



**TTH POLİMERAZ ENZİMİNİN
TIBBİ MOLEKÜLER TANI KİTLERİNDE
KULLANIM AMAÇLI REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

**HÜMEYRA AYDIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Ağustos - 2017**

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TTH POLİMERAZ ENZİMİNİN TIBBİ MOLEKÜLER TANI KİTLERİNDE
KULLANIM AMAÇLI REKOMBİNANT ÜRETİMİ**

HÜMEYRA AYDIN

**TOKAT
2017**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

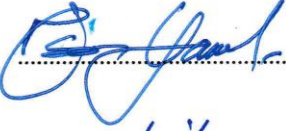
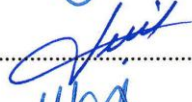
**TÜBİTAK tarafından 2210-C öncelikli alanlara yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans
Burs Programı kapsamında desteklenmiştir.**

Hümeýra AYDIN tarafından hazırlanan “Tth Polimeraz Enziminin Tıbbi Moleküler Tanı Kitlerinde Kullanım Amaçlı Rekombinant Üretimi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 4 AĞUSTOS 2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çoğunluğu ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Yrd. Doç. Dr. Seçil ERDEN TAYHAN
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Yrd. Doç. Dr. Melek GÜL
Amasya Üniversitesi


.....

.....

.....

Prof. Dr. Ebubekir ALTUNTAŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

11/28/2017

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 içerdiği 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.

HÜMEYRA AYDIN

4 Ağustos 2017

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TTH POLİMERAZ ENZİMİNİN TIBBİ MOLEKÜLER TANI KİTLERİNDE KULLANIM AMAÇLI REKOMBİNANT ÜRETİMİ

HÜMEYRA AYDIN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA GÖKÇE)

Tth polimeraz, 834 aa büyüklüğünde ve 94 kda ağırlığında bir enzimdir. Tth polimeraz; hem PCR hem reverse transkriptaz PCR uygulamalarında ayrıca DNA dizileme çalışmaları ve bunlara bağlı olarak viral ve bakteriyel bulaşıcı veya ölümcül hastalıkların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. Reverse transkripsyon (RT) ve PCR (Reverse Transkriptaz PCR), enfeksiyöz ajanlar ya da genetik hastalıkların teşhisi için kullanılmalarının yanı sıra, klonlama ve RNA dizilerinin analizi, gen ekspresyonunun takibi gibi moleküler işlemler için de güçlü birer araç olarak kullanılmaktadırlar. Üretilmesi planlanan rekombinant Tth polimeraz enzimi, sahip olduğu polimeraz aktivitesi ile PCR uygulamalarında, reverse transkriptaz aktivitesi ile de RT-PCR uygulamalarında kullanılabilir. Aynı zamanda DNA dizilemede de kullanılan en güvenilir enzimlerden biridir. Bu tez çalışmasında moleküler biyolojik uygulamalarda kullanılan en önemli enzimlerden biri olan Tth polimerazın, uygun vektör sistemi kullanılarak *Escherichia coli* ekspresyon sisteminde üretimi planlanmıştır. Tth polimeraz enzimine ait nükleotid dizisi biyoinformatik araçlar kullanılarak oluşturulmuş ve sentezletirilmiştir. Elde edilen gen dizisine *E. coli* K12 SUŞU için kodon optimizasyonu yapılmış, pTOLT vektörüne klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Klonlama işleminin doğrulanmasının ardından protein ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Protein ekspresyonu için *E. coli* BL21 pLysE hücreleri kullanılmıştır. Ekspresyon çalışmaları sonrası üretilen Tth polimeraz, SDS-PAGE analizi ile görüntülenmiş ve üretiminin gerçekleştiği doğrulanmıştır.

2017, 59 SAYFA

ANAHTAR KELİMELE: PCR, RT-PCR, Tth Polimeraz, *E.coli*, Rekombinant enzim

ABSTRACT

MASTER THESIS

EXPRESSION OF RECOMBINANT TTH POLYMERASE ENZYME FOR DEVELOPMENT OF MEDICAL MOLECULAR DIAGNOSTIC KITS

HÜMEYRA AYDIN

**GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. İSA GOKÇE

The Tth polymerase is an enzyme with a size of 834 aa and a weight of 94 kDa. Tth polymerase is frequently used in both PCR and reverse transcriptase PCR applications as well as in DNA sequencing studies and to diagnosis in viral and bacterial infectious or fatal diseases. Reverse transcription (RT) and PCR (Reverse Transcriptase PCR) are used as tools for the diagnosis of infectious agents or genetic diseases, as well as for molecular processes such as cloning, analysis of RNA sequences and gene expression. The recombinant Tth polymerase enzyme that is planned to be produced can be used in PCR applications with polymerase activity and RT-PCR applications with reverse transcriptase activity. It is also one of the most reliable enzymes used in DNA sequencing. In this study, production of *Escherichia coli* expression system was planned by using appropriate vector system of Tth polymerase which is one of the most important enzymes used in molecular biological researches. The nucleotide sequence of the enzyme Tth polymerase was constructed and synthesized using bioinformatic tools. The obtained gene sequence was codon optimized for *E. coli* K12 strain and cloned into pET22b and pTOLT vectors. After confirmation of the cloning process, protein expression studies were carried out. *E. coli* BL21 plyse cells were used for protein expression. The produced Tth polymerase after expression studies was analyzed by SDS-PAGE and the presence of the enzyme was confirmed.

2017, 59 PAGES

KEYWORDS: PCR, RT-PCR, Tth Polymerase, *E. coli*, Recombinant enzyme

ÖNSÖZ

Çalışmalarım ve akademik hayatım süresince geniş bilgi birikimi ve yol göstericiliği ile bana her konuda yardımcı olan, tecrübelerinden ve tüm laboratuvar imkanlarından faydalanma fırsatı veren saygıdeğer Hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE' ye teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen "Rekombinant Protein Üretim Laboratuvarı" değerli ekip arkadaşlarım Rizvan İMAMOĞLU, Duygu DÜZGÜN ve Emirhan BOZOĞLAN' a çok teşekkür ederim.

Üniversite eğitimim süresince "gerçek mühendisler" yetiştirmek için büyük çaba sarfeden, derslerinden, bilgisinden, ilminden ve en önemlisi vizyonundan faydalanabilme imkanına sahip olduğum için çok şanslı hissettiğim, şu an aramızda olmayan Hocamız rahmetli Yrd. Doç. Dr. Volkan KÖSELİ' ye minnettarım.

Tez çalışmamı 2210-C öncelikli alanlara yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her evresinde maddi manevi desteklerini esirgemeyen, her daim yanımda olarak bana güç veren sevgili aileme, biricik motivasyon kaynağım, bana şans getirdiğine inandığım kedim Rüzgar' a sonsuz teşekkürler.

HÜMEYRA AYDIN

4 Ağustos 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Enzim Kavramı.....	2
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	2
2.3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Enzimler.....	4
2.3.1. DNA Polimerazlar.....	4
2.3.1.1. Prokaryotik Polimerazlar.....	4
2.3.1.2. DNA Polimeraz I ve Klenow Fragmenti.....	5
2.3.1.3. T4 DNA Polimeraz.....	6
2.3.2. Termostabil Polimerazlar.....	6
2.3.2.1. Bst Polimeraz.....	6
2.3.2.2. Taq Polimeraz.....	7
2.3.2.3. Tth Polimeraz.....	7
2.3.3. Reverse Transkriptazlar.....	10
2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	12
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Mekanizması.....	12
2.4.1.1. Denatürasyon.....	14
2.4.1.2. Primerin Bağlanması (Annealing).....	14
2.4.1.3. Zincir Uzaması (Extension).....	14
2.5. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	15
2.6. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	16
2.6.1. Gen klonlamanın temel ilkeleri.....	16

2.6.1.1. Klonlamada Kullanılan Vektörler	18
2.6.1.1.1. Plazmitler	18
2.6.1.1.2. Kozmid Vektörler	20
2.6.1.1.3. Viral Vektörler	20
2.6.1.1.4. BAC Vektörleri	22
2.6.1.1.5. YAC Vektörleri	23
2.6.2. Hedef genin seçilmesi	24
2.6.3. Restriksiyon enzimleri ve DNA'nın kesilmesi	24
2.6.4. DNA'nın plazmite yerleştirilmesi	25
2.6.5. Rekombinant DNA'nın çoğaltılması	26
2.6.6. Klonlanan vektörün hücrelerden seçimi	26
2.6.7. Klonlamanın doğrulanması	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	27
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	28
3.1.3. Kullanılan çözeltiler.....	29
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Tth Polimeraz Proteinini Kodlayan Genin Tasarımı.....	31
3.2.2. Tth Polimeraz Enziminin Vektörlere Klonlanması.....	36
3.2.3. Restriksiyon Enzimleri İle Kesim	36
3.2.4. DNA Ligasyonu.....	38
3.2.5. PİPES'li kompetent hücre hazırlanması	39
3.2.6. Transformasyon	40
3.2.7. Plazmit DNA saflaştırılması	40
3.2.8. Doğrulama restriksiyon kesimi	41
3.2.9. DNA Dizileme	42
3.3. TTH DNA Polimeraz Enziminin Üretilmesi	42
3.3.1. FSB'li Kompetent Hücre Hazırlanması	42
3.3.2. <i>E. Coli</i> BL21 Plyse Hücrelerinin Parçalanması	43
3.3.3. TTH Polimeraz Enziminin Saflaştırılması	43
3.3.4. SDS-Page İçin Numunelerin Hazırlanması	44

3.3.5.Diyaliz.....	45
3.3.6. Tth Polimeraz Enzimi İçin Aktivite Testi (PCR).....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Tth Polimeraz Enziminin Vektörlere Klonlanması.....	46
4.2. Restriksiyon Enzimi İle Kesimi.....	46
4.3. Doğrulama Restriksiyon Enzim Kesimi.....	46
4.4. DNA Dizileme.....	47
4.5. Tth Polimeraz Enziminin Üretilmesi.....	50
4.6. Tth Polimeraz Enziminin Saflaştırılması.....	50
4.7. Tth Polimeraz Enziminin Aktivite Tayini.....	50
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	52
6. KAYNAKLAR.....	56
7. ÖZGEÇMİŞ.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
Bç	baz çifti
µl	mikro litre
M	Molar
mM	mili molar
µM	mikro molar
nm	nano metre
P	Fosfat
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)

Kısaltmalar	Açıklama
Amp	Ampisilin
APS	Amonyum persülfat
BSA	Sığır Serum Albümin
ddH ₂ O	Çift saf su (Double distilled water)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
E. coli	Escherichia coli
FSB	Frozen Storage Buffer
IPTG	İzopropil β-D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PİPES	piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi

TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tth polimeraz enziminin üç boyutlu modellemesi.....	9
Şekil 2.2. PCR' ın işleyiş mekanizması.....	13
Şekil 2.3. RT-PCR aşamaları.....	15
Şekil 2.4. Rekombinant Dna eldesi.....	17
Şekil 2.5. pBR 322 plazmit vektörü dairesel haritası.....	19
Şekil 2.6. Bakteriyofaj lambda genomu ve dairesel yapısı.....	21
Şekil 2.7. M13 vektörü dairesel yapısı.....	21
Şekil 2.8. BAC vektörü dairesel haritası.....	23
Şekil 2.9. YAC vektörü dairesel haritası.....	24
Şekil 3.1. pET22b(+) vektör haritası, polilinker bölgenin restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren detaylandırılmış DNA dizisi.....	34
Şekil 3.2. pTOL plazmit vektörü ve poli-linker bölgesinin detaylandırılmış restriksiyon enzimlerinin DNA dizisi.....	35
Şekil 4.1. BamHI ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş Tth plazmit DNA'sının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 4.2. pTOLTTH plazmit DNA'sının doğrulama kesimi %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.3. pTOLT vektör sistemine göre beş numaralı plazmitin DNA dizileme sonuçlarının kromatogram şeklindeki görüntüsü.....	49
Şekil 4.4. Tth polimeraza ait PCR örneklerinin %1' lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	51

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tth polimeraz enzimine ait genel özellikler.....	8
Çizelge 2.2. Tth polimeraz enziminin atomik kompozisyonu.....	8
Çizelge 2.3. Tth polimeraz enziminin amino asit kompozisyonu.....	8
Çizelge 2.4. Moleküler Biyolojide Kullanılan Temel Polimerazlar.....	10
Çizelge 2.5. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları.....	25
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve marka bilgileri.....	27
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve marka bilgileri.....	28
Çizelge 3.3. pTOLT vektör sistemi kesim reaksiyonu bileşenleri.....	36
Çizelge 3.4. pTOLT vektör sistemi için ligasyon karışımı içerikleri.....	38
Çizelge 3.5. pET22b vektör sistemi için ligasyon karışımı içerikleri.....	38
Çizelge 3.6. pTOLT vektör sistemi doğrulama kesim reaksiyonu bileşenleri.....	41
Çizelge 3.7. pET22b vektör sistemi doğrulama kesim reaksiyonu bileşenleri.....	41
Çizelge 3.8. Tth polimeraz enziminin aktivite tayini için PCR reaksiyonu koşulları.....	45

1. GİRİŞ

Yaşamın yapıtaşı olan proteinler doğal metabolizmalarının bir parçası olarak tüm canlılar tarafından sentezlenir. Enzimler gibi bazı proteinler biyokatalizör olarak görev yapar ve metabolik reaksiyonların hızını artırır. Proteinler, hücre sinyal yollarında, immün cevaplarda, hücre adezyonunda ve hücre döngüsünde önemli rol oynarlar. Genetik mühendisliği ve protein mühendisliği uygulamaları ile endüstriyel olarak yaygın bir şekilde üretilmektedirler. Doğal ve rekombinant proteinler, biyofarmasötik, enzim ve tarım gibi büyük endüstrilere hizmet etmektedir. Protein yapıdaki enzimler, bu endüstrilerin yanı sıra tıp, biyomedikal araç, gıda, beslenme, deterjan, tekstil, deri, kağıt, hamur, polimerler ve plastik endüstrilerinde yaygın kullanıma sahiptir. Enzim endüstrisi 1980 ve 1990 yıllarında ilerleme göstermeye başlamıştır. 1970' li yıllarda enzimler bitkisel ve hayvansal kaynaklardan elde edilmekteydi. Bu durum kullanılabilirliği düşük ve yüksek maliyetli enzimlerin üretilmesi ile sonuçlanmıştır. Mikrobiyal enzim üretim endüstrisindeki gelişmelere bağlı olarak genetik olarak kolaylıkla manipüle edilebilen, istenilen miktar ve özellikteki enzim üretimi de artmıştır. 1990' lı yıllarda pek çok enzim Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmiştir. 1993' te endüstriyel enzim pazarının %50' sinden fazlası rekombinant proseslerden sağlanmaya başlamıştır (Demain ve Vaishnav, 2009).

Enzimler, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonları katalizlemekle görevli protein yapıdaki moleküllerdir. Enzimlerin hücrelerde önemli metabolik görevleri bulunmaktadır. Enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere 21. yüzyılın anahtar teknolojilerinden bir tanesi olan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmekte ve ilgili oldukları alanlarda kullanıma sunulmaktadır (Wiseman, 1987).

Enzim teknolojisinin, artan biyoteknolojik çalışmalar, Ar-Ge faaliyetleri ve medikal araştırmalar ile bağlantılı olarak gelişmesi sonucu biyoteknolojinin endüstriyel ve moleküler enzimler ile ilgili alanlarında yapılan araştırmalar bir hayli önem kazanmıştır. Son yıllarda stratejik alan olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisi teknikleri kullanılarak enzim üretimi büyük oranda ilerleme kaydetmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Enzim Kavramı

Enzimler her bir organizmanın metabolizmasında önemli rol oynayan ve proteinler içerisindeki yaygın gruptur. Hücrelerdeki tüm kimyasal reaksiyonlar ve metabolik adımlar enzimler tarafından katalizleyen ve düzenleyen biyokatalizörlerdir (Shomburg ve ark., 2002). Canlı organizmalardaki mevcut reaksiyonları hızlandırmakta ve sonucunda yan ürün oluşturmamaktadırlar. Katalitik RNA yapısındaki moleküllerin bir kısmı hariç tamamı protein yapıdadır. En büyük ve en spesifik protein grubudur (Keha ve Küfrelioğlu, 2004).

Yapılarının aydınlatılması çalışmaları ile birlikte enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonların da kinetiklerinin araştırılması çalışmaları hızlanmıştır. Enzimler katalitik olarak güçlü moleküllerdir. Çeşitli moleküllere ve reaksiyonlara spesifik olarak parçalama, birleştirme, bazı alt grupları uzaklaştırma gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

Enzim biyolojisi ve kimyası üzerine çalışmalar, Michaelis-Menten denkliğinin oluşturulması ve 1926 yılında Sumner tarafından üretilen saf kristal yapıdaki üreaz enzimi ile başlamaktadır. Enzim kinetiği ve üretimi üzerine çalışmalar zamanla yoğunlaşmış ve yeni bir endüstri kolu meydana gelmiştir. Günümüze kadar pek çok enzimin kinetik özellikleri, aminoasit yapısı, dinamik özellikleri, üç boyutlu yapıları çalışılmış ve çalışılmaya devam etmektedir (German ve ark, 2012).

2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Her hücre substratına ve bu substrata bağlı reaksiyona özgü birkaç bin farklı enzim içermektedir. Başlangıçta her enzime keşfedicisi tarafından bir isim verilmiştir ve pek çoğu günümüzde hala kullanılmaktadır. Bununla birlikte bilinen enzim sayısı arttıkça bu sistem yeterli olmamış, adlandırmada karışıklıklar yaşanmaya başlamıştır. Aynı zamanda her enzimin katalizlediği reaksiyon hakkında yeterli bilgi içermemesi bu karmaşayı artırmış ve yeni düzenlemelere ihtiyaç duyulmuştur (Buxbaum, 2007). Mevcut karışıklığın düzenlenmesi amacıyla 1955 yılında Uluslararası Enzim

Komisyonu (International Comission on Enzyme) kurulmuştur. Bu komisyon tarafından enzimlerin isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasında kullanılan üç genel prensip belirlenmiştir (Shomburg ve ark., 2002).

Tek enzimler için "-az" eki ile biten adlandırmalar yapılmaktadır. Birden fazla sistem üzerinde etkin olan enzimler için bu adlandırma sistemi kullanılmamaktadır.

Bir diğer adlandırma sistemine göre enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre adlandırılmaktadırlar. Son olarak, katalizledikleri reaksiyonların çeşidine göre adlandırılmaktadırlar. (Aehle, 2004).

Bu komisyon tarafından hazırlanan rapora göre her enzim bir E.C. koduna sahiptir. Enzimler katalizledikleri reaksiyonun türüne göre altı temel gruba ayrılır ve her bir grup için farklı kod numaraları tanımlanmaktadır. E.C. kodları noktalar ile birbirlerinden ayrılmış dört rakamdan oluşmaktadır. İlk rakam enzimin altı ana sınıftan hangisine ait olduğunu belirtmektedir.

1. Oksidoredüktazlar
2. Transferazlar
3. Hidrolazlar
4. Liyazlar
5. İzomerazlar
6. Ligazlar

E.C. kodundaki ikinci rakam enzimin alt sınıfını göstermektedir. Üçüncü rakam ikinci alt grubu belirtir. Son rakam ise enzimin ikinci alt grup içerisindeki seri numarasını ifade etmektedir. Örneğin, **E.C. 2.7.1.1** (ATP:glucose phosphotransferase) (Buxbaum, 2007).

