

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

SERRATIA MARCESCENS GBS19 İZOLATINA AİT
KİTİNAZ A GEN BÖLGESİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE TARIM
ZARARLISI *MYZUS PERSICAE* ÜZERİNE
İNSEKTİSİDAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET CAN

AĞUSTOS 2022

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

***SERRATIA MARCESCENS* GBS19 İZOLATINA AİT
KİTİNAZ A GEN BÖLGESİNİN KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE TARIM
ZARARLISI *MYZUS PERSICAE* ÜZERİNE
İNSEKTİSİDAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AHMET CAN

AĞUSTOS 2022

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Ahmet CAN tarafından hazırlanan *Serratia marcescens* GBS19 İzolatına Ait Kitinaz A Gen Bölgesinin Klonlanması, Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Tarım Zararlısı *Myzus persicae* Üzerine İnektisidal Akitivitesinin İncelenmesi başlıklı tezin 03.08.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Reşat ÜNAL (Jüri Başkanı) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza _____
Prof. Dr. Ömür BAYSAL (Danışman) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza _____
Dr. Öğr. Üyesi Osman TELLİ (Üye) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Kırklareli Üniversitesi, Kırklareli	İmza _____

ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Reşat ÜNAL (Bölüm Başkanı / Anabilim Dalı Başkanı) Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza _____
Prof. Dr. Ömür BAYSAL Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla	İmza _____

Savunma Tarihi: 03.08.2022

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

Ahmet CAN

03.08.2022

ÖZET

***SERRATIA MARCESCENS* GBS19 İZOLATINA AİT KİTİNAZ A GEN BÖLGESİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE TARIM ZARARLISI *MYZUS PERSICAE* ÜZERİNE İNSEKTİSİDAL ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Ahmet CAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömür BAYSAL

Ağustos 2022, 98 sayfa

Entomopatojen olma potansiyelindeki mikroorganizmaların ürettiği birtakım enzimlerin biyolojik mücadele ve kontrol amaçlı kullanılma durumu, hedeflenmiş organizma haricinde diğer canlılar açısından güvenli olması gibi birçok avantaja sahiptir.

Bu tez çalışması, kitinazın biyolojik mücadelede kullanımının biyolojik ve çevre dostu bir çözüm önerisi olarak ortaya koymasını amaçlamıştır. Gerçekleştirilen tez çalışmasında kullanılan yöntemler olarak, *S. marcescens* GBS19 genomu içerisinde bulunan *chiA* gen bölgesi, spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgesi pBluescript II KS (+) klonlama vektörüne klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi ile doğrulanan *chiA* geni pET-22b (+) ekspresyon vektörüne klonlanmış ve *Escherichia coli* BL21(DE3)'de protein eksprese edilmiştir. Ekspresyonu sağlanan *chiA* proteini his-taq afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE ile görüntülenmiştir. SDS-PAGE sonucunda beklendiği üzere 62.5 kDa'lık protein bandı görülmüştür. Aynı zamanda protein ekspresyonu qPCR kullanılarak doğrulanmıştır. Elde edilen *chiA* enziminin en iyi çalıştığı sıcaklık ve pH düzeylerine bakılmıştır. Elde edilen sonuca göre enzimin çalıştığı en iyi sıcaklık 40°C, en iyi pH ise 5 olarak bulunmuştur. Enzimin çalıştığı optimum koşullar belirlendikten sonra tarım zararlısı *Myzus persicae* üzerine insektisidal aktivitesi çalışılmıştır. Saf *chiA* enziminin LD₅₀ değeri 15.804 ppm bulunmuştur. Biyoinformatik modelleme hesaplamalı biyoloji yöntemleri kullanılarak enzimin substrat olan kitin ile arasındaki bağlanmanın en yüksek -4.10 kcal/mol olduğunda tespit edilmiştir. *chiA* enzimi, NCBI veritabanında bulunan ref_seq *chiA* enzimleri ile karşılaştırıldığında en yakın olduğu kitinaz kodlayan aminoasitlere %98,93 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Serratia marcescens*, *chiA*, insektisidal aktivite, *Myzus persicae*

ABSTRACT

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION OF THE CHITINASE A GENE REGION OF *SERRATIA MARCESCENS* GBS19 ISOLATION AND INVESTIGATION OF INSECTICIDAL EFFECT ON AGRICULTURAL PEST *MYZUS PERSICAE*

Ahmet CAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ömür BAYSAL

August 2022, 98 pages

It has many advantages such as the use of certain enzymes produced by microorganisms with the potential to be entomopathogenic for biological control and control purposes, and being safe for other living things apart from the targeted organism.

