalama sayısı daha yüksek olduğu için bakteriyel plazmit kullanılmıştır. Böylelikle daha yüksek oranda kitinaz enziminin üretiminin sağlanması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda kitinaz enziminin genine uygun primer dizaynı yapılmıştır. Kitinaz geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve pET 28a(+) ifade vektörüne aktarılmıştır. Elde edilen pET28b-CD2AD2 konstraktı *Escherichia coli* rosetta (DE3) bakterisinde ifadelendirilmiştir. Enzim saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

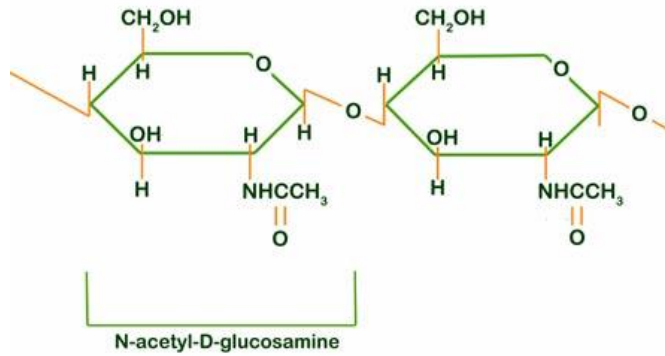
2.1 Kitin

Kitin $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$, yunanca kökenli bir kelimedir ve zırh anlamına gelmektedir. 1811 yılında ilk olarak Bradcannott tarafından kullanılmıştır. Dünyada selülozdan sonra en yaygın ikinci biyopolimerdir. Kabuklular, örümcekler ve böcekler gibi arthropodların dış iskeletlerinde ve çoğu funginin hücre duvarındaki ana bileşendir. Yumuşakçaların radulaları, kafadan bacaklıların gagaları ve iç kabukları kitin içerir. Nematodların yumurta kabuklarında ve özafaguslarında da bulunmuştur. Süngerlerin yapısal elementi olarak da keşfedilmiştir (Shaidi ve ark., 1999).

Kitin toksik olmayan, biyobozunur doğal bir polimerdir. İndirgenmesi, sertliği, biyoaktivitesi ve su tutma kapasitesi gibi özellikler nedeniyle ilgi çeken bir polisakkarittir (Shaidi ve ark., 1999).

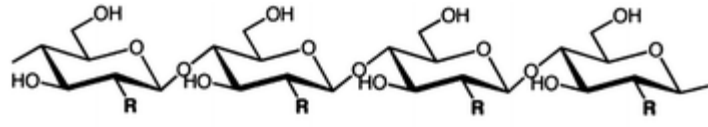
2.1.1. Kitinin kimyasal yapısı

Sistemik adı (1,4)-2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukan olan kitinler, β-1,4 bağlı N-asetil glukozaminin (2-asetil-2-amino-2-deoksi- β-D-glukopiranoz) çözünmez linear bir polimeridir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Kitin monomeri (Staufenberger, 2012)

Beyaz, sert, elastik olmayan, azotlu bir polisakkarit olan kitinin kimyasal yapısı selüloza çok benzer. Selülozdan farklı olarak, kitinin yapısında hidroksil gruplarının yerine asetilasyona uğramış amino grupları bulunmaktadır. Ayrıca moleküller arası hidrojen bağları polimeri güçlendirir. Bu nedenle; selüloza göre kitin daha güçlü ve dayanıklıdır (Staufenberger, 2012).



Cellulose: **R = OH**
Chitin: **R = NHAc**

Şekil 2.2. Kitin ve selülozun karşılaştırması

Doğal polisakkaritlerin çoğu asidik veya nötr olmasına rağmen kitin baziktir (Kumar, 2000). Aynı zamanda hidrofobik olan kitin, yalnızca yoğun hidroklorik asit, sülfirik asit, %78-97 fosforik asit ve susuz formik asitte çözünebilen bir polimerdir. Ancak asitler, alkaliler, alkoller ve diğer organik solventlerle seyreltilebilir veya yoğunlaştırılabilir (Staufenberger, 2012).

2.1.2. Kitinin kristal yapısı

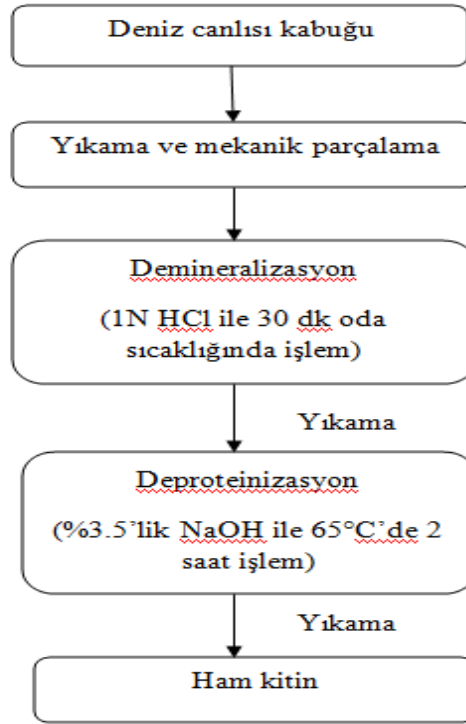
Doğal çevrede diatom spinleri hariç saf kitin (kolloidal/ham kitin) polimeri oluşmazken şimdiye kadar üç kristal kitin formu tanımlanmıştır:

- ✓ **α -kitin;** antiparalel zincirli olup en stabil ve en fazla bulunan formdur.
- ✓ **β -kitin;** paralel zincirlidir. Bu nedenle moleküller arası bağlar daha zayıftır. β -kitin, su alıp şiştiğinde α -kitine dönüşebilirken, tersi mümkün değildir.
- ✓ **γ -kitin;** zincir birimlidir (2 yukarı ve 1 aşağı). Nadir bulunmakla birlikte ara form olduğu düşünülmektedir.

α -kitin eklem bacaklıların dış iskeletinde, yumuşakçaların kabuklarında ve planktonlarda bulunurken; β -kitin fungal hücre duvarlarının temel bileşenidir. γ -kitin ise mürekkep balığının mide duvarında bulunur (Staufenberger, 2012).

2.1.3. Kitinin kimyasal eldesi

Türkiye'nin Akdeniz ve Ege bölgelerinde karides üretimi yapılmaktadır. Örneğin; Erdek Gıda Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü'nün verilerine göre 2009-2011 yıllarında ortama olarak 160.000 kilo karides üretilmektedir. Üretilen karidesin haşlanıp kafası ve kabuklarından ayrıldığında % 70 civarında fire vermektedir. Bu atık kabuklardan kimyasal olarak kitin elde edilmektedir.



Şekil 2.3. Deniz hayvan kabuklarından kitin eldesi

2.1.4. Kitinin kullanım alanları

Sahip oldukları özellikler nedeniyle kitinin birçok kullanım alanı vardır. Ortalama % 6,98 azot içeriğinden dolayı kitin iyi bir şelatlama ajanıdır. Bu nedenle ticari olarak da ilgi görmektedir (Kumar, 2000).

- ✓ **Tarım:** Son çalışmalar kitinin bitkilerde savunma mekanizması için iyi bir indüktör olduğunu göstermiştir. Ayrıca kitinin bitkilerde immun yanıtı geliştirmeye yardımcı bir fertilizer olabilirliği test edilmiş, sonuçta çok daha iyi verim sağlanmış ve ortalama ömür artmıştır (Cummings, 1996)
- ✓ **Biyoteknoloji:** Proteinlerin ayrıştırılması, kromatografi
- ✓ **Biyomedikal:** Tümör aktivitelerinin inhibe edilmesi, kandaki kolesterol miktarının tayini, yapay deri, ameliyat ipliği
- ✓ **Ortopedik/Periodantal uygulamalar:** Hidroksiapatit-kitin kompozit materyali
- ✓ **Kağıt endüstrisi:** Dayanıklı kağıt üretimi
- ✓ **Farmasotik:** Çeşitli ilaçlar
- ✓ **Oftalmoloji:** Optik lenslerin yapımında
- ✓ **Tekstil:** Giyim, pansuman bezleri

- ✓ **Kullanılmış suların arıtılması:** Ağır metallerin çökertilmesi, radyoaktif metallerin çökeltilmesi
- ✓ **Kozmetik:** Nemlendirici kremler, şampuanlar ve diş macunları
- ✓ **Yem sanayi:** Kabuklardan elde edilen karatenodilerin yemlere eklenmesi
- ✓ **Gıda endüstrisi:** Antioksidatif katkı maddesi, asit regülatörü, renk koruyucu, antimikrobiyal katkı maddesi, kaplama maddesi (Demir ve Seventekin, 2009).

N-asetil glukozamin ve kitinden türetilmiş oligosakkaritler ve ilaçlar olarak kullanışlı olması beklenilmektedir. Ancak kitinin endüstriyel kullanımı büyük bir ölçekte başarılamamıştır. Çünkü hidroklorik asit muamelesi olmadan kristal kitindeki β -1,4 bağlarının hidrolizi için uygun bir enzim yoktur. Eğer böyle bir enzim olursa, endüstriyel ölçekte kitinin kullanımı büyük bir ilerleme kaydedecektir. Ayrıca besin endüstrisinden büyük bir geri dönüşümü için de kullanılabilir olmalıdır (Oku ve Ishikawa, 2006). Böylelikle asit muamelesi olmaksızın kitinin monomerlerine ayrılması sağlanır. Elde edilen monomerlerinde kullanım alanları oldukça geniştir. Kitinaz enzimi ile kitinin kullanılabilirliğinin artırılması hedeflenmektedir.

2.2. Kitinazlar

Kitinazlar organizmalar arasında oldukça yaygındır. Bakteriler, mantarlar, bitkiler, böcekler ve bazı omurgalılarda bulunmalarına karşın bu organizmalardaki rolleri çeşitlilik gösterir.

Örneğin bakterial kitinazlar mantar, protozoa ve omurgasızlara karşı savunmada görevlidirler. Ayrıca akçaağaç, siyah, kırmızı ve beyaz meşe gibi bazı bitkilerin genotiplerinde de doğal olarak kitinaz geni bulunmuştur. Bunun dışında kitinaz geninin bitkilere transferi sonucunda elde edilen transgenik bitki insektisit ve fungusit özellikler kazanır.

İnsan kitinazları alerjik astım gibi T-helper-2-driven hastalığına karşı etki eden anti-inflamatuvar ile özellikle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Tsuji ve ark., 2010).

Maya ve fungideki kitinazlar otoliz, besinsel ve morfogenetik fonksiyonlar için önemli iken viral kitinazlar host hücrelerin patogenezi ile ilgilidir (Tsuji ve ark., 2010).

2.2.1. Kitinazların sınıflandırılması

Kitinazlar (EC 3.2.1.14) kitindeki N-asetil glukozaminler arasında bulunan glikozidik β -1,4 bağımlı hidrolizleyebilen enzimlerdir (Oku ve Ishikawa,2006). Sistemik adı poli [1,4-(N-asetil- β -D-glukozamin)] glukanohidrolazdır. Bu enzimin ismi 1,4- β -poli-N-asetilglukozaminidaz, poli- β -glukozaminidaz, kitodekstrinaz olarak adlandırılmasına karşın en yaygın kullanılan adı kitinazdır.

Kitinazlar iki büyük kategoride sınıflandırılırlar. Bunlar;

- a. Endokitinazlar: Kitin zinciri boyunca internal bölgelerde glikozidik bağları ayırır.
- b. Ekzokitinazlar:
 - Kitobiosidazlar: Kitin zincirinin indirgenmemiş ucundan diasetilkitobioz birimlerini ayırır.
 - B(1,4)-N-asetil-glukozaminidazlar (NAGase): N-asetilglukozamin oligomerlerinden monomer (NAG) oluşturur (Li ve Greene, 2010).

Enzimler, substrat spesifitesini etkileyen bir enzimin fiziksel durumu gibi amino asit sekanslarına göre de sınıflandırılabilirler. Buna göre kitinazlar glikosid hidrolaz süperfamiliyasına aittirler. Bu sistem içinde de kitinazlar glikosid hidrolaz familyalarından 18 ve 19'a aittirler (Staufenberger, 2012). Bu iki familya amino asit sekansları, üç-boyutlu yapıları ve katalitik reaksiyonların moleküler mekanizmalarına göre değişiklik gösterir (Li ve Greene, 2010).

GH18 kitinazları virüsler, Arkea, bakteri, fungi, bitkiler (sınıf III ve V) ve böcekler ve memeliler gibi hayvanların çeşitli gruplarını oluşturan doğada yaygındır. Tersine, GH19 kitinazları daha sınırlı bir dağılıma sahiptir ve bugüne kadar yüksek bitkilerde (sınıf I, II ve IV) nematodlar, virüsler ve bazı bakteri gruplarında bulunmuşlardır. Ayrıca, GH18 ve GH19 kitinazları farklı katalitik mekanizmalarına sahiptirler. GH19 üyeleri kataliz sonrası α anomer üreten çevirici mekanizmayı gösterirken GH18 üyeleri hidroliz ürünleri β anomer olduğunu tespit mekanizması ile ortaya koyarlar. Buna ek olarak, bu iki familyanın kitinazları farklı atalardan ayrıldığını gösteren kendi amino asit sekansları benzerlik göstermez ve tamamen farklı boyutsal yapıları olduğunu sergiler. Fakat, her iki ekso ve endokitinazlar her iki familyada bulunmuştur.

Familiya 19 kitinazlarının katalitik domaini, her biri α -helikal yapıca zengin olan iki lob içerir ve tekli yer değiştirme katalitik mekanizmasına sahiptir (Li ve Greene,2010). Tersine; familiya 18 kitinazları azımsanmayacak miktarda sekans farklılığına sahiptir. Bütün katalitik domainleri korunmuş bir DXDXE motifli triozfosfat izomeraz [TIM Barrel (β/α) 8-fold] kıvrımlarına sahiptir. Substrat destekli mekanizmayla hidrolitik reaksiyonu katalizler (Tsuji ve ark., 2010; Li ve Greene, 2010).

2.2.2. Glikosid hidrolaz familiyası 18

Familiya 18 özellikle bakteri kitinazlarını barındırır. GH familiya 18 kitinazları genel bir katalitik domain ve bir veya daha fazla kitin bağlama domaini içerir. Bu enzim ailesi peptit omurgası boyunca birbirini sırayla izleyen sekiz α -heliks ve sekiz paralel β -strain içeren barrel yapısı (TIM Barrel) içeren silindirik yapı ile karakterizedir. Bir β -bağlı polimer, serbest β -anomere bağlanması durumunda bir tespit etme mekanizması aracılığıyla çalışır. Katalitik kalıntıların glutamik asit olduğu belirlenmiştir (Staufenberger, 2012).

GH familiya 18 aminoasit sekanslarındaki farklılıklara göre A, B ve C alt ailelerine ayrılır. GH 18 subfamiliya B bakteriyal kitinazlar arasında yaygındır (Staufenberger, 2012). Subfamiliya A ve B kitinazları arasında ana yapısal farklılık, subfamiliya A'da TIM-Barrel katalitik domainine küçük bir a+b domaini eklenirken, B subfamilyasında bu insersiyon domainin olmamasıdır. Örneğin; 18 familyasından A alt ailesine ait olan insan kitotriosidazı bir TIM domainine ve bunun içine girebilen bir modülü olan bir kitinaz insersiyon domainine (CID) sahiptir (Li ve Greene, 2010).

Subfamiliya A da TIM barrelin N ve C terminal uçlarında başka değişiklikler de görülebilir. Diğer yandan *Serratia marcescens* kitinaz C'si B subfamilyasındadır ve bir katalitik domain, bir fibronektin tip III benzeri domain ve bir kitin bağlama domaini içerir.

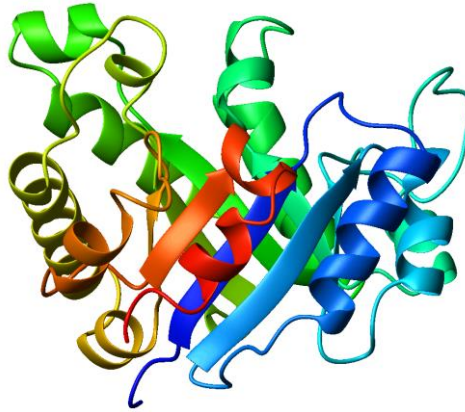
Subfamiliya A, B ve C'nin tümü multimodülerdir. ChiA bir fibronektin III (FnIII) ile N-terminal kitin bağlama modülüne sahiptir. ChiB bir C-terminal CBM5 kitin bağlama modülüne sahipken ChiC ise CBM12 kitin bağlama modülünün alt kısmı ile birleşmiş bir C-terminal FnIII modülüne sahiptir. Önceki çalışmalarda, salgılanmış kitinolitik proteinler ve sadece katalitik domaini içeren bir form tespit edilmiştir. ChiC1

olarakta bilinen tam uzunluktaki ChiC, bu formun ChiC2 ürününü vermek için endojen proteaz ile ayırma eğilimindedir. ChiA ve ChiB için mevcut kristal yapıları bütün iki domain proteinleri karşılaştırılır. ChiC'nin ise sadece katalitik domainin kristal yapısı belirlenmiştir. Fakat, *Bacillus circulans*'ın kitinaz A1 üzerinde yapılan çalışmalardan bireysel FnIII ve BCM12 için yapısal bilgi mevcuttur (Vaaje-Kolstad ve ark., 2013).

Aromatik rezidü hattında derin substrat bağlama yarıklarına sahip olan ChiA ve ChiB enzimleri, ekzo-etkili enzimlerdir. Derin yarıkların bir anahtar özelliği substrat bağlama yarığının biri 'duvarını' oluşturan, a + b insert domaini varlığıdır. Bu 60-80 rezidü domain, sadece GH18 enzimlerinin TIM-Barrel'inin 7 strand ve 7 heliksinin arasına eklenir. Domain ChiB'de substrat bağlama bölgesine katılan ekstra loop içerebilir, ama ChiA'da daha azdır. ChiC'de a + b domaini yoktur ve ChiA ve ChiB'de görülen çoğu aromatik rezidüsü olmayan daha sık substrat bağlama yarığına sahiptir. Bu nedenle ChiC'nin gelişmeyen endo- etkili enzim olabileceği ileri sürülmüştür (Vaaje-Kolstad ve ark., 2013).

ChiC'nin yapısı bilinmemektedir. Ama aminoasit sekansına göre C-terminalinde bulunan bir katalitik domain ve iki varsayımsal kitin bağlama domaini içerir. ChiC'de endokitinaz hevaminin kristal yapısı gözlenmiş olan daha açık bir substrat bağlama yarığına sahiptir (Horn ve ark., 2006).

TIM-Barrel domaini bir $(\alpha/\beta)_8$ -barrel kıvrımı içerir ve çoğu enzim olan birçok proteinde bulunur. TIM barrel domainleri düşük sekans benzerliğine sahiptirler ve çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Spesifik enzim aktivitesi β -strand'ın karboksil ucunda bulunan sekiz loop ile belirlenir. Bazı TIM-Barrellerde ikinci bir domaine ait ilave bir loop TIM domainin aktif bölgesini yaklaştırır ve katalize katılır (Li ve Greene, 2010).



Şekil 2.4. TIM-barrel

CID, CID süperfamilyasındaki tek familyadır. Beş veya altı antiparalel β -dizisi ve bir α -heliks'den oluşmuştur. CID, TIM-Barrel'in yedinci α -heliks ve yedinci β -dizisinin arasına eklenir. CID'in yerleştiği bu bölge subfamilya A'da olduğu gibi C'de derin değildir. Ayrıca, çeşitli fonksiyonlara sahip bazı memeli glikoproteinleri yapısında bir TIM domain ve CID bulunduran familya 18 kitinazın kıvrımına da sahiptirler. Örneğin; kıkırdak glikoprotein-39 (HCgp-36) bu şekildedir.

TIM domainine ve CID'e ek olarak subfamilya A'daki bazı kitinazlar, substrat bağlama bölgesi içeren bir veya iki ek domain barındıran kitin degradasyonunu kapsar (Li ve Greene, 2010). Örneğin; *S. marcescens* kitinaz B'si, bir ekstra C-terminal domainine sahip iken; *S. marcescens* kitinaz A'sı, ekstra bir N-terminal domainine sahiptir.

2.2.3. Glikosid hidrolaz familyası 19

GH familya 19 üyeleri çoğunlukla bitki kitinazlarını kapsayan, yüksek bir α -heliks içeriği ile bilobal yapıya sahiptir. Bu yapı çok değişkendir ve bugüne kadar 20 farklı aminoasit sekansına dayanarak belirlenmiştir. Familya 19 enzimleri, genellikle serbest α -anomere β -bağlı polimerin yapıştığı bir tersine çevirme mekanizması aracılığıyla etki eder. Enzim sınıfının katalitik kalıntısı henüz doğrulanamamıştır (Staufenberger, 2012).