2.3. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Enzimler

Moleküler klonlama için kullanılan nükleik asitler doğal ya da sentetik orijinli olabilir ve uzunlukları birkaç nükleotitten binlerce nükleotide uzanabilir. Nükleik asitler belirli karakteristik özellikler kazanmaları için kapsamlı bir şekilde manipüle edilebilir. Bu manipölasyonlar arasında parçalama, birleştirme, fosfat ya da metil grupları gibi modifiye edici grupların eklenmesi olabilir. Bu manipölasyonlar polimerazlar, ligazlar, nükleazlar, fosfatazlar ve metilazlar tarafından katalizlenir (Rittié ve ark., 2008).

2.3.1. DNA Polimerazlar

DNA polimerazlar, yapısal birimlerin ya da deoksiribonükleotid trifosfatların(dNTPs) bir araya gelmesi ile polimerlerin oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. DNA polimeraz enzimi aktivite gösterebilmesi için serbest 3' OH grubuna ihtiyaç duymaktadır. İhtiyaç duyulan serbest 3' OH grubunu primaz olarak adlandırılan bir RNA polimeraz tarafından sentezlenen primerlerden elde etmektedirler. Primerin yalnızca serbest 3' OH ucuna nükleotid eklerler. Moleküler biyolojide kullanılan polimerazların pek çoğu bakteri ya da onları enfekte eden virüslerden köken almaktadır. Moleküler biyolojide en çok kullanılan DNA polimerazlar, Pol I, Klenow fragmenti, T4 DNA polimeraz, Termotabil polimerazlar, Taq polimeraz, Tth polimeraz, Pfu polimerazdır. Bu polimerazlar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR,PZR), DNA etiketleme, çentik translasyonu gibi farklı moleküler biyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Rittié ve ark., 2008).

2.3.1.1.Prokaryotik Polimerazlar

Bakterilerde DNA replikasyonundan sorumlu Pol I, Pol II ve Pol III olmak üzere 3 çeşit polimeraz bulunmaktadır. Bu 3 enzimde primer ve dNTP lerin olduğu ortamda DNA zincirlerinin 5 '→ 3' yönünde uzamasını katalizler. DNA Pol III 1970 yılında keşfedilmiştir ve prokaryotik replikasyonu yürüten ana enzimdir. Her 3 enzim aynı zamanda 3 '→ 5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (Haupenthal ve ark., 2012).

2.3.1.2. DNA Polimeraz I ve Klenow Fragmenti

Genetik mühendisliğinde rutin olarak kullanılan dört tip DNA polimeraz bulunmaktadır. Bunlardan ilki, çoğunlukla E. Coli kaynaklı DNA polimeraz I' dir. Bu enzim çoğunlukla iki iplikli bir DNA molekülünün, kısa tek iplikli bölgesine bağlanır. İlerledikçe mevcut ipliği yıkar ve yeni bir iplik sentezler. Bu sebeple DNA polimeraz I, çift aktiviteli DNA' nın polimerleşmesi ve yıkılmasında görevli- enzimlere en iyi örneklerdendir (Brown, T.A., 2009).

DNA polimeraz I kolay elde edilebilir oluşu ve sahip olduğu pek çok özelliğinden dolayı moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat replikasyonun büyük kısmını tek başına gerçekleştiremez. Tek bir polipeptittir ve iki alt üniteye sahiptir. DNA polimeraz I' in polimeraz ve nükleaz aktiviteleri, bu iki alt ünite tarafından kontrol edilir. Nükleaz aktivite polipeptit molekülünün ilk 323 aminoasiti tarafından kontrol edilir. Bu sebeple bu parçanın uzaklaştırıldığında, polimeraz aktivitesi olan fakat DNA' yı yıkamayan modifiye halde bir enzim bırakır. Klenow fragmenti olarak adlandırılan bu modifiye enzim halen tek iplikli kalıp DNA üzerinde komplementer bir iplik sentezleyebilir, fakat nükleaz aktivitesi yoktur. Doğal polimerazlar ve değiştirilmiş versiyonları gibi birkaç enzim daha Klenow fragmanı ile benzer özelliklere sahiptir. Klenow fragmenti 5'→3' yönünde polimeraz aktiviteye sahiptir. Diğer alt birim ise 3'→5' yönünde ekzonükleaz aktiviteye sahiptir ve terminal fosfodiester bağını kırarak DNA zincirinden deoksiniükleotid monofosfatları (dNMP) uzaklaştırabilmektedir. Bu ekzonükleaz, hata düzeltme (proof reading) mekanizmasında kullanılabilmektedir. Polimeraz sentez sırasında herhangi bir hata yaparsa hatalı nükleotid bu mekanizma ile uzaklaştırılır (Allison, L.A., 2014).

PCR(PZR)' da sıklıkla kullanılan Taq polimeraz enzimi *Thermus aquaticus* mikroorganizmasından elde edilen bir çeşit DNA polimeraz I enzimidir. *Thermus aquaticus* organizması kaplıcalarda yaşayan bir organizmadır ve bu özelliği sayesinde Taq polimeraz enzimi ısıya dayanıklı, denatürasyona dirençlidir. Bu haliyle PCR(PZR) uygulamasının denatürasyon aşamasında 94 °C sıcaklığa çıkıldığında denatüre olmaz ve aktivitesini korur (Ishino S. ve Ishino Y., 2014).

2.3.1.3. T4 DNA Polimeraz

Bakteriyofaj T4 polimeraz dNTP'lerin yokluğunda 3'→5' ekzonükleaz ve dNTP'lerin varlığında 5'→3' polimeraz aktivitelerini gerçekleştirmek için bir kalıp DNA ve primere ihtiyaç duymaktadır. E. coli DNA polimeraz I' in aksine T4 DNA Pol 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine sahip değildir. Bu sebepten T4 DNA polimeraz DNA fragmentlerini 5' ucundaki çentikleri doldurmada, çentik translasyonunda ya da çift zincirli DNA' nın 3' ucunu etiketlemede Klenow fragmenti yerine kullanılabilir (Studier ve ark., 1990). T4 DNA polimerazın ekzonükleaz aktivite hızı çift zincirli DNA' ya dakikada yaklaşık 40 baz, tek zincirli DNA' ya ise dakikada yaklaşık 4.000 baz şeklindedir. Standart koşullar altında çalışıldığında T4 DNA Polimerazın polimerizasyon hızı dakikada 15.000 nükleotide ulaşmaktadır (Rittié ve ark., 2008).

2.3.2. Termostabil Polimerazlar

Termostabil DNA polimerazlar 70' li yılların başında saflaştırılmışlardır. PCR(PZR) çalışmalarındaki ilerlemelere bağlı olarak, yüksek sıcaklıklarda DNA sentezine imkan tanımaları sayesinde moleküler klonlamada oldukça etkin kullanılır hale gelmişlerdir. Termostabil polimerazlar tıpkı termofilik organizmalarda olduğu gibi G/C oranı yüksek DNA bölgelerini replike edebilirler (Pantazaki ve ark., 2002).

2.3.2.1. Bst Polimeraz

Bst polimeraz, *Bacillus stearothermophilus* (Bst) organizmasından 1968 yılında izole edilmiş bir termostabil DNA polimeraz I' dir. 39-40°C arasında çoğalabilmektedir. Bst polimerazın active olduğu optimum sıcaklık 65°C ' dir. 15 dakika 75°C' de inkübe edildiğinde inaktif hale gelmektedir (Adams ve Kelly., 1998). Bst polimeraz I 5'→3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve maksimum aktivite gösterebilmesi için yüksek konsantrasyonda Mg^{+2} konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bst DNA polimeraz iki protein fragmentinden(kısımından) meydana gelmektedir. Büyük protein fragmenti(kısmı) termostabildir ve bu yüzden saç tokası (hairpin) oluşumundan kaynaklanan problemlerden kaçınmak için 65°C' de gerçekleştirilen dizileme reaksiyonlarında oldukça kullanışlıdır (Moser ve ark., 2012).

2.3.2.2. Taq Polimeraz

Taq polimeraz *Thermus aquaticus* mikroorganizmasından elde edilen ve *E. coli* DNA polimeraz I' in homoloğu olan bir enzimdir. Bununla birlikte DNA polimeraz ve 5' nükleaz aktivitesinden sorumlu domainlere (bölge) sahiptir. Taq polimerazın polimeraz domainlerinin ve polimeraz I' in Klenow fragmentinin yapıları hemen hemen aynıdır (Eom ve ark., 1996). Taq polimeraz 1976 yılında saflaştırılmıştır. Yarı ömrü 95 °C' de 40 dakikadır. Mg^{+2} iyonu varlığında ve 80 °C' de optimum aktivite gösterir. Taq polimeraz 3'→5' ekzonükleaz aktivitesinden yoksundur bu sebepten proofreading(hata düzeltme) mekanizmasına sahip değildir. Aktivite gösterdiği reaksiyonlarda PCR(PZR) ürünlerinin 3' ucuna birkaç adet Adenin bazı ekler (Terpe, K., 2013).

2.3.2.3. Tth Polimeraz

Thermus thermophilus mikroorganizmasından izole edilmiş polimeraz özellikte bir enzimdir. Tth polimeraz olarak adlandırılan enzim 834 aa büyüklüğünde ve 94 kDa ağırlığındadır (Asakura ve ark., 1993). 3'→5' ekzonükleaz (proof reading) aktivitesinden yoksundur. Tth polimeraz Mg^{+2} iyonu varlığında kalıp DNA' dan çift zincirli DNA polimerizasyonunu, Mn^{+2} varlığında kalıp RNA' dan çift zincirli DNA polimerizasyonunu katalizlemektedir. Tth polimeraz; hem PCR da hem de (RT) Reverse transkriptaz PCR(PZR)' da ayrıca DNA dizileme çalışmaları ve bunlara bağlı olarak viral ve bakteriyel bulaşıcı veya ölümcül hastalıkların tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (Moser ve ark., 2012).

Tth polimeraz, çok özgül bir yapıya sahip olup, DNA' ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesinin sahip olduğu gibi, RNA' ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi de (reverse transkriptaz) göstermektedir. Bu özelliği sayesinde reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) esnasında ayrıca bir reverse transkripsiyon basamağına ihtiyaç duyulmayarak zamandan tasarruf edilebilmekte ve olası kontaminasyon ihtimallerinin önüne geçilebilmektedir. Böylece reverse transkripsiyon işlemi tek basamakta ve tek bir tüp içerisinde gerçekleştirilebilmektedir (Çimen, C., 2010).

Tth polimerazın aktivitesinin, yapılan çalışmalar sonucunda oldukça yaygın kullanımı olan Taq polimeraza göre 100 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Shandilya ve ark., 2004). Ayrıca PCR(PZR) işlemlerinde en çok kullanılan Taq polimeraz enzimi kan örneklerinde stabil kalmazken, Tth polimeraz enzimi kan örneklerinde stabil kalabilmekte ve böylece kandan direk PCR(PZR) işlemini mümkün kılmaktadır (Nishimura ve ark., 2000).

Çizelge 2.1. Tth polimeraz enzimine ait genel özellikler

Aminoasit sayısı	2505
Moleküler ağırlık	94 kDa
Toplam atom sayısı	24978
Molekül formülü	$C_{7072}H_{11641}N_{2505}O_{2874}S_{886}$
Tahmin edilen yarılanma süresi	4.4 hours (memeli hücrelerinde, in vitro) >20 hours (maya, in vivo) >10 hours (<i>E. coli</i> , in vivo)

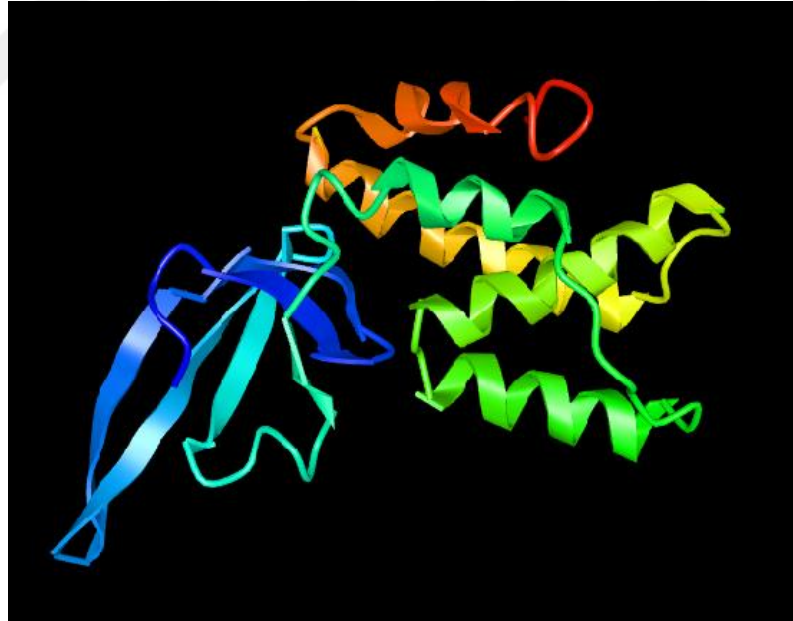
Çizelge 2.2. Tth polimeraz enziminin atomik kompozisyonu

Karbon	C	7072
Hidrojen	H	11641
Azot	N	2505
Oksijen	O	2874
Kükürt	S	886

Çizelge 2.3. Tth polimeraz enziminin amino asit kompozisyonu

Amino asit	Sayıca miktar	Yüzdece miktar
Ala (A)	440	%17.6
Arg (R)	0	0
Asn (N)	0	0
Asp (D)	0	0
Cys (S)	886	%35.4
Gln (Q)	0	0
Glu (E)	0	0
Gly (G)	811	%32.4

His (H)	0	0
Ile (I)	0	0
Leu (L)	0	0
Lys (K)	0	0
Met (M)	0	0
Phe (F)	0	0
Pro (P)	0	0
Ser (S)	0	0
Thr (T)	368	%14.7
Trp (W)	0	0
Tyr (Y)	0	0
Val (V)	0	0
Pyl (O)	0	0
Sec (U)	0	0



Şekil 2.1. Tth polimeraz enziminin 3 boyutlu modellemesi (Srivastava ve ark., 2013)

2.3.3. Ters (Reverse) Transkriptazlar

Genetik mühendisliği uygulamalarında önemli bir diğer polimeraz ise revers transkriptazdır. Revers transkriptazlar, kalıp olarak DNA değil RNA kullanmaktadırlar. Bu enzim RNA kalıbına komplementer olacak şekilde DNA (cDNA) ipliği sentezlemektedir. cDNA sentezi moleküler biyoloji çalışmalarında oldukça temel uygulamalardan biridir. 1960'lara kadar genetik bilginin transferinin DNA' dan RNA' ya olduğu düşünülmekteydi. Rous Sarcoma Virüs (RSV) ve Rauscher Leukaemia Virüs'ten elde edilen reverse transkriptazların karakterize edilmesi ile birlikte RNA kalıbından tek zincirli DNA molekülünün sentezlenebileceği düşünülmüştür. Sonuçta oluşan tek zincirli DNA, RNA kalıbının komplementer bir kopyasıdır ve cDNA olarak adlandırılır (Özsolak ve Milos, 2011).

Çizelge 2.4. Moleküler Biyolojide Kullanılan Temel Polimerazlar (Rittié ve ark., 2008'den uyarlanmıştır).

Enzim	Gereksinimleri	Aktivite	Temel uygulamaları
Pol I	Kalıp Primer DNTps	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz (proof reading) 5'→3' Ekzonükleaz	DNA replikasyonu Çentik translasyonu
Pol II	Kalıp Primer	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz	DNA replikasyonu
Pol III	Kalıp Primer	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz	DNA replikasyonu
Klenow	Kalıp Primer DNTps	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz	DNA replikasyonu
T4 DNA Polimeraz	Kalıp Primer	5'→3' Polimeraz(dNTps varlığında) 3'→5' ekzonükleaz(dNTps yokluğunda)	DNA replikasyonu

Modifiye T7 DNA Polimeraz	Kalıp Primer dNTPs	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz	Büyük DNA fragmentlerinin amplifikasyonu Radyoaktif problemlerin hazırlanması
Mutant Modifiye T7 DNA Polimeraz	Kalıp Primer dNTPs	5'→3' Polimeraz	Dizileme çalışmaları
Terminal deoksinükleotidil transferaz(TdT)	DNA primeri Mg^{+2} , Co^{+2}	Mg^{+2} varlığında tek zincirli DNA primerini, Co^{+2} varlığında çift zincirli DNA primerini kullanarak DNA' nın 3' ucuna homopolimer kuyruk ekleme	Modifiye nükleotidler kullanarak DNA 3' uçlarını etiketleme DNA' nın 3'-OH ucuna homopolimer kuyruk ekleme
Bst Polimeraz	Kalıp $MgCl_2$ 65°C optimum sıcaklık	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz	PCR
Taq Polimeraz	Kalıp $MgCl_2$ 90°C optimum sıcaklık	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz	PCR
Tth Polimeraz	Kalıp (DNA ya da RNA) Mg^{+2} , Mn^{+2} 74°C optimum sıcaklık	Mg^{+2} varlığında DNA polimeraz Mn^{+2} varlığında reverse transkriptaz	PCR RT-PCR
Pfu, Pow, Vent, Pab	Kalıp dNTPs $MgCl_2$	5'→3' Polimeraz 3'→5' ekzonükleaz (proof reading) 5'→3' Ekzonükleaz	Yüksek duyarlılıkta PCR

2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

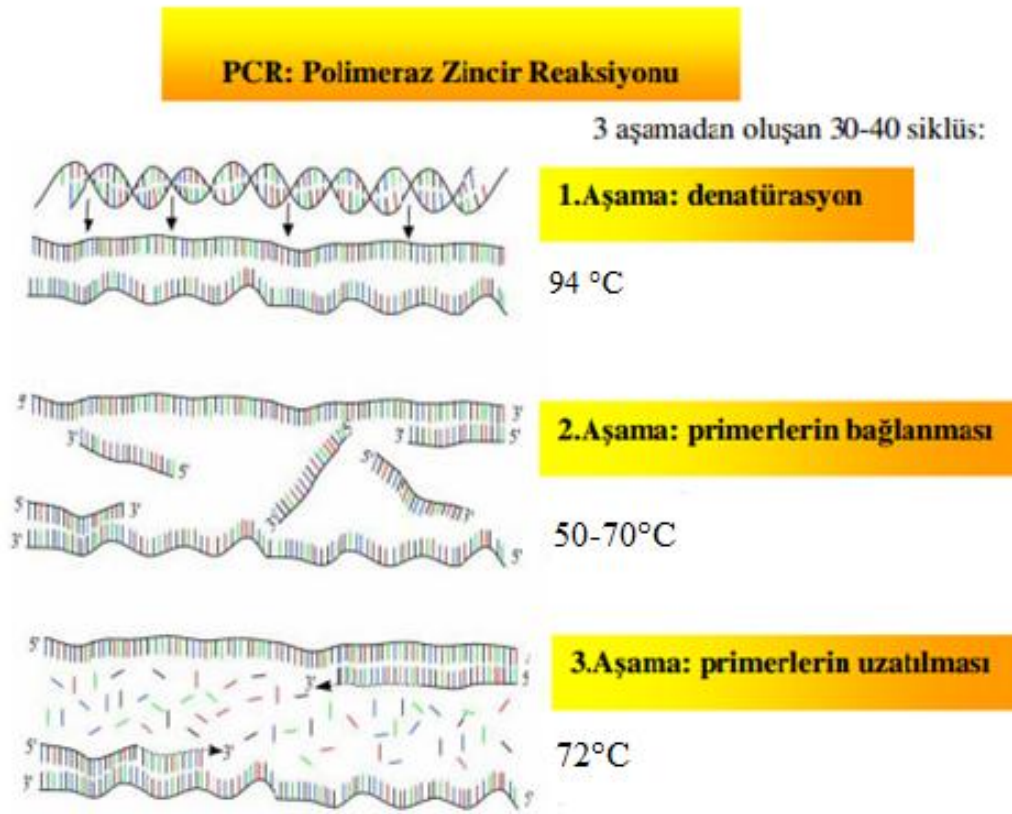
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR,PZR), özgül bir DNA parçasının oldukça hızlı ve otomatize bir şekilde, oligonükleotid primerler kullanılarak milyonlarca kopyasının sentezlenmesini sağlayan in vitro bir tekniktir. PCR(PZR), istenilen DNA dizisini çoğaltma hususunda hızlı, seçici ve duyarlı bir teknik oluşu ile moleküler biyolojik çalışmalarda kullanılan en temel uygulamalardan biri haline gelmiştir (Erich, H., 1989). Üzerinde çalışma yapılacak genetik materyalin çok az miktarda dahi olsa çoğaltılmasına imkan tanır. Spesifik DNA dizisi çoğaltılırken, istenmeyen dizilerin baskılanması söz konusudur (Çetinkaya, E. ve Ayhan, Kamuran., 2012). Oldukça geniş kullanım alanine sahip olan PCR(PZR)' ın kullanım alanlarından bazıları aşağıda listelenmiştir.