This thesis study aimed to present the use of chitinase in biological control as a biological and environmentally friendly solution. The methods to be used in the thesis study carried out, the *chiA* gene region in the *S. marcescens* GBS19 genome was amplified by PCR using specific primers. The amplified gene region was cloned into the pBluescript II KS (+) of cloning vector and sequence analysis was performed. The *chiA* gene confirmed by sequence analysis, was cloned into the pET-22b (+) expression vector and the protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The expressed *chiA* protein was purified using his-taq affinity chromatography and visualized by SDS-PAGE. As expected, a protein band of 62.5 kDA was observed as a result of SDS-PAGE. Also, protein expression was confirmed using qPCR. The optimum temperature and pH levels for the *chiA* enzyme were examined. According to the results the temperature for the highest activity for the was found to be 40°C, and the pH was 5 level. After assessing the optimum conditions in which the enzyme works, its insecticidal activity on the agricultural pest *Myzus persicae* was investigated. The LD50 value of the pure *chiA* enzyme was found to be 15,804 ppm. By computational analysis using ligand- protein interaction, it was determined that the highest binding between the enzyme and chitin, which is the substrate, was -4.10 kcal/mol in addition to 8 different binding points. When the *chiA* enzyme was compared with the *ref_seq* *chiA* enzymes found in the NCBI database, it showed similarity to the closest chitinase with 98.93%.

Keywords: *Serratia marcescens*, *chiA*, insecticidal activity, *Myzus persicae*

Canım aileme,



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübe ve fikirleri ile bana yol gösteren, yardımlarını ve tavsiyelerini benden esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Ömür BAYSAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin iyileştirilmesi ve eksiklerimin giderilmesinde verdikleri destek ve tavsiyelerinden dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yasemin İSPİRLİ DOĞAÇ, Arş. Gör. Talip ZENGİN ve Arş. Gör. Yeşim KAYA hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Reşat ÜNAL, Dr. Öğr. Üyesi Osman TELLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Klonlama çalışmalarımnda hiçbir desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN ve Arş. Gör. Hayriye AKEL BİLGİÇ'e teşekkür ederim. Aynı zamanda yaprak bitlerinin teminatı ve böcek denemelerinde verdiği desteklerden dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KEÇECİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, tez çalışmam sırasında beni her zaman destekleyen ve motive eden Buse ARDIL'a sonsuz sevgisi için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımnda bana destek olan ekip arkadaşlarım Ahmet KORKUT, Yiğit KÜRÜM'e ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her anımda yanımda olan, bana inanan ve yol gösteren sevgili annem Müzeyyen CAN ve sevgili kardeşim Hayri CAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20/114/02/1/5 proje numarası ile desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteğinden ötürü teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans burs programı tarafından "1649B022103359" başvuru numarası ile desteklenmiştir. Destekleri için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	18
1.1. Kitin	19
1.1.1. Kitinin Yapısı.....	20
1.1.2. Kitinin Kullanım Alanları	21
1.1.3. Kitin Biyosentezi	21
1.2. Enzimler	22
1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması	22
1.2.2. Enzimlerin Kullanım Alanları	23
1.3. Kitinazlar	24
1.3.1. Kitinazların Sınıflandırılması	24
1.3.2. <i>Serratia marcescens</i> ve Ürettiği Kitinazlar	25
1.3.3. Kitinazların Uygulama Alanları.....	27
1.3.3.1. <i>Böcek Kontrolünde Kitinazlar</i>	27
1.3.3.2. <i>Endüstriyel Açından Kitinazlar</i>	28
1.3.3.3. <i>Biyokontrol Ajanı Olarak Kitinazlar</i>	28
1.4. <i>Myzus Persicae</i>	28
1.4.1. <i>M. persicae</i> Yaşam Döngüsü	30
1.4.2. <i>M. persicae</i> Zararları.....	30
1.5. Amaç ve Kapsam	31
2. MATERYAL VE METOT.....	32
2.1. Materyaller.....	32
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar	32
2.1.2. Kullanılan Kitler	33