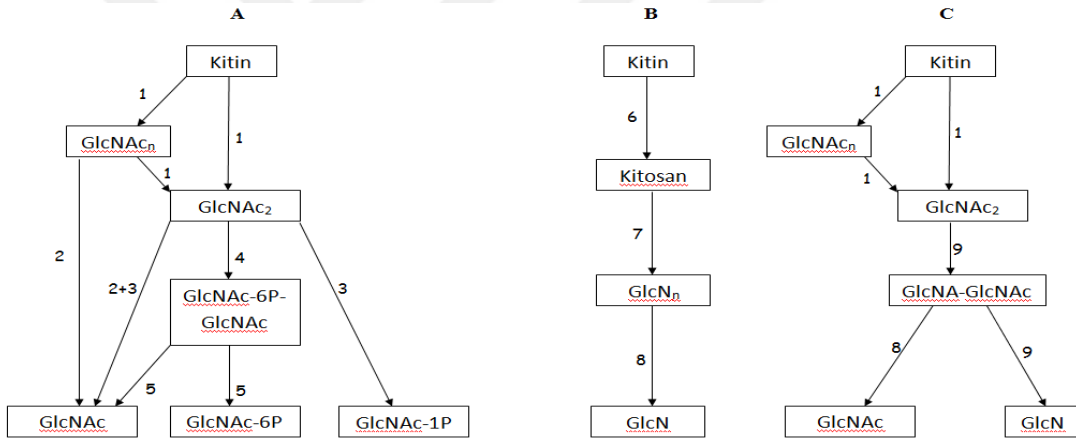
2.2.4. Kitinin enzimatik hidrolizi

Şimdiye kadar kitinin sadece üç biyodegradasyon yolu tanımlanmıştır:

A) Kitinaz tarafından, kitin kitooligosakkaritlere (GlcNAc_n) ve N-asetil glukozamin dimerlerine parçalanır. Glukozamin dimerleri sonra β -N-asetil glukozaminidaz ile N-asetil glukozamin formuna veya kitoolisakkaritlerden direkt olarak serbest GlcNAc 'lere hidrolizlenir (Rxn 2). Bazı organizmalar GlcNAc_2 fosforilazla GlcNAc_2 'yi GlcNAc 'ye ve GlcNAc -1-fosfata degrade eder (Rxn 3) veya bir 6-fosfo-glukozaminidaz ile GlcNAc ve GlcNAc -6-fosfat'a degradasyonunu takiben bir GlcNAc_2 fosfotransferaz sistemi (Rxn 4) ile dimeri GlcNAc -6-fosfat- GlcNAc 'ye dönüştürür. Bu yol izi bakteri ve fungide bulunmuştur.

B) Bakteri ve fungi tarafından kitin degradasyonunun başka bir yol izi, kitin deasetilaz enzimiyle kitin deasetilasyonu boyunca meydana geldiği önerilmiştir. Sonuç olarak deasetillenmiş kitin olan kitosan sonra ekso-β-D-glukozaminidaz kooperasyonu (Rxn 8) kitosanaz tarafından glukozamine (GlcN) degrade olur (Rxn 7).

C) Üçüncü yol izi şimdiye kadar sadece bir arche olan *T. kodakaraensis*' de keşfedilmiştir. Bu yol izinde kitin GlcNAc₂' ye bir kitinaz tarafından degrade edilir. Bu dimer GlcN-GlcNAc-disakkaritine GlcNAc deasetilaz tarafından kısmen deasetile edilir (Rxn 9). Bu ürün ekso-β-D-glukozaminidaz tarafından GlcN ve GlcNAc monomerlerine hidroliz edilir (Rxn 8). Son olarak GlcNAc, GlcNAc₂ deasetilaz tarafından (Rxn 9) GlcN monomerlerine kitinin tamamının konversiyonu ile deasetilize edilir (Staufenberger, 2012).



Şekil 2.5. Kitin katabolik yol izi. Numaralarla temsil edilen farklı enzimler; (1) kitinaz, (2) β-N asetilglukozaminidaz, (3) GlcNAc₂ fosforilaz, (4) GlcNAc₂ fosfotransferaz sistem, (5) 6-fosfo-β-glukozaminidaz, (6) kitin deasetilaz, (7) kitosaanaz, (8) ekso-β-D-glukozaminidaz, (9) GlcNAc₂ deasetilaz. Kısaltmalar; (GlcNAc_n) N-asetilkitooligosakkarit, (GlcN_n) kitooligosakkarit, (GlcNAc₂) diasetilkitobioz, (GlcN₂) kitobioz, (GlcNAc-1P) GlcNAc-1fosfat, (GlcNAc-6P) GlcNAc-6-fosfat.

2.3. Endüstriyel açıdan kitinaz

Patojenik fungusların hücre duvarları ve böceklerin dış iskeletleri kitin içerir. Bu nedenle bu organizmaların biyokontrolünde kitinazlar kullanılabilir (Gooday, 1995). Mantar enfeksiyonlarında anti-fungal preparatların üretilmesinde kitinazlar kullanılabilir. Böylelikle sağlık açısından hiçbir toksik etkisi olmayan, kullanıma uygun preparatlar hazırlanabilir.

Kitin degradasyonu sonucu ortaya çıkan GlcNAc, anti-inflamatuar bir maddedir ve insan vücudunda sentezi mümkündür. Ancak sentetik olarak elde edilmek istendiğinde yüksek miktarlarda ekzokitinaz ve N-asetilglukozaminidazlara gereksinim vardır (Aerts ve ark., 1996).

2.4. Kitinaz üreten organizmalar

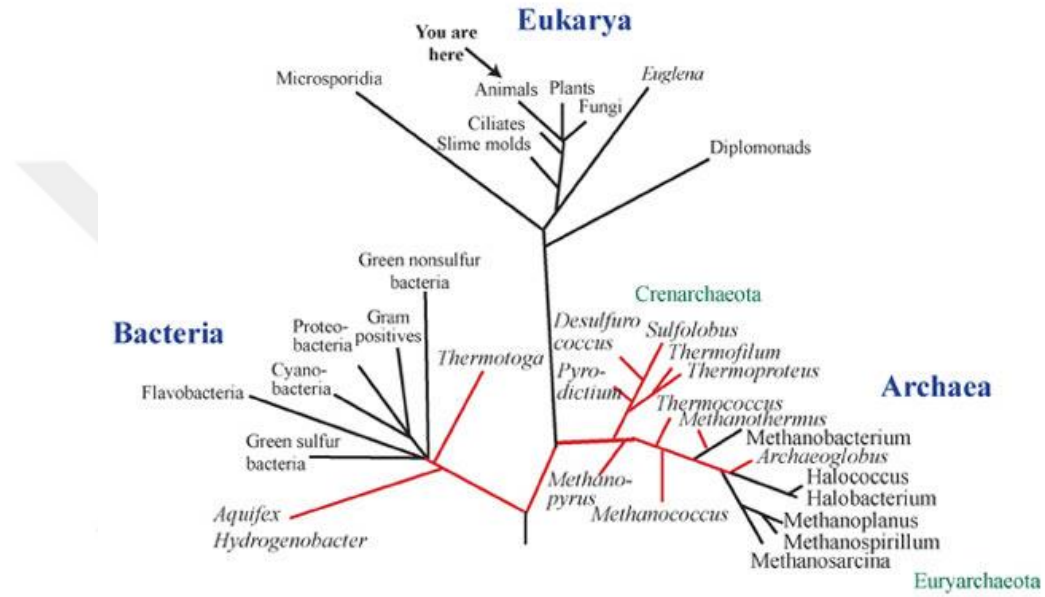
Çalışmamızda kullandığımız mikroorganizma *P. furiosus*'un dışında *T. kodakaraensis*, *Streptomyces griseus*, *S. thermoviolaceus*, *S. cyaneus*, *Aspergillus fumigatus*, *Triticum aestivum*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *Clostridium paraputrificum*, *Vibrio proteolyticus*, *Cryptococcus neoformans*, *T. chitonophagus*, *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisia*, *Lactococcus lactis* ve diğer birçok organizmada kitinaz enzimi bulunmuştur (www.brendaenzymes.com).

Çizelge 2.1. Arkel kitinazlar (Staufenberger, 2012)

Organizma	Enzim Ailesi	Karakterizasyon şekli	Referans
<i>T. chitonophagus</i>	GH18	Doğal saflaştırma, aktivite ve karakterizasyon yapılmıştır.	Genbank Acc. No. AAR13021.1 (Andronopoulou ve Vorgias, 2004)
<i>T. kodakaraensis</i> KOD1	GH18	Rekombinant enzim, aktivite ve karakterizasyon yapılmıştır.	Genbank Acc. No. BAD85954.1 (Tanaka ve ark., 1999)
<i>P. furiosus</i>	GH18	Rekombinant enzim, aktivite ve karakterizasyon yapılmıştır.	Genbank Acc. No. AAL81357.1 (Oku ve Ishikawa 2006)
<i>Halobacterium</i> sp. strain NRC-1	GH18	Rekombinant enzim, aktivite ve karakterizasyon yapılmıştır.	Genbank Acc. No. AAG19274.1 (Hatori ve ark. 2006)
<i>H.salinarum</i>	GH18	Genom anotasyon	Genbank Acc. No. CAP13543.1 (Pfeiffer ve ark. 2008)
<i>Halomicrobium mukohataei</i>	GH18	Genom anotasyon	Genbank Acc. No. ACV49028.1 (Tindall ve ark. 2009)
<i>Haloterrigena turkmenica</i> DSM 5511	GH18	Genom anotasyon	Genbank Acc. No. ADB61056.1 (Saunders ve ark. 2010)
<i>Methanoplanus petrolearius</i> DSM 11571	GH18	Genom anotasyon	Genbank Acc. No. ADN37298.1 <i>Candidatus</i>

2.5. Arke domaini

Woese ve Fox, 3 domain olduğunu önermişlerdir; tüm tipik bakterileri içeren Bakteria, metanojenik bakterileri içeren Arkebakteria ve ökaryotik hücrelerinde sitoplazmik komponent bulunduran Ökarya. Arkebakteri'yi sonradan Arke olarak tekrardan isimlendirmişlerdir (Makarova ve Koonin, 2003).



Şekil 2.6. Canlıların moleküler temellere göre sınıflandırılması

2.5.1. Yapısal özellikleri

Arke domainin üyeleri spiral, küre, çubuk, levha şeklinde, düzensiz şekilli veya pleomorfik olmak üzere morfolojik olarak oldukça çeşitlidir. Tek hücre, küme halinde veya filament formunda bulunabilirler. Çapları 0,1-15 µm arasında değişmektedir. Genellikle binary fisyon ile çoğalırlar. Ama bazı üyeleri tomurcuklanma, fragmentasyon ve henüz bilinmeyen bir mekanizma ile de çoğalabilirler.

Thermoplasma türleri gibi bazı arkeler hücre duvarı içermezler. Hücre duvarı bulunduran arkeler gram-pozitif veya gram-negatif gibi görünebilirler. Ultrayapısal olarak bakteria domainin üyelerine benzerlik gösterirler. Gram-negatif arkeal hücre duvarlarının dış membranında kompleks lipopolisakkaritleri yerine bir yüzey glikoproteini veya protein altbirimleri bulunur.

Arkeal lipidler isoprenoid hidrokarbonlardır. Bakteria ve ökaryalardaki lipidler düz zincirli ve ester bağı içerirler. Arkeal lipidler ise dallanmışlardır ve eter bağları ile gliserole bağlanmışlardır. Membranların sertliği, arkenin yaşadığı habitata bağlıdır. Membranın akışkanlığı ve stabilitesinin devamlılığı habitata göre değişiklik gösterir.

2.5.2. Fonksiyonel özellikleri

Anaerobik, tuzlu ortamdan ileri derecede tuzlu ortama kadar, yüksek sıcaklık ve düşük sıcaklık habitatlarını da içeren ekstrem çevrelerde bulunurlar. Bazıları hayvanların sindirim sistemlerinde simbiyont olarakta bulunurlar.

Arke domainin bazı üyeleri aerob, bazıları zorunlu anaerob ve bazıları da fakültatif anaerobtur. Bazıları kemolitototrofik, diğerleri kemoorganotroftur ve bazıları bir besinsel durumdan diğerine değişerek büyüyebilirler. Büyüme sıcaklıkları mezofilikten hipertermofiliğe kadar değişiklik gösterir. pH büyüme aralığı çok asidik ile nötrün biraz üzeri arasındadır. Bazı zorunlu halofillerdir ancak diğerleri halotoleranttır. Bakteri ve Arke için anabolik ve katabolik işlevleri benzer olmasına karşın metanojenlerde farklıdır.

2.5.3. Moleküler özellikleri

Bakterial kromozomlara göre küçük ve ekstrakromozomal element olan Arkel kromozom tek iplikli halkasal DNA molekülüdür. Genomlarının G+C içeriği %21-68 mol arasında değişiklik gösterir. Ökaryada bulunan histon proteinlerine benzer arkeal DNA bağlama proteinleri vardır.

Termal denatürasyona ve ekstremler halofillerin genomik yapısal bütünlüğü için genomik direnç hücre içinde bulunan yüksek tuz konsantrasyonuna bağlıdır.

Arkeal gen organizasyonu ökaryalarla homoloji gösterir. Arkeal 23S, 16SrRNA ve tRNA genlerinde intronlar bulunmuştur.

DNA replikasyonunda rol alan arkeal DNA polimerazlar tespit edilmiştir. Bu enzimlerin temel protein sekansı ökaryaların DNA polimerazına benzerlik göstermektedir. Bazıları 3'-5' ekzonükleaz (proofreading) aktivitesine sahiptir. *H. halobium* DNA polimerazının ters transkriptaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Arke'da topoizomerazlar, giraz ve restriksiyon endonükleazlar da belirlenmiştir.

Bakteriada tek tip RNA polimeraz bulunurken ökaryalarda RNA polimeraz POL I, II ve III olarak adlandırılan 3 tip RNA polimeraz bulunmaktadır. Arke'da tek tip RNA polimeraz bulunmaktadır ve ökarya RNA polimeraz POL II ile benzerlik göstermektedir. Arkeal RNA polimeralar yaklaşık 14 alt birim içerdikleri için kompleksirler. *E. coli* RNA polimerazın aksine arkeal RNA polimeraz in vitro olarak transkripsiyon yapamazlar.

Arkeal promotorlar transkripsiyonel başlangıç bölgesinin -32 ile -25 bp yukarı kısmında A-T'ce zengin bir sekansa sahiptirler. Bu konsensus sekans ökaryotik TATA kutusuna benzemektedir.

2.5.4. Arke domainin taksonomisi

Arkeler dört şubeden oluşur. *Euryarchaeota* ve *Crenarchaeota* iki temel şube iken *Korarchaeota* ve *Nanoarchaeota* köke en yakın yerde dallanmıştır. Her şube arke ağacında büyük bir dallanma gösterir. Bilinen bütün organizmalar arasında en yüksek sıcaklıklar ve ekstrem pH'larda üreyen türleri ile pek çok arke ekstremofildir (Madigan ve Martinko, 2010).

Euryarchaeota arkenin fizyolojik yönden farklı bir grubunu oluşturmaktadır. Bu şubenin gruplarından köke yakın dallanan hipertermofil *Thermococcus* ve *Pyrococcus*, metanojen *Methanopyrus* ve fenotipik olarak mikrop plazmalara benzeyen hücre duvarı olmayan prokaryot olan *Thermoplasma*'yı içermektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

Thermococcus anoksik termal sulara özgü küre şekilli bir hipertermofilik öriarkedir. Bir demet polar flagella içerir ve oldukça hareketlidirler. *Thermococcus* bir obligat anaerobik kemoorganotroftur; 70-95°C'de S⁰'ü elektron alıcı olarak kullanıldığı proteinler ve diğer organik karışımların bulunduğu ortamlarda üremektedir (Madigan ve Martinko, 2010).

Pyrococcus morfolojik yönden *Thermococcus*'a benzemektedir ve çok daha yüksek sıcaklık ihtiyacından dolayı bu türden ayrılmaktadır. *Pyrococcus* 70 ve 106°C arasında, optimum olarak 100°C'de üremektedir. *Thermococcus* ve *Pyrococcus* metabolik yönden de birbirlerine oldukça benzemektedirler. Peptitler, amino asitler, şekerler, oluşan yağ asitleri, CO₂ ve H₂'den enerji elde ederler. Pirüvat, oluşan asetat, H₂ ve CO₂'yi fermente edebilirler. Ek olarak, *Pyrococcus* ve *Thermococcus* türleri

yüksek tuz yoğunluğuna sahip jeotermal olarak sıcak yağ rezervlerinde bulunmuş ve işlenmiş yağ varlığında büyüyebilirler. Aynı yağ rezervleri içerisinde, arkeal sülfat indirgeyicilerinin üyelerinin H_2S oluşumundan sorumlu olabileceği bulunmuştur (Madigan ve Martinko, 2010).

Çalışmalarda model organizma olan *T. kodakaraensis* ile *P. furiosus*'un homolojisi tabloda gösterildiği şekildedir.

Çizelge 2.2. *T. kodakaraensis* ile *P. furiosus*'un homolojisi (Fukui ve ark.,2005).

	<i>T. kodakaraensis</i>	<i>P. furiosus</i>
Genom özellikleri		
Genom ebatı (bp)	2,088,737	1,908,256
Protein-kodlama bölgeleri	92.1%	92.5%
GC içeriği	52.0%	40.8%
Stabil RNAlar		
tRNA'lar	46	46
intron içeren tRNA'lar	Trp, Met	Trp, Met
tRNAs	16S-23S	16S-23S
	5S (x2), 7S	5S (x2), 7S
Diğerleri	RNaseP	RNaseP
CDSs	2306	2065
Mobil elementler		
Inteinler	16	10
Transposazlar	7	>30
Virus-ilişkili bölgeler	4	0
Sıralı tekrarların uzun dizileri		
R1 ailesi	0	0
R2 ailesi	3	7

2.6. Arke kitinazları

Arke domaini içinde, genetik ve moleküler bilgi açısından şimdiye kadar sadece 10 öriarkeal kitinaz bulunmuştur. Tamamı glikosid hidrolaz 18A ve 18 C alt familyasına atfedilmiştir. Bunları çoğu bilinen genlerin benzerliğinde genom işlemeciliği ile bilgi notları eklenilmiştir. Böylece, gerçek kitin parçalayabilme yetenekleri henüz ortaya çıkarılamamıştır. Bildiğimiz kadarıyla, aktivite kanıtı da dahil olmak üzere enzimatik karakterizasyon sadece dört organizma için yapılmıştır (Staufenberger ve ark., 2012).

1) *T. chitinophagus*; hücrenin dış tarafına kitinaz bağlandığı için şimdiye kadar karbon ve enerji kaynağı olarak direk olarak kitin üzerinde büyüeyebilen tek Arkeondur. Optimal aktivite 70°C'de ve pH 7'de ölçülmüştür. Bu kitinaz oldukça termostabildir ve allosamidin tarafından inhibisyon göstermemiştir. Buna ek olarak, üre ve SDS tarafından denatürasyona dirençlidir.

2) Tanaka et al. *T. kodakaraensis* KOD1'in kitinaz genini klonlamışlardır ve overekspresyonunu sağlamışlardır. Bu enzim 85°C ve pH 5'te optimal aktivite göstermiştir. Amino asit sekansına ve gen delesyon deneylerine göre GH18A'ya benzerlik gösteren bir bölgesi ve GH18C'ye benzerlik gösteren bir diğer bölgesi ve 3 substrat bağlama bölgesi ile çift aktif bölgeye sahiptir.

3) *P. furiosus* genomu, GH18 A ve B alt familyalarına ait iki kitinaz içermektedir. *E. coli*'de hem klonlanmıştır hem de eksprese edilmiştir. 90-95°C ve pH 6'da optimal aktivite göstermiştir. Ayrıca, koloidal kitin üzerinde birlikte inkübe edildiği zaman iki proteinin sadece biri ile inkübasyonu karşılaştırıldığında beş kat artışla sonuçlanması bu iki kitinazın sinerjistik olarak hareket ettiğini göstermektedir. Fakat, sonraki DNA sekans analizi, çerçeve kaymasına neden olan bir nükleotit insertiyonu sonucu iki genin oluştuğunu göstermektedir. Insert edilen nükleotit kaldırılınca kitinaz aktivitesinde 40 kat bir artış ile sonuçlanan yapay bir rekombinant kitinaz Oku ve Ishikawa tarafından eksprese edilmiştir. *P. furiosus* kitinazı gibi diğer kitinazlarda da bir dimerik durumu bilinmektedir.