- ❖ Orak hücre anemisi, AIDS, lösemi gibi DNA ve RNA temelli hastalıkların klinik olarak tanısında,
- ❖ Patojen organizmaların tespitinde,
- ❖ Çeşitli türlerin tanısında,
- ❖ Polimorfizm çalışmalarında,
- ❖ Arkeolojik çalışmalarda,
- ❖ Adli tıp çalışmalarında,
- ❖ Klonlama ve gen ekspresyon çalışmalarında,
- ❖ DNA dizi analizinde,
- ❖ Genom kütüphaneleri oluşturmada,
- ❖ Kalıtsal hastalıkların tanısında.

2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Mekanizması

PCR(PZR), çift iplikli DNA molekülü üzerindeki hedef dizilere oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması prensibi ile çalışmaktadır. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıklarda denature edildikten sonra, oligonükleotid primerler tek iplikli DNA molekülü üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgeler ile eşleşirler. Bu işlem spesifik olarak düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. Polimerazlar, uygun tamponlar ile birlikte dNTP' ler varlığında primerlerin uzamasını sağlamaktadırlar. Bu işlem sonucunda kalıp DNA' ya tamamlayıcı özellikte yeni bir DNA molekülü

sentezlenmektedir. Standart bir PCR(PZR) döngüsü temelde üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve bağlanan primerlerin uzaması (ekstension) şeklindedir. Her bir döngü çoğaltılmak istenen hedef DNA molekülü miktarını iki katına çıkarır. Denatürasyon, primerlerin bağlanması ve bağlanan primerlerin uzaması aşamalarının ard arda tekrarlanması ile hedef DNA' nın yaklaşık 30 jenerasyon sonra milyonlarca kopyasına ulaşmak mümkün olabilmektedir (Temizkan ve Arda, 2004).



Şekil 2.2. PCR(PZR)' ın işleyiş mekanizması (Vierstracte, 1999).

2.4.1.1. Denatürasyon

Çift zincirli DNA molekülünün 94-97°C sıcaklıklara çıkıldıktan sonra çift zincirler arasındaki hidrojen bağlarının kırılarak birbirinden ayrılmasıdır. DNA çift zinciri Guanin ve Sitozine (G+C) zengin ise bu hidrojen bağlarını kırmak daha zor olduğundan denatürasyon sıcaklığı artmaktadır. Denatürasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmemesi primer yapışması ve uzamasını da etkileyeceğinden denatürasyon sıcaklığının doğru seçilmesi önemlidir (Sambrook ve Russell, 2001). Kalıp DNA büyük ise veya genomik DNA için başlangıç denatürasyon aşaması uzatılabilir. Denatürasyonu takip eden aşama PCR(PZR) uygulamasının spesifitesini etkilemesi açısından çok önemli olan primerin bağlanması (annealing) aşamasıdır.

2.4.1.2. Primerin Bağlanması (Annealing)

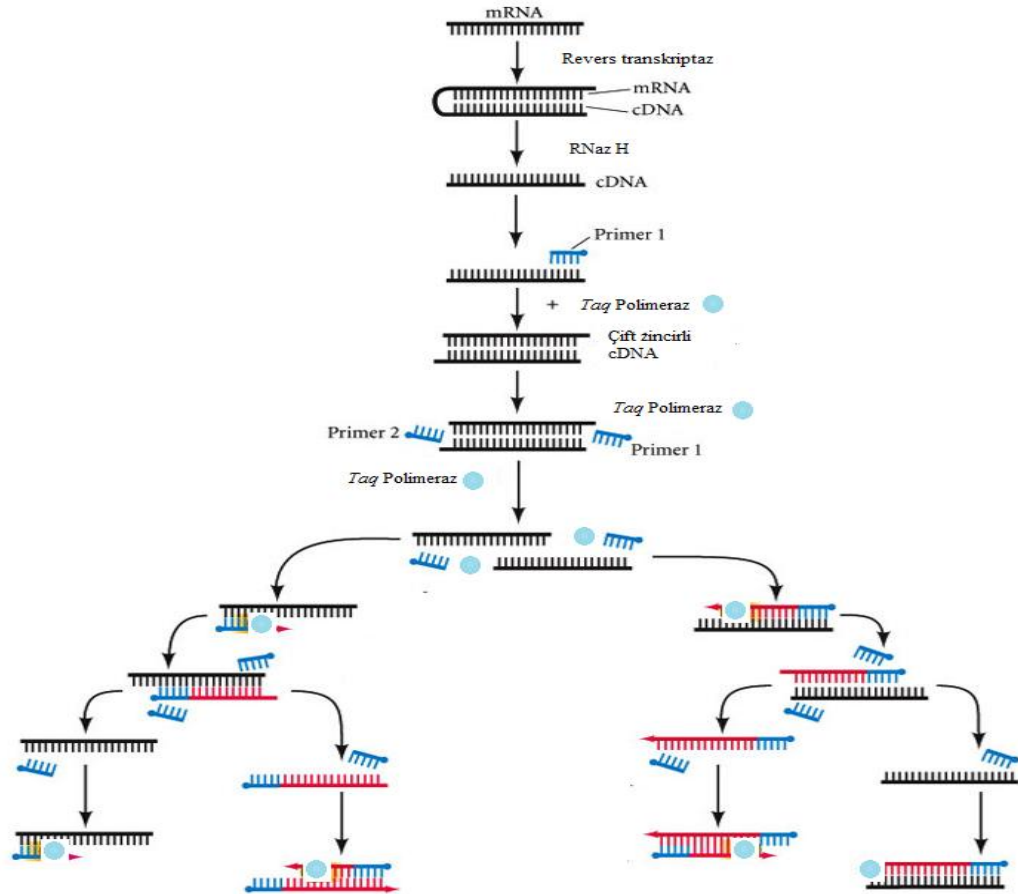
Elde edilen tek zincirli DNA' ya 50-70°C ' de, hedef bölgeye spesifik olacak şekilde dizayn edilmiş oligonükleotid primerlerin bağlanması aşamasıdır. Primerlerin hedef DNA' ya bağlanma süreleri, primerin uzunluğuna, baz içeriğine, derişimine göre değişebilmektedir. Başlangıç sıcaklığı primerlerin erime sıcaklıklarına (T_m) göre belirlenmektedir. Reaksiyon şartları, kalıp DNA' nın yapısı, yanlış eşleşmeler gibi etkenler T_m' yi etkilemektedir. Genellikle T_m sıcaklığının 4-5°C altındaki değerlerde bağlanma sıcaklığı seçilir (Temizkan ve Arda, 2004).

2.4.1.3. Zincir Uzaması (Extension)

Zincir uzaması aşamasında optimum sıcaklık Taq polimerazın maksimum aktivite gösterdiği 72°C olarak belirlenir. Taq polimeraz, Mg⁺² varlığında ortamdaki dNTP' leri primerlere 5'→3' yönünde ekler. Genellikle iki dakika yeterli olurken, uzun DNA parçaları elde edilmek isteniyorsa süre uzatılabilir. Önerilen döngü sayısı 25-35 arasındır. Döngü sayısını artırmak (40 döngüden fazlası) hedeflenen ürün miktarını artırmaz aksine istenmeyen ürün miktarının artmasına sebep olur (Temizkan ve Arda, 2004).

2.5. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Genetik materyalin RNA olduğu durumlarda PCR(PZR) işlemi söz konusu olduğunda ilk olarak RNA' nın DNA' ya çevrilmesi gerekmektedir. Bu sebeple RNA revers transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer (cDNA) DNA' ya çevrilir. Standart PCR(PZR) uygulamalarına bu aşamadan sonra devam edilmektedir. Bu şekilde modifiye edilmiş PCR(PZR), Revers Transkriptaz PCR(PZR) tekniği olarak adlandırılmaktadır. RT-PCR farklı RNA virüslerinin tespitinde kullanılan güvenli bir tekniktir (Rotbart, 1990).



Şekil 2.3. RT-PCR aşamaları (Gilbert, 2013)

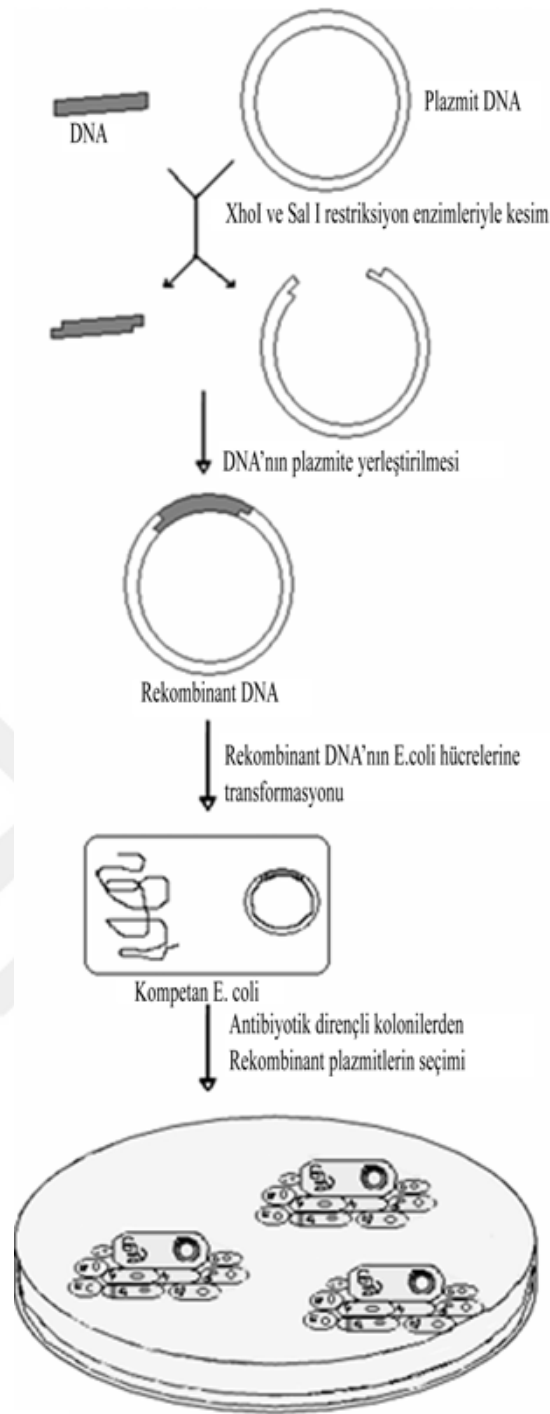
RT-PCR, hızlı, hassas ve güvenilir bir prosedürdür. Bunun yanı sıra cDNA kütüphaneleri oluşturmak için de kullanılmaktadır. Standart RT-PCR prosedürü temelde

iki DNA polimerazın aktivitesine bağılıdır. Bunlardan ilki, RNA kalıbından cDNA sentezleyen revers transkriptaz, diğeri hedef DNA dizisinin çoğaltılmasını sağlayan bir DNA polimerazdır. Revers transkriptaz aktivitesi ile RNA kalıbından cDNA sentezlenirken, polimeraz aktivitesi ile sentezlenen cDNA' dan çift zincirli DNA çoğaltılır (Overbergh. ve ark., 1998).

2.6. Rekombinant DNA Teknolojisi

2.6.1. Gen klonlamanın temel ilkeleri

DNA için taşıyıcı rol oynayan küçük ve dairesel yapıdaki moleküller vektör olarak adlandırılmaktadır. Klonlama işleminin temel mekanizması, organizmanın genomundan elde edilen DNA fragmentinin vektöre entegre edilmesidir. Vektör DNA'sına, organizmaya ait bir DNA fragmentinin entegre edilmesi ile oluşan moleküle rekombinant DNA (rDNA) denir. Oluşturulan rekombinant DNA molekülü bakteri hücrelerine transforme edilir. Ve transforme bakterilerin bölünmesi sonucu rekombinant DNA molekülü replike olur ve klon olarak adlandırılan rekombinant kopyalar meydana gelmektedir. Klonlanmış DNA molekülünün varlığı, transformasyonun gerçekleştirdiği hücrelerden saflaştırılması ile doğrulanmaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008).

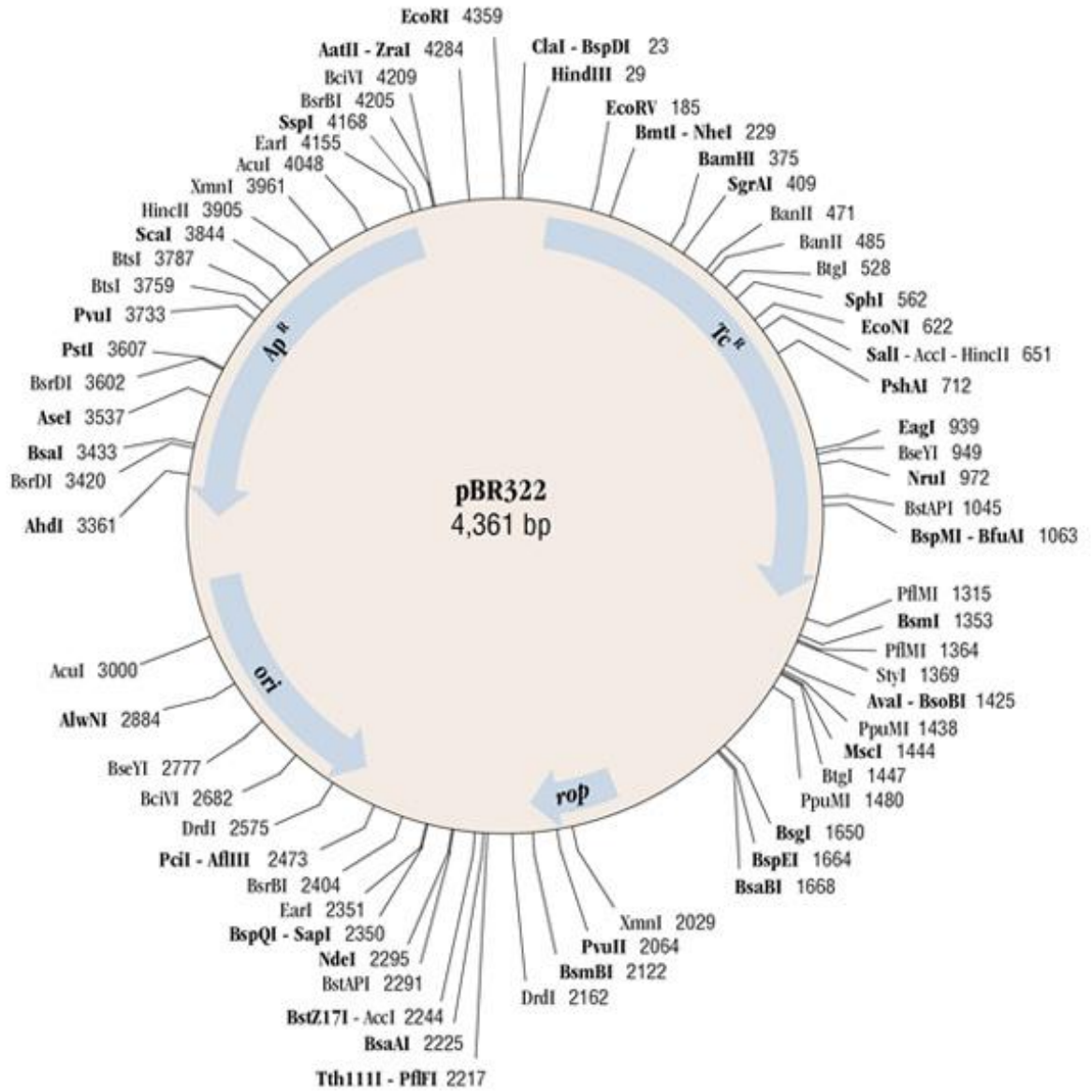


Şekil 2.4. Rekombinant DNA Eldesi(Kuk ve Erensoy, 2008)

2.6.1.1. Klonlamada Kullanılan Vektörler

2.6.1.1.1. Plazmitler

Genetik mühendisliği uygulamalarının temel bileşenlerinden biri plazmit vektörlerdir. Bakteri hücrelerinde çift zincirli DNA şeklinde bulunan plazmitler, birtakım genetik manipülasyonlar uygulanarak biyoteknoloji ve genetik mühendisliği alanlarında kullanılmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi alanında kullanılan ilk plazmit plazmit pBR 322 plazmitidir. pBR 322 plazmiti, ampicilin, tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı direnç genleri içermesinin yanısıra pekçok farklı restriksiyon enzimi için de kesim bölgeleri içermektedir. pUC plazmiti ise pBR 322 plazmitinden geliştirilmiş bir plazmit olup, pBR 322 plazmitinin yarısı büyüklüğündedir. Daha büyük DNA parçalarının klonlanmasına imkan tanımaktadır. pUC plazmiti, pekçok farklı restriksiyon enzimi için kesim bölgeleri (polilinker bölge) içerirler. Bu polilinker bölge, *E.coli* mikroorganizmasının lac Z geni içerisinde bulunmaktadır (Iost, I. ve Dreyfus M., 1995). Polilinker bölge içerisine entegre edilen DNA parçası, lacZ geninin aktivitesini bozmakta ve beyaz kolonilerin oluşmasına neden olmaktadır. Böylelikle rekombinant özellik taşıyan hücrelerin seçilimini kolaylaştıran bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır. Genetik mühendisliği ve klonlama çalışmaları için kullanılan plazmitlerin büyüklüğü 1 kb ile 200 kb arası değişmektedir (Hartley, J.L., 2006). Plazmitler, çoğunlukla süperheliks yapıda, çift zincirli ve daireseldir. Replikasyon mekanizmasının gerçekleşebilmesini sağlayan replikasyon orjinlerine sahiplerdir. Bu şekilde çalışma amacına göre düşük yada yüksek oranda replike olma yeteneğine sahip plazmitler oluşturulabilmektedir (Kuk ve Erensoy, 2008).