4) Hatori et al. *Halobacterium* sp. strain NRC-1'in genomunda farzedilen bir kitinaz geni bulmuştur ve ekstrem halofilik bir Arkeon olan *Haloarcula japonica* strain TR-1'de eksprese etmişlerdir. Aktivite, yaklaşık 5M'a kadar değişen NaCl konsantrasyonlarında muhafaza edilmiştir. Buna ek olarak enzim %30 (v/v)'a kadar yoğun DMSO konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.

5) *S. tokodaii* str.7 nin ORF ORF BAB65950, ilk fonksiyonel crenarkeal kitinazı kodlar. Bu enzim glikosid hidrolaz familyasının ne 18 ne de 19 atfedilebilir. Filogenetik protein sekans ağacı içinde glikosid hidrolaz familya 18'in üyelerine yakın ilişki içinde ORF'nin amino asit sekansının kümелendiği ortaya çıkmaktadır (Staufenberger ve ark., 2012).

2.6.1. *P. furiosus* kitinazı

P. furiosus kitinazı α ve β kristal kitini hidrolizleyen bir endokitinazdır. AD1 ve AD2 olmak üzere iki katalitik domain içerirken ChBD1 ve ChBD2 olarak adlandırılan iki kitin bağlama domaini içerir. *P. furiosus* kültür ortamında kitinaz enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Maksimum enzim aktivitesi sadece kitinin β formundan elde edildiği gibi 90°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda α kitinden de elde edilmiştir. Pf-ChiA

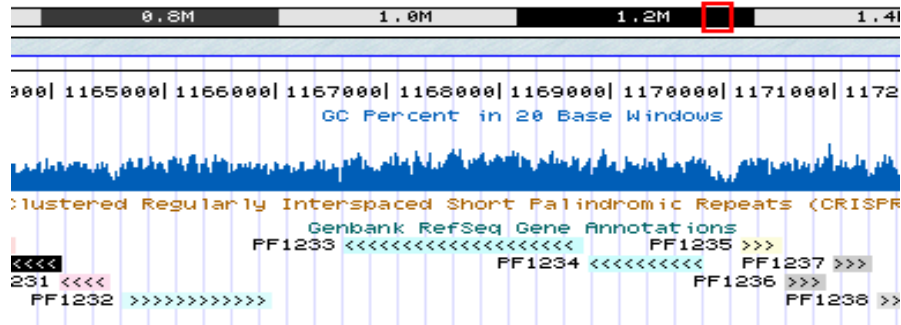
1075 amino asitlik büyük bir proteindir. İki katalitik domain (AD1 ve AD2) ve iki kitin bağlama domaininden (ChBD1 ve ChBD2) oluşmuştur. ChBD'ler ve kitin arasındaki moleküler arası etkileşimlerin kristal kitinin etkin hidrolizinde elde edilen kitin yüzeyine yakın bağlanmış olan katalitik domaini zorlaması beklenir (Mine ve ark., 2013).

Karbonhidrat bağlayıcı domainler, karbonhidrat bağlama aktivitesine sahip fonksiyonel domainler olarak belirlenmiştir ve halihazırda 32,130 modül amino asit sekansları baz alınarak 67 aile olarak sınıflandırılmıştır (Mine ve ark., 2013).

Oku ve Ishikawa'nın 2006 'da yaptığı çalışmada rekombinant kitinaz enziminin kolloidal kitine karşı aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Ama kristal kitine karşı aktivite rapor edilmemiştir. Bunun gibi yararlı bir kitinaz bulmak için hipertermofilik arleden hipertermostabil kitinaz genleri araştırılmıştır. Bir hipertermofilik arke olan *T. kodakaraensis*'te (TK-ChiA) kitinaz enzim geni rapor edilmiştir.

Oku ve Ishikawa'nın yapmış olduğu ve konu ile ilgili olan en güncel çalışmada rekombinant enzimin kristal kitine karşı aktivitesi incelenmiştir. Enzimin aktivitesi kitin substratının serbest indirgen ucunun ölçümüyle belirlenmiştir ve 1-6 (μmol/mg) olarak hesaplanmıştır (Oku ve Ishikawa, 2006).

P. furiosus'un genom veritabanında TK-ChiA olan iki ORF homologu bulunmuştur. TK-ChiA ile sekans benzerliği hakkında, *P. furiosus*'un iki bitişik ORF'sinde iki kitin bağlama domaini ve iki katalitik domain bulunmuştur (Oku ve Ishikawa, 2006). Şekil 4'de görüldüğü gibi PF1233 ve PF1234 numaraları ile gösterilen genler aynı yönde ifadelenmektedir ve ters yönde ifadelenen PF1232 ve PF1235 genleri arasında bulunmaktadır.



Şekil 2.7. *P. furiosus* genomunda TKChiA ve TKChiB ile homolog olan PF1233-1234 genlerinin dizilişi (<http://archaea.ucsc.edu/>)

Kristal kitin stabil olarak doğada bol miktarda bulunmaktadır. Endüstride kullanmak için kristal kitine karşı kitinaz aktivitesi önemlidir. Bu yüzden, yapılacak olan bu çalışmayla üretilen rekombinant enzimin, kitin israfının büyük miktarının azaltılmasının ve tekrar kullanımının yanı sıra kitin oligomerlerinin üretimi için kristal kitinin endüstriyel hidrolizinde kullanışlı olması beklenilmektedir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmada kullanılan *P. furiosus*, Almanya Regensburg Üniversitesi Mikrobiyoloji kürsüsü ve Arkea merkezinden temin edilmiştir

Besiyerleri, tamponlar, çeşitli çözeltiler, enzimler, shaker, spektrofotometre, elektroforez ve diğer ekipmanlar kullanılmıştır.

3.1.1. Kullanılan besiyerleri

Sea Salts Medium

Deniz tuzu	40 g/L
PIPES	3,1 g/L
VSM iz elementler solüsyonu	1 ml/L
Yeast extract	1 g/L
Rezasurin	0,5 mg/L

P. furiosus' u çoğaltmak amacıyla kullanılmıştır (Gao ve ark., 2003).

VSM iz elementler solüsyonu;

Nitrilotriasetik asit	1,5 g/100ml
FeCl ₂ .6H ₂ O	0,5 g/100ml
Na ₂ WO ₄ .2 H ₂ O	0,3 g/100ml
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0,4 g/100ml
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g/100ml
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/100ml
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/100ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g/100ml
Na ₂ MoSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g/100ml

1 N NaOH çözeltisi ile pH 6,8'e ayarlanmıştır ve besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

Luria Bertani Medium

Yeast extract	5 g/L
Trypton	10 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L

Besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. Antibiyotik olarak 50µg/ml kanamisin kullanılmıştır. Bu besiyeri antibiyotikli, sıvı ve katı olarak hazırlanmıştır ve *E. coli DH5α*’nın geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Kitinli besiyeri

Kolloidal kitin	4,94 g/L
Maltoz	5,56 g/L
Yeast ekstrakt	0,62 g/L
KH ₂ PO ₄	1,33 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65 g/L
Agar	20 g/L

pH 7’ye ayarlanmıştır (Khan ve ark., 2010). 121°C’de 15 dk steril edildikten sonra cam petrilere besiyeri dökümü gerçekleştirilmiştir. Rekombinant hücrelerde kitinaz ekspresyonunun gözlenmesi için kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan tampon ve çözeltiler

Sodyum asetat çözeltisi

DNA’nın etanol ile çöktürülmesinde kullanılmıştır. 3M sodyum asetat trihidrat çözeltisi hazırlamak için 40,8 g tuz tartılmış ve 100 ml distile su içinde çözdürülmüştür. Asetik asit ile pH 5,4’e ayarlanmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Kalsiyum klorür çözeltisi

E. coli suşunun kullandığımız iki farklı strainini kompetent hücre olarak hazırlamak için kullanılmıştır. 0,1 M CaCl₂ için 1,10 g tuz tartılmış ve 100 ml distile su içinde çözdürülmüştür. 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Kalsiyum klorür - gliserol çözeltisi

Kompetent hücre hazırlama aşamasında kullanılmıştır. Bu çözelti için çözeltinin %20'si gliserol olacak şekilde, gliserol ve önceden hazırlanan 0,1 M CaCl_2 çözeltisi kullanılarak hazırlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Magnezyum klorür çözeltisi

Kompetent hücre hazırlığı için kullanılmıştır. Çözelti konsantrasyonu 0,1 M olacak şekilde $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tuzu kullanılarak 100 ml hazırlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Tris – asetat (TAE) tamponu

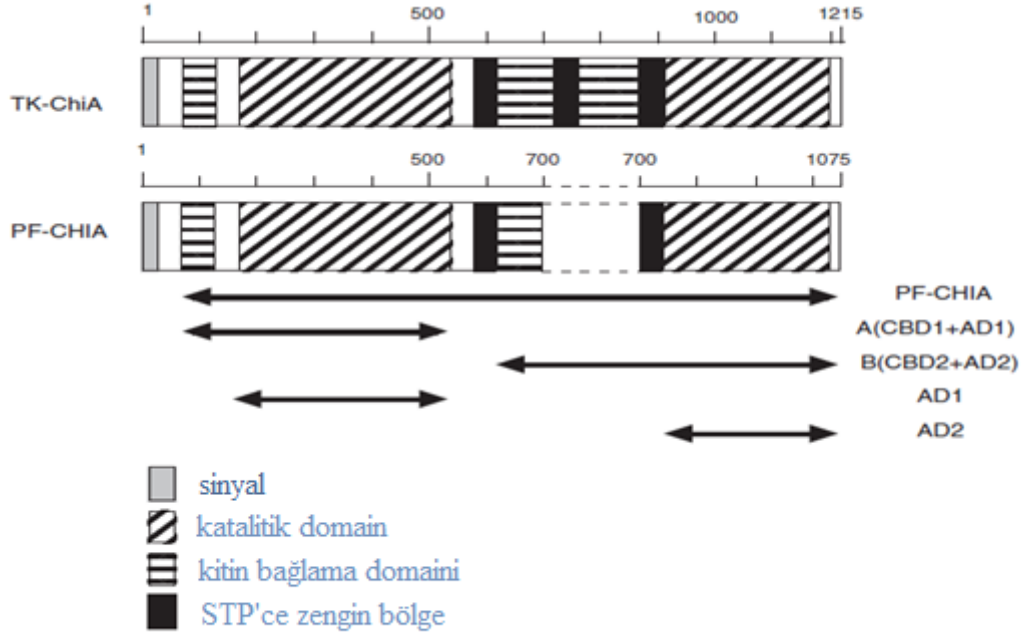
Trizma base	242 g/L
Glasiyel asetik asit	57,1 ml/L
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml/L

TAE tamponu pH 8,0 olacak şekilde, tamponun kontaminasyonunu engellemek açısından gerektiğinde seyreltilmek üzere 50X olarak hazırlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer dizaynı

Oku ve Ishikawa (2006) α kristal kitine karşı en yüksek aktivitesi olduğu belirtilen (9.45 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) B tip enzimi (aktif bölge 2 + katalitik bölge 2) kodlayan bölgeye uygun primerler uygun restriksiyon kesim bölgeleri eklenerek tasarlanmıştır.



Şekil 3.1. TK-ChiA ve PF-ChiA kitinazlarının kitin bağlama domaini ve aktif domainlerinin karşılaştırılması

P. furiosus organizmasının kitinaz gen sekansı <http://Arke.ucsc.edu/> sitesinden belirlenmiştir.

```
atgttggaacactagcttcgctagtttgagcggagaatgtgtatccaaatgcctccatgaattttacgaatacgtggctaaacgccaatctgggtcattgtt
cctctgtggagtggtgaaacttctctgttggtcctgggtggtctctgtctacactccagaaggctagtgatcctattttatgtgaattgccagtgcaacaagt
tgctgagcatcttctaataaacaactctgtcatcttactcctatcattggagtaactcatcttccaaatttctcatcactttttcgggataaatctg
cttaattgtctgaacacatttcagctaccttgattgcattttctgcgttagaaggagtcagtagtaatccatcgtcattggattgactctatctactcttcccc
cttctggccatcgtttctattataccgtatcctcctgtagtcctatccccggatcgctgggtaaggtaaagctgaattttaccaaggctcttctcttgggacta
tgagtagggcatctgcaagtttatctgcatcgataccggcttctatgtcaaagccaagtaagtggtcattatatgtatcaattacctttatgtaccattcagcca
attgttctggcgtgctggcctgttggaagatatggctcctacagccccacaaacgctattattacttctccaccaatttctctgagttcttactctcatcaac
aaatttcttagaggaattgagcctgcccaagctggaccgttgaaactgaactatagagaatgaatccaaggtaaagtacttagttccagtttaactttgca
tatttactaagggtgtgtactgatagactcatatcgatataggagcaagaagtggttctggtattggattgcattcccaggaagtggtgtaggagttga
gagtcgggtaggagtaggagttgggtgggtgtgggagtggtgagttgtgaggagttgggtgagatgtggtgtggtagtggtgtgggtgtgggtgag
ttgtccctccggttggtgtccatatgtcaattactgtccgtttatttctagggtatttcttctactttgtctccttggtccgtttactatgaatccaaatgttctgt
cggccctttattccagcttactggagtgagatgacatagccattcccccttgtttgtagcgctccagaagcttctacagtggtcctggggctagtttaa
ccttcacagtcagtcatactgtccatccaaattaagagtcacatcatactcagcaccactacccaatcgtttaccttaccttagagatcctgagactggg
acaggggtag
```

Şekil 3.2. *P. furiosus* kitinazı gen dizisi

Şekil 3.2’de dizisi verilen kitinaz geninin kodladığı proteinin dizisi ise Şekil 3.3’te verilmiştir. α kristal kitine karşı en yüksek aktivitesi olduğu belirtilen B tip enzime ait aminoasit sekansı sarı ile işaretlenmiştir.

```
"MKYLDFINVM TYDYHGAWDPITGHLAPLYADPNAPYEDPNIKWNFNVNASIQWYLKHGVNPK
QLGLGLPFYGRSFANVPPENNGLYQPFSGTPAGTWGPAYETHGVMDYWDIEEKRASGQYNNY
WDPVAMVPWLYSPSLKIFISYDDKKSIGIKVDYALKYNLGGVMVWEITADRKP GTNSHPLLD TIL
EHIAQGGGVPTSP TPTPTPTPTPTPTPTTTTTSTPTPTTTTTTPSPTTTTTTTTTTTTTTTTTSTTTTTPTTTTT
PVPVSGSLEV KVN DWGSGAEYDVT LN LDGQYDWT VKVK LAPGATVGSFWSANKQEGNGYVIF
TPVSWNKGPTATFGFIVNGPQGD KVEEIT LEINGQVIDIWTPTGGTTPPTTTTTSTPTPSQTPTPTP
TPTPTPTPTPTL TPTPLPGNANPIPEHFFAPYIDMSLSVHKPLVEYAKLTG TKYFTLAFILYSSVYN
GPAWAGSIPLEKFVDEVRELREIGGEVIAFGGAVGPYLCQQASTPEQLAEWYIKVIDTYNATYL
DFDIEAGIDADKLADALLIVQRRPWVKFSFTLPSPDPGIGLAGGYGIETMAKKGVRVDRVNPMT
MDYYWTPSNAENAIKVAENVFRQLKQIYPEKSDEEIWKMIGLTPMIGVNDDKS VFTLEDAQQLV
DWA IQHKIGSLAFWSVDRDHPGTGEVSPLHRGTNDPDWAFSHVFKFMEAFGYTFSAQTSEAS
VPT"
```

Şekil 3.3. *P. furiosus* kitinazının protein dizisi

Buna göre ilgili proteini kodlayan nükleotit sekansı kullanılarak EcoRI ve XhoI restriksiyon kesim bölgelerinin ilavesi ile primer dizaynı gerçekleştirilmiştir. Bu restriksiyon enzimleri seçiminde plazmit içerisinde tek kesim bölgelerinin olmasına dikkat edilmiştir. Primer dizaynı için Serial Cloner ve Clone Manager (http://www.scied.com/pr_cmbas.htm) programları kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. *P. furiosus* kitinazının çoğaltılması için tasarlanan primerler

Primer adı	Dizisi	Kesim bölgesi enzimi
ChiForw	5'-tata GAATTC tatg actaccctgtccagctc-3'	EcoRI
ChiRev	5'-ttctCTCGAGtcATGTTGGAACACTAGCTTcg-3'	XhoI

3.2.2. DNA izolasyonu

P. furiosus kültüründen DNA izolasyonu üretici tavsiyeleri modifiye edilerek, Bio Basic / Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Genomic DNA Kit kullanılarak yapılmıştır.

Sıvı kültürden ince iğneli steril şırınga ile 1,3 ml alınmıştır. 6000 rpm’de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. Pelet 100 µl TE buffer (10:1) içinde resüspanse edilmiştir. 20 µl (20 ng/ml) Proteinaz K ilavesi yapılmıştır. Karışım vortekslenip 65°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kısa bir vorteks yapılmıştır. 8 µl RNazA (100 ng/ml) eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 15 sn son hızda

vortekslenip 250 µl Digestion solüsyonu ve 150 µl etanol (%96-100) eklenip kolona yükleme yapılmıştır. 10000 rpm’de 2 dk santrifüj yapılmıştır. 500 µl Wash solüsyonu eklenilmiştir ve 10000 rpm’de 2 dk santrifüj yapıp alttaki sıvı dökülmüştür. Kolon temiz 1,5 ml’lik steril bir mikrofüj tüpüne aktarılmıştır. 75 µl Elution buffer eklenilmiştir ve 10000 rpm’de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Spin kolon atılıp genomik DNA’yı barındıran mikrosantrifüj tüpü +4°C’de saklanılmıştır.

3.2.3. Farklı DNA polimerazlar ile kitinaz geninin amplifikasyonu

P. furiosus DNA’sından Taq polimeraz, Pfu polimeraz ve Phire polimeraz kullanılarak kitinaz geni çoğaltılmaya çalışılmıştır.

Taq Polimeraz: Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*’dan elde edilen ve 94°C’ye kadar dayanabilen DNA polimeraz enzimidir.

Çizelge 3.2. *P. furiosus* kitinazının Taq polimeraz ile çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı

10X Taq buffer	1 µl
10 mM dNTPs	1 µl
ChiForw	1 µl
ChiRev	1 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
Template DNA	1,5 µl
Taq DNA polimeraz	1 µl
Distile su	11,5 µl
Toplam hacim	20 µl

Çizelge 3.3. *P. furiosus* kitinazının Taq polimeraz ile çoğaltılması için PZR koşulları

98°C	30 saniye	
98°C	5 saniye	} 30 döngü
50°C	5 saniye	
72°C	25 saniye	
72°C	1 dakika	

Pfu polimeraz: Hipertermofilik bir arke olan *P. furiosus* mikroorganizmasından elde edilen bir DNA polimerazdır. Bu enzim 3’-5’ ekzonükleaz proofreading aktivitesine sahiptir. Taq DNA polimeraz ile karşılaştırıldığında termostabilite ve proofreading özellikleri bakımından daha üstündür.

Çizelge 3.4. *P. furiosus* kitinazının Pfu polimeraz ile çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı

Pfu tampon	4 µl
10 mM dNTPs	0,4 µl
ChiForw	1 µl
ChiRev	1 µl
Pfu polimeraz	0,4 µl
Template DNA	1,5 µl
Distile su	11,7 µl
Toplam hacim	20 µl

Çizelge 3.5. *P. furiosus* kitinazının Pfu polimeraz ile çoğaltılması için PZR koşulları

98°C	30 saniye	
98°C	5 saniye	} 30 döngü
50°C	5 saniye	
72°C	25 saniye	
72°C	1 dakika	

Phire Hot Start II DNA polimeraz: Arkeal bir DNA polimerazdır.

Çizelge 3.6. *P. furiosus* kitinazının Phire DNA polimeraz ile çoğaltılması için hazırlanan PZR karışımı

5X reaksiyon tamponu	4µl
ChiForw	1µl (10pmol/µl)
Chi Rev	1µl (10pmol/µl)
Phire hot start II	0,4µl
Distile su	11,7µl
Toplam hacim	20µl

Çizelge 3.7. *P. furiosus* kitinazının Taq polimeraz ile çoğaltılması için PZR koşulları

98°C	30 saniye	
98°C	5 saniye	} 30 döngü
50°C	5 saniye	
72°C	25 saniye	
72°C	1 dakika	

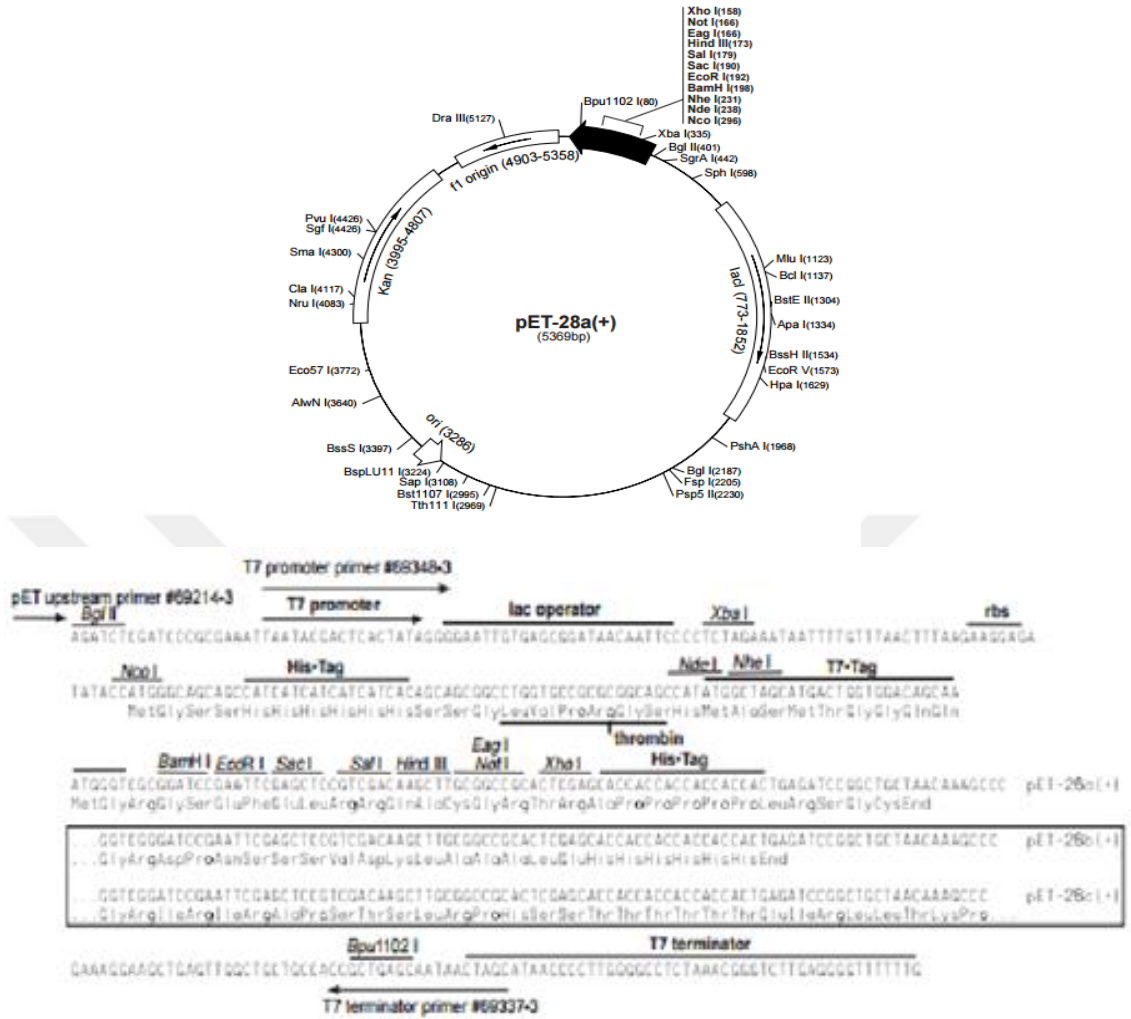
3.2.4. Plazmit izolasyonu

pET sistemi T7 lac promotörü içeren kanamisine dirençli bakteriyel ekspresyon vektörüdür. N-terminal ucta 6-His kuyruğuna ve trombin parçalama bölgesine sahiptir. Internal T7 epitopu ve C-terminal ucta 6His- işaretine sahiptir.

pET sistemi *E. coli* içinde klonlama ve rekombinant proteinlerin ekspresyonu için şimdiye kadar geliştirilmiş en güçlü sistemdir. Hedef genler, güçlü bakteriofaj T7 transkripsiyonu ve translasyon sinyallerinin kontrolü altında pET plazmitine klonlanır. Ekspresyon konak hücre içinde bir T7 RNA polimeraz kaynağı sağlandığında indüklenir. Selektif ve aktif olan T7 RNA polimerazı tam olarak indüklendiğinde, hücrenin tüm kaynakları hedef gen ekspresyonu için dönüştürülür. İndüksiyon sonrası arzu edilen ürün birkaç saat içerisinde bütün hücre proteinlerinden %50'sinden de fazlasını içerebilir. Bu sistem son derece güçlü olmasına rağmen, uyarıcının konsantrasyonunu düşürerek ekspresyon seviyesinin azaltılması mümkündür. Ekspresyon seviyesinin azaltılması bazı hedef proteinlerinin çözünebilirlik verimini arttırabilir. Bu sistemin bir diğer önemli yararı, indüklenmemiş durumdaki transkripsiyonel sessiz hedef genleri koruma yeteneğidir. Hedef genler, ilk olarak T7 RNA polimeraz genini içermeyen konakları kullanarak klonlanır. Böylelikle konak hücre için potansiyel toksik proteinlerin üretimi nedeniyle kararsız plazmit eliminasyonu gerçekleştirilmiş olur.

Bir ekspresyon olmayan konakta bir kez kurulan hedef protein ekspresyonu, λ pL ve pI promotörleri kontrolü altında T7 RNA polimeraz geni taşıyan bir faj olan λ CE6 ile konağın enfekte edilmesiyle veya lacUV5 kontrolü altında T7 RNA polimeraz geninin kromozomal bir kopyasını içeren ekspresyon konağına, plazmit transferiyle başlatılabilir. İkinci durumda, bakteri kültürüne IPTG veya laktoz eklemesi ile veya otomatik indüksiyon besiyeri kullanılarak ekspresyon indüklenir.

Kitinaz geninin ekspresyonu için kullanılması planlanan pET vektörü, kanamisine direnç geni de içeren pET28a(+)'dır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. pET28a(+) vektör sistemi

Çalışmamızda Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi, EcoRI ve XhoI bölgelerinden kesim yapılmış ve kitinaz geni bu bölgeye eklenmiştir. Sonuçta oluşan rekombinant protein N-terminal His-tag içerecek şekilde tasarlanmıştır.

pET28a(+) vektörünün stoktaki *E.coli* DH5α hücrelerinden ve gerekli durumlarda ilgili hücrelerden izolasyonu Bio Basic / Molecular Biology Kit EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Mini Preps Kit kullanılarak yapılmıştır. Genel olarak prosedür şu şekildedir;

Bir gece boyunca antibiyotikli LB besiyerinde büyütülen hücrelerden 2 ml 12000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülüp 100 µl Solution I ile pelet süspanse edilmiştir ve 1 dk bekletilmiştir. Karışıma 200 µl Solution II eklenip tüp 4-6 kez yavaşça karıştırılmış ve oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. 350 µl Solution III

ilavesi yapılmıştır. Yavaşça karıştırılıp oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. 12000 rpm’de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatant kolona transfer edilmiştir ve 2 dk bekletilmiştir. 10000 rpm’de 2 dk santrifüjlendikten sonra 750 µl Wash solution eklenip 10000 rpm’de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Kolon steril bir eppendorfa transfer edilmiştir ve kolonun merkezine 50 µl Elution buffer eklenilmiştir. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe ettikten sonra 10000 rpm’de 2 dk santrifüjlenmiştir. Elde edilen plazmit -20°C’de saklanmıştır.

3.2.5. Plazmit ve PZR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesimi

Rekombinant DNA molekülünün oluşturulması sırasında her bir vektör molekülü, halkayı açmak için tek bir pozisyonda kesilmelidir. Bir defadan fazla kesilen molekül iki ya da daha fazla fragmana ayrılacak ve klonlama aracı olarak kullanışlı olmayacaktır. Bu kesim işlemi restriksiyon endonükleazlarca gerçekleştirilir.

Restriksiyon endonükleazlar, çift iplikli DNA’yı sadece sınırlı sayıda tanıma yerlerinden keserler. Günümüzde 250 adet farklı suştan elde edilmiş 1200’e yakın farklı restriksiyon enzimi bilinmektedir. Bu enzimler genellikle elde edildikleri organizmayı yansıtacak şekilde isimlendirilirler. Bir restriksiyon enzimi önce DNA molekülünü boydan boya tarar ve kendi tanıma dizisi ile karşılaştığında ona bağlanır. Çift sarmalın her iki ipliği üzerinde birer adet şeker-fosfat bağı kırılır veya metilasyon yapar. Restriksiyon enzimlerinin tanıma yerleri 4-6 bazlık palindromik sekanslardır. Restriksiyon enzimleri ile kesim sonucunda 5’ uzun uçlar, 3’ uzun uçlar veya küt uçlar oluşur. 5’ veya 3’ uzantılı kesimler yapışkan uçların oluşmasına neden olur.

Ticari olarak restriksiyon enzimleri üretilmektedir ve genellikle 10 U/µl konsantrasyonunda satışa sunulmaktadır. Bir ünite restriksiyon enzim aktivitesi, uygun koşullar altında 1µg DNA’yı bir saatte kesebilen enzim olarak tanımlanır. Bu enzimlerin çoğu %50 gliserol içeren tamponlarda ve -20°C’de saklanır.

Bu çalışmada restriksiyon enzimi olarak EcoRI ve XhoI kullanılmıştır. *EcoRI* geni, *E. coli* RY13 straininden elde edilirken, *XhoI* geni, *Xanthomonas holcicola* straininden elde edilir. Bu enzimler 37°C’de aktif hale gelirler. Her iki enzimde NEBuffer 2.1 tamponunda %100 çalışırlar. pET28a(+) vektörü ve CDAD2 için kullanılan restriksiyon reaksiyon karışımı çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. pET28a(+) vektörü ve CDAD2'nin XhoI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesimi için kullanılan reaksiyon karışımı

10X tampon	2 µl
XhoI	2 µl
EcoRI	1 µl
DNA	4 µl
Distile su	11 µl
Toplam hacim	20 µl

3.2.6. Ligasyon

Ligasyon işlemi vektör molekülü ve klonlanacak olan DNA molekülünün birleşmesi ile gerçekleşir ve bu reaksiyonu katalizleyen DNA ligaz enzimidir. Ligaz enzimleri her hücrede bulunmasına rağmen laboratuarda kullanılan enzim genellikle T4 bakteriofajı ile enfekte edilen *E. coli* bakterisinden saflaştırılır. Hücrede bulunan DNA ligazlar DNA replikasyonu sırasında oluşan okazaki fragmentlerini 3'-5' fosfodiester bağları ile birbirine bağlamada ve hasarlı DNA'ların tamirinde görev alırlar. Rekombinant DNA teknolojisinde ise ligaz enzimi ilgi duyulan DNA parçalarını vektör DNA moleküllerine in vitro şartlarda kovalent bağlarla bağlayarak rekombinant DNA elde edilmesinde kullanılırlar. DNA ligaz enzimi ATP varlığında birbirlerine geçici olarak hidrojen bağları ile tutunmuş yapışkan uç taşıyan DNA parçalarından birinin 3'OH ucunu ile vektörün 5' fosfat ucu arasında 3'-5' fosfodiester bağının oluşumunu katalizler.

İnsert DNA ligasyon için hazırlandıktan sonra, konsantrasyonu bilinmiyorsa agaroz jel üzerinde konsantrasyonu bilinen benzer büyüklükteki standart ile PZR ürününün boyama yoğunluğu karşılaştırılabilir. Böylelikle yaklaşık olarak PZR ürününün konsantrasyonu tahmin edilir. Vektöründe konsantrasyonu bilinmiyorsa, aynı işlem onun içinde gerçekleştirilebilir. Belirli bir vektör ve insert için optimal oranını belirlemekte farklı DNA oranları kullanılabilir. Çoğu durumda 1:1 veya 1:3 vektör: insert oranında iyi çalışır. Ama 1:5, 5:1 veya 10:1 oranı bile kullanılabilir. Spesifik vektör: insert molar oranı için aşağıdaki formül kullanılabilir:

$$\frac{\text{vektör(ng)} \times \text{insert boyutu(kb)}}{\text{vektör boyutu(kb)}} \times \frac{\text{insert molar miktarı}}{\text{vektör molar miktarı}} = \text{insert (ng)}$$

PZR ürünü ve plazmitin kesimleri ayrı ayrı olarak gerçekleştirilmiştir ve bu işlem için EcoRI ve XhoI enzimleri kullanılmıştır. Reaksiyon sonrasında termal inaktivasyon yapılmamıştır. Ancak reaksiyon karışımı temizlenerek kullanılmıştır. Bu işlem için Bio Basic Inc. EZ-10 Spin Column PZR Products Purification Kit'i kullanılmıştır ve işlem basamakları aşağıdaki gibidir;

Restriksiyon hacmine (20 µl) üç katı kadar Binding Buffer (60 µl) eklenilmiştir. Karışım kolona transfer edilmiştir ve oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir. 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra alttaki sıvı dökülmüştür. 750 µl Wash Solution eklenilmiştir. 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Spin kolon steril bir mikrofüj tüpüne transfer edilmiştir ve üzerine 40 µl distile su eklenilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 10000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen ürün -20°C'de stoklanmıştır.

Ligasyon karışımı hazırlanırken farklı oranlarda kesilmiş pET28a ve CDAD2 geni kullanılmıştır. Bu oranlar Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. pET28a ve CDAD2 genlerinin ligasyonu için kullanılan reaksiyon karışımları

	(1:3)	(1:2)	(1:1)	(2:1)	(3:1)
pET28a	2	2,5	4	5	6
CDAD2	6	5	4	2,5	2
Buffer	1	1	1	1	1
Ligaz	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Distile su	0,5	1	0,5	1	0,5

Reaksiyon +4°C'de 2 gün boyunca sürdürülmüştür.

3.2.7. Transformasyon ve plazmit seçilimi

Pek çok bakteri türü, büyüdükleri ortamdan DNA moleküllerini alabilme yeteneğine sahiptirler. Bu şekilde alınan DNA çoğunlukla yıkılır, fakat nadiren konak hücrede hayatta kalıp replike olabilir. Özellikle, DNA molekülü konak tarafından tanınan replikasyon orjinli bir plazmitse meydana gelir.

E. coli'yi de içeren bakteri türlerinin çoğu, normal şartlar altında sınırlı miktarda DNA alırlar. Bu türleri etkili bir şekilde transforme etmek için bakteriler DNA alma yeteneklerini arttıracak birtakım fiziksel veya kimyasal muamelelere maruz bırakılmalıdır. Bu muameleye tabi tutulan hücrelere kompetent denir.

Soğuk tuz çözeltisinde ısıtılan *E. coli* hücrelerinin DNA alımında ısıtılmayan hücrelerden çok daha etkili oldukları belirlenmiştir. Rubidyum klorit ve bunun gibi diğer tuzlarda etkili olmasına rağmen 50 mM'lık kalsiyum klorür çözeltisi geleneksel olarak kullanılmaktadır.

Kalsiyum klorür, muhtemelen DNA'nın hücre dışına çökmesine neden olur veya hücre duvarında DNA bağlanmasını arttırıcı bir çeşit değişmeden sorumludur. Her iki durumda da hücreye DNA alımına değil, sadece DNA'nın bağlanmasına etki eder. DNA, kompetent hücrelere ilave edildiğinde, hücre dışına bağlı kaldığı görülür. Hücrelere DNA'nın asıl girişi sıcaklığı 42°C'ye arttırmakla uyarılır.

Kompetent hücre olarak seçilmiş olan *E. coli* DH5α patojen değildir ve laboratuvar klonlamada kullanılmak için geliştirilmiştir. Yüksek verimli transformasyon sağlayan çoklu mutasyonlarla bir klonlama suşu olarak D. Hanahan tarafından geliştirilmiş bir straindir. Bu strain bir seri mutasyona sahiptir. Bunlar; lacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1'dir. lacZ Delta M15 mutasyonu; rekombinant hücrelerde mavi-beyaz koloni taramaya izin verir. endA1 mutasyonu, yüksek plazmit aktarım hızı sağlayan alt endonükleaz bozulmasına neden olur. recA1 mutasyonu ise daha stabil bir insert için homolog rekombinasyonu azaltır. Bu strain 4.686.137 nükleotit, 4359 gen ve 4128 proteini kodlayan gen içeren dairesel bir kromozomdur. Ayrıca kendi plazmitlerini içerir ve plazmit insertünü kabul edebilme yeteneğine sahiptir (Griffith, 2001).

DH5α kompetent hücresi hazırlığı:

LB agar üzerinde bir gece hücreler büyütülmüş hücreler plate üzerine 500-1000 µl LB broth eklenerek hücreler toplanılmıştır. 100 ml LB broth, 500 µl bu hücre kültüründen inoküle edilmiştir. 200 rpm 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra 600nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. OD 0,5-0,7' ye ulaşana kadar ara ara ölçüm yapılmıştır ve OD istenilen aralığa geldiğinde hücrelerin gelişimini durdurmak için erlen 15 dk buzda bekletilmiştir. Kültür 8000 rpm 4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Elde edilen pelet 40ml 0,1M $MgCl_2$ ile yavaşça çözündürülmüştür. 5000 rpm 4°C’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 20ml 0,1 M $CaCl_2$ solüsyonu ilavesi ile çözündürülmüştür. Elde edilen solüsyon en az 30 dk buzda bekletilmiştir. 5000 rpm 4°C’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Pelet 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ -%20 gliserol ile yavaşça resüspanse edilmiştir ve bu solüsyon eppendorf tüplerine 150’şer μ l dağıtılarak -80°C’ye kaldırılmıştır.

Kompetent hücre hazırlığı için tüm kullanılan uçlar, eppendorflar ve çözeltiler bir gece önceden -20°C’de soğutularak hazır hale getirilmiştir.

Isı şoku ile transformasyon

DH5 α kompetent hücreleri -80°C’den alınmış ve taze buz içerisinde 20 dk. çözünmesi beklenilmiştir. Çözünme gerçekleştikten sonra ligasyon karışımından eklenilmiştir. Buz içerisinde 20-30 dk inkübe edilmiştir. Hücrelerin DNA’yı alabilmeleri için 1 dk 42°C’de bekletilmiştir ve hemen buza alınıp 1-2 dk bekletilmiştir. Böylelikle hücreler, DNA’yı alabilmeleri için ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Devamında plazmitleri içeren hücrelerin, ilgili antibiyotiği eksprese etmesine zaman tanımak için, antibiyotiksiz LB broth’dan 1 mL karışımın üzerine eklenmiş ve 37°C’de 1,5 saat boyunca 200 rpm’de çalkalamalı olarak kanamisine direnç sağlayacak genin ekspresyonu için zaman verilmiştir. Süre sonunda üreyen hücreler 10000 rpm’de 1 dk. santrifüj edilerek çökeltilmiş ve üst sıvıdan 500 μ L uzaklaştırılmıştır. Kalan sıvı içinde pellet süspanse edildikten sonra, kanamisinli LB plakelere yüzeye yayma ekimleri yapıp 37°C’de bir gece (12-15 saat) inkübe edilmiştir. Plate üzerinde gelişen kolonilerin plazmit içerdiği kabul edilmiştir. Bu plazmitlerden muhtemel kitinaz geni içerenlerin tespiti için ilgili primerler kullanılarak koloni PZR yapılmıştır.

Koloni PZR ile transformant kontrolü

CD2AD2 geni, vektörün ORF 1 ve lacI promotorü arasına insert edilmiştir. Bu nedenle blue-white tarama kullanılmayıp koloni PZR yöntemi tercih edilmiştir.

Hücrelerin doğru plazmit insertünü alıp alamadığını kontrol edebilmek amacıyla kullanılan hızlı bir protokoldür. Bu protokole göre plate üzerinde gelişen koloniden steril kürdan yardımı ile alınmıştır ve 15 μ l distile su içinde homojenize edilmiştir.

Koloniye içeren su 90-95°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir ve üstteki sıvı PZR için kullanılmıştır.

3.2.8. Etanol ile presipitasyon

DNA'nın gerektiği durumlarda konsantre edilmesi için soğuk etanol ile çöktürülmüştür. Bunun için, 135 µl DNA örneği alınmış ve üzerine 15 µl sodyum asetat eklenmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra 300 µl %100'lük soğuk etanol eklenmiştir ve karıştırılmıştır. -20°C'de en az bir saat bekletilmiştir.

13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatant dikkatlice boşaltılmıştır. 1 ml %70'lik soğuk etanol eklenmiştir ve spin santrifüj yapılmıştır. Süpernatant dikkatlice boşaltıldıktan sonra 40°C'de 1 saat bekletilmiştir. 30 µl ultra saf su eklenmiştir ve DNA'nın saf su içinde tam dağılabilmesi için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.

3.2.9. Agaroz jel elektroforezi

Elektroforez, elektriksel bir alanda moleküllerin yüklerine, moleküler ağırlıklarına ve büyüklüklerine göre ayırt edildiği bir tekniktir. Bu analizin temeli, moleküllerin elektriksel bir alanda jel üzerindeki göçüne dayanır. Göç hızı molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin konsantrasyonuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlı olarak değişmektedir.