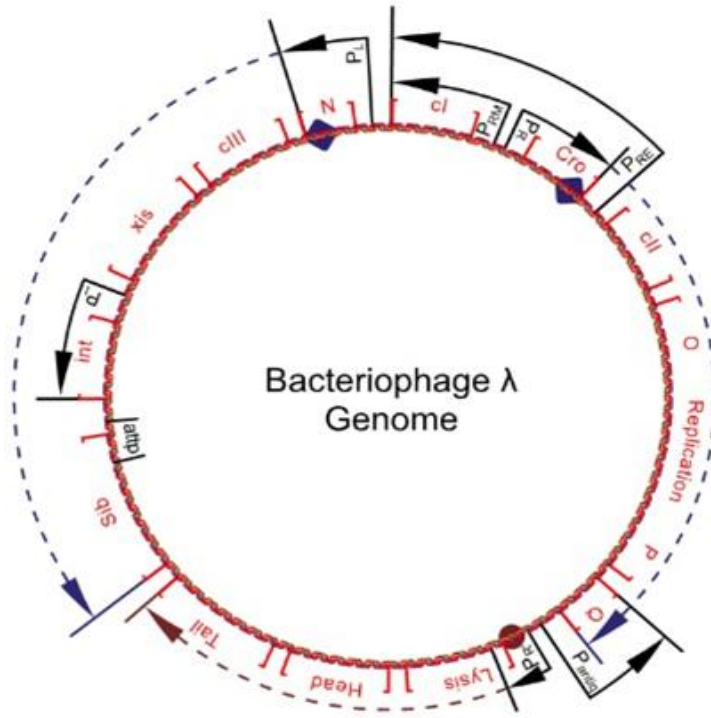
Şekil 2.5. pBR 322 plazmit vektörü dairesel haritası(Bolivar ve ark., 1977)

2.6.1.1.2. Kozmid Vektörler

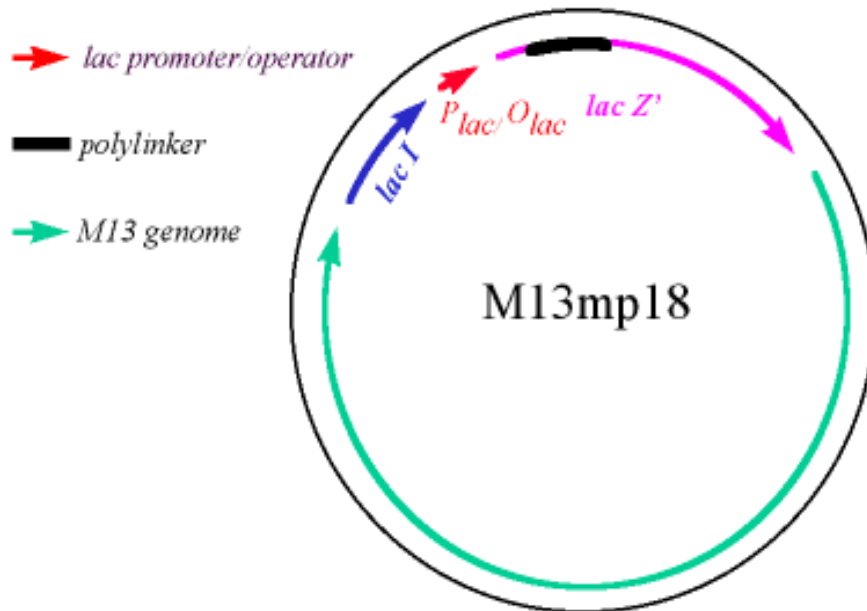
Genetik mühendisliği çalışmaları bünyesinde son olarak çalışılmış ve geliştirilmiş λ -tabanlı vektör sistemidir. Faj DNA'sı ile bakteri plazmitinden oluşmaktadırlar. Kozmidler cos bölgesi içeren plazmitlerdir. Cos bölgesi fajların protein kılıflarına, λ DNA molekülünü paketlemekle görevli enzimlerin işlevselleşmesi açısından önemlidir. Vektörün protein kılıf içerisine paketlenmesi için gereklidir. Kozmideler de plazmitler gibi polilinker bölgeye, antibiyotik dirençlik genine ve replikasyon mekanizması için replikasyon orjinine sahiptirler. Yaklaşık olarak 37-52 kb'lık DNA parçalarını taşıyabilmektedirler (Bardakçı ve ark., 2009).

2.6.1.1.3. Viral Vektörler

Viral vektörler, hücrelere gen aktarımı ve gen ekspresyonunda kullanılmak üzere virüslerin modifiye edilmesi sonucu oluşmuşlardır. Herpes, retro, vaccinia, baculovirus ve adeno gibi DNA ve RNA kökenli virüsler vektör olarak kullanılmış ve kullanılmaktadır. Viral vektörlerden en yaygın kullanılanı lambda fajıdır. Lambda fajı genom büyüklüğü yaklaşık 45 kb olan bir E.coli virüsüdür. 45 kb'lık genomun yaklaşık 15 kb'lık kısmı fajın E.coli genomuna entegre olmasında görevli genleri içermektedir. Bu kısım restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilip çıkarılabilmekte ve yabancı DNA molekülü bir DNA ligaz enzimi aracılığıyla genoma eklenebilmektedir. Faj bu halde iken de bakteriyi enfekte edebilmekte ve bakteri içerisinde çoğalabilmektedir. Lambda genomu doğrusal yapıdadır. İçerdiği cos bölgesi sayesinde halkasal hale gelebilmektedir. Bu özelliği sayesinde plazmit vektörler ile benzer işlemlere tabii tutularak E.coli hücrelerine transfeksiyonları sağlanabilmektedir. Gen klonlama işlemlerinde ve genetik mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere geliştirilen bir diğer viral vektör ise M13 bakteriyofajıdır (Lachmann, R., 2004). Tek zincirli yapıdaki DNA'sı bakteri hücrelerine entegre olduğunda çift zincirli yapı kazanmaktadır. Bu çift zincirli yapıya replikatif form denir ve bu yapının gen klonlama işlemlerinde kullanımı mümkündür. M13 vektörleri, tek zincirli DNA temelli çalışan bir teknik olan Sanger DNA dizileme tekniğinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Viral vektörler 10-15 kb'lık DNA fragmanlarını taşıyabilmektedirler. E.coli plazmitine gama fajından gelen cos dizisi eklenmesi ile oluşturulmaktadırlar (Vannucci ve ark., 2013).



Şekil 2.6. Bakteriyofaj lambda genomu ve dairesel yapısı

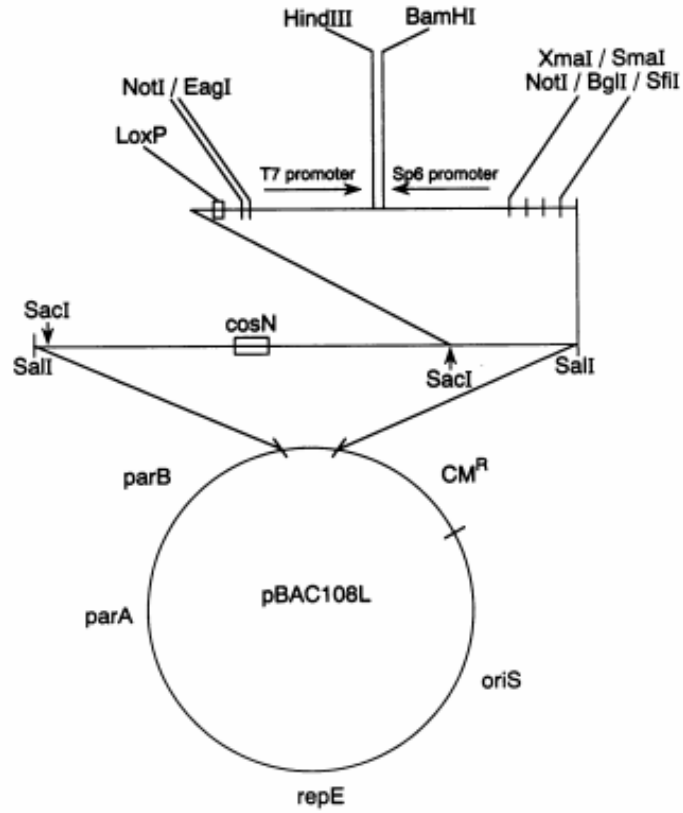


Şekil 2.7. M13 vektörü dairesel yapısı

2.6.1.1.4. BAC Vektörleri

Plazmit ve viral vektörlerin nispeten daha küçük DNA taşıma kapasitesine sahip olmaları sebebiyle geliştirilmişlerdir. Ökaryotik DNA' ların analizlerinde daha büyük DNA parçalarının klonlanıp taşınabileceği yapıdaki vektörlerdir. Yaklaşık 100-300 kb' lık DNA parçalarını taşıyabilmektedirler. Plazmit vektörler ile aynı teknikler uygulanarak oluşturulmaktadır. Ancak bakterilere normal yollarla transforme edilemeyecek büyüklükte olmalarından dolayı bakteri hücrelerine aktarımları elektroporasyon yöntemi ile mümkün olmaktadır. Vektör hücre içine entegrasyonu, bakteri hücre zarına uygulanan yüksek elektrik akımı sonucu zar porlarının geçirgenliğinin artırılması ile gerçekleşmektedir. Düşük kopya sayısına sahiplerdir. Bu nedenle bakteri hücrelerinden izole edildiklerinde elde edilen plazmit miktarı düşük olmaktadır (Bardakçı ve ark, 2010).

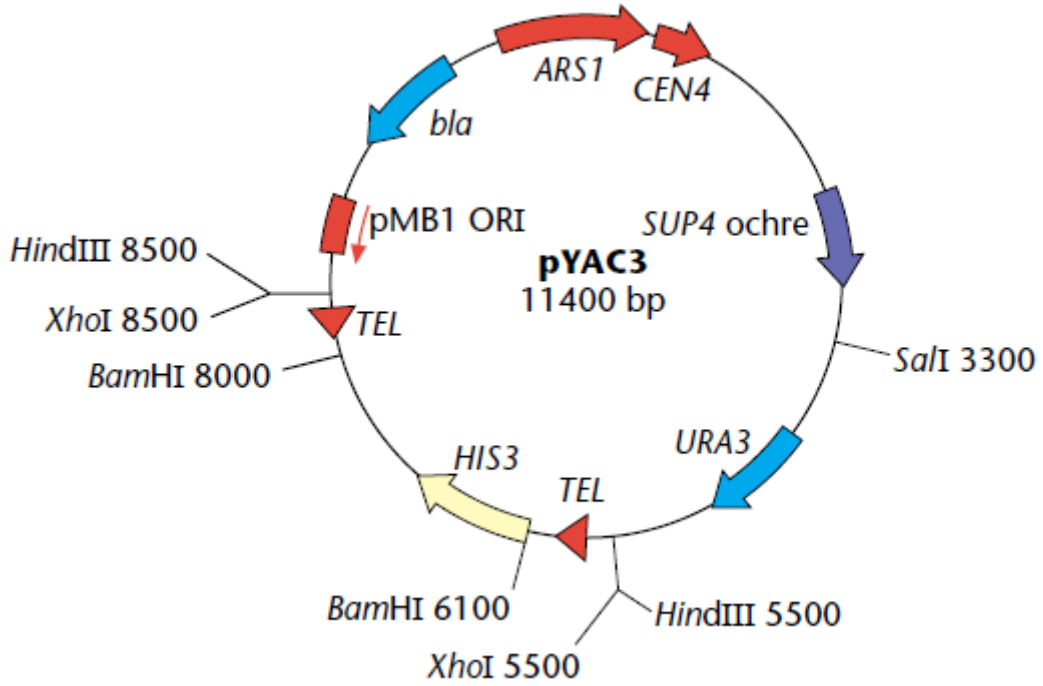
BAC' lar *E.coli* F plazmitinin türevleridir. BAC vektörleri için, tipik konakçı hücre doğal formundan farklı olarak restriksiyon ve çeşitli modifikasyon sistemlerinden yoksun olan *E. coli* hücreleridir. Bu *E.coli* mutantları BAC vektörlerini zarar görmekten korumaktadır. Tipik konakçı hücre bazı rekombinasyon yollarına sahip olmayabilir. Mevcut bu durum, klonlanan DNA' nın BAC vektörlerinden konakçı hücre kromozomuna rekombinasyonuna ve bununla birlikte yeniden düzenlenmesine engel olmaktadır (Madigan ve Martinko, 2012).



Şekil 2.8. BAC vektörü dairesel haritası (Shizuya ve ark., 1992)

2.6.1.1.5. YAC Vektörleri

Büyük boyuttaki DNA fragmanlarını klonlama işlemlerinde sıklıkla tercih edilmektedirler. Kromozom temelli olarak hazırlanmaktadır. Ökaryotik kromozomlar, hücre döngülerinin S evresinde sentromer, telomer ve replikasyon bölgelerinin birlikte aktivitesi ile replike olmaktadır. Bir YAC vektörünün fonksiyonel olabilmesi için de telomer, sentromer ve replikasyon bölgesine sahip olması gerekmektedir. Rekombinant DNA' nın entegre olabileceği kesim bölgesi ve yine rekombinant DNA' yı içeren hücrelerin seçilimini sağlayacak seçici genlere sahip olmaları gerekmektedir. Maya hücrelerine transformasyon verimi düşük olmaktadır. YAC vektörlerine entegre edilen DNA replikasyon basamağında yeniden düzenlenebilmekte ve yeni kombinasyonlar oluşabilmektedir. Bu gibi dezavantajları bulunmasına rağmen YAC vektörleri, büyük boyuttaki DNA fragmanlarını taşıyabilme kapasiteleri sayesinde genom projelerinde, haritalama işlemlerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Green, E.D., Riethman, H.C., Dutchik, J.E., Olson, M.V.,



Şekil 2.9. pYAC3 vektörü dairesel haritası (Bruschi ve ark., 2002)

2.6.2. Hedef genin seçilmesi

Klonlama ve genetik mühendisliği çalışmalarındaki en önemli basamaklardan biri, hedef genin seçilmesidir. Bir genin yapısal özelliklerinin araştırılması, DNA ve protein aşısı çalışmalarında kullanılabilmesi için klonlanması aşamasında önem arz etmektedir. Üretilen rekombinant proteinlerin kendilerine spesifik hastalıkların tanısında kullanılabilmesini sağlaması, klonlama işleminde gen seçimi aşamasında dikkat edilmesi gereken durumlardandır (Kuk ve Erensoy, 2008).

2.6.3. Restriksiyon enzimleri ve DNA'nın kesilmesi

Rekombinant DNA teknolojisi ve genetik klonlama işlemlerinin gelişmesinde ve ilerlemesindeki en önemli adımlardan birisi de restriksiyon enzimlerinin keşfedilmesi ve özelliklerinin detaylı bir şekilde ortaya çıkarılmasıdır. Restriksiyon enzimleri, fajlara karşı savunma mekanizması olarak kullanılmak üzere bakteriler tarafından sentezlenmektedir. DNA'yı spesifik bölgelerden kesen restriksiyon enzimleri elde

edildikleri bakteriler hücrelerine göre adlandırılmaktadırlar. DNA'yı spesifik bölgelerden kesen bu enzimler DNA manipölasyonlarını gerçekleştirmede kritik rol oynamaktadırlar. Birtakım restriksiyon enzimleri, yapışkan uçlar oluştururken bazıları ise küt uçlu DNA dizileri oluşturmaktadırlar (Kuk ve Erensoy, 2008).

Çizelge 2.5. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları (Kuk ve Erensoy, 2008).

Enzimin adı	İzole edildiği mikroorganizma	Oluşturduğu uç	Tanıma dizisi
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens	Yapışkan uç	5'-G [^] GATCC-3' 3'-C CTAG [^] G-5'
EcoRI	Escherichia coli	Yapışkan uç	5'-G [^] AATTC-3' 3'-C TTAA [^] G-5'
KpnI	Klebsiella pneumoniae	Yapışkan uç	5'-GGTAC [^] C-3' 3'-C [^] CATGG-5'
Sal I	Streptomyces albus	Yapışkan uç	5'-G [^] TCGAC-3' 3'-C AGCT [^] G-5'
XhoI	Xanthomonas holcicola	Yapışkan uç	5'-C [^] TCGAG-3' 3'-G AGCT [^] C-5'
AluI	Artrobacter luteus	Küt uç	5'-AG [^] CT-3' 3'-TC [^] GA-5'
SmaI	Serratia marcessens	Küt uç	5'-CCC [^] GGG-3' 3'-GGG [^] CCC-5'

2.6.4. DNA'nın plazmite yerleştirilmesi

Klasik yöntemlerle gen klonlama işlemlerinde, DNA'nın plazmit vektöre yerleştirilmeden önce, restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiş genin ve plazmit DNA' sının agaroz jelden saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırılmış hedef gen ve plazmit vektör, T4 DNA ligaz enzimi varlığında reaksiyon koşulları altında birleştirilir (Kuk ve Erensoy, 2008).

2.6.5. Rekombinant DNA'nın çoğaltılması

Genin plazmit vektöre entegre edilmesi ile elde edilen rekombinant DNA'nın çoğaltılması gerekmektedir. Çoğaltım işlemi rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine aktarılması (transformasyon) ile sağlanmaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008).

2.6.6. Klonlanan vektörün hücrelerden seçimi

Klonlama sonrası rekombinant plazmitlerin seçimi karşılaşılan problemlerden biridir. Transformasyon sonrası oluşan onlarca plazmitten yabancı DNA' yı içeren plazmiti seçmek için antibiyotik dirençlilik genlerinden faydalanılmaktadır. Antibiyotik direnç geni içeren plazmitler bu özellikleri sayesinde seçici besiyeri ortamlarında kolaylıkla ayırtedilebilmektedirler (Kaplan ve ark., 2002).

2.6.7. Klonlamanın Doğrulanması

Klonlamanın doğruluğunun tespiti birkaç farklı metod ile yapılabilir. Bunlardan ilki PCR(PZR) analizidir. Kolonilerden elde edilen PCR(PZR) ürünlerinin, agaroz jel elektroforezinde analizi sonucu plazmitin yabancı DNA' yı içerip içermediği tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte doğrulama restriksiyon enzim kesimi ile de rekombinant plazmitlerin doğrulanması yapılmaktadır. Güvenilirliği artırmak amacı ile DNA dizi analizi çalışmalarına ilerleyen aşamalarda ihtiyaç duyulmaktadır (Sambrook ve ark., 1989)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve marka bilgileri

Kullanılan Cihaz	Markası
MD ₅₀₀ mikrodalga fırın	ARÇELİK
DNA Engine, PCR(PZR) makinesi	BIORAD
Güç kaynağı	BIORAD
Bio TDB100 Termostatlı Blok Isıtıcı	BIOSAN
Spin Cihaz	BIOSAN
Çalkalamalı İnkübatör	BIOSAN ES 20
Mikro 22R santrifüj	HETTICH
80 dondurucu	HETTICH
50L otoklav	HMC HIRAYAMA
UV/VIS Spektrofotometre	VARİAN CARRY 50
Etüv	MEMMERT
Sonikatör	SONICS (VCX130)
UV Okuyucu	SYNGENE SYTC/1422
Dikey Soğutucu +4°C	UĞUR
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA ARE
Buzdolabı	VESTEL GTP 455A
Yüksek Hızlı Santrifüj	VISION VS 30 000i
Buz makinesi	VISION
Çalkalamalı İnkübatör	ZHICHENG - ZHWY111C

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve marka bilgileri

Kullanılan Kimyasal	Markası
Agar	BD Bacto™ Agar
Agaroz	Bioron
Akrilamid	Amresco
Ampisilin	Sigma Aldrich
APS	Biorad
BamHI	Takara
Beta Merkaptotanol	Carlo Erba
Bezamidin	Merck
BSA	Promega
CaCl ₂ .2H ₂ O	Carlo Erba
DMSO	Merck
Etanol	Merck
Etidyum bromür	ICN
Gliserol	Euromedex
HCl	Merck
IPTG	Amresco
Jelden DNA izolasyon kiti	Bio Basic
KCH ₃ COO	Merck
KCl	Sigma
Kloramfenikol	Sigma
KpnI	Takara
LB Broth Base	Invitrogen

Çizelge 3.2. (Devam) Kullanılan kimyasallar ve marka bilgileri

Kullanılan Kimyasal	Markası
NcoI	Takara
Plazmit DNA saflaştırma kiti	Bio Basic
PMSF	Sigma Aldrich
SDS	Serva
T ₄ DNA ligaz	Takara
TEMED	Biorad
Trypton	BD Bacto™
Tris	Sigma Aldrich
Triton X 100	Takara
XhoI	Takara

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

PMSF çözeltisi: 150 µg PMSF 1 ml mutlak etanolde çözülerek hazırlandı.

Kloramfenikol Çözeltisi: Kloramfenikol son konsantrasyon değeri 34 mg/ml ' ye ayarlanarak ve mutlak etanol ile çözülmüştür. 0.2 µm'lik filtre ile sterilize edilmiştir.