1x TAE tamponunda %1'lik (w/v) agaroz jel hazırlanmıştır. Kaynatılıp soğutulmuştur. Her 100 ml jele 2µl Et-Br (10 mg/ml) eklenmiştir. Agaroz solüsyonu tarakları yerleştirilmiş olan kasete aktarılmış ve 30 dk soğuması beklenilmiştir. Örnekler jelde 80-90 voltta 45 dakika yürütülmüştür.

3.2.10. Kiti naz ekspresyonu

Doğru diziye sahip olduğu belirlenen plazmit yukarıda anlatılan prosedürlerdeki gibi kompetent hale getirilen BL21(DE)pLysE hücrelerine ısı şoku ile transfer edilmiştir. Transformasyon sonrası kanamisin içeren petri kaplarından bir öze dolusu koloni 5mL'lik steril LB + Km⁵⁰ besiyerine aktarılmış ve 4 saat boyunca 37°C'de 200 rpm'de çalkalamalı olarak inkübe edilmiştir.

İlk önce gen ekspresyonunu sağlayacak uygun IPTG (izopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid) konsantrasyonunu bulmak için 6 tane 25 mL LB+Km50 içeren 100 mL'lik erlenlere 1.25'şer mL (%5) aktif kültür aktarılmış ve 37°C'de 200 rpm'de OD₆₀₀ 0.6 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. Üremeyi yavaşlatmak amacıyla kültür buz üzerinde 5 dk. inkübe edildikten sonra 5 erlene farklı konsantrasyonlarda 12.5 μ L (0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1 mM) IPTG ilave edilirken bir tanesi negatif kontrol olarak IPTG ilave edilmemiştir. Daha sonra erlenler, ekspresyonun gerçekleştirilmesi için 37°C'de 200 rpm'de 3.5-4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda 6000 rpm'de +4 °C'de 10 dk. santrifüj yapılarak hücreler toplanmıştır. Pelletlerin gramı ölçülerek işlem görünceye kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.11. *E.coli* BL21(DE) pLysE hücrelerinin parçalanarak eksprese edilen kitinazın belirlenmesi

Hücrelerin IPTG ilavesinden önce ve sonra süpernatanttan ve hücrelerden 1'er mL alınarak protein ekspresyonu araştırılmıştır. Bunun için intraselüler olarak eksprese edilen proteine ulaşmak için hücrelerin parçalanması gerekmiştir. Hücreler parçalanmadan önce, 10 μ L 100mM proteaz inhibitör kokteyli, 10 μ L 100 mM benzamidin 10 mL resüspanسیون tamponuna eklenmiştir. 1 g hücreye 3.5 mL olacak şekilde resüspanسیون tamponu hücrelerin üzerine eklenmiş ve homojenize hale getirilen hücreler buz içinde sonikatörde parçalanmıştır. Çözünmeyen debris, 6000 rpm'de +4 °C'de 10 dk. santrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra, ekspresyon seviyesi SDS-PAGE yöntemi ile gözlenmiştir.

Uygun IPTG konsantrasyonu belirlendikten sonra enzim özelliklerinin belirlenmesi amacıyla indüksiyon 500 mL'lik LB + Km⁵⁰ besiyerinde gerçekleştirilmiştir.

500 mL LB+Km⁵⁰ içeren 2 L'lik erlenlere 25mL (%5) aktif kültür aktarılmış ve 37°C'de 200 rpm'de OD₆₀₀ 0.6 oluncaya kadar inkübe edilmiştir. Üremeyi yavaşlatmak amacıyla kültür buz üzerinde 5 dk. inkübe edildikten sonra erlene 250 μ L 0.2 mM IPTG ilave edilerek, ekspresyonun gerçekleştirilmesi için 37°C'de 200 rpm'de 3.5-4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda 6000 rpm'de +4 °C'de 10 dk. santrifüj

yapılarak hücreler toplanmıştır. Pelletlerin gramı ölçülerek işlem görünceye kadar - 80°C’de saklanmıştır.

3.2.12. Kitinazın ekstraksiyonu

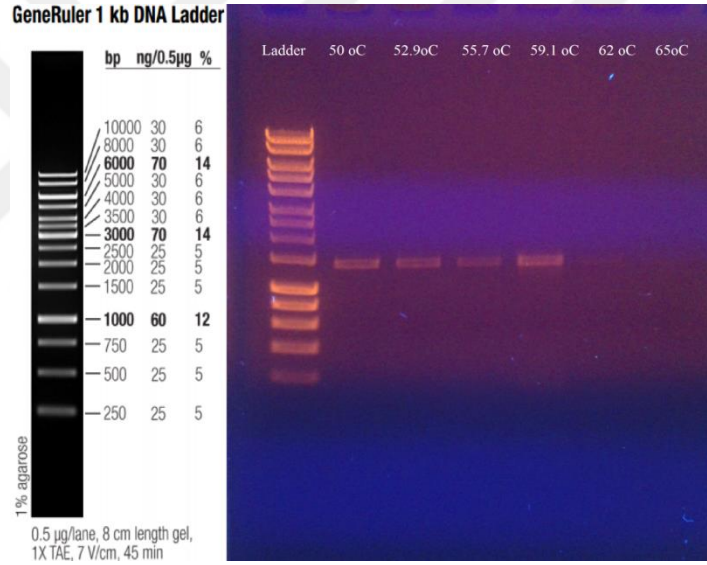
Pelletler yukarıda anlatıldığı gibi, 1 g hücreye 3.5 mL olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyli ve benamidin içeren resüspansiyon tamponu eklenmiş ve homojenize hale getirilen hücreler buz içinde sonikatörde parçalanmıştır. Çözünmeyen debris, 6000 rpm’de +4 °C’de 10 dk. santrifüj ile uzaklaştırıldıktan sonra süpernatant enzim karışımı olarak kullanılmıştır. Hipertermofilik bir arke olan *P. furiosus* kitinazı, optimum 85 °C’de aktivite gösterdiği ve bu sıcaklıklarda *E. coli* proteinleri denatüre olacağı için, ilave saflaştırma yapılmamıştır.

3.2.13. Kitinaz aktivitesinin belirlenmesi

BL21(DE)pLysE hücrelerinden ekstrakte edilen kitinaz içeren süpernatantın kitinaz aktivitesinin belirlenmesi için kitin petrilere kullanılmıştır. Bu amaçla 20-100 µL kitinaz süpernatantı petrilere spotlanmış ve 85°C’de 24 saate kadar inkübe edilmiştir. Petrillerdeki açılma zonları gözlenmiştir. Petri kaplarındaki besiyerinin kurumaması için inkübatöre su ilave edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

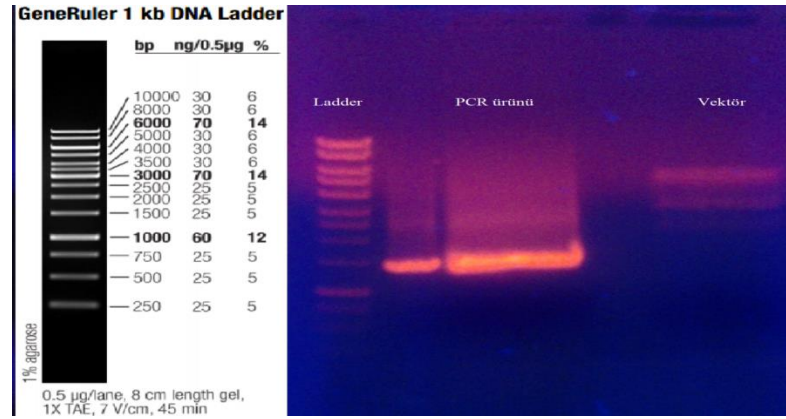
P.furiosus DNA'sı izole edildikten sonra elde edilen DNA'nın spektral yöntemle konsantrasyonu 23,45 µg/ml ve saflığı 1,8 olarak belirlenmiştir. İzole edilen DNA'nın Chi F ve Chi R primeri ile çoğaltılması sonucunda 1407 bp'lik bir fragment elde edilmiştir. Polimerizasyon, Taq polimeraz ile elde edilememiş olmasına rağmen, Pfu polimeraz ve Phire polimeraz ile istenilen ebattaki fragmente ulaşılmıştır. *P. furiosus* genomunun % G +C miktarı 40.77'dir. Çok yüksek bir değer olmaması nedeniyle, bakterial kökenli DNA polimerazın uygun şekilde gene bağlanamamış olması düşünülmektedir. Ancak %44 G+C içeriğine sahip *P.abysyi* ile yapılan çalışmada Taq polimeraz ile genomun çok düşük verimde de olsa çoğaltıldığı gösterilmiştir (Killelea et al., 2014). *P. furiosus* ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 4.1. PZR ürünü agaroz jel görüntüsü

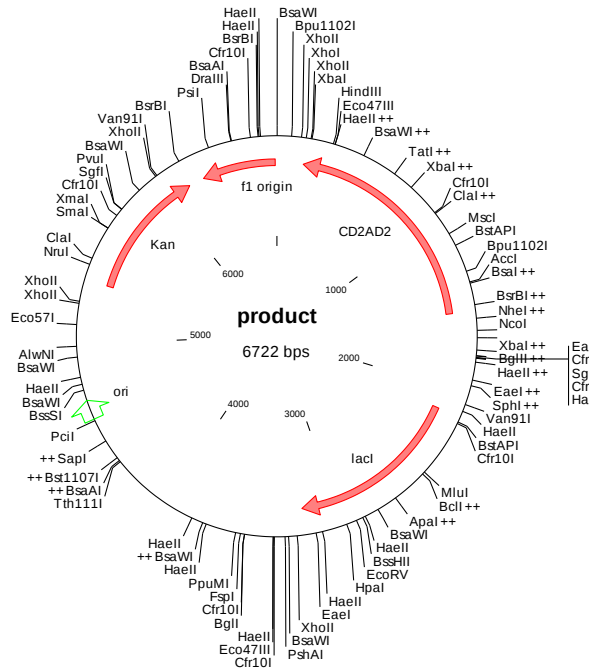
Şekil 4.1'de görüldüğü gibi kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı 59.1 °C olarak belirlenmiş ve takip eden çalışmalarda bağlanma sıcaklığı olarak 59.1 °C kullanılmıştır.

Yaklaşık 150 ml kadar çoğaltılan kitinaz geni, PZR purifikasyon kiti ile temizlendikten sonra, pET28a(+) plazmiti ve temizlenmiş PZR ürünü XhoI ve EcoRI enzimleri ile kesilmiş ve jelden kesilerek jel ekstraksiyon kiti ile temizlenmiştir.

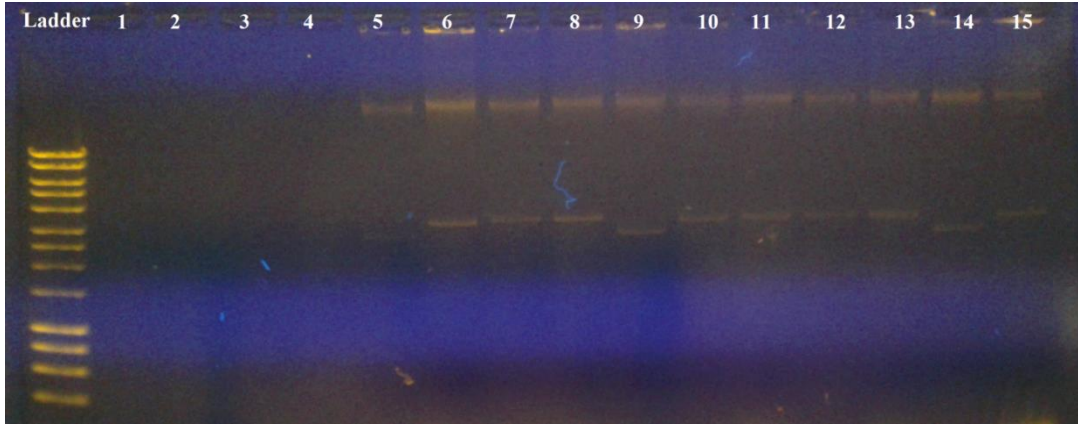


Şekil 4.2. EcoRI ve XhoI ile kesilmiş PZR ürünü ve vektörün jel kesiminden önceki agaroz jel görüntüsü

Jelden kesilip temizlenen fragmentler metotta bahsedildiği gibi ligasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. +4°C’de 48 saatlik inkübasyon sonrası 2-5 µL ligasyon karışımı kompetent haldeki *E.coli* DH5α hücrelerine aktarılmış ve 12 saat 50 µg kanamisin içeren LB besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plazmit içeriği taranmıştır. Bunun için üreyen kolonilerden bir kürdan dolusu hücre, 5 dk. kaynar suda bekletildikten sonra, 6000 rpmde 5 dk. santrifüj yapılarak kalıtım materyali içeren süpernatant agaroz jele yüklenmiştir. Böylelikle doğru plazmit içeren hücreler aranmıştır. Buna göre plazmit içindeki CD2AD2 geninin şeması Şekil 4.3’teki gibidir.

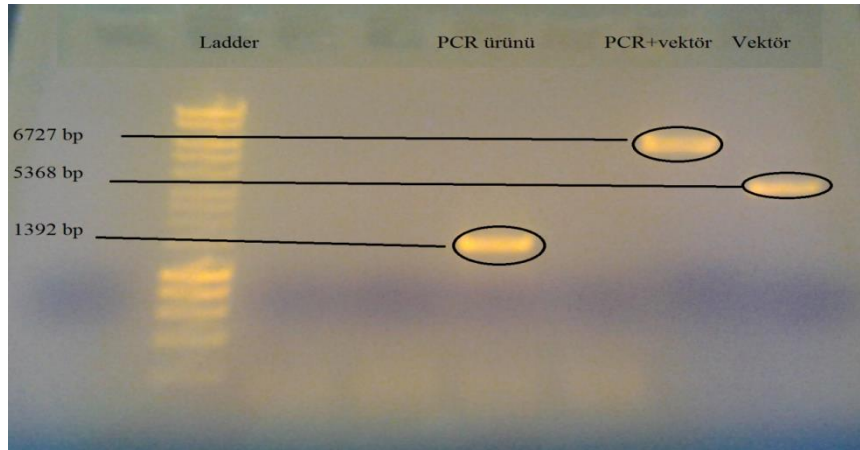


Şekil 4.3. pET28b-CD2AD2 konstraktının Serial Cloner programı ile gösterimi.



Şekil 4.4. Doğrudan jele yüklenen kolonilerin gösterilmesi

Şekil 4.4’de de görüldüğü gibi 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 ve 15. koloniler agaroz jelde daha yüksek büyüklükte bant vermişlerdir. Plazmitler hücre içinde süpersarmal yapıda bulundukları için, lineer haldeki büyüklüklerinden daha hızlı ilerledikleri bilindiği için, yaklaşık 6700 baz içeren plazmitlerin agaroz jelde daha aşağıda görülmeleri normaldir. Yine de sonuçların doğrulanması için, doğru ebatta plazmit içerdiği tespit edilen bütün örneklerden miniprep yöntemi ile plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu plazmitler kontrol amacı ile restriksiyon enzimleri ile kesilip tekrardan agaroz jelde yürütülmüşlerdir.

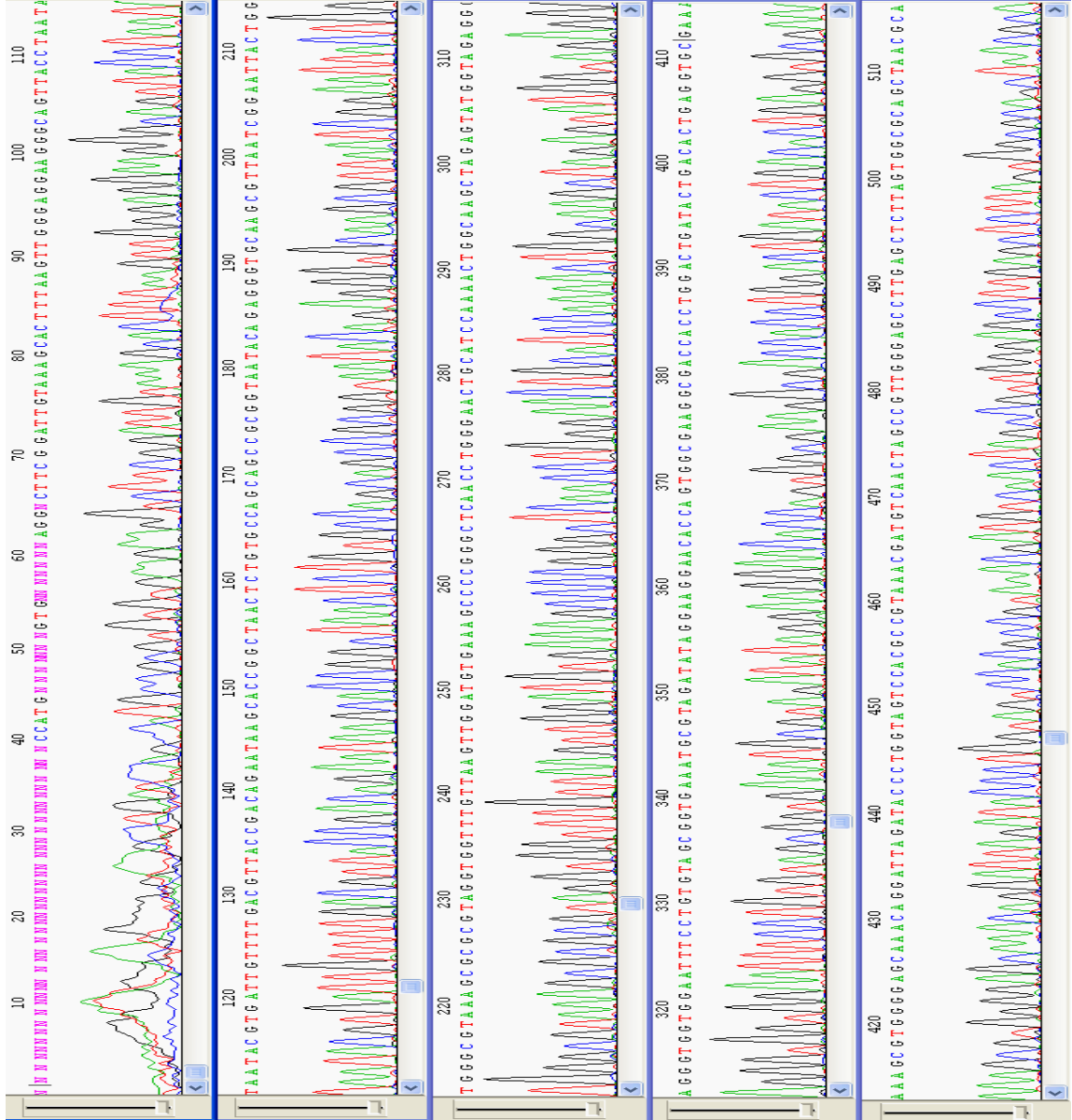


Şekil 4.5. Seçilen plazmitin doğruluğunun gösterilmesi

Şekilde, seçilen kolonilerden ekstrakte edilen plazmitlerin EcoRI restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu gösterilmiştir. Beklenen ebatta, 6727 bp’lık büyüklükte plazmite sahip kolonilerden 8 no’lu koloniye ait plazmit seçilmiştir. Koloni %20 gliserol içinde -80 °C’de saklanmıştır.

Çift iplikli plazmit ve içerdiği kitinaz geni, tüm kesim bölgeleri ve açık okuma kalıpları ile serial cloner programı kullanılarak, elde edilen konstraktın yapısı ayrıntılı olarak gösterilmiştir (EK A.).

Restriksiyon kesimi ile doğrulananan kitinaz geni içeren pET28(a) plazmitin dizisi, mutasyon kontrolleri için Refgen firmasının yapmış olduğu Sanger dizi analizi yöntemi ile doğrulanmıştır. Örnekler firmaya 50 ng olacak şekilde gönderilmiştir.