FSB çözeltisi: 7.4 g KCl, 100 g gliserol, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 10 ml 1 M (pH:7.5) KCH₃COO belirtilen miktarlarda eklenmiş ve pH:6.5 değerine ayarlanarak, son hacim 1 000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavlanarak saklanmıştır.

Ampisilin: 1.5 gram ampisilin 15 ml saf suda çözülmüştür. Steril 0.2 µm'lik ile sterilize edilip mikrotüplere bölünmüş ve -20 °C' de saklanmıştır.

IPTG: 1.5 gram IPTG, 15 ml steril su ile çözülmüş ve steril 0.2 µm'lik ile sterilize edilip mikrotüplere bölünmüş ve -20 °C'ye kaldırılmıştır.

LB çözeltisi: 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1 000 ml suda çözülmüştür. 1 000 ml'lik çözeltiden 250'şer ml' lik stoklar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok şişelere 3.75 g agar eklenip karıştırılmış ve otoklavlanmıştır.

Agaroz Elektroforez Jeli: 1.5 gram agaroz üzerine 150 ml 1 X TAE tamponu eklenmiş ve homojen bir görüntü elde edilene kadar mikrodalga fırında eritilmiştir. Üzerine 1.5 µl etidyum bromür eklenmiş ve elektroforez kasetine dökülmüştür.

Diyaliz çözeltisi: 10 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH:7.5 olacak şekilde 3 litre distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

SDS Elektroforez Jeli Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Alt Tampon: 4 g SDS (%0.4) ve 182 g Tris (1.5 M) 1 000 ml saf suda çözülmüştür. pH:8.8 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Üst Tampon: 4 g SDS (%0.4) ve 60.5 g Tris (1.5 M) 1 000 ml saf suda çözülmüştür. pH:6.6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Yükleme jeli: 1 ml üst tampon, 2.55 ml su, 0.35 ml %40 akrilamid, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED' den oluşmaktadır. Tüm kimyasallar eklendikten sonra son olarak APS ve TEMED eklendi ve kasete dökülmüş ve yürütme jeli polimerleşene kadar beklenmiştir. Üzerine yükleme jeli dökülmüş ve polimerleşene kadar beklenmiştir.

Elektroforez Tamponu (1X): 14.4 g Glisin, 1 g SDS ve 3 g Tris bileşikleri 1 000 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yükleme Tamponu (5X): 5 ml gliserol (%50), 0.6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.5 ml β-ME (β- Merkaptotanol), 2 ml %10'luk SDS, 1 000 µl %1'lik Bromfenol mavisi ve 0.9 ml saf su karışımı ile hazırlanmıştır.

SDS Jel boyama (Staining) Çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası, 450 ml metanolde çözülmüştür Çözelti filtre kâğıdı ile filtre edildikten sonra, üzerine 450 ml saf su ve 100 ml asetik asit eklenmiştir.

Destaining Çözeltisi: 100 ml asetik asit, 100 ml metanol ve 800 ml saf su ile hazırlanmıştır.

Amonyum Persülfat (APS-%10): 0.5 g APS tartılmış ve 5 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

Afinite Kromatografisiyle Saflaştırmada Kullanılan Cözeltiler:

NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu: 65 ml, 0.2 M NaH₂PO₄ ve 0.2 M, 435 ml Na₂HPO₄ karıştırılarak pH:8.0'a ayarlanmış ve toplam hacim saf su eklenerek 1 000 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (Loading Buffer) 2.92 g NaCl, 500 ml NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄ tamponu içerisinde (pH:8.0) cözölmüştür.

Yıkama tamponu (Wash Buffer): (25 mM imidazol, 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, pH:8): 0.85 g imidazol, 2.92 g NaCl, 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH:8.0) tamponu içerisinde cözölmüştür.

Elüsyon tamponu (Elution Buffer): (300 mM imidazol, 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH:8.0): 10.2 g imidazol, 2.92 g NaCl, 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu içerisinde (pH:8.0) cözölmüştür.

Tris Tamponu: 12.12 g tris bir miktar su ile cözölmüş ve pH değeri derişik HCl eklenerek 7.5'e ayarlanmıştır. 2.92 g NaCl eklenmiş ve son hacim 1 000 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

300mM imidazol Tris/HCl Tamponu: 2.04 g imidazol, 100 ml Tris/HCl tamponu içinde cözölmüş ve pH değeri, derişik HCl ilavesi ile 7.5'e ayarlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tth Polimeraz Proteinini Kodlayan Genin Tasarımı

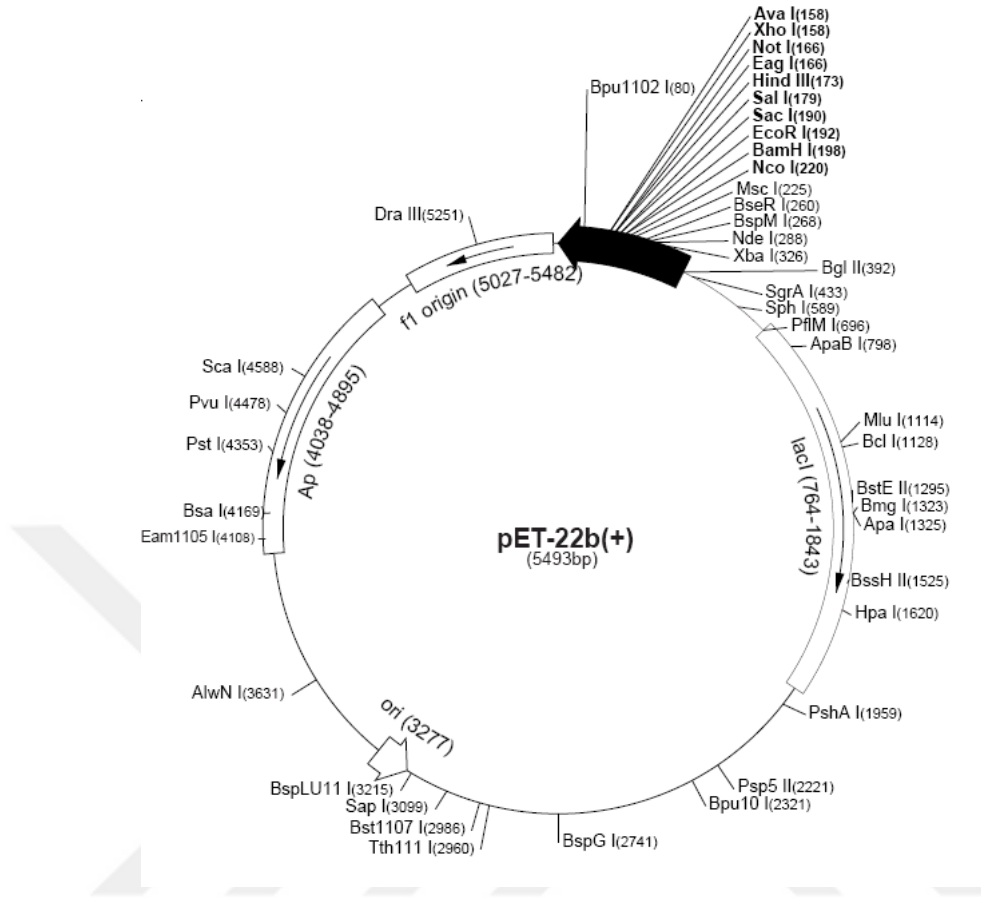
Tth polimeraz enziminin sentezi için gerekli olan DNA dizisi NCBI (National Center for Biotechnology Information) ' dan elde edilmiştir (Aksesyon numarası:BAM64800.1) Klonlama işlemi için pET22b ve pTOLT plazmit vektörleri kullanılmıştır. NCBI' dan alınan diziye *E. coli* K12 organizması için biyoinformatik araçlar yardımı ile kodon optimizasyonu uygulanmıştır. Kodon optimizasyonu için jCat uygulaması kullanılmıştır (<http://www.jcat.de/>). Gen dizisi Biomatic firması tarafından sentezlenmiştir.

NCBI' dan alınan gen dizisi

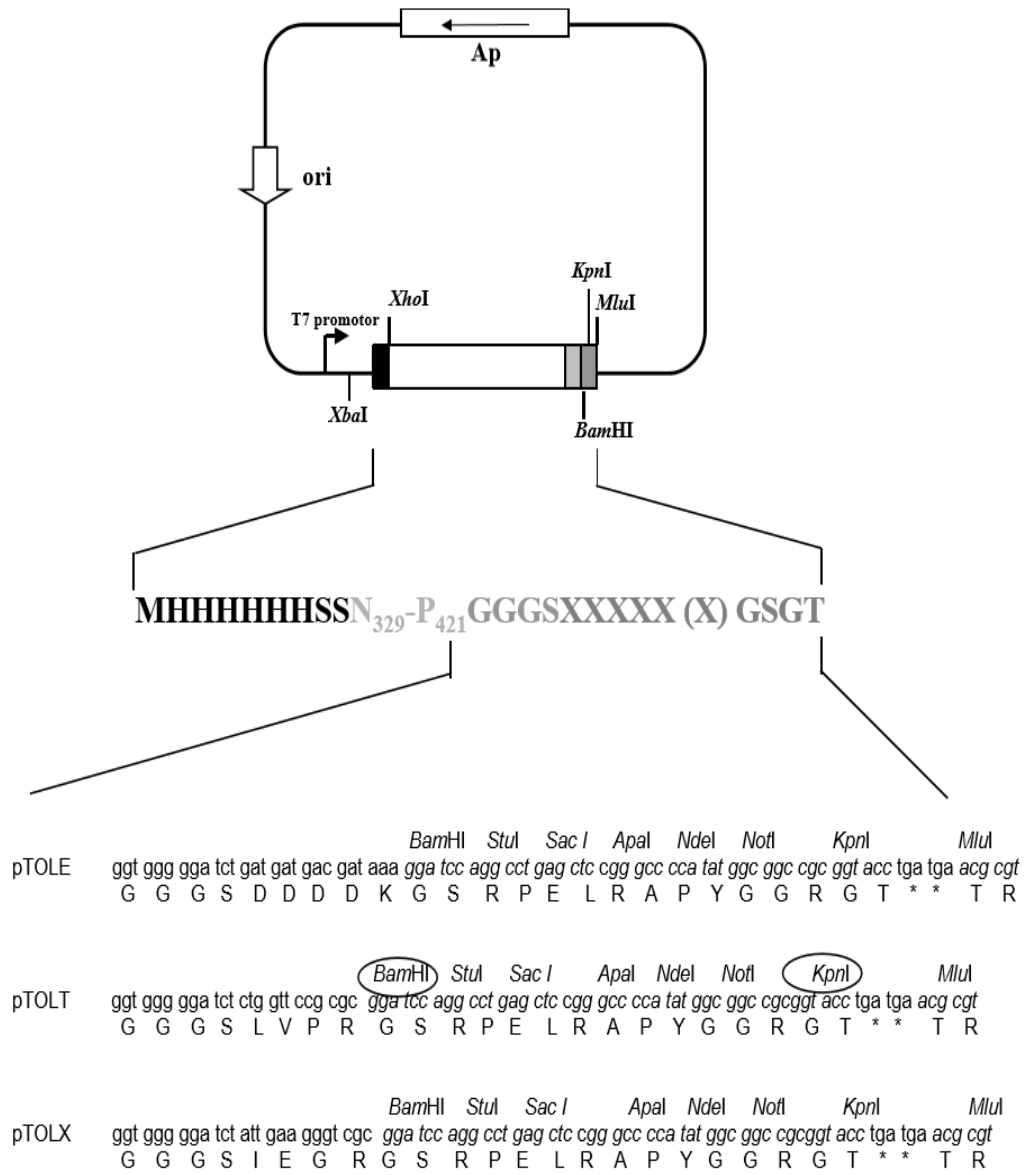
ATGGAGGCGATGCTTCCGCTCTTTGAACCCAAAGGCCGGGTCTCCTGGTGGACGGCCACCACCTGGCCT
ACCGCACCTTCTTCGCCCTGAAGGGCCTCTCCACGAGCCGGGGCGAACCGGTGCAGGCGGTCTACGGCTT
CGCCAAGAGCCTCCTCAAGGCCCTGAAGGAGGACGGGTACAAGGCCGTCTTCGTGGTCTTTGACGCCAAG
GCCCCCTCCTTCCGCCACGAGGCCTACGAGGCCTACAAGGCGGGGAGGGCCCCGACCCCCGAGGACTTCC
CCCCGCGAGCTCGCCCTCATCAAGGAGCTGGTGGACCTCCTGGGGTTTACCCGCCTCGAGGTCCCCGGCTA
CGAGGCGGACGACGTCTCGCCACCCTGGCCAAGAAGGCGGAAAAAGAAGGGTACGAGGTGCGCATCCTC
ACCGCCGACCGGGACCTCTACCAGCTCGTCTCCGACCGCGTCGCCGTCTCCACCCCCGAGGGCCACCTCA
TCACCCCCGAGTGGCTTTGGGAGAAGTACGGCCTCAGGCCGGAGCAGTGGGTGGACTTCCGCGCCCTCGT
GGGGGACCCCTCCGACAACCTCCCCGGGGTCAAGGGCATCGGGGAGAAGACCGCCCTCAAGCTCCTCAAG
GAGTGGGGAAGTCTGGAAAACCTCCTCAAGAACCTGGACCGGTGAAGCCGGAACCTCCGGGAGAAGA
TCAAGGCCACCTGGAAGACCTGAGGCTCTCCTTGGAGCTCTCCCGGGTGCACCGACCTCCCCCTGGA
GGTGGACCTCGCCAGGGGCGGGAGCCCGACCGGGAGGGGCTTAGGGCCTTCTGGAGAGGCTGGAGTTC
GGCAGCCTCCTCCACGAGTTCGGCCTCCTGGAGGCCCGCCCCCTGGAGGAGGCCCCCTGGCCCCCGC
CGGAAGGGGCTTCGTGGGCTTCGTCTCTCCCGCCCCGAGCCCATGTGGGCGGAGCTTAAAGCCCTGGC
CGCTTGCAGGGACGGCCGGGTGCACCGGCAGCAGACCCCTTGGCGGGGCTAAAGGACCTCAAGGAGGT
CGGGGCTCCTCGCCAAGGACCTCGCCGTCTTGGCCTCGAGGGAGGGGCTAGACCTCGTGCCCGGGGACG
ACCCATGCTCCTCGCCTACCTCCTGGACCCCTCCAACACCACCCCGAGGGGGTGGCGCGGCGCTACGG
GGGGAGTGGACGGAGGACGCCGCCACCGGCCCTCCTCTCGGAGAGGCTCCATCAGAACCTCCTTAAG
CGCTTCCAGGGGAGGAGAAGCTCCTTTGGCTCTACCACGAGGTGGAAGGCCCTTCTCCCGGGTCTGG
CCCACATGGAGGCCACCGGGGTACAGCTGGACGTGGCCTACCTTCAGGCCCTTTCCCTGGAGCTTGCGGA
GGAGATCCGCCGCTCGAGGAGGAGGTCTTCCGCTTGGCGGGCCACCCCTTCAACCTCAACTCCCGGGAC
CAGCTGGAAAGGTGCTCTTTGACGAGCTTAAGCTTCCCGCCTTGGGGAAGACGCAAAAGACGGGCAAGC
GCTCCACCAGCGCCGCGGTGCTGGAGGCCCTACGGGAGGCCACCCCATCGTGGAGAAGATCCTCCAGCA
CCGGGAGCTACCAAGCTCAAGAACACCTACGTGGACCCCTCCCAAGCCTCGTCCACCCGAGGACGGGC
CGCTTCCACACCCGCTTCAACCAGACGGCCACGGCCACGGGGAGGCTTAGTAGCTCCGACCCCAACCTGC
AGAACATCCCCGTCCGACCCCTTGGGCCAGAGGATCCGCCGGGCCTTCGTGGCCGAGGCGGGATGGGC
GTTGGTGGCCCTGGACTATAGCCAGATAGAGCTCCGCGTCTCGCCACCTCTCCGGGGACGAAAACCTG
ATCAGGTCTTCCAGGAGGGGAAGGACATCCACACCAGACCGCAAGCTGGATGTTCCGGCTCCCCCGG
AGGCTGTGGACCCCTGATGCGCCGGGCGGCCAAGACGGTGAACCTTCGGCGTCTCTACGGCATGTCCGC
CCACCGGCTCTCCAGGAGCTCTCCATCCCCTACGAGGAGGCCTCGGCCTTTATTGAGCGCTACTTCCAA
AGCTTCCCCAAGGTGCGGGCTGGATAGAAAAGACCCTGGAGGAGGGGAGGAAGCGGGGCTACGTGGAAA
CCCTCTTCGGAAGAAGGCGCTACGTGCCCCGACCTCAACGCCCCGAGTGAAGAGCGTCAGGGAGGCCGCGGA
GCGCATGGCCTTCAACATGCCCCGTCCAGGGCACCGCCGCCGACCTCATGAAGCTCGCCATGGTGAAGCTC
TTCCCCCGCTCCGGGAGATGGGGGCGCATGCTCCTCCAGGTCCACGACGAGCTCGTTCTGGAGGCGC
CCAAAGACCGGGCCAGGAGGTGGCCGCTTGGCCAAGGAGGTGATGGAAGGGGTCTACCCCTCGCCGT
CCCCCTGGAGGTGGAGGTGGGGATCGGGGAGGACTGGCTTTCGCCAAGGGTTAG

E. coli K12 organizması için kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş gen dizisi

CCATGGGAGGATCCGAGCTCATGGAAGCTATGCTGCCGCTGTTCTGAACCGAAAGGTCGTGTTCTGCTGGT
TGACGGTCACCACCTGGCTTACCGTACCTTCTTCGCTCTGAAAGGTCTGACCACCTCTCGTGGTGAACCG
GTTTACGGCTGTTTACGGTTTCGCTAAATCTCTGCTGAAAGCTCTGAAAGAAGACGGTTACAAAGCTGTTT
TCGTTGTTTTTCGACGCTAAAGCTCCGTCTTCCGTCACGAAGCTTACGAAGCTTACAAAGCTGGTCTGTC
TCCGACCCCGGAAGACTTCCCGCGTCAGCTGGCTCTGATCAAAGAACTGGTTGACCTGCTGGGTTTCACC
CGTCTGGAAGTTCCGGGTACGAAGCTGACGACGTTCTGGCTACCCTGGCTAAAAAGCTGAAAAAGAAG
GTTACGAAGTTCGTATCCTGACCGCTGACCGTGACCTGTACCAGCTGGTTTCTGACCGTGTTGCTGTTCT
GCACCCGGAAGGTCACCTGATCACC CGGAATGGCTGTGGGAAAAATACGGTCTGCGTCCGGAACAGTGG
GTTGACTTCCGTGCTCTGGTTGGTGACCCGCTCTGACAACCTGCCGGGTGTTAAAGGTATCGGTGAAAAA
CCGCTCTGAAACTGCTGAAAGAATGGGGTTCTCTGGAAAACCTGCTGAAAAACCTGGACCGTGTTAAACC
GGAAAACGTTTCGTGAAAAAATCAAAGCTCACCTGGAAGACCTGCGTCTGTCTCTGGAAGTGTCTCGTGTT
CGTACCGACCTGCCGCTGGAAGTTGACCTGGCTCAGGGTCGTGAACCGGACCGTGAAGGTCTGCGTGCTT
TCCTGGAACGCTCTGGAATTCGGTTCTCTGCTGCACGAATTCGGTCTGCTGGAAGCTCCGGCTCCGCTGGA
AGAAGCTCCGTGGCCGCCGCCGGAAGGTGCTTTCGTTGGTTTCGTTCTGTCTCGTCCGGAACCGATGTGG
GCTGAACTGAAAGCTCTGGCTGCTTGCCGTGACGGTCGTGTTACCGTGCTGCTGACCCGCTGGCTGGTC
TGAAAGACCTGAAAGAAGTTCGTGGTCTGCTGGCTAAAGACCTGGCTGTTCTGGCTTCTCGTGAAGGTCT
GGACCTGGTTCCGGGTGACGACCCGATGCTGCTGGCTTACCTGCTGGACCCGCTCTAACACCACCCCGGAA
GGTGTTGCTCGTCGTTACGGTGGTGAATGGACCGAAGACGCTGCTCACCGTGCTCTGCTGTCTGAACGTC
TGCACCGTAACCTGCTGAAACGCTCTGGAAGGTGAAGAAAACTGCTGTGGCTGTACCACGAAGTTGAAAA
ACCGCTGTCTCGTGTTCTGGCTCACATGGAAGCTACCGGTGTTTCGTGCTGACGTTGCTTACCTGCAGGCT
CTGTCTCTGGAAGTGGCTGAAGAAATCCGTGCTCTGGAAGAAGAAGTTTTCCGTCTGGCTGGTCAACCGT
TCAACCTGAACTCTCGTGACCAGCTGGAACGTGTTCTGTTTCGACGAAGTGCCTGCTGCCGGCTCTGGGTAA
AACCAGAAAACCGGTAAACGTTCTACCTCTGCTGCTGTTCTGGAAGCTCTGCGTGAAGCTCAACCGATC
GTTGAAAAAATCCTGCAGCACCGTGAAGTACCAAACTGAAAAACACCTACGTTGACCCGCTGCCGCTCTC
TGGTTACCCGCGTACCGGTGCTCTGCACACCCGTTTCAACCAGACCGCTACCGCTACCGGTGCTCTGTC
TTCTTCTGACCCGAACCTGCAGAACATCCCGGTTTCGTACCCGCTGGGTGACGCTATCCGTGCTGCTTTC
GTTGCTGAAGCTGGTTGGGCTCTGGTTGCTCTGGACTACTCTCAGATCGAACTGCGTGTTCTGGCTCACC
TGTCTGGTGACGAAAACCTGATCCGTGTTTTCCAGGAAGGTAAAGACATCCACACCCAGACCGCTTCTTG
GATGTTCCGTGTTCCGCCGGAAGCTGTTGACCCGCTGATGCGTCTGCTGCTAAAACCGTTAACTTCGGT
GTTCTGTACGGTATGTCTGCTCACCGTCTGTCTCAGGAAGTGGCTATCCCGTACGAAGAAGCTGTTGCTT
TCATCGAACGTTACTTCCAGTCTTTCCCGAAAGTTCGTGCTTGGATCGAAAAAACCTGGAAGAAGGTGCG
TAAACGTGGTTACGTTGAAACCCTGTTTCGGTCTGCTGCTGTTACGTTCCGGACCTGAACGCTCGTGTTAAA
TCTGTTTCGTGAAGCTGCTGAACGTATGGCTTTCAACATGCCGGTTCAGGGTACGGCTGCTGACCTGATGA
AACTGGCTATGGTTAAACTGTTCCCGCGTCTGCGTGAAATGGGTGCTCGTATGCTGCTGCAGGTTACGA
CGAAGTCTGCTGGAAGCTCCGCAGGCTCGTGCTGAAGAAGTTGCTGCTCTGGCTAAAGAAGCTATGGAA
AAAGCTTACCCGCTGGCTGTTCCGCTGGAAGTTGAAGTTGGTATGGGTGAAGACTGGCTGTCTGCTAAAG
GTCTCGACGGTACC



Şekil 3.1. pET22b(+) vektör haritası, polilinker bölgenin restriksiyon enzim kesim bölgelerini içeren detaylandırılmış DNA dizisi (Novagen, 2016).



Şekil 3.2. pTOL plazmit vektörü ve poli-linker bölgesinin detaylandırılmış restriksiyon enzimlerinin DNA dizisi (Anderluh ve ark., 2003).

3.2.2. Tth Polimeraz Enziminin Vektörlere Klonlanması

Öncelikle sentezlenen Tth polimeraz genini taşıyan plazmitin çoğaltılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Geni taşıyan plazmit E. coli DH5 α hücrelerine ısı şoku uygulanarak transforme edilmiştir. Transforme haldeki E. coli hücreleri LB katı besiyerinde 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece sonunda büyüyen hücrelerden 4 ml’lik LB sıvı besiyerlerine inoküle edilmiş ve 37°C’de bir gece büyütülmüştür (Sambrook ve ark., 1989). Büyüyen kültürlerden Biobasic Plazmit DNA saflaştırma kiti kullanılarak plazmit DNA saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Restriksiyon Enzimleri İle Kesim

Çizelge 3.3. pTOLT vektör sistemi kesim reaksiyonu bileşenleri

Tth Geni Kesim Reaksiyonu	pTOLT Vektörü Kesim Reaksiyonu
28 μ l pET22bTth plazmit DNA	20 μ l pTOLT plazmit DNA 80 ng/ μ l
4 μ l Multicore (Promega)	3 μ l Multicore (Promega)
4 μ l BSA (10 mg/ml)	3 μ l BSA (10 mg/ml)
2 μ l BamHI (15 U/ μ l)	2 μ l BamHI (15 U/ μ l)
2 μ l KpnI (10 U/ μ l)	2 μ l KpnI (10 U/ μ l)

Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu Çizelge 3.3’ de gösterildiği gibi hazırlanmış ve deney tüpleri birkaç saniye santrifüj edilerek 37°C’de Dört saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Deney tüpleri 45 dakikada bir spin yapılmıştır. Dört saat sonunda kesim reaksiyonu ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülmüş ve jelden kesilmiştir. “Biobasic Gel and PCR(PZR) Clean-Up” saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma kiti prosedürü aşağıda verilmiştir:

- ❖ Jel üzerine ağırlığının üç katı kadar “Cleanup Solution” eklenmiş ve 60 °C 10 dk ısıtılarak jel eritilmiştir.
- ❖ Karışım sonrasında EZ-10 Spin kolona aktarılmıştır. 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)’de santrifüj uygulanmıştır.

- ❖ Kolonun altında toplanan sıvı atılmış ve kolona 750 µl “Wash Solution” eklenmiştir. 2 dk 10 000 rpm (8 000xg) değerinde santrifüj uygulanmıştır. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- ❖ Kolona sonrasında 750 µl “Wash Solution” tatbik edilmiştir. 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)‘de santrifüj uygulanmıştır. Alttaki sıvı atılmıştır.
- ❖ Kolon 1.5 ml yeni bir Eppendorf tüpüne yerleştirilmiş ve tam merkezine olacak şekilde 30-50 µl “Elution Buffer” (veya su) eklenmiştir. 2 dk 50°C' de ısı uygulanmıştır.
- ❖ 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)‘de santrifüj uygulanmıştır.

Vektörler için uygulanan restriksiyon kesim reaksiyonundan sonra oluşan ürünler “Biobasic Gel and PCR(PZR) Clean-Up” saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma kiti prosedürü aşağıda verilmiştir:

- ❖ DNA karışımı üzerine hacminin üç katı kadar “Cleanup Solution” eklenmiştir.
- ❖ DNA karışımı EZ-10 Spin kolona aktarılmış ve 2 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)‘de santrifüj uygulanmıştır.
- ❖ Kolonun altında toplanan sıvı atılmış ve kolona Kolona 750 µl “Wash Solution” eklenmiştir. 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)‘de santrifüj uygulanmıştır. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- ❖ Kolona 750 µl “Wash Solution,Yıkama çözeltisi” tatbik edilmiştir. 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)‘de santrifüj uygulanmıştır. Altta toplanan sıvı atılmıştır.
- ❖ Kolon 1.5 ml' lik yeni bir Eppendorf tüpüne yerleştirilmiş ve tam merkezine olacak şekilde 30-50 µl “Elution Buffer, Elüsyon tamponu” (veya su) eklenmiştir. 2 dk 50°C' de ısı uygulanmıştır.
- ❖ 2 dk 10 000 rpm (8 000xg)‘de santrifüj uygulanmıştır.

3.2.4. DNA Ligasyonu

Aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör plazmit DNA' lar ve gen parçaları T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak ligasyona tabi tutulmuştur. Ligasyon reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlanmıştır:

Çizelge 3.4. pTOLT vektör sistemi için ligasyon karışımı içerikleri

Ligasyon Karışımı I	Ligasyon Karışımı II
1 µl pTOLT plazmiti 80 ng/µl	3 µl pTOLT plazmiti 80 ng/µl
3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Takara)	3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Takara)
20 µl Tth Geni 90 ng/µl	18 µl DNA Tth Geni 90 ng/µl
1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl	1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl

Çizelge 3.5. pET22b vektör sistemi için ligasyon karışımı içerikleri

Ligasyon Karışımı I	Ligasyon Karışımı II
0.5 µl pET22b plazmiti 80 ng/µl	2.5 µl pET22b plazmiti 80 ng/µl
3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Takara)	3 µl 10X T4 DNA Ligaz Tamponu (Takara)
20.5 µl Tth Geni 90 ng/µl	18.5 µl Tth Geni 90 ng/µl
1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl	1 µl T4 DNA Ligaz 350 U/µl

Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6' da gösterildiği şekilde hazırlanan ligasyon karışımları +18°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında transforme edilene kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.2.5. Pipesli Kompetent Hücre Hazırlanması

- ❖ -80 °C'de stoklanan E. coli DH5α hücreleri LB agar besiyeri içeren petrilere ekilmiş ve 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ 16 saat inkübasyondan sonra petriden 1 koloni seçilmiş ve seçilen koloni 25 ml SOB içeren, 250 ml'lik erlene inoküle edilmiştir. 37°C, 250 rpm' de 6 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ 6 saat sonunda 250 ml SOB içeren erlenlere ve DH5α kültüründen 10 ml, 4 ml ve 2 ml olacak şekilde inokülasyon gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Erlenler 18-22 °C, 14 saat, 150 rpm inkübe edilmiştir.
- ❖ 45 dakikada bir OD₆₀₀ değerleri ölçüldü. OD₆₀₀ değeri 0.6 olduğunda erlenler çalkalayıcıdan alınmış ve 10 dakika süre ile buzlu suda bekletilmiştir. Ve hemen ardından hücrelere +4°C, 2500 g (3900 rpm) değerinde 10 dakika süre ile santrifüj uygulanmıştır.
- ❖ Uygulanan santrifüjün ardından oluşan süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Hücrelerin üzerine 80 ml PİPES' li tampon ilave edilmiş ve hücreler süspanse hale getirilmiştir.
- ❖ Hücrelere +4 °C, 2500 g (3900 rpm) değerinde 10 dakika boyunca santrifüj uygulanmış ve tüpteki tampon çözeltinin tamamen uzaklaştırılmasına dikkat edilmiştir.
- ❖ Hücrelerin üzerine 0°C, 20 ml PİPES'li tampon ilave edilmiş ve hücreler yeniden süspanse hale getirilmiştir.
- ❖ Süspanse haldeki hücrelerin üzerine 1.5 ml DMSO eklenmiştir. Nazıkçe karıştırılıp, buz banyosunda 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ İnkübasyon sonrası hücreler steril mikrotüplere aktarılmış ve sıvı azot içinde hızlı bir br şekilde donmaları sağlanmıştır. Tüm bu işlemler tamamlandıktan sonra hücreler saklanmak üzere 80°C' ye kaldırılmıştır (Inoue ve ark., 1990).

3.2.6. Transformasyon

- ❖ 200' er µl kompetent hücre alınmış ve üzerine 5 µl ligasyon ürününden eklenmiştir. Karışım 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- ❖ 2 dakika süre ile 42°C'de ısı şoku uygulanmıştır.
- ❖ Isı şokunun ardından karışım tekrar buz banyosunda 5 dakika bekletilmiştir.
- ❖ Karışıma 200 µl LB sıvı besiyeri eklenmiş ve yarım saat süre ile 37 °C ve 240 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ Her bir mikrotüp antibiyotikli besiyerlerine yayma ekim tekniği kullanılarak ekilmiş ve 37°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Hanahan, 1985).

3.2.7. Plazmit DNA Saflaştırılması

Yayma ekim sonucu petrilerde büyüyen hücrelerden birer koloni seçilerek pTOLT ve pET22b vektör sistemleri için ampicilin içeren 4 ml LB sıvı besiyerlerine inokule edilmiştir. 37 °C de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmış ve bir gece boyunca büyüyen hücreler santrifüj ile toplanmıştır. Ardından “Biobasic Plasmid DNA Purification” kiti kullanılarak aşağıda verilen protokole göre saflaştırmıştır.

- ❖ Büyüyen hücreleri içeren kültürden 1.5-5 ml tüplere aktararak, 2 dk 12 000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- ❖ 100 µl Solution 1 eklenerek iyice vortekslenmiştir. 1 dakika bekletilmiştir.
- ❖ Karışım üzerine 200 µl Solution 2 eklenmiştir. Nazikçe 4-6 defa alt üst edilip, 1 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- ❖ Karışıma 350 µl Solution 3 eklenerek nazikçe alt üst edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dk boyunca bekletilmiştir.
- ❖ Ardından 12 000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir.
- ❖ Sıvı kısım EZ-10 spin kolona tatbik edilmiş ve 2 dk 10 000 rpm 'de santrifüjlenmiştir.
- ❖ Altta toplanan sıvı atılmıştır. Kolon üzerine 750 µl “Wash Solution, yıkama çözeltisi” eklenerek 2 dk 10 000 rpm 'de santrifüjlenmiş ve altta biriken sıvı atılıp, kolon aynı tüpe tekrar yerleştirilmiştir.

- ❖ Kolona 750 µl “Wash Solution” eklenip, 2 dk 10 000 rpm (8 000 g)’de santrifüj uygulanmıştır.
- ❖ Tüpün altında biriken sıvı atılıp, Wash Solution’ın kolonda kalan miktarını uzaklaştırmak için 1 dk daha santrifüj uygulanmıştır.
- ❖ Kolon yeni 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip, kolonun merkezine 50 µl saf su eklenmiş, 50°C’de 2 dk boyunca bekletilmiştir.
- ❖ 10 000 rpm’de 2 dk boyunca santrifüj uygulanmış ve plazmit DNA saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

3.2.8. Doğrulama Restriksiyon Kesimi

Plazmitler saflaştırıldıktan sonra Tth genini plazmite klonlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacı ile Doğrulama restriksiyon kesimi uygulanmıştır.

Çizelge 3.6. pTOLT vektör sistemi doğrulama kesim reaksiyonu bileşenleri

pTOLT Vektör Sistemi İçin Kesim Reaksiyonu
18 µl Plazmit DNA 80ng/µl
2.5 µl 10X Buffer H
2.5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl NcoI (10 U/µl)
1 µl XhoI (15 U/µl)

Çizelge 3.7. pET22b vektör sistemi doğrulama kesim reaksiyonu bileşenleri

pET22b Vektör Sistemi İçin Kesim Reaksiyonu
18 µl Plazmit DNA 80ng/µl
2.5 µl 10X Buffer H
2.5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl KpnI (10 U/µl)
1 µl BamHI (15 U/µl)

3.2.9. DNA Dizileme

Pozitif olduğu düşünölen plazmit DNA’lardan 30 µl alınmış ve DNA dizilemeye gönderilmiştir. DNA dizileme işlemi Macrogen firması tarafından yapılmıştır.

3.3. TTH DNA Polimeraz Enziminin Üretilmesi

Protein ekspresyon çalışmalarında E. coli BL21 pLysE suşu kullanılmıştır. -80°C de stoklanan hücreler, 4 µl kloramfenikol antibiyotiğı içeren 4 ml’lik LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bir gece boyunca 37°C’de 240 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler FSB’ li kompeten hücre hazırlama prosedürü uygulanarak kompetent hücre haline getirilmiştir.

3.3.1. FSB’ li Kompetent Hücre Hazırlanması

- ❖ Gece boyunca büyüyen kültürden 1 ml alınarak 50 ml’ lik steril LB (Luria Bertani) besi yeri içeren iki erlene eklenmiştir. 37 °C ve 250 rpm değerlerinde inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ OD₆₀₀ değeri 0.7 olduğunda erlenler inkübatörden alınarak +4°C, 5 000 rpm değerlerinde 10 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır.
- ❖ Santrifüj sonrası sıvı kısım uzaklaştırılmış, pelet üzerine 50 ml soğuk FSB çözeltisi eklenmiştir. Vortekslenerek hücrelerin çözünmesi sağlanmıştır. Ardından Hücreler 1 saat boyunca buz banyosunda bekletilmiştir.
- ❖ 1 saatin sonunda +4 °C, 4 000 rpm değerlerinde 10 dakika süre ile santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan sıvı kısım uzaklaştırılmış, oluşan pelet 8 ml soğuk FSB çözeltisi ile muamele edilmiştir. Ve peletin iyice çözünmesi sağlanmıştır.
- ❖ Pelet tamamen çözündüğünde 560 µl DMSO eklenmiş ve 3 saat buzda bekletilmiştir. Bu işlemler sonucunda kompetent hücreler hazır hale gelmiştir (Hanahan, 1983).

Pozitif plazmitler hazırlanan kompetent hücrelere transforme edildi. Transformasyon sonrasında hücreler kloramfenikol ve ampisilin antibiyotiği içeren LB Agar besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve bir gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan ve büyüyen hücrelerden birer koloni, kloramfenikol(Chl) ve ampisilin(Amp) antibiyotiği içeren 4 ml'lik LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. Bir gece 37°C 240 rpm değerlerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler antibiyotik içeren 600 ml LB sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. Saatte bir kez olmak üzere 600 nm'deki absorbansları kontrol edilerek hücreler büyümeye bırakılmıştır. OD₆₀₀ 0.7' ye ulaştığında hücreler IPTG eklenerek indüklenmiştir. IPTG ilavesi sonrası hücreler 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda kültür içeriği 6 000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası E. coli BL21 pLysE hücreleri -20°C'de saklanmıştır (Guda ve ark., 1995).

3.3.2. E. Coli BL21 Plyse Hücrelerinin Parçalanması

İndükleme sonrası -20 °C' de stoklanan hücreler parçalama işleminden önce çıkarılarak bir süre buzda bekletilmiştir. Yükleme tamponu (pH:8) eklenerek hücreler süspanse hale getirilmiştir. Süspanse haldeki hücrelerin üzerine 100 mM, 100 µl PMSF ve benzamidin eklenmiştir. Lizozim ilavesinden sonra buz üzerine yerleştirildi. Hücrelerin soğuk kalmasına özen gösterilerek 1 saat süre ile sonikasyon işlemine devam edilmiştir. Sonikasyon sonrası 6 000 rpm' de 10 dakika süre ile santrifüj uygulanmış ve sonucunda oluşan süpernatant alınmıştır. Alınan süpernatant kısım 30 000 rpm, +4 °C değerlerinde 60 dk süre ile santrifüjlenmiştir. Böylece hidrofobik diğer proteinler ve hidrofobik hücre materyalleri uzaklaştırılmıştır.

3.3.3. TTH Polimeraz Enziminin Saflaştırılması

TTH Polimeraz enziminin saflaştırılması afinite kromatografisi ve kısmi saflaştırma yöntemleri uygulanmıştır. Afinite kromatografisi esnasında kullanılan kolon dolgu maddesi Ni-NTA agaroz rezindir. Kolondan elüsyon için ise imidazol içeren elüsyon tamponu kullanılmıştır. Kolona 1 ml Ni-NTA agaroz (Qiagen) rezin eklendikten sonra kolon yükleme tamponu ile yıkanmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen protein solüsyonu

kolona eklenmiş ve kolondan gelen tüm fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş kolon yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Bu şekilde kolonda tutunmuş olan diğer proteinlerin ayrılması sağlanmış ve ardından kolon elüsyon tamponu ile tekrar yıkanmıştır. Kolona tutunmuş haldeki protein üç ayrı fraksiyon olacak şekilde elüe edilmiştir (Laemmli, 1970).