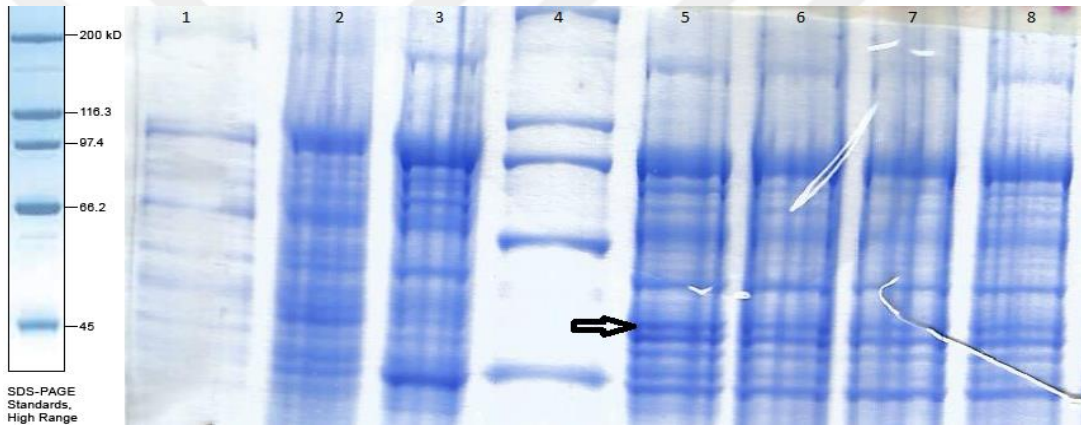
Şekil 4.6. Dizi analiz kromatogramları

Elde edilen kromatogramlar, ilk 45 ve son 70 bazlık karışık pikleri içeren kısımlar uzaklaştırıldıktan sonra değerlendirilmiştir. Kromatogram sonucunda alınan

dizi ile olması gereken dizi karşılaştırılmış ve buna göre dizide herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

4.1. pET28:CD₂AD₂ füzyon proteininin ekspresyonu

Mutasyon kontrolü yapılmış olan pET28:CD₂AD₂ konstraktı, ekspresyon çalışması için *E.coli* BL21 (DE3)pLysE hücrelerine transforme edilmiştir. 50 mg/ml konsantrasyonunda kanamisin içeren LB petrilerinde üreyen hücrelerden yöntemde anlatıldığı gibi büyütülen hücrelerin kitinaz ekspresyonu 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1 M konsantrasyonlarındaki IPTG ile indüklenmiştir. Süre sonunda büyüyen hücreler parçalandıktan sonra, ekspresyon seviyesi SDS-PAGE yöntemi ile kontrol edilmiştir.



Şekil 4.7. IPTG konsantrasyonunun kitinaz ekspresyonuna etkisi (örneklerin protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçüldükten sonra her bir kuyuya 30 ng protein yüklenmiştir.) 1. Kuyu: Süpernatant 2. Kuyu: IPTG eklenmemiş negatif kontrol 3. Kuyu 0,1 M IPTG 4. Kuyu High Range Marker (BioRad) 5. Kuyu 0,2 M IPTG 6. Kuyu 0,4 M IPTG 7. Kuyu 0,5 M IPTG 8. Kuyu 1 M IPTG

Şekil 4.7’de görüldüğü gibi kitinaz ekspresyonu için 0.2 M IPTG yeterli gelmiştir. Protein moleküler ağırlığı yaklaşık 55 kDa büyüklüğündedir. *T. kodakaraensis* ChiA 134 kDa, *S. tokodaii* 77 kDa, *T. chitinophagus* 50 kDa büyüklüğünde protein sentezlerken *P. furiosus* ChiA proteini 39 kDa, ChiB’nin ise 11 kDa olduğu bilinmektedir.

Ekspresyonun gerçekleştiği görüldükten sonra büyük hacim ile üretim yapılmış ve eksprese edilen kitinazın aktivitesi araştırılmıştır. 500 mL LB+Km⁵⁰ içeren 2 L’lik erlenlerde 200 mM IPTG 0.2 mM IPTG ilave edilerek 37°C’de 200 rpm’de 3.5-4 saat boyunca ekspresyonun gerçekleştirilen hücreler toplanıp parçalandıktan sonra hücre

debrisi uzaklaştırılmış ve süpernatant kitinazı da içeren enzim karışımı olarak kullanılmıştır.

Hipertermofilik bir arke olan *P. furiosus* kitinazı, optimum 85°C’de aktivite gösterdiği ve bu sıcaklıklarda *E. coli* proteinleri denatüre olacağı için metotta açıklandığı gibi hazırlanan ve tek karbon kaynağı olarak kitin substratı içeren petri kaplarına 25 µL olacak şekilde kitinazı da içeren enzim karışımı spotlanmış ve 85 °C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu sıcaklıkta *E. coli* hücrelerine ait proteinler denatüre olacağı için kitin substratının parçalanmasından kaynaklanan açılma zonları, *P. furiosus* kitinazının aktif olduğunu gösterecektir. Ancak 70-90°C’lik inkübasyon sıcaklık denemelerine rağmen ifade edilen kitinaz aktif olarak açılma zonları göstermemiştir.

5. SONUÇ

Oku ve Ishikawa yapmış oldukları çalışmada konak olarak pET sistemini ve konak hücre olarak *E. coli*'yi kullanmışlardır. Bu çalışma ile elde ettikleri rekombinant proteinin hem kolloidal hem de kristal kitin üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırmaları sonucunda en yüksek aktiviteyi B(CBD2+AD2) enzimi ile elde etmişlerdir. Kreuzer ve ark.'larının 2013 yılında yayınladıkları çalışmada wild type *P. furiosus* kullanmışlardır. Karbon kaynağı olarak kullanılan kitin içeren besiyerinde gelişme göstermediği belirlenmiştir. Çalışmanın devamında genetik mühendisliği ile 1006 nükleotit delesyonu ile elde edilen tek enzimin daha çok aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Tek bir enzim olarak tekrardan dizayn edilen kitinaz enzimini içeren *P. furiosus* straini, ChiB domainini içeren strain karşılaştırıldığında bir avantaja sahip olduğunu göstermişlerdir. Elde ettikleri bu sonuç ile Oku ve Ishikawa'nın in vitro olarak elde ettikleri veriyi doğrulamadığını ileri sürmüşlerdir (Kreuzer ve ark., 2013).

Yaptığımız çalışmada mutasyon olmaksızın hem kristal kitine hem de kolloidal kitine karşı enzim aktivitesinin artırılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk basamağında Taq polimeraz, Pfu polimeraz ve Phire polimeraz enzimleri kullanılarak Chi F ve Chi R primeri ile *P. furiosus*'a ait genomik DNA'nın çoğaltılmasına çalışılmıştır. Ancak Pfu polimeraz ve Phire polimeraz ile 1407 bp'lik bir fragment çoğaltılırken, Taq polimeraz ile istenilen ebattaki fragmente ulaşamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda *P. abyssi* genomik DNA'sı ile yapılan çalışmalarda Taq polimeraz ile yaklaşık 3 kb'lık bir fragment çoğaltılmış olmasına rağmen, potansiyel denatürantlardan çok fazla etkilendiği ve polimerizasyon hızının düşük olduğu gösterilmiştir (Killelea et al., 2014). %G+C içeriğinin (%40) yüksekliğinin Taq polimerazın bağlanmasında sorun yaratabileceği düşünülse de *P. abyssi*'nin daha yüksek %G+C'e sahip olması (%44) bu hipotezinin etkisini azaltmıştır. Çalışmamız sonucunda arkeal DNA ile çalışılacağı zaman arkeal DNA polimeraz kullanılması önerilmektedir.

1999 yılında Tanaka ve ark. yapmış oldukları çalışmada bir hipertermofilik arkeon olan *T. kodakaraensis* KOD1'a ait ChiA genini, pET-25(+) vektörüne aktarmışlar ve *E.coli*'ye transforme etmişlerdir. Lakin kalıtsal sinyal bölgesinden dolayı

ekspresyon gerçekleşmeyince bakteriyel sinyal sekansı ile değiştirilmiştir. Çalışmamızda, *P. furiosus* kitinazının *E.coli*'de ekspresyonu 0.2 M IPTG ile gerçekleştirildiği ve yaklaşık 55 kDa büyüklüğünde proteinin sentezlendiği belirlenmiştir. Ekspresyonun gerçekleşmesi çalışmamızın başarılı olduğunu göstermektedir.

T. kodakarensis ile yüksek homoloji gösteren *P. furiosus*'un kitinaz proteinini kodlayan ChiA ve ChiB gen bölgesinde bulunan mutasyon sonucu çerçeve kayması olmuş ve gen inaktif olmuştur. Çalışmamızda daha önce Oku ve Ishikawa tarafından düzeltildiği belirtilen ve aktivitede 40 kat artışa sebep olduğu söylenen nükleotit insersiyonu, bu çalışmanın amacını oluşturmaktaydı. Proteinin eksprese olduğu SDS-PAGE ile daha önceden belirlenmiştir. Ancak yapılan in vitro denemeler sonucunda maalesef aktif bir protein elde edilememiştir. Bunun sebebi olarak histidin bağlantısı olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu kalıtın uzaklaştırılabilmesi için bir çalışma yapılamamıştır.

Çalışmanın hedeflerinden birisi olan kristal kitin hidrolizinin gerçekleştirilmesi denemesi başarısız olmuş, yüksek aktivitede enzim elde edilememiştir. Proteinin inaktif denmesi için aktivite ölçümü spektrofotometrik yöntemlerle ve kromojenik substratlar kullanılarak ölçülmeli ve çok düşük orandaki aktiviteler dahi belirlenmelidir. Elde edilen proteinin aktif olup olmadığını tespit edebilmek için enzimatik reaksiyon gerçekleştirilebilir. Reaksiyon sonucunda da indirgen şeker tayini ile proteinin aktivitesi belirlenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Aerts, J.M.F.G., Boot, R.G., Renkema, G.H., et al., "Chitotriosidase: a human macrophage chitinase that is a marker for Gaucher disease manifestation. In: Muzzarelli, R.A.A., editor. Chitin Enzymology. Vol.2. Atec Edizioni-Grottammare", p. 3-10 (1996).
- Dai, D., Hu, W., Huang, G. and Li, W., Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus* sp. Hu1, African Journal of Biotechnology Vol. 10(13), pp. 2476-2485, 28 March (2011).
- Demir, A., Seventekin, N., Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, Teknolojik Araştırmalar: TTED 2009 (2) 92-103 (2009).
- Einbu, A., Characterisation of Chitin and a Study of its Acid-Catalysed Hydrolysis, Theses at NTNU, 2007:74 (2007).
- Frederiksen, R. F., Paspaliari, D. K., Larsen, T., Storgaard, B. G., Larsen, M. H., Ingmer, H., Palcic, M. M. and Leisner, J. J., Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors, Microbiology (2013), 159, 833–847 (2013).
- Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., et al. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes., Genome Res. 2005 15: 352-363 (2005).
- Gao, J., Bauer, M. W., Shockley, K. R., Pysz, M. A., and Kelly, R. M., Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases, Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69(6):3119 (2003).
- Gooday G.W., " Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan, In: C. Ratledge editor. Biochemistry and microbial degradation", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 279-312 (1994).
- Griffith, M., Genetic Modification of the Escherichia coli Strain DH5α to Allow the Selection of Plasmids Carrying Complementary Yeast Genes (2001).
- Hamid, R., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Javed, S., Purification and Characterization of Thermostable Chitinase from a Novel *S. maltophilia* Strain, Malaysian Journal of Microbiology, Vol 9(1) 2013, pp. 7-12 (2012).
- Hoell, I. A., Dalhus, B., Heggset, E. B., Aspö, S. I. and Eijsink, V. G. H., Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes, FEBS Journal 273 (2006) 4889–4900 a 2006 The Authors Journal compilation (2006).
- Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., A reliable reducing end assay for chito-oligosaccharides, 0144-8617/\$ - see front matter q 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.carbpol.2003.11.011 (2004).
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørlie, M., Varum, K. M. and Eijsink, V. G. H., Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*, FEBS Journal 273 (2006) 491–503 a 2006 The Authors Journal compilation (2006).
- <http://Arke.ucsc.edu/>
<http://www.brenda-enzymes.info/>
<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>
http://www.scied.com/pr_cmbas.htm
- Itoi, S., Kanomata, Y., Uchida, S., Kadokura, K., Nishio, T., Oku, T. and Sugita, H., Effect of the C-terminal domain of *Vibrio proteolyticus* chitinase A on the

- chitinolytic activity in association with pH changes, *Letters in Applied Microbiology* 54, 441–446 a 2012 The Society for Applied Microbiology (2012).
- Khan, M. A., Hamid, R., Ahmad, M., Abdin, M. Z. ve Javed, S., Optimization of Culture Media for Enhanced Chitinase Production from a Novel Strain of *Stenotrophomonas maltophilia* Using Response Surface Methodology, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20(11), 1597–1602 (2010).
- Killelea, T., Ralec C., Bossé, A. and Henneke, G., PCR performance of a thermostable heterodimeric archaeal DNA polymerase , *Front. Microbiol.* 5, 195 doi: 10.3389/fmicb.2014.00195 (2014)
- Kreuzer, M., Schmoltzer, K., Waegel, I., Thomm, M. ve Hausner, W., Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source, <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/9> (2013).
- Kumar, M.N.V.R., “A review of chitin and chitosan applications”, *React. Funct. Polym.*, 46: 1-27 (2000).
- Li, H., Greene, L. H., Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding, *PLoS ONE* 5(1): e8654. doi:10.1371/journal.pone.0008654 (2010).
- Lobo, M. D. P., Silva, F. D. A., Landim, P. G. C., Cruz, P. R., Brito, T. L., Medeiros, S. C., Oliveira, J. T. A., Vasconcelos, I. M., Pereira, H. D. and Grangeiro, T. B., Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*, *BMC Biotechnology* 2013, 13:46 (2013).
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık (2010).
- Makarova, K. S., Koonin, E. V., Comparative Genomics of Arke: How much have we learned in six years, and what’s next?, *Genome Biology* 2003, 4:115 (2003).
- Mine, S., Ikegami, T., Kawasaki, K., Nakamura, T., Uegaki, K., Expression, refolding, and purification of active diacetylchitobiose deacetylase from *Pyrococcus horikoshii*, *Protein Expression and Purification* 84 (2012) 265–269 (2012).
- Mine, S., Nakamura, T., Sato, T., Ikegami, T. and Uegaki, K., Solution structure of the chitin-binding domain 1 (ChBD1) of a hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*, *J. Biochem.* 2014;155(2):115–122 doi:10.1093/jb/mvt104 (2013).
- Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K. and Uegaki, K., Structure of the catalytic domain of the hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*, *Acta Cryst.* (2007). F63, 7–11 (2007).
- Oku, T., and Ishikawa, K., Analysis of the Hyperthermophilic Chitinase from *Pyrococcus furiosus*: Activity toward Crystalline Chitin, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka, 563-8577, Japan (2006).
- Purushotham, P., Arun, P. V. P. S., Prakash, J. S. S., Podile, A. R., Chitin Binding Proteins Act Synergistically with Chitinases in *Serratia proteamaculans* 568, *PLoS ONE* 7(5): e36714. doi:10.1371/journal.pone.0036714 (2012).
- Ramirez, M. G., Avelizapa, L. I. R., Avelizapa, N. G. R., Camarillo, R. C., Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases, *Journal of Microbiological Methods* 56 (2004) 213– 219 (2004).

- Shahidi, F.; Arachchi J. K. V.; Jeon, Y.-J., Food Applications of Chitin and Chitosans., Trends in Food Science & Technology (10) p:37-51 (1999).
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. ve Jeon, Y.J., “Food applications of chitin and chitosan”, Trends Food Sci. Tech., 10: 37-51 (1999).
- Staufenberger, T., Chitinases in the tree of life ecological, kinetic and structural studies of archaeal and marine bacterial chitinases, der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät (2012)
- Staufenberger, T., Imhoff, J. F., Labes, A., First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*, Microbiological Research 167 (2012) 262– 269 (2012).
- Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M., and Imanaka, T., A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. Appl. Environ. Microbiol., 65, 5538-5344 (1999).
- Tanaka, T., Fukui, T. and Imanaka, T., Different Cleavage Specificities of the Dual Catalytic Domains in Chitinase from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1*, Vol. 276, No. 38, Issue of September 21, pp. 35629–35635 (2001).
- Tanaka, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T., Characterization of an Exo-β-d-Glucosaminidase Involved in a Novel Chitinolytic Pathway from the Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1, J. Bacteriol. 2003, 185(17):5175 (2003).
- Tsuji ve ark., H., Shigenori Nishimura, S., Inui, T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura T. and Uegaki K., Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from *Pyrococcus furiosus* – the role of conserved residues in the active site FEBS Journal 277, 2683–2695 (2010).
- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. and Watanabe, T., Roles of the Exposed Aromatic Residues in Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase A from *Serratia marcescens* 2170, Vol. 276, No. 44, Issue of November 2, pp. 41343–41349 (2001).
- Ueda, M., Kotani, Y., Sutrisno, A., Nakazawa, M. and Miyakate, K., Purification and Characterization of Chitinase B from Moderately Thermophilic Bacterium *Ralstonia* sp. A-471, Biosci. Biotechnol. Biochem., 69 (4), 842-844 (2005).
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. and Eijsink, V. G. H., The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides, FEBS Journal 280 (2013) 3028–3049 ^a 2013 The Authors Journal compilation (2013).
- Waage, I., Schmid, G., Thumann, S., Thumm, M., and Hausner, W., Shuttle Vector-Based Transformation System for *Pyrococcus furiosus*, Appl. Environ. Microbiol. 2010, 76(10):3308. DOI: 10.1128/AEM.01951-09. (2010).

EK A. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

Ligated pET28a:Cd2AD2: 6727 bp

##

ATCCGGATATAGTTCTCTCTTTAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAA < 100
I R I * F L L S A K N P S R P V * R P Q G V M L V I A Q R W Q Q P T
S G Y I S S F S Q K T P L Q D P F R E G P K G L C * L L S S G G S S Q
P D I V P P F S K K P L K T R L E A S Y C A S V A A N
TAGGCCATATACAAGGAGGAAGTCGTTTTGGGGAGTTCTGGGCAATCTCCGGGGTTCCTCCCAATACGATCAATAACGAGTCGCCACCGTCGTCGGTT
10 20 30 40 50 60 70 80 90

XhoI
SciI
PaeR7I
Sfr274I
StrI
SlaI
PspXI

<6His

CTCAGCTTCCTTTCCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCA**GTTGGTGGTGGTGGTGGT**CTCGAGTCATGTTGGAACACTAGCTTCGCTAGTTTGAGCGGAG < 200
Q L P F G L C * Q P D L S G G G G G G A R V M L E H * L R * F E R R
L S F L S G F V S S R I S **V V V V V V** L E S C W N T S F A S L S G E
S A S F F R A L L A A G S Q **W W W W W** C S S H V G T L A S L V * A E
GAGTCGAAGGAAGCCCGAAACAATCGTGGCGCTAGAT**CACCACCACCACCACCAC**GAGTCAGTACAACCTTGTATCGAAGCGATCAAATCGCCTC
110 120 130 140 150 160 170 180 190

AATGTGTATCCAAATGCCTCCATGAATTTTACGAATACGTGGCTAAACGCCCAATCTGGGTCATTTGTTCCTCTGTGGAGTGGTGAACCTTCTCTGTG < 300
 M C I Q M P P * I L R I R G * T P N L G H L F L C G V V K L L L L
 C V S K C L H E F Y E Y I V A K R P I W V I C S S V E W * N F S C W
 N V Y P N A S M N F A T N T W L N A Q S G S F V P L W S G E T T G A S P V G
 TTACACATAGGTTTACGGAGGTACTTAAATGCTTATGCACCGATTTCGGGGTTAGACCCAGTAAACAGGAGACACCTCACCACCTTTGAAGAGGACAAC
 210 220 230 240 250 260 270 280 290

```
>Eco31I
>Bso31I
>BsaI
```

GTCTCGGGTGGTCTCTGTCTACTACTCCAGAAGGCTAGTGATCCTATTTTATGTTGAATTGCCAGTCAACAAGTTGCTGAGCATCTTCTAATGTAACAC < 400
V L G G L S C L H S R R L V I L F Y V E L P S Q Q V A E H L L M * T H
S W V V S V Y T P E G * * S Y F M L N C P V N K L L S I F * C K H
P G W S L S T L Q K A S D P I A Q S T S C * A S S N V N T
CAGGACCCACAGACAGATGTGGAGGCTCTCCGATCACTAGGATAAAATACAAC*TAACGGGTGCTGTTTCAACAGCTCGTAGAAGATTACATTTGTG
310 320 330 340 350 360 370 380 390

ACTCTTGTCATCATTTACTCCTATCATITGGAGTTAATCCTATCATCTTCCAAATTTCTTCATCACTTTTTTCGGGATAAATCTGCTTTAATGTCTGAAC < 500
S C H H L L L S L E L I S S S K F L H H F F F R D K S A L I V * T
T L V I I I Y S Y H W S * S Y H L P N F F I T F F G I N L L * L S E T H
L L L S S F T P I I I G V N P I I F Q I S S S L F S G * I C F N C L N
TGAGAACAGTAGTAATGGAGTAGTAACCTCAATTAGGATAGTAGAAGGTTAAAGAAAGTAGTAAAAAAGCCCTATTTAGACGAAATTACAGACTTG
410 420 430 440 450 460 470 480 490