Kısmi saflaştırma ile saflaştırma yönteminde ise, ultrasantrifüj sonrası oluşan süpernatant kısma ısı uygulaması gerçekleştirilmiştir. Süpernatanta öncelikle 70°C'de 10 dakika süre ile ısı uygulanmıştır. Isı uygulaması sonucunda denatüre olduğu düşünülen diğer proteinlerin uzaklaştırılması için 15 000 rpm' de 2 dakika süre ile santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısım temiz bir tüpe alınmış ve tekrar 70°C'de 10 dakika süre ile ısı uygulanmıştır. İkinci kez 15 000 rpm' de 2 dakika süre ile santrifüj uygulanmış ve oluşan süpernatant kısım alınmıştır. Böylelikle kısmi saflaştırma işlemi tamamlanmış ve Tth polimeraz aktivite testi uygulamaları yapılana kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.3.4. SDS-Page İçin Numunelerin Hazırlanması

Kolondan elüe edilen her fraksiyon için SDS-PAGE(sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) numuneleri hazırlanmıştır. Her bir fraksiyondan 200' er µl'lik numuneler alınmış ve üzerlerine 100' er µl SDS sample buffer ilave edilmiştir.

Elüsyonlar ve yükleme tamponu karışımı 100 °C'de 2 dakika denatüre edilmiş ve önceden hazırlanmış olan SDS-PAGE jeline yüklenmiştir. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra jel boyama işlemi gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970).

3.3.5. Diyaliz

Diyaliz, hedef proteinin afinite kromatografisi aşamasında kullanılan tampon çözeltiler içerisinde bulunan küçük moleküllerin (tuz gibi) uzaklaştırılması için uygulanan bir yöntemdir. Tuz ve diğer küçük moleküller yarı geçirgen bir zar aracılığıyla hedef proteinin bulunduğu çözeltilerden uzaklaştırılmaktadır. Elüe edilen protein çözeltisi diyaliz torbasına konur ve hazırlanan diyaliz tamponu içerisine bırakılır. Diyaliz torbasının porlarından daha küçük yapıda olan moleküller difüzyon esasına göre diyaliz çözeltisine geçerken daha büyük yapıdaki moleküller torba içerisinde kalmaktadır (Hessa ve ark., 2012).

Diyaliz çözeltisi, 10 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH:7.5 olacak şekilde 3 litre distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Afinite kromatografisinden elde edilen saf Tth polimeraz elüsyonlarından 0.6 ml diyaliz torbasına eklenmiş ve 16 saat diyalize bırakılmıştır. 16 saat diyaliz edilen Tth polimeraz, gliserol ilave edilerek -20 °C ' de saklanmıştır.

3.3.6. Tth Polimeraz Enzimi İçin Aktivite Testi (PCR,PZR)

Aşağıda verilen PCR(PZR) koşullarında seri reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Tüm numuneler için Touch-down PCR(PZR) uygulanmıştır.

Çizelge 3.8. Tth polimeraz enziminin aktivite tayinin için gerçekleştirilen PCR(PZR) reaksiyonu koşulları

2.5 µl Tampon
1.5 µl Mg ⁺²
1.5 µl dNTPs
1.5 µl GFP primer (reverse)
1.5 µl GFP primer (sense)
0.5 µl GFP kalıp DNA
0.25 µl-5µl Tth polimeraz (değişken)
15.75 µl-11 µl su (değişken)
Toplam hacim: 25 µl

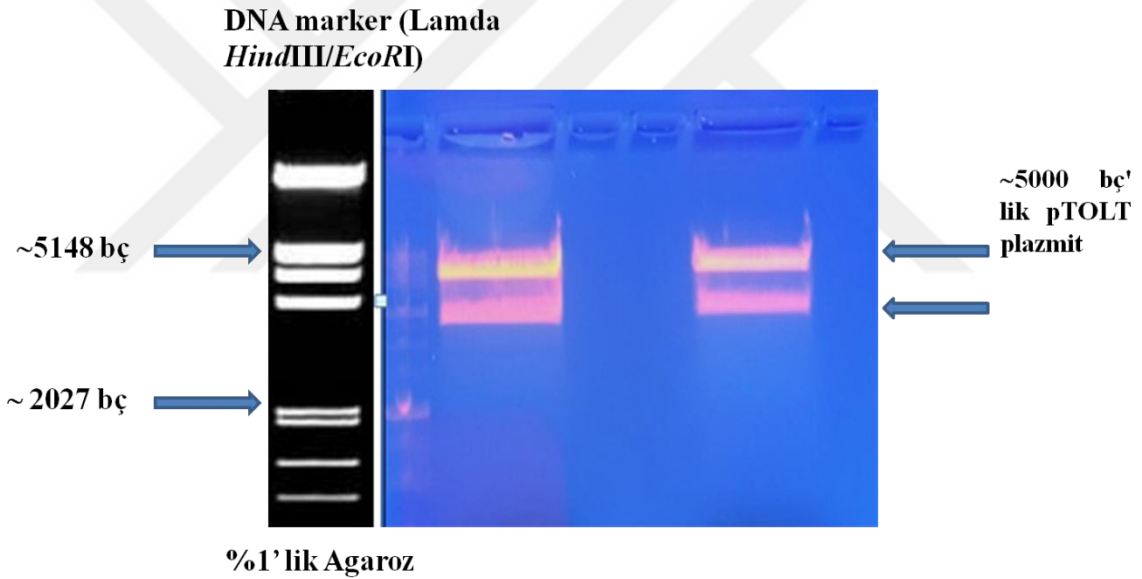
Yukarıda verilen PCR(PZR) karışımlarının bazılarına 3' er µl betain eklenmiştir. Betain PCR(PZR) enhancer olarak kullanılan indirgeyici bir maddedir ve PCR(PZR) etkinliğini arttırmaktadır (Ralsen ve ark., 2006).

4. BULGULAR

4.1. Tth Polimeraz Enziminin Vektörlere Klonlanması

4.1.1. Restriksiyon Enzimi İle Kesim

Restriksiyon enzimleri ile kesimi gerçekleştirilen Tth geninin taşıyan plazmit %1' lik agaroz jelde yürütülmüştür. Sonrasında jelden kesim işlemi gerçekleştirilmiş ve saflaştırılmıştır.

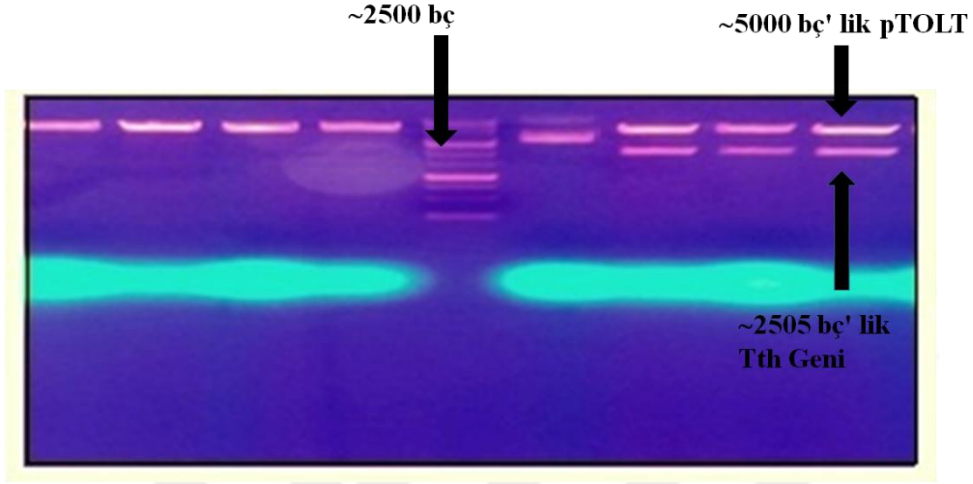


Şekil 4.1. BamHI ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş Tth plazmit DNA'sının %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1. DNA marker (Lamda HindIII/EcoRI), 2-5. BamHI ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş Tth plazmit DNA'sı.

4.2. Doğrulama Restriksiyon Enzim Kesimi

Tth geni ve vektörler restriksiyon enzimleri ile kesilip ligasyon işleminin ardından *E. Coli* DH5α suşuna transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası ekimi yapılan petrilere büyüyen hücrelerden 4 ml' lik antibiyotikli LB sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. Büyüyen kültürlerden plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen

plazmitler klonlama işleminde kullanılan enzimlerler kesilmiş ve doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir.



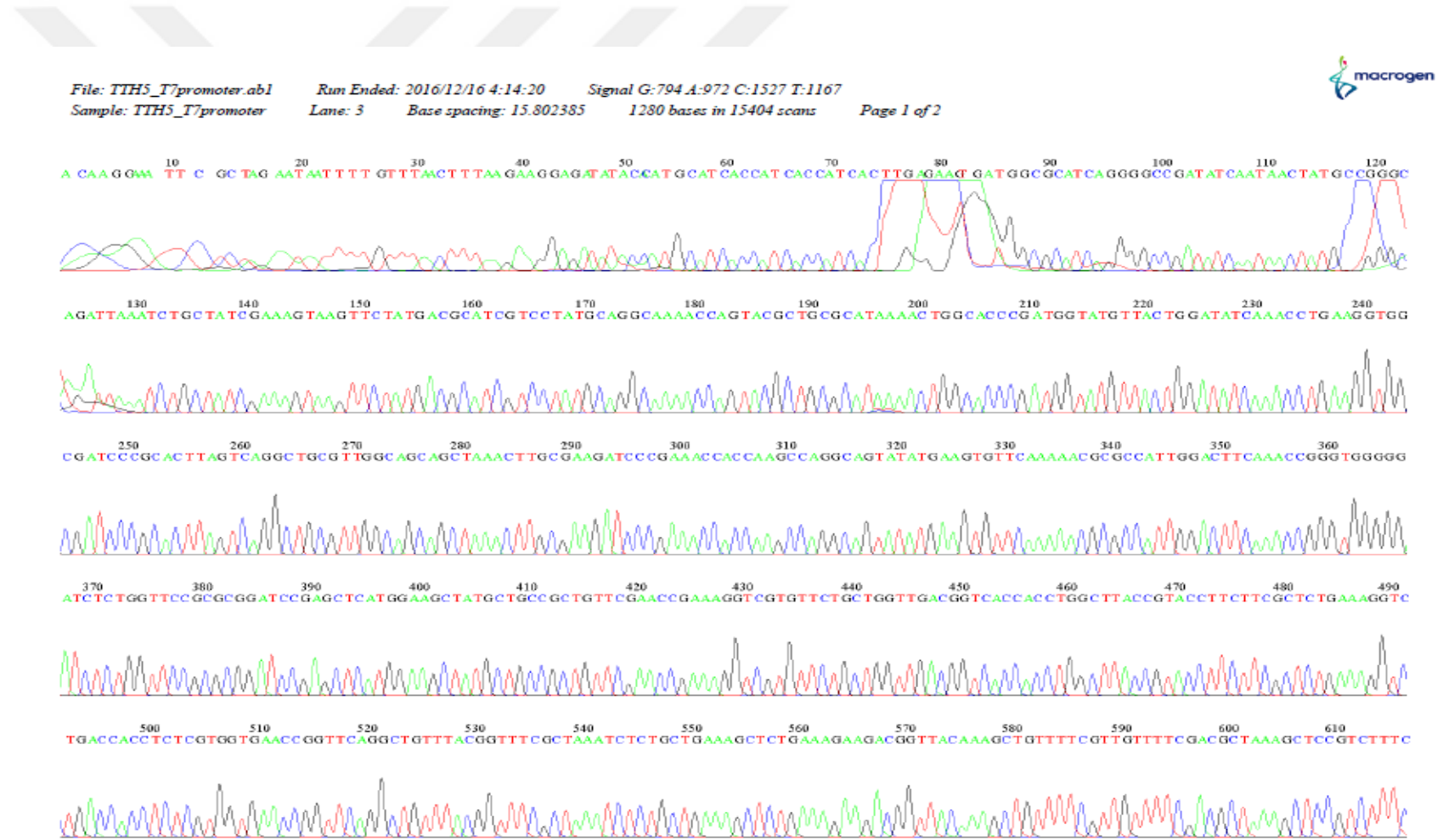
Şekil 4.2. pTOLTTH plazmit DNA'sının doğrulama kesimi %1'lik agaroz jel görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 6. kuyucuklar negatif plazmitler, 7, 8, 9. kuyucuklar 2505 bç' lik TTH geninin içeren pozitif plazmitler, 5. kuyucuk DNA marker (Lamda *HindIII/EcoRI*)

4.4. DNA Dizileme

Tth polimeraz enzimini kodlayan DNA parçasının pTOLT vektör sistemine çerçeve kayması problemi oluşmadan, klonlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği DNA dizileme sonucundan elde edilen kromatogram (Şekil 4.1) analiz edilerek belirlenmiştir. Dizileme sonucunda elde edilen beş numaralı plazmite ait DNA dizisi aşağıda verilmiştir.

Dizileme sonucu pozitif olan 5 numaralı plazmite ait gen dizisi

ACAAGGAAATTCGCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACATGCATCACCATCACCAT
CACTTGAGAAGTGATGGCGCATCAGGGGCCGATATCAATAACTATGCCGGGCAGATTAAATCTGCTATCG
AAAGTAAGTTCTTGACGCATCGTCCTATGCAGGCAAAACCAGTACGCTGCGCATAAAACTGGCACCCGAT
GGTATGTTACTGGATATCAAACCTGAAGGTGGCGATCCCGCACTTAGTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTA
AACTTGCGAAGATCCCGAAACCACCAAGCCAGGCAGTATATGAAGTGTTCAAAAACGCGCCATTGGACTT
CAAACCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCGAGCTCATGGAAGCTATGCTGCCGCTGTTTCGAA
CCGAAAGGTCGTGTTCTGCTGGTTGACGGTCACCACCTGGCTTACCGTACCTTCTTCGCTCTGAAAGGTC
TGACCACCTCTCGTGGTGAACCGGTTCAAGGCTGTTTACGGTTTTCGCTAAATCTCTGCTGAAAGCTCTGAA
AGAAGACGGTTACAAAGCTGTTTTCGTTGTTTTTCGACGCTAAAGCTCCGTCTTTCGTCACGAAGCTTAC
GAAGCTTACAAAGCTGGTCGTGCTCCGACCCCGGAAGACTTCCCGCGTCAGCTGGCTCTGATCAAAGAAC
TGGTTGACCTGCTGGGTTTCAACCGTCTGGAAGTTCCGGGTTACGAAGCTGACGACGTTCTGGCTACCTT
GGCTAAAAAAGCTGAAAAAGAAGGTTACGAAGTTTCGTATCCTGACCGCTGACCGTGACCTGTACCAGCTG
GTTTCTGACCGTGTTGCTGTTCTGCACCCGGAAGGTCACCTGATCACCCCGGAATGGCTGTGGGAAAAAT
ACGGTCTGCGTCCGGAACAGTGGGTTGACTTCCGTGCTCTGGTTGGTGACCCGTCTGACAACCTGCCGGG
TGTTAAAGGTATCGGTGAAAAAACCGCTCTGAAACTGCTGAAAGAATGGGGTTCTCTGGAAAACCTGCTG
AAAAACCTGGACCGTGTTAAACCGGAAAACGTTTCGTGAAAAAATCAAAGCTCACCTGGAAAACCTGCGTC
TGTCTCTGGAAGTGTCTCGTGTTCGTACCGACCTGCCGCTGGAAGTTGACCTGGCTCAGGGTCTTGAACC
GGACCGTGAAGGTCTGCGTGCTTTCCTGGAACGCTCTGGAATTTCGGTTCTCTGCTGCACAAATTCGGTCTG
CTGGAAACTCCGGTTCGG



Şekil 4.3. pTOLT vektör sistemine göre 5 numaralı plazmitin DNA dizileme sonuçlarının kromatogram şeklindeki görüntüsü (Macrogen firması tarafından yapılmıştır.)

4.5. Tth Polimeraz Enziminin Üretilmesi

DNA dizileme sonucu pozitif olan plazmitlerden *E. coli* BL21 pLysE suşuna transformasyon yapılmış ve hücre büyümesi gözlemlenen petrilerden 4 ml'lik LB antibiyotikli tüplere inoküle edilerek 37⁰C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Tüplerde büyüyen hücrelerden 1' er ml 50 ml'lik erlenlere aktarılmıştır. 37 ⁰C'de 240 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. OD₆₀₀:0,7 olduğunda IPTG ilave edilerek indüklenmiştir. İndükleme işlemi yaklaşık üç saat boyunca devam etmiştir. İndükleme sonrası hücreler santrifüj edilerek toplanmış ve -20 ⁰C'de saklanmıştır.

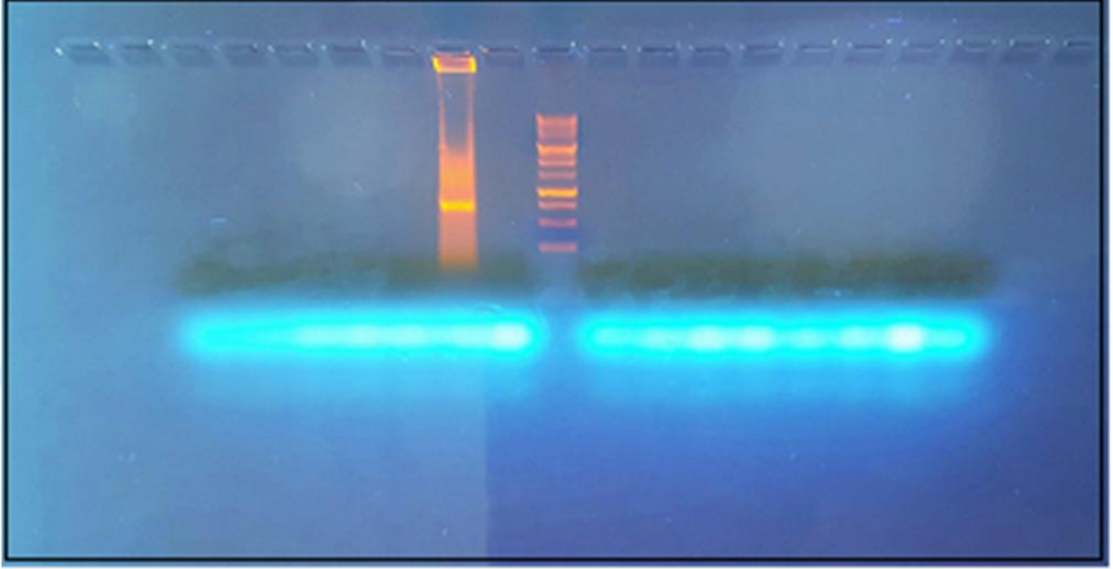
4.6. Tth Polimeraz Enziminin Saflaştırılması

Üç saat süre ile IPTG ile indüklenen hücreler sonrasında -20 ⁰C'den çıkarılmış ve buz üzerinde soğuk kalması sağlanarak sonikatör cihazı ile parçalama işlemine tabi tutulmuştur. 30 000 rpm, +4⁰C'de 1 saat süre ile santrifüj uygulanmış ve hidrofobik hücre bileşenlerinin çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ve pelet kısımlarından örnekler alınmış ve SDS-PAGE analizi için başlık 3.3.4' de anlatıldığı gibi numuneler hazırlanmıştır. Süpernatanta afinite kromatografisi ve kısmi saflaştırma yöntemleri uygulanmıştır. Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi Ni-NTA agaroz rezindir. Tth enzimi kolondan imidazollü elüsyon tamponu ile alınmıştır.