MscI
Msp20I
MlsI
MluNI
Bali

ACATTTTCAGCTACCTTGATTGCATTTTCTGCGTTAGAAAGGAGTCCAGTAGTAATCCATCGTCATTGGATTGACTCTATCTACTCTTACCCCTCTTCTGG < 600
H F Q L P * L H F L R * K E S S S N P S S L D * L Y L L L P P S W
I F S Y L D C I F S C V R L R S P V V I H R H W I D L S I Y T S Y P P F L L A
T F S A Y L D C I F S C V R L R S P V V I H R H W I D L S I Y T S Y P P F L L A
TGTA AAAGTCGATGGAAC TAAAGCAAAAGACGCAATCTTCTCAGGTCATCATTAGGTAGCAGTAACCTAATCGAGATAGATGAGAATGGGGGAAGAACC

EK A Devam pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

```
CCATCGTTTCTATTATACCGTATCCTCTGCTAGTCTATCCCCGGATCGCTGGGTAAGGTAAGCTGAATTTTACCAAGGTCTTTCTCTTTGGACTAT < 700
P S F L L Y R I L L L V L S P D R W V R * S * I L P K V F L F G L *
H R F Y Y T V S S C * S Y P R I A G * G K A E F Y P R S F S L D Y
I V S I I P Y P P A S P I P G S L G K V K L N F T Q G L S L W T M
GGTAGCAAGATAATATGGCATAGGAGGACGATCAGGATAGGGCCCTAGCGACCCATTCCATTTCGACTTAAATGGGTCCAGAAAGAGAAACCTGATA
610 620 630 640 650 660 670 680 690

GAGTAGGGCATCTGCAAGTTTATCTGCATCGATACCGGCTTCTATGTCAAAGTCCAAGTAAGTGGCATTATATGTATCAATTACCTTTATGTACCATTC < 800
V G H L Q V Y L H R Y R L L C Q S P S K W H Y M Y Q L P L C T I Q
E * G I C K F I C I D T G F Y V K V Q V S G I I C I N Y L Y V P F S
S R A S A S L S P A S P I P A S M S K S K * V A L Y V S I T F M Y H S
CTCATCCCGTAGACGTTCAATAGACGTAGCTATGGCCGAAGATACAGTTTCAGGTTCATTACCCTAATATACATAGTTAATGGAATACATCGTAAGT
710 720 730 740 750 760 770 780 790

MfeI
MunI
|
GCCAATTGTTCTGGCGTGTGGCTGTGGCAAAGATATGGTCCTACAGCCCCACCAACGCTATTATTACTTCTCCACCAATTTCTCTGAGTTCTCTTA < 900
P I V L A C W P V G K D M V L Q P H Q T L L L L L H Q F L * V L L
Q L F W R A G L L A K I W S Y S P T K R Y Y Y F S T N F S E F S Y
A N C S G V L A C W Q R Y G P T A P P N A I I T S P P I S L S S L T
CGGTTAACAAAGCCGACGACCGGACAACCGTTTCTATACCAGGATGTCGGGGTGGTTTTCGATAATAATGAAGAGGTGGTTAAAGAGACTCAAGAGAAT
810 820 830 840 850 860 870 880 890

BmcAI
ZrmI
ScaI
AssI
|
CCTCATCAACAAATTTCTCTAGAGGAATTGAGCCTGCCAAGCTGGACCGTTGTAAACTGAAGTATAGAGAATGAATGCCAAGGTAAGTACTTAGTTCC < 1000
P H Q Q I S L E E L S L P K L D R C K L N Y R E * M P R * S T * F Q
L I N K F L * R N * A C P S W T V V N * T I E N E C Q G K V L S S
S S T N F S R G I E P A Q A G P L * T E L * R M N A K V K Y L V P
GGAGTAGTTGTTTAAAGAGATCTCCTTAACCTCGGACGGGTTTCGACCTGGCAACATTGACTTGATATCTCTTACTTACGGTTCCATTTCATGAATCAAGG
910 920 930 940 950 960 970 980 990

AGTTAACTTTGCATATTTCTACTAAGGCTTGTGTACTGATAGACTCATATCGATATAGGGAGCAAAGAAGTGTCTGGTATTGGATTGCATTCACAGGA < 1100
L T L H I L L R A C V L I D S Y R Y R E Q R S V L V L D L H S Q E
S * L C I F Y * G L V Y * * T H I D I G S K E V F W Y W I C I P R K
V N T F A Y T K G L C T D R L I S I * G A K K C S G I G F A F P R G
TCAATTGAAACGTATAAGATGATTCGCCAACACATGACTATCTGAGTATAGCTATATCCCTCGTTTCTTACAAAGACCATAACCTAAACGTAAGGGTCCT
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

AGTGGCGTAGGAGTTAGAGTCGGGGTAGGAGTAGGAGTTGGGGTGGGTGTGGAGTTGGCGTTGGAGTTTGTGAGGGAGTTGGGGTAGAGTGTGGTGTGG < 1200
V A * E L E S G * E * E L G W V W E L A L E F V R E L G * M W L W
W R R S * S R G R S R S W G G C G S W R W S L * G S W G R C G C G
S G V G V R V G V G V G V G V G V G V G V C E G V G V D V V V V
TCACCGCATCCTCAATCTCAGCCCCATCCTCATCCTCAACCCCAACCCACACCTCAACCGCAACCTCAAAACACTCCCTCAACCCCATCTACACCAACAC
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

TAGTGGGTGTGGGAGTTGTCCTCCGGTGGTGTCCATATGTCAATTACTTGTCCGTTTATTCTTAGGGTTATTCTTCTACTTTGTCTCCTTGTGGTCC < 1300
* W V W E L S L R L V S I C Q L L V R L F L G L F L L L C L L V V R
S G C G S C P S G W C P Y V N Y L S V Y F * G Y F F Y F V S L W S
V G V G V V P P V G V H M S I T C P F I S R V I S S T L S P C G P
ATCACCCACACCTCAACAGGGAGGCCAACACAGGTATACAGTTAATGAACAGGCAATAAAGATCCCAATAAAGAAGATGAAACAGAGGAACACAGG
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

HindIII
|
GTTTACTATGAATCCAAATGTTGCTGTGCGGCCCTTTATTCAGCTTACTGGAGTGAAGATGACATAGCCATTCCCCTCTTGTTTGTTAGCGCTCCAGAAG < 1400
L L * I Q M L L S A L Y S S L L E * R * H S H S P L V C * R S R S
V Y Y E S K C C C R P F I P A Y W S E D D I A I P L L F V S A P E A
F T M N P N V A V G P L F Q L T G V K M T * P F P S C L L A L Q K
CAATGATACTTAGTTTACACGACAGCCGGGAAATAAGGTGAATGACCTCACTTCTACTGTATCGGTAAGGGGAGAACAAATCGCGAGGCTCTTC
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390

CTTCCTACAGTGGCTCCTGGGGCTAGTTTAACCTTCACAGTCCAGTCATAGTCCATCCAAATTAAGAGTCACATCATACTCAGCACCCTACCCCAAT < 1500
F L Q W L L G L V * P S Q S S H T V H P N * E S H H T Q H H Y P N
S Y S G S W G * F N L H S P V I L S I Q I K S H I I L S T T T P I
L P T V A P G A S L T F T V Q S Y C P S K L R V T S Y S A P L P Q S
GAAGGATGTCACCGAGGACCCCGATCAAATTGAAGTGTGAGGTGATGACAGGTAGGTTTAATTCAGTGTAGTATGAGTCGTGGTGTATGGGGTTA
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490
```

EK A Devamı. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi. Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

BmtI
BspOI
NheI
AsuNHI

BamHI
EcoRI

CGTTTACCTTTACCTCTAGAGACTCTGAGACTGGGACAGGGGTAGTCATAGATTCCGGATCCCGACCCATTGTCTGCCACCATGCTAGCCATATG < 1600
R L P L P L E I L R L G Q G * S * N S D P D P F A V H Q S C * P Y G
V Y L Y L * R S * D W D R G S H R I R I P T H L L S T S H A S H M
F T F T S R D P E T G T G V V I E F G S R P I C C P P V M L A I W
GCAAATGGAAATGGAGATCTCTAGGACTCTGACCTGTCCCATCAGTATCTTAAGCCTAGGGCTGGGTAAACGACAGGTGGTCAGTACGATCGGTATAC
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590

<BarI
Bsp19I
NcoI

<Thrombin site <6His

GCTGCCGCGCGGACACAGGCCGCTGCTGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCATGGTATATCTCTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGG < 1700
C R A A P G R C C D D D D D G C C P W Y I S F L K L N K I I S R G
A A A R H Q A A A V M M M M M A A A H W I S P S * S * T K L F L E G
L P R G T R P L L * * * * * W L L P M V Y L L L K V K Q N Y F * R
CGACGGCGCGCGTGGTCCGGCGACGACACTACTACTACTACTACCGACGACGGGTACCATATAGAGGAAGAATTTCAATTTGTTTAAATAAGATCTCC
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690

<LacO <T7 BglII SgrAI

GGAATTGTTATCCGCTCACAATTCCTCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCA < 1800
E L L S A H N S P I V S R I N F A G S R S R S S T P D A S W P A S
N C Y P L T I P L * * V V L I S R D R D L D P L R R T H R G R H H
G I V I R S Q F P Y S E S Y * F R G I E I S I L Y A G R I V A G I T
CCTTAAACAATAGCGAGTGTTAAGGGATATCACTCAGCATAAATAAGCGCCCTAGCTCTAGAGCTAGGAGATGCGGCCTGCGTAGCACC GGCGGTAGT
1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790

CCGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCTATATCGCCGACATCACCAGTAGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTGTTTTCGGCGT < 1900
P A P Q V R L L A P I S P T S P M G K I G L A T S G S * A L V S A W
R R H R C G C W R L Y R R H R W G R S G S P L R A H E R L F R R
G A T G A V A G A Y I A D I T D G E D R A R H F G L M S A C F G V
GGCCGCGGTGTCCAGCCAACGACCGCGATATAGCGGCTGTAGTGCTACCCCTTCTAGCCGAGCGGTGAAGCCGAGTACTCGCGAACAAGCCGCA
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890

PaeI
SphI

GGGTATGGTGGCAGGCCCCGTGGCGGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCAATGCACCATTCCTTGCGGCGGCGGTGCTCAACGGCCCTCAACCTACTA < 2000
V W W Q A P W P G D C W A P S P C M H H S L R R R R C S T A S T Y Y
G Y G G R P R G R G T V G R H L L A C T I P C G G G A Q R P Q N L A
G A T G A V A G G L L G A I S L H A P F L A A A V L N G L P L T
CCCATACCACCGTCCGGGGACCGGCCCTGACAACCCGCGGTAGAGGAACGTACGTGGAAGGAACGCCGCCACGAGTTGCCGGAGTTGGATGAT
1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990

CTGGGCTGCTTCTAATGCAGGAGTCGCATAAGGGAGAGCGTCGAGATCCCGGACCATCGAATGGCGCAAAACCTTTTCGGCGGTATGGCATGATAGCGC < 2100
W A A S * C R S R I R E S V E I P D T I E W R K T F R G M A * * R
G L L P N A G V A * G R A S R S R T P S N G A K P F A V W H D S A
L G C F L M Q E S H K G E R R D P G H H R M A Q N L S R Y G M I A P
GACCCGACGAAGGATTACGTCTCTCAGCGTATTCCTCTCGCAGCTCTAGGGCCTGTGGTAGCTTACCGCGTTTTGGAAAGCGCCATACCGTACTACTCGCG
2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090

CCGGAAGAGAGTCAATTCAGGTTGGTGAATGTGAAACAGTAACGTTATACGATGTGCGAGAGTATGCCGGTGTCTCTTATCAGACCGTTTCCCGCGTGG < 2200
P E E S Q F R V V N V K P V T L Y D V A E Y A G V S Y Q T V S R V V
R K R V N S G W * M * N Q * R Y T M S Q S M P V S L I R P F P A W
G R E S I Q G G E C E T S N V I R C R R V C R C L L S D R F P R G
GGCCTTCTCTCAGTTAAGTCCGACCACTTACACTTTGGTCATTGCAATATGCTACAGCGTCTCATACGCCACAGAGAATAGTTGGCAAGGGCGCAC
2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190

TGAACGAGCCAGCCACGTTTCTGCGAAAACGCGGAAAAAGTGAAGCGCGGATGGCGAGCTGAATTACATTCCCAACCGCGTGGCACAACAACCTGGC < 2300
N Q A S H V S A K T R E K V E A A M A E L N Y I P N R V A Q Q L A
* T R P A T F L R K R G K K W K R R W R S * I T F P T A W H N N W R
E P G Q P R F C E N A G K S G S G D G G A E L H S Q P R G T T T T G
ACTTGGTCCGGTCCGTCGAAAGACGCTTTTTCGCGCCTTTTTCACCTTCGCGCGTACCGCCTCGACTTAATGTAAGGGTTGGCGCACCGTGTGTGACCG
2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290

GGGCAAAACAGCTGTTGCTGATTGGCGTTGCCACCTTCGCAGTCTGGCCCTGCACGCGCGCTCGCAATGTCTGCGCGCGGATTAATCTCGCGCCGATCAACTG < 2400
G K Q S L L I G V A T S S L A L H A P S Q I V A A I K S R A D Q L
A N S R C * L A L P P P V W P C T R R R K K L S R R L N L A P I N W
G Q T V V A D W R C H L Q S G P A R A V A N C R G D * I S R R S T G
CCCGTTTGTGCAACGACTAACCGCAACGGTGGAGGTGAGACCGGACGTGCGCGGACGGTTTAACAGCGCGCTAATTTAGAGCGCGGCTAGTTGAC
2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390

<RceI MluI FbaI BclI Ksp22I
| | |
GGTGCCAGCGTGGTGGTGTGCTAGACGAAAGCGGCGTCAAGAGCCTGTAAAGCGGCGGTGCACAATCTTCTCGCGCAACCGCTCAGTGGGCTGATCA < 2500
G A S V V V S M V E R S G V E A C K A A V H N L L A Q R V S G L I I
V P A W W C R W * N E A A S K P V K R R C T I F S R N A S V G * S
C Q R G G V D G R T K R R R S L * S G G A Q S S R A T R Q W A D H
CCACGGTGCACACCACAGCTACCATCTTGCTTCGCGCGAGCTTCGGACATTCGCGCGCCAGCTGTAGAAAGAGCGGTTGCGCAGTCAACCGGACTAGT
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490

TTAACTATCCGCTGGATGACCAGGATGCCATTGCTGTGGAAGCTGCCTGCACCTAATGTTCGGCGTTTATTCTTGATGTCTCTGACCAGACACCCATCAA < 2600
N Y P L D D Q D A I A V E A A C C T N V P A L F L D V S D Q T P I N
L T I R W M T R M P L L W K L P A L M F R R Y F L M S L T R H P S T
* L S A G * P G C H C C G S C L H * C S G V I S * C L * P D T H Q
AATTGATAGCGACCTACTGGTCTTACGGTAACGACACCTTCGACGGAGCTGATTACAAGGCGCAATAAAGAACTACAGAGACTGGTCTGTGGGTAGTT
2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590

>lacI
BstEII
BstPI
PspEI
EcoO65I
Eco91I
| |
CAGTATTATTTTCTCCATGAAGACGGTACGCGACTGGGCGTGGAGCATCTGGTGCATTGGGTACCAGCAAATCGCGCTGTTAGCGGGGCCATTAAGT < 2700
S I I F S P H E D G T R L G V E H L V A L G H Q Q I A L L A G P L S
V L F S M E K T V R D W A W S I W S H W V T S K S R C * R A H * V
Q Y Y F L P * R R Y A T G R G A S G R I G S P A N R A V S G P I K F
GTCATAATAAAGAGGGTACTTCTGCCATGCGCTGACCCGCACCTCGTAGACCAGCGTAACCCAGTGGTTCGTTTACGCGACAATCGCCGGGTAATTCA
2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690

<NmeAIII
|
TCTGTCTCGGCGCTCTGCGTCTGGCTGGCTGGCATAAATATCTCACTCGCAATCAAATTCAGCCGATAGCGGAACGGGAAGCGGACTGGAGTGCCATGT < 2800
S V S A R L R L A G W H K Y L T R N Q I Q P I A E R E G D W S A M S
L S R R V C V W L A G I N I S L A I K F S R * R N G K A T G V P C
C L G A S A S G W L A * I S H S Q S N S A D S G T G R R L E C H V
AGACAGAGCGCGCGAGACGCGAGACCGACCGCTATTTATAGAGTGAGCGTTAGTTTAAAGTCCGGCTATCGCCTTGCCCTTCGCTGACCTCAGCGTACA
2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790

McaTI
BssHII
BsePI
PauI
PteI
|
CCGTTTTCACAAACCATGCAAAATGCTGAATGAGGGCATCGTTCCCACTGCGATGCTGGTTGCCAACGATCAGATGGCGCTGGGCGCAATGCGCGCCAT < 2900
G F Q Q T M Q M L N E G I V P T A M L V A N D Q M A L G A M R A I
P V F N K P C K C * M R A S F P L R C W L P T I R W R W A Q C A P L
R F S T N H A N A E * G H R S H C D A G C Q R S D G A G R N A R H
GGCCAAAAGTTGTTTGGTACGTTTACGACTTACTCCCGTAGCAAGGGTGACGCTACGACCAACGGTTGCTAGTCTACCGGACCGCGCTTACCGCGGTA
2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890

EcoRV
Eco32I
|
TACCAGTCCGGGCTGCGGTTGGTGGCGATATCTCGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAGACAGCTCATGTATATCCGCGGTTAACCACCATCAA < 3000
T E S G L R V G A D I S V V G Y D D T E D S S C Y I P P L T P T I K
P S P G C A L V R I S R * W D T T I P K T A H V I S R R * P P S N
Y R V R A A R W C G Y L G S G I R R Y R R Q L M L Y P A V N H H Q T
ATGGCTCAGGCGCGACGCGCAACCAGCGCTATAGAGCCATCACCCTATGCTGCTATGGCTTCTGTCGAGTACAATATAGGGCGGCAATTGGTGGTAGTTT
2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990

CAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAACGACGCTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGG < 3100
Q D F R L L G Q T S V D R L L Q L S Q G Q A V K G N Q L L P V S L V
R I F S A C W G K P A W T A C C N S L R A R R * R A I S C C P S L W
G F S P A G A N Q R W P L A A C T L S G P G G E G Q S A V A R L T G
GTCTTAAAGCGGACGACCCCGTTGGTTCGACCTGGCGAAGACGCTTGAGAGAGTCCCGGTCGCGCACTTCCCGTTAGTCGACAACGGGCGAGTAGTACC
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090

EK A Devamı. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi. Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

TGAAAAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGA < 3200
K R K T T L A P N T Q T A S P R A L A D S L M Q L A R Q V S R L E
* K E K P P W R P I R K P P L P A R W P I H * C S W H D R F P D W K
E K K N H P G A Q Y A N R L S P R V G R F I N A A G T T G F P T G
ACTTTTCTTTTGGTGGGACCGGTTATGCGTTTGGCGGAGAGGGCGCGCAACCGGCTAAGTAATTACGTCGACCGTGTCCAAAGGGCTGACCT
3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190

AAGCGGCGAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTAAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCGGGATCTCGACCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTC < 3300
S G Q * A Q R N * C K L A H S L G T G I S T D A L E S L Q P S Q L
A G S E R N A I N V S * L T H * A P G S R P M P L R A F N P V S S
K R A V S A T Q L M * V S S L I R H R D L D R C P * E P S T Q S A P
TTCGCGCGTCACTCGCGTTGCGTTAATTACATTCAATCGAGTGAGTAATCCGTGGCCCTAGAGCTGGCTACGGGAACCTCTCGGAAGTTGGGTCAGTCGAG
3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290

BoxI
PshAI
BstPAI
|
CTTCGGTGGGCGCGGGCATGACTATCGTCGCGCACTTATGACTGCTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCATT < 3400
L P V G A G H D Y R R R T Y D C L L Y H A T R R T G A G S A L G H F
F R W A R G M T I V A A L M T V F F I M Q L V G Q V P A A L W V I
S G G R G A * L S S P H L * L S S L S C N S * D R C R Q R S G S F
GAAGGCCACCGCGCCCGTACTGATAGCAGCGCGTGAATAGTACGAGAAGAAATAGTACGTTGAGCATCCTGTCCACGGCCGTCGCGAGACCCAGTAA
3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390