4.7. Tth Polimeraz Enziminin Aktivite Tayini

Başlık 3.3.6' da verilen şekilde PCR(PZR) karışımları hazırlanmış ve 33 döngü ile Touch-Down PCR(PZR) işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR(PZR) ürünü %1' lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Elde edilen agaroz görüntüsünde Tth polimeraza ait 15 numunenin çalışmadığı, sadece altıncı kuyucuktaki Pfu polimerazın (pozitif kontrol) çalıştığı gözlenmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 M 9 10 11 12 13 14 15 16



Şekil 4.4. Tth polimeraza ait PCR(PZR) örneklerinin %1' lik agaroz jeldeki görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. kuyucuklar farklı enzim miktarları ile (0.25 μ l, 0.5 μ l, 1 μ l, 1.5 μ l, 2.5 μ l, 5 μ l) hazırlanan ve sonucu negatif olan PCR (PZR) reaksiyonları, 6. kuyucuk, Pfu polimeraza ait pozitif kontrol, 8. kuyucuk DNA ladder

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Biyomedikal ekipmanlar, tıbbi tanı kitleri ve bu tanı kitlerinde kullanılmak üzere uluslararası standartlara uygun kimyasal ve biyolojik maddelerin geliştirilmesi son dönemde öncelikli olarak belirlenen alanlar içerisinde değerlendirilmektedir. Sağlık Bakanlığı tarafından belirlenen hedefler arasında yerli tıbbi cihaz (tıbbi tanı kitleri dâhil) üretimini desteklemek, sektördeki dış ticaret açığını minimize etmek ve bu gelişmeler doğrultusunda ülkemizdeki yerli markalaşmaya katkı sağlamak yer almaktadır. Sağlık bakanlığı, "tıbbi cihaz (tıbbi tanı kitleri dâhil) alanında kurumsal yapılarıyla; dışa bağımlılığı en aza indirgenmiş, ileri teknoloji katma değeri yüksek ürünleri de geliştirip üretebilen ve uluslararası standartların oluşumunda etkili küresel bir oyuncu olmak" gerekliliğini vizyon edinmenin önemi üzerinde hassasiyetle durmaktadır. Biyomedikal ekipman, tıbbi tanı kitlerinin ve bu kitlerde kullanılacak kimyasal ve biyolojik maddelerin geliştirilmesi gibi alanlarda Ar-Ge ve yenilik faaliyetlerinin desteklenmesinin ulusal hedef ve stratejilerimize önemli ölçüde katkı sağlaması beklenmektedir. Tıbbi tanı kitlerinde kullanılmak üzere son yıllarda üretimi sağlanan en önemli biyolojik maddelerden biri de enzimlerdir (Wiseman, 1987). Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere 21. yüzyılın anahtar teknolojilerinden bir tanesi olan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilmekte ve ilgili oldukları alanlarda kullanıma sunulmaktadır.

Enzim endüstrisinden elde edilen ürünlerin kullanım alanlarının çok çeşitli olması, maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle bu alanda yapılan çalışmalara verilen önem son yıllarda giderek artmıştır (Gessese, 1998). Tth polimerazın, polimeraz aktivitesinin yanı sıra sahip olduğu reverse transkriptaz aktivitesi sayesinde, AIDS, Hepatit C, Ebola, Kırım Kongo Kanamalı Ateşi gibi viral RNA kökenli bulaşıcı veya ölümcül hastalıkların teşhisinde önemli rol oynaması ve teşhis sürecini kolaylaştırıp, harcanan süreyi kısaltması beklenmektedir. Bu gibi enfeksiyonlar, erken dönemde belirtilerini göstermese bile bulaşıcı özelliklerini korumaktadırlar. Virüs kaynaklı enfeksiyonların erken teşhisi hayatidir. Tth enzimi bu özelliği sayesinde hem viral RNA kaynaklı patojenlerin hem viral DNA kaynaklı patojenlerin eş zamanlı tanısına olanak sağlayabilecek kapasitededir.

Protein ekspresyonu için gen dizaynı aşamasında gerçekleştirilen kodon optimizasyonu oldukça önemlidir. Bir aminoasit birden fazla kodon tarafından ifadelenebilmektedir ve bazı kodonlar diğerlerinden daha fazla kullanılabilir. Fakat ifade edilme oranı organizmanın türüne göre değişmektedir (Moreno ve ark., 2005). Kodon kullanımı hücrenin sahip olduğu uygun tRNA yoğunluğu ile ilişkili olabilmektedir. Eğer klonlanacak genin kodon kullanım eğilimi, konak hücrenin sahip olduğu kodon kullanım eğiliminden çok farklı ise, genin konak hücrede ifadelenebilmesi (translasyonu) düşük verimle gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle ekspresyon aşamasında konak organizmaya göre kodon optimizasyonu yapılması gerekmektedir. Kodon optimizasyonu ile DNA dizisi nadir kodonlardan arındırılmakta ve böylelikle proteinin ekspresyon seviyesi artırılmaktadır (Angov, 2011). Bizim çalışmamızda da jCat uygulaması kullanılarak *E. coli* K12 suşu için kodon optimizasyonu yapılmıştır. Bu uygulama ile, *E. coli* K12 suşunda bulunan lösin aminoasitine ait nadir kodon dizileri GCA, GCT, GCC değiştirilmiş, GCG olarak kodon optimizasyonu uygulanmıştır.

Bizim çalışmamızda ekspresyon sistemi olarak prokaryot *E.coli* ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Prokaryotik rekombinant ekspresyon sistemleri, kolaylıkla kültür edilebilir, hızlı hücre üremesi sağlar ve basit saflaştırma yöntemlerine uygundur. Bu gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedirler (Chen, 2012). Fakat bu sistemler translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirmede yetersizdir. Ve üretilen proteinlerin birçoğu çözünmeyen "inklüzyon cizimcikleri" haline gelmektedir. Sonuç olarak işlevsel protein elde etmek zorlaşmaktadır (Miroux, B. ve Walker, E.J., 1996). Bu çalışmada, Tth polimeraz enzimi için yapılan ekspresyon çalışmalarında inklüzyon cisimciği oluşumu görülmemiştir.

Proteini kodlayacak nükleotid dizi biyoinformatik araçlar kullanılarak sentezlenmiş ve klonlama işlemlerine geçilmiştir. Klonlama işlemlerinin kolay gerçekleşebilmesi için dizinin başına *NcoI* ve *BamHI* sonuna *XhoI* ve *KpnI* restriksiyon enzimleri için kesim bölgeleri eklenmiştir pTOLT vektörüne klonlama işlemlerinden sonra klonlama işleminin başarılı olduğu jel görüntüsünde görülmüştür. Nükleotid dizisinde ise herhangi bir mutasyon olmadığı dizi analizi sonucunda görülmüştür (Şekil 4.2). Plazmit vektörlere klonlanan Tth geni, rekombinant protein ekspresyonu çalışmalarında sahip

olduğu özellikleri nedeniyle sıkça kullanılan *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerinde başarılı bir şekilde eksprese edilmiştir. Bu hücreler T7 RNA polimeraz genini içermektedirler. Bu hücre soyu IPTG ile indüklenebilmektedir. Hedef proteinin degrede olmasına neden olabilecek bazı proteazları da içermemektedir. Ekspresyon çalışmaları sonrası elde edilen ürün afinite kromatografisi ve kısmi saflaştırma yöntemleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Aktivite çalışmalarına geçmeden önce, saflaştırma işlemi için tercih edilen afinite kromatografisi yönteminde kullanılan imidazolün uzaklaştırılması için enzim çözeltisi diyalize bırakılmıştır.

Tth polimeraz enziminin aktivite çalışmaları PCR(PZR) tekniği temelli olarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite testi için değişen enzim ve Mg^{+2} iyonu konsantrasyonlarında ve farklı tampon sistemleri kullanılarak seri PCR(PZR) reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Tth polimeraz, 1/10 ve 1/100 oranlarında seyreltilmiş ve hiç seyreltme uygulanmamış olarak kullanılmıştır. Seyreltilen bu Tth polimerazlardan 0,25 µl, 0,50 µl, 1 µl, 2 µl, 5 µl olacak şekilde değişen enzim miktarları kullanılmıştır. Mg^{+2} iyonu konsantrasyonu ise ticari olarak piyasada var olan benzerlerinin optimum çalışma koşulları göz önüne alınarak 0,5 mM - 5 mM aralığında çalışılmıştır. PCR(PZR) enhancer olarak 3 µl betain kullanılmıştır.

Yapılan PCR(PZR) çalışmaları sonucunda üretilen Tth polimeraz enziminin öngörüldüğü şekilde planladığımız sistemde üretildiği, fakat aktif olmadığı gözlemlenmiştir. Tth polimeraz enzimi nispeten büyük bir enzimdir (94 kDa) ve prokaryotik ekspresyon sistemlerinde proteinin post-translasyonel modifikasyonlar açısından yeterli şekilde modifiye olamamasına neden olabilmektedir. Tth polimeraz enziminin aktivitesi çalışmalarında bu nedenle *P. pastoris*, *K. lactis* gibi sekresyon yapabilen ökaryotik sistemler gibi farklı ekspresyon sistemleri ile de çalışılması önerilebilir (Demain ve Vaishnav., 2009).

Rekombinant olarak üretilecek proteinlerin ekspresyonunu artırmak ve saflaştırma işlemlerini kolaylaştırmak amacı ile füzyon protein teknolojisi geliştirilmiştir. Füzyon proteinler, bazı spesifik proteazlar için tanıma bölgesi, üretilmesi hedeflenen proteine bağlı bir kuyruk ve alıcı hücreye ait kararlı bir protein içerirler. Hedef proteinin periplazmaya veya besi ortamına salgılanması istenen durumlarda proteinin konak hücre proteazları tarafından degrade olmasını engellerler. Ve genellikle doğal bir protein formu gibi salgılanırlar. Saflaştırma işlemleri kendilerine spesifik olarak geliştirilen afinite yöntemleri şeklinde uygulanır. Saflaştırma işlemi tamamlandıktan sonra, kimyasal degradasyon veya proteaz aktivitesi ile füzyon proteinler hedef proteinden ayrılabilir (Sorensen, H.P., 2005).

Bu çalışmada, Tth polimeraz enzimi pTOLT plazmit vektörüne klonlanmıştır. pTOLT plazmit vektöründen gelen TOL proteinini, protein ekspresyonu aşamasında Tth polimeraz ile füzyon proteinini olarak eksprese edilmektedir. *E.coli* gibi ekspresyon sistemlerinde eksprese edilen rekombinant proteinini çözünabilir formda ve yüksek verimde elde etmede birtakım sorunlarla karşılaşılabilir. Bu gibi sorunları ortadan kaldırmak için kullanılan yöntemlerden biri de füzyon proteinlerinin kullanımıdır (Wang ve ark., 2010). Füzyon proteinleri, eksprese edilen proteinleri periplazmik bölgeye yönlendirmede, hedef proteinin ekspresyonunu artırmada, saflaştırma işlemlerinin daha kolay gerçekleştirilmesinde etkilidir. Aynı zamanda inklüzyon cisimciği oluşumu da bu şekilde önlenmektedir. Fakat füzyon proteinlerinin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi de zaman zaman söz konusu olabilmektedir (De Marco ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda ise TOL füzyon proteininin Tth polimeraz enzim aktivitesi üzerinde etkisi olup olmadığını anlayabilmek amacı ile sonraki aşamalarda TOL proteinini uzalaştırmaya imkan tanıyan proteaz kesim bölgesi içeren yeni bir sistem ile çalışılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Adams, M. W., R. M. Kelly., 1998. Finding and using hyperthermophilic enzymes. Trends Biotechnol, 16:329–332.
- Angov, E., 2011. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. Biotechnology Journal, Volume 6, 650-659.
- Asakura, K., Komatsubara, H., Soga, S., Yomo, T., Oka, M., Emi, S., Urabe, I., 1993. Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of DNA Polymerase Gene (poL4) from *Thermus thermophilus* HI38. Journal Of Fermentation And Bioengineering, 76 (4), 265-269.
- Bardakçı, F., Yıldırım, A., 2010. Rekombinant DNA Teknolojisi. Moleküler Biyoloji, Nobel Yayınevi, Ankara, 471-502.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L. and Boyer, H.W., 1977. Gene. 2, 95-113.
- Brown, T.A., 2009. Saflaştırılmış DNA' nın Manipölasyonu. Gen Klonlama ve DNA Analizi, Bardakçı, F., Yenidünya, A.F., ve Yılmaz, N. Nobel Yayınevi, Ankara, 54-86.
- Brown, T.A., 1990. Gene Cloning. Second Edition. London: Chapman & Hall, p.3-11.
- Bruschi, V. C., Gjuracic, K., Tosato, V., 2002. Encyclopedia Of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Buxbaum, E., 2007. Fundamentals of Protein Structure and Function. Springer Science+Business Media, New York.)
- Chen, R., 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. Biotechnology Advances, Volume 30, 1102-1107.
- Çetinkaya, E., Ayhan, Kamuran., 2012. Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. Karaelmas Science and Engineering Journal, 2 (1), 53-62.
- Çimen, C., 2010. Sitogenetik ve Moleküler Tekniklerin Klinikte Uygulama Alanları. (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Edirne.
- Demain, A., Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnology Advances, 27, 297–306.
- De Marco, V., Stier, G., Blandin, S., De Marco, A., 2004. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. Biochemical and biophysical research communications, 322(3), 766-771.
- Erlich, H., 1989. Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Immunology, Vol.9,No. 6.
- German, D.P., Marcelo, K.R.B., Stone, M.M., Allison, S.D., 2012. The Michaelis–Menten kinetics of soil extracellular enzymes in response to temperature: a cross-latitudinal study. Global Change Biology, Volume 18, 1468-1479.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Environmental Microbiology . 64 (9), 3533-3535.
- Gilbert, F., 2013. Developmental biology. 10. Baskı

- Green, E.D., Riethman, H.C., Dutchik, J.E., Olson, M.V., 1991. Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics*, Volume 11, Issue 3, 658–669.
- Hartley, J.L., 2006. Cloning technologies for protein expression and purification. *Curr Opin Biotechnol*, 17(4): 359-366.
- Hauptenthal, J., Hüsecken, K., Negri, M., Maurer, C.K., Hartmann, R.W., 2012. Influence of DNA template choice on transcription and inhibition of *E. coli* RNA polymerase. *American Society for Microbiology*, Volume 61.
- Hessa, T., Sharma, A., Mariappan, M., Eshleman, H.D., Gutierrez, E., Hedge, R.S., 2012. Protein Targeting and Degradation are Coupled for Elimination of Mislocalized Proteins. *Nature*, 475(7356): 394–397
- Iost, I., Dreyfus, M., (1995). The stability of *Escherichia coli* lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*, 14, 3252– 3261
- Ishino, S., Ishino, Y., 2014. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*. Volume 5, Article 465.
- Kaplan, M., Kuk, S., Özdarendeli, A., Bulut, Y., ve Kalkan, A., 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması ve rekombinant plazmitlerin polimeraz zincir reaksiyon taraması ile belirlenmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 26, 388-392.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. *Biyokimya*. Aktif Yayınevi, No:64, Türkiye.
- Kuk, S., Erensoy, A., 2008. Gene Clonning, Selection of Plasmids and Application of *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Gene. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (1), 16-22.
- Lachmann, R., 2004. Herpes simplex virus-based vectors. *Int J Exp Pathol*, 85(4): 177-190.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2012. *Mikrobiyal Genomik*. Mikroorganizmaların Biyolojisi, Çökmüş, C. Palme Yayıncılık, Ankara, 479-501.
- Miroux, B., Walker, E.J., 1996. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *J. Mol. Biol*, 260, 289–298.
- Moreno, R., Haro, A., Castellanos, A., Berenguer, J., 2005. High-Level Overproduction of His-Tagged Tth DNA Polymerase in *Thermus thermophilus*. *Applied And Environmental Microbiology*, 591–593.
- Moreno, R., O, Zafra, F, Cava, J, Berenguer., 2003. Development of a gene expression vector for *Thermus thermophilus* based on the promoter of the respiratory nitrate reductase. *Plasmid*, 49:2–8
- Moser, M.J., DiFrancesco, R.A., Gowda, K., Klingele, A.J., Sugar, D.R., Stocki, S., Mead, D.A., Schoenfeld, T.W., 2012. Thermostable DNA Polymerase from a Viral Metagenome Is a Potent RT-PCR Enzyme. *Plos ONE*, Volume 7.
- Nishimura, N., Nakayama, T., Tonoike, H., Kojima, K., Kato, S., 2000. Direct polymerase chain reaction from whole blood without DNA isolation. *Annals of Clinical Biochemistry*, (37), 674-680.
- Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C., 1998. Quantification Of Murine Cytokine Mrnas Using Real Time Quantitative Reverse Transcriptase Pcr. *Cytokine*, Vol. 11, No. 4, 305–312.

- Özsolak, F., Milos, P.M.M., 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet.*, 12(2): 87–98
- Pantazaki, A.A., Pritsa, A.A., Kyriakidis, D.A., 2002. Biotechnologically relevant enzymes from *Thermus thermophilus*. *Microbiol Biotechnol* (2002) 58:1–12.
- Ralsler, M., Querfurth, R., Warnatz, H-J., Lehrach, H., Yaspo, M-L., Krobisch, S., 2006. An efficient and economic enhancer mix for PCR. *Biochemichemical and Biophysical Research Communications*, 347, 747-751.
- Rittié, L., Perbal, B., 2008. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J. Cell Commun. Signal*, 2, 25–45.
- Rotbart, H.A., 1990. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J. Clin. Microbiol*, 28, 438–442.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York, p. 1-1.86.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. In *molecular cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, New York, 2, 18-90.
- Shandilya, H., Griffiths, K., Flynn, E., Astatke, M., Shih, P., Lee, J., Gerard, G., Gibbs, M., Bergquist, P., 2004. Thermophilic bacterial DNA polymerases with reverse-transcriptase activity. *Extremophiles*, (8), 243–251.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M., 1992. Cloning And Stable Maintenance Of 300-Kilobase-Pair Fragments Of Human Dna In *Escherichia Coli* Using An F-Factor-Based Vector. *Biochemistry*, Vol. 89, Pp. 8794-8797
- Shomburg, I., Chang, A., Shomburg, D., 2002. BRENDA enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acid Research*, 30, 47-49.
- Sorensen, H.P., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotech.*, 115, 113-128.
- Srivastava, D.B., Leon, K., Osmundson, J., Garner, A.L., Weiss L.A., Westblade, L.F., Glickman, M.S., Landick, R., Darst, S.A., Stallings, C.L., Campbell, E.A., 2013. Structure and function of CarD, an essential mycobacterial transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(31)
- Studier, F.W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W., (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185, 60–89.
- Telefoncu, A., Pazarlıoğlu, N., 2010. *Biyoteknoloji Temel Prensipler ve Uygulamalar*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 418-420, İzmir.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitapevleri, 101-119, İstanbul.
- Terpe, K., 2013. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 97, Issue 24, 10243–10254
- Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., 2013. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*, 36, 1-22, 2013
- Wurm, F.M., Bernard, A.R., 1999. Large scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*, 10, 156–159.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hümeýra AYDIN
Doğum Tarihi ve Yeri : 13.06.1991 - ÜSKÜDAR
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0542 587 9327
e-mail : humeyra.aydin@alanya.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi- Mühendislik ve Doğa Bilimler Fakültesi - Biyomühendislik Bölümü	09.06.2014

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017-	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi - Mühendislik Fakültesi - Genetik ve Biyomühendislik Bölümü	Araştırma Görevlisi

Aldığı Burslar ve Ödüller

- TÜBİTAK 2210 C öncelikli alanlara yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı (Bursiyer)
- TÜBİTAK 114Z956 kodlu "Farklı Flüoresans Proteinlerin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Boya Duyarlı Güneş Pillerindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması" konulu proje (Bursiyer)