>RpaB5I
|
TTCGGCGAGGACCGCTTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCCTGTGCGTTGCGGTATTCGGAATCTTGACAGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCAGTGGTC < 3500
R R G P L S L E R D D D R P V A C G I R N L A R P R S S L R H W S
F G E D R F R W S A T M I G L S L A V F G I L H A L A Q A F V T G P
S A R T A F A G A R R * S A C R L R Y S E S C T P S L K P S S L V
AAGCCCTCCTGGCGAAAGCGACCTCGCGCTGCTACTAGCCGGACAGCGAAGCCATAAGCCTTAGAACGTGCGGGAGCGAGTTCCGGAAGCAGTGACCCAG
3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490

MstI
AvaII
AccI6I
NsbI
FspI
FspAI
BglI
PpuMI
Psp5II
PspPPI
|
CCGCGACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCGGCATGGCGGCCACCGGTTGCGCATGATCGTGCTCCTGTGCTGTTGAGGACCCGGCTAGG < 3600
R H Q T F R R E A G H Y R R H G G P T G A H D R A P V V E D P A R
A T K R F G E K Q A I I A G M A A P R V R M I V L L S L R T R L G
P P N V S A R S R P L S P A W R P H G C A * S C S C R * G P G * A
GGCGGTGGTTTGCAAGCCGCTCTTCGCTCGGTAATAGCGGCCGTACCGCGGGGTGCCACGCGTACTAGCAGGAGGACAGCACTCCTGGGCCGATCC
3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590

CTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCAGATACGCGAGCGAAGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTTGCGACCTGAGCAACAACA < 3700
L A G L P Y W L A E * I T D T R A N V K R L L L Q N V C D L S N N M
W R G C L T G * Q N E S P I R E R T * S D C C C K T S A T * A T T
G G V A L L V S R M N H R Y A S E R E A T A A A K R L R P E Q Q H
GACCGCCCCAACGGAATGACCAATCGTCTTACTTAGTGGCTATGCGCTCGCTTGCACTTCGCTGACGACGACGTTTTCAGAGCGCTGGACTCGTTGTTGT
3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690

TGAATGGTCTTCGGTTTCCGTTTTCGTAAGTCTGGAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGC < 3800
N G L R F P C F V K S G N A E V S A L H H Y V P D L H R R M L L A
* M V F G F R V S * S L E T R K S A P C T I M F R I C I A G C C W L
E W S S V S V F R K V W K R G S Q R P A P L C S G S A S Q D A A G
ACTTACCAGAAGCAAAGGCACAAGCATTTTCAGACCTTTGCGCCTTCAGTCGCGGACGTGGTAATACAAGGCCTAGACGTAGCGTCTACGACGACCG
3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790

>MqI
|
TACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCGCATCCATACCGCCAGTTGTTTACC < 3900
T L W N T Y I C I N E A L A L T L L S D F S L V P P H P Y R Q L F T
P C G T P T S V L T K R W H * P * V I F L W S R R I H T A S C L P
Y P V E H L H L Y * R S A G I D P E * F F S G P A A S I P P V V Y P
ATGGGACACCTTGTGGATGTAGACATAATTGCTTCGCGACCGTAACCTGGGACTCACTAAAAGAGACAGGGCGGCGTAGGTATGGCGGTCAACAAATGG
3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890

EK A Devamı. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi. Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

```
CTCACACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTCATCGTGAGCATCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAAT < 4000
L T T F Q * P G M F I I S N P Y R E H P L S F H R Y H Y P H E Q K S
S Q R S S N R A C S S S V T R I V S I L S R F I G I I T P M N R N
H N V P V T G H V H H Q * P V S * A S S L V S S V S L P P * T E I
GAGTGTGCAAGGTCAATTGGCCGTACAAGTAGTAGTCATTGGGCATAGCACTCGTAGGAGAGAGCAAAGTAGCCATAGTAATGGGGGTACTTGTCTTTA
3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990
```

```
CCCCCTTACACGAGGCATCAGTGACCAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAAACGCTTCTGGAGAACTCA < 4100
P L H G G I S D Q T G K N R P * H G P L Y Q K P D I N A S G E T Q
P P Y T E A S V T K Q E K T A L N M A R F I R S Q T L T L L E K L N
P L Y T R H Q * P N R K K P P L T W P A L S E A R H * R F W R N S
GGGGAATGTGCTCCGTAGTCACTGGTTGTCTTTTGGCGGGAATTGTACCGGGCGAAATAGTCTTCGGTCTGTAAATGCGAAGACCTCTTTGAGT
4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090
```

```
ACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGG < 4200
R A G R G * T G R H L * I A S R P R * * A L P Q L P R A F R * * R
E L D A D E Q A D I C E S L H D H A D E L Y R S C L A R F G D D G
T S W T R M N R Q T S V N R F T T T L M S F T A A A S R V S V M T V
TGCTCGACCTGCGCCTACTTGTCCGTCTGTAGACACTTAGCGAAGTGCTGGTGCCTACTCGAAATGGCGTCGACGGAGCGCGAAAGCCACTACTGCC
4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190
```

```
TGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGAGAGCGGTCACAGCTTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGT < 4300
* K P L T H A A P G D G H S L S V S G C R E Q T S P S G R V S G C W
E N L * H M Q L P E T V T A C L * A D A G S R Q A R Q G A S A G V
K T S D T C S S R R R S Q L V C K R M P G A D K P V R A R Q R V L
ACTTTTGAGACTGTGTACGTCGAGGGCCTCTGCCAGTGTGGAACAGACATTCCGCTACGGCCCTCGTCTGTTTCGGGCGAGTCCCGCGAGTCGCCACAA
4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290
```

Tth111I
PsyI
AspI
PflFI

BstZ17I
Bst1107I
BssNAI

```
GGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATATCGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCA < 4400
R V S G G R S H D P V T * R * R S V Y W L N Y A A S E Q I V L R V H
G G C R G A A M T Q S R S D S G V Y T G L T M R H Q S R L Y * E C T
K T S D T C S S R R R S Q L V C K R M P G A D K P V R A R Q R V L
CCGCCCCACAGCCCCGCGTCCGTACTGGGTCAATGCGTATCGCTACATATGACCGAATTGATACGCCGTAGTCTCGTCTAACATGACTCTACGT
4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390
```

>SapI
>PciSI
>LguI
>BspQI

```
CCATATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGCG < 4500
H I C G V K Y R T D A * G E N T A S G A L P L P R S L T R C A R S
I Y A V * N T A Q M R K E K I P H Q A L F R F L A H * L A A L G R
P Y M R C E I P H R C V R R K Y R I R R S S A S S L T D S L R S V V
GGTATATACGCCACACTTTATGGCGTGTCTACGCATTCCTCTTTTATGGCGTAGTCCGCGAGAAGGCGAAGGAGCGAGTGACTGAGCGACGCGAGCCAGC
4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490
```

PciI
BspLU11I
PscI

```
TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAATAGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA < 4600
F G C G E R Y Q L T Q R R * Y G Y P Q N Q G I T Q E R T C E Q K A S
S A A A S G I S S L K G N T V I H R I R G * R R K E H V S K R P
R L R R A V S A H S K A V I R L S T E S G D N A G K N M * A K G Q
AAGCCGACGCGCTCGCCATAGTCAGTGAGTTTCCGCCATTATGCCAATAGTGTCTTAGTCCCTATTGCGTCTTTCTTGTACACTCGTTTTCCGGT
4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590
```

```
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGG < 4700
K R P G T V K R P R C W R F S I G S A P L T S I T K I D A Q V R G
A K G Q E P * K G R V A G V F P * A P P P * R A S Q K S T L K S E V
Q K A R N R K K A A L L A F F H R L R P P D E H H K N R R S Q R
CGTTTTCCGGTCTTGGCATTTTTCCGCGCAACGACCGCAAAAAGGTATCCGAGGCGGGGACTGCTCGTAGTGTTTTAGCTGCGAGTTTCAGTCTCC
4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690
```

EK A Devamı. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi. Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

```

                                <BauI
                                <BssSI
                                <Bst2BI
                                <BsiI
                                |
TGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGT < 4800
G E T R Q D Y K D T R R F P L E A P S C A L L F R P C R L P D T C
A K P D R T I K I P G V S P W K L P R A L S C S D P A A Y R I P V
W R N P T G L * R Y Q A F P P G S S L V R S P V P T L P L T G Y L S
ACCGCTTTGGGCTTCCTGATATTCTATGGTCCGCAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGCGAGAGGACAAGGCTGGGACGGCGAATGGCCTATGGACA
4710      4720      4730      4740      4750      4760      4770      4780      4790

CCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA < 4900
P P F S L R E A W R F L I A H A V G I S V R C R S F A P S W A V C T
R L S P F G K R G A F S * L T L * V S Q F G V G R S L Q A G L C A
A F L P S G S V A L S H S S R C R Y S L S S V * V V R S K L G C V H
GGCGGAAAGAGGGAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTATCGAGTGCGACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTTCGACCCGACACACGT
4810      4820      4830      4840      4850      4860      4870      4880      4890

                                <ColE1 origin
                                |
CGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACT < 5000
N P P F S P T A A P Y P V T I V L S P T R * D T T Y R H W Q Q P L
R T P R S A R P L R L I R * L S S * V Q P G K T R L I A T G S S H W
E P P V Q P D R C A L S G N Y R L E S N P V R H D L S P L A A A T
GCTTGGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAATCAGGTTGGGCCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGCTCGTCGGTGA
4910      4920      4930      4940      4950      4960      4970      4980      4990

                                <DraRI
                                |
GGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCT < 5100
V T G L A E R G M * A V L Q S S * S G G L T T A T L E G Q Y L V S
* Q D * Q S E V C R C Y R F L E V V A * L R L H * K D S I W Y L
G N R I S R A R Y V G G A T E F L K W W P N Y G Y T R R T V F G I C
CCATTGCTCAATCGTCTCGCTCCATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAAGTCTACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTCTGTCATAAACCATAGA
5010      5020      5030      5040      5050      5060      5070      5080      5090

>Eco57I
>AclI
|
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCA < 5200
A L C * S Q L P S E K E L V A L D P A N K P P L V A V V F L F A S S
R S A E A S Y L R K K S W * L L I R Q T N H R W * R W F F C L Q A
A L L K P V T F G K R V G S S * S G K Q T T A G S G G F F V C K Q
CGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTCTCAACCATCGAGAGTATAGCCGTTTGTGTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAACGTTTCGT
5110      5120      5130      5140      5150      5160      5170      5180      5190

GCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTGTTG < 5300
R L R A E K K D L K K I L * S F L R G L T L S G T K T H V K G F W
A D Y A Q K K R I S R R S F D L F Y G V * R S V E R K L T L R D F G
Q I T R R K K G S Q E D P L I F S T G S D A Q W N E N S R * G I L
CGTCTAATGCGCGTCTTTTTTCTAGAGTTCTCTAGGAAACTAGAAAAAGATGCCCCAGACTGCGAGTCACTTGTCTTTGAGTGAATTCCTAAAAC
5210      5220      5230      5240      5250      5260      5270      5280      5290

GTCATGAACAATAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGCTCTTGCTCTAGGCCGCGATTAAAT < 5400
S * T I K L S A Y I N S N T R G V M S H I Q R E T S C S R P R L N
H E Q * N C L L T * T V I Q G V L * A I F N G K R L A L G R D * I
V M N N K T T V C L H K Q * Y K G C Y E P Y S T G N V L L * A A I K F
CAGTACTTGTATTGTTGACAGCAATGTATTGTCTATTATGTTCCCCACAACTACGCGGTATAAGTTGCCCTTTGCAGAACGAGATCCGGCGCTAATTTA
5310      5320      5330      5340      5350      5360      5370      5380      5390

                                BtuMI
                                RruI
                                Bsp68I
                                NruI
                                |
                                >HaeIV
                                |
TCCAACATGGATGCTGATTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGCAATCAGGTGCGCACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGC < 5500
S N M D A D L Y G Y K W A R D N V G Q S G A T I Y R L Y G K P D A P
P T W M L I Y M G I N G L A I M S G N Q V R Q S I D C M G S P M R
Q H G C * F I W V * M G S R * C R A I R C D N L S I V W E A R C A
AGGTTGTACTACGACTAAATATACCATATTTACCCGAGCGCTATTACAGCCGTTAGTCCACGCTGTTAGATAGCTAACATACCTTCGGGCTACGCG
5410      5420      5430      5440      5450      5460      5470      5480      5490

```

EK A Devamı. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi. Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

```

CAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGAC < 5600
E L F L K H G K G S V A N D V T D E M V R L N W L T E F M P L P T
Q S C F * N M A K V A L P M M L Q M R W S D * T G * R N L C L F R P
R V V S E T W Q R * R C Q * C Y R * D G Q T K L A D G I Y A S S D
GTCTCAACAAAGACTTTGTACCGTTTCCATCGCAACGGTTACTACAATGTCTACTCTACCAGTCTGATTTGACCGACTGCCTTAAATACGGAGAAGCGTG
5510      5520      5530      5540      5550      5560      5570      5580      5590

                               SmaI
                               TspMI
                               XmaI
                               Cfr9I
                               |
CATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCAGTCCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCA < 5700
I K H F I R T P D D A W L L T T A I P G K T A F Q V L E E Y P D S
S S I L S V L L M M H G Y S P L R S P G K Q H S R Y * K N I L I Q
H Q A F Y P Y S * * C M V T H H C D P R E N S I P G I R R I S * F R
GTAGTTCGTAATAATAGGCATGAGGACTACTACGTACCAATGAGTGGTGACGCTAGGGGCCCTTTTGTGCGTAAGGTCCATAATCTTCTTATAGGACTAAGT
5610      5620      5630      5640      5650      5660      5670      5680      5690

                               Ple19I
                               BpvUI
                               PvuI
                               MvrI
                               SgfI
                               AsiSI
                               RgaI
                               SfaAI
                               ||
                               >KanR
                               |
GGTGAAATATTTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCGCGTTGCATTGATTCCTGTTTGTGTAATTGTCTCTTTTAACAGCGATCGCGTATTTGCTCTCG < 5800
G E N I V D A L A V F L R R L H S I P V C N C P E N S D R V F R L A
V K I L L M R W Q C S C A G C I R F L F V I V L L T A I A Y F V S
* K Y C * C A G S V P A P V A F D S C L * L S F * Q R S R I S S R
CCACTTTTATAACAACTACGGCAGCGTCACAAGGACGCGGCCAACGTAAGCTAAGGACAAACATTAAACAGGAAAATTGTCGCTAGCGCATAAAGCAGAGC
5710      5720      5730      5740      5750      5760      5770      5780      5790

                               >AjuI
                               |
CTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCA < 5900
Q A Q S R M N N G L V D A S D F D D E R N G W P V E Q V W K E M H
L R R N H E * I T V W L M R V I L D M T S V M A G L L N K S G K K C I
S G A I T N E * T R F G * C E * F * * R A * W L A C * T S L E R N A
GAGTCCCGTTAGTGCTTACTTATGTCCAAACCAACTACGCTCACTAAACTACTGCTCGCATTACCGACCGGACAACCTTGTCAGACCTTTCTTTACGT
5810      5820      5830      5840      5850      5860      5870      5880      5890

TAAACTTTTGCCATTCTCACCGGATTGATCGTCCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTGAT < 6000
K L L P F S P D S V V T H G D F S L D N L I F D E G K L I G C I D
N F C H S H R I Q S S L M V I S H L I T L F L T R G N * * V V L M
* T F A I L T G F S R H S W * F L T * * P Y F * R G E I N R L Y * C
ATTTGAAAACGGTAAGAGTGGCCTAAGTCAGCAGTGAGTACCATAAAGAGTGAACATTATGGAATAAAACTGCTCCCTTTAATTATCCAACATAACTA
5910      5920      5930      5940      5950      5960      5970      5980      5990

GTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAA < 6100
V G R V G I A D R Y Q D L A I L W N C L G E F S P S L Q K R L F Q K
L D E S E S Q T D T R I L P S Y G T A S V S F L L H Y R N G F F K
W T S R N R R P I P G S C H P M E L P R * V F S F I T E T A F S K
CAACCTGCTCAGCCTTAGCGTCTGGCTATGGTCTAGAACGGTAGGATACCTTGACGGAGCCACTCAAAGAGGAAGTAATGTCTTTGCCGAAAAGTTT
6010      6020      6030      6040      6050      6060      6070      6080      6090

AATATGGTATTTGATAATCCTGATGATAAATGTCAGTTTCATTGATGCTCGATGAGTTTCTTAAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAAT < 6200
Y G I D N P D M N K L Q F H L M L D E F F * E L I H E R I H I * M
N M V L I I L I * I N C S F I * C S M S F S K N * F M S G Y I F E C
I W Y * * S * Y E * I A V S F D A R * V F L R I N S * A D T Y L N
TTATACCATAACTATTAGGACTATATTATTAACTGCAAGTAACTACGAGCTACTCAAAAGATTCTTAATTAAGTACTCGCCTATGTATAAACTTA
6110      6120      6130      6140      6150      6160      6170      6180      6190

GTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGAAATGTAACGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAA < 6300
Y L E K * T N R G S A H I S P K S A T * N C K R * Y F V K I R V K
I * K N K Q I G V P R T F P R E K V P E I V N V N I L L K F A L N
V F R K I N K * G F R A H F P E K C H L K L * T L I F C * N S R * I
CATAAATCTTTTATTTGTTTATCCCAAGGCGCGTGTAAGGGGCTTTTCACGGTGACTTTAAACATTTGCAATTATAAAACAATTTTAAAGCGCAATTT
6210      6220      6230      6240      6250      6260      6270      6280      6290

```

EK A Devamı. pET 28a(+) içindeki çift zincirli DNA dizisi Serial Cloner programı ile gösterilmesi. Özellikler T7 bölgesi [1744 : 1725], ColE1 origin [5253 : 4625], F1 ori bölgesi [6271 : 6711], M13 origin [6716 : 6261], LacO geni [1725 : 1703], KanR geni [5353 : 6165], lacI geni [2122 : 3213], 6His [1645 : 1628], 6His [157 : 140], Thrombin kesim bölgesi, [1618 : 1601].

```

                                AanI
                                PsiI
                                |
TTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGTTGAGTGTTGTTCCA < 6400
F L L N Q L I F * P I G R N R Q N P L * I K R I D R D R V E C C S S
F C * I S S F F N Q * A E I G K I P Y K S K E * T E I G L S V V P
F V K S A H F L T N R P K S A K S L I N Q K N R P R * G * V L F Q
AAAAACAATTTAGTCGAGTAAAAAATGGTTATCCGGCTTTAGCCGTTT TAGGGAATATTTAGTTTCTTATCTGGCTCTATCCCAACTCACAAACAAGGT
6310      6320      6330      6340      6350      6360      6370      6380      6390

                                >AloI
                                |
GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGCTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCCT < 6500
L E Q E S T I K E R G L Q R Q R A K N R L S G R W P T T * T I T L
V W N K S P L L K N V D S N V K G R K T V Y Q G D G P L R E P S P *
F G T R V H Y * R T W T P T S K G E K P S I R A M A H Y V N H H P
CAAACTTTGTTCTCAGGTGATAATTTCTGCACCTGAGTTGCAGTTTCCCGCTTTTGGCAGATAGTCCCGCTACCGGGTGATGCACCTTGGTAGTGGGA
6410      6420      6430      6440      6450      6460      6470      6480      6490

                                DraIII
                                AdeI
                                |
                                |
AATCAAGTTTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGC < 6600
I K F F G V E V P * S T K S E P * R E P P I * S L T G K A G E R G
S S F L G S R C R K A L N R N P K G S P R F R A * R G K P A N V A
N Q V F W G R G A V K H * I G T L K G A P D L E L D G E S R R T W R
TTAGTTCAAAAACCCAGCTCCACGGCATTTCTGTGATTAGCCTTGGGATTTCCCTCGGGGGCTAAATCTCGAACTGCCCTTTTCGGCCGCTTGACACCG
6510      6520      6530      6540      6550      6560      6570      6580      6590

GAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCG < 6700
E K G R E E S E R S G R * G A G K C S G H A A R N H H T R R A * C A
R K E G K K A K G A G A R A L A S V A V T L R V T T T P A A L N A
E R K G R K R K E R A L G R W Q V * R S R C A * P P H P P P R L M R
CTCTTTCCCTTCCCTTCTTTCCTCGCCCGCATCCCGCGACCGTTACATCGCCAGTGCAGCGCATTTGGTGTGTGGGCGGCGCAATTACGC
6610      6620      6630      6640      6650      6660      6670      6680      6690

CCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCGCA < 6727
A T G R V P F A X
P L Q G A S H S P
R Y R A R P I R X
GGCGATGTCCCGCGCAGGGTAAGCGGT
6710      6720

```

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Tuğba AKSOY
Doğum Tarihi ve Yeri : 23/11/1990 – Bakırköy
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
e-mail : t.aksoy90@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	GOP Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı	2015
Lisans	GOP Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı	2011
Lise	Akşemsettin Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2014 – 2015	Mayasan Gıda A.Ş.	AR-GE Uzmanı