2.1.3.	Kullanılan Cihazlar	33
2.2.	Yöntemler	34
2.2.1.	<i>Serratia Marcescens</i> GBS19 İzolatı Genomik DNA İzolasyonu	34
2.2.2.	Spektrofotometrik Analiz ve Agaroz Jel Elektroforezi	36
2.2.3.	Kolloidal Kitin Hazırlanması.....	36
2.2.3.1.	<i>Mavi Yengeç Kabuklarından Kitin Elde Edilmesi</i>	36
2.2.3.2.	<i>Kitinin Koloidal Hale Getirilmesi</i>	37
2.2.4.	chiA Gen Bölgesine Spesifik Primer Tasarımı.....	38
2.2.5.	chiA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	38
2.2.6.	chiA Gen Bölgesi ve Klonlama Vektörünün Kesim Enzimleri ile Muamelesi.....	39
2.2.7.	Kesilmiş PCR Ürünü ve Klonlama Vektörünün Saflaştırılması.....	40
2.2.8.	Saf chiA Ürününün pBluescript II KS (+) Vektörüne Ligasyonu	41
2.2.9.	Elektrokompetant Bakteri Hazırlama	42
2.2.10.	Ligasyon Ürününün Elektrokompetan Bakteri (One Shot TOP10)'ye Transformasyonu	43
2.2.11.	Transforme Bakterilerden Plazmit DNA İzolasyonu.....	43
2.2.12.	Gen Bölgesinin Sekanslanması.....	44
2.2.13.	Transforme Plazmitin ve pET-22b (+) Ekspresyon Vektörünün Restriksiyon Endonükleazlar ile Mumalesi	44
2.2.14.	Gen Bölgesinin Jelden Ekstraksiyonu ve Ekspresyon Vektörünün Saflaştırılması	45
2.2.15.	chiA Ürününün pET-22b (+) Vektörüne Ligasyonu ve Ligasyon Ürününün <i>E. coli</i> BL21(DE3) Elektrokompetan Bakterisine Transformasyonu	45
2.2.16.	chiA Proteininin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	46
2.2.17.	Protein Miktar Tayini ve Toplam Protein Standart Eğrisi.....	47
2.2.18.	SDS-PAGE	48
2.2.19.	Rekombinant Plazmiti İçeren <i>E. coli</i> BL21(DE3) Bakterilerinden RNA İzolasyonu.....	49
2.2.20.	Total RNA'dan cDNA Sentezi	49
2.2.21.	cDNA'dan PCR	50
2.2.22.	Kantitatif PCR (qPCR)	51
2.2.23.	qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	51
2.2.24.	chiA Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	52
2.2.25.	chiA Enziminin Optimum pH'sının Belirlenmesi	52

2.2.26.	chiA Enziminin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....	53
2.2.27.	chiA Enziminin Myzus persicae Üzerine İnsektisidal Aktivite Testleri.....	53
2.2.27.1.	Patlıcan Yapraklarının Hazırlanması.....	53
2.2.27.2.	Yaprak Bitlerinin Hazırlanması.....	54
2.2.27.3.	Aktivite Denemeleri.....	55
2.2.28.	Biyoinformatik Analizler.....	56
2.2.28.1.	chiA-Kitin Bağlanma Kompleksi.....	56
2.2.28.2.	chiA Proteini Benzerlik Karşılaştırma.....	57
3.	BULGULAR.....	58
3.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	58
3.2.	chiA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması.....	59
3.3.	chiA Gen Bölgesinin Klonlanması.....	59
3.4.	chiA Gen Bölgesi Sekans Analizi.....	61
3.5.	chiA Gen Bölgesinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	63
3.6.	chiA Proteinin Ekspresyonu, Saflaştırılması ve SDS-PAGE Analizi.....	64
3.7.	<i>E. coli</i> BL21(DE3)'den Total RNA İzolasyonu.....	65
3.8.	cDNA Sentezi ve cDNA PCR.....	66
3.9.	Kantitatif PCR (qPCR).....	67
3.10.	Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	68
3.10.1.	Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	68
3.10.2.	Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	70
3.11.	<i>Myzus persicae</i> Üzerine İnsektisidal Aktivite Testleri.....	71
3.11.1.	İnsektisidal Aktivite Sonuçlarının LD50 Değerleri.....	72
3.12.	Biyoinformatik Analiz Sonuçları.....	73
3.12.1.	chiA-Kitin Bağlanma.....	73
3.12.2.	chiA Proteini Benzerlik Karşılaştırma Sonucu.....	74
4.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	77
	KAYNAKÇA.....	82

EK A. Sekans Analizi.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	97



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. <i>S. marcescens</i> taksonomik hiyerarşi (ITIS, 2022)	25
Çizelge 1. 2. <i>M. persicae</i> taksonomik hiyerarşi (ITIS, 2022)	29
Çizelge 2. 1. Kullanılan kimyasallar	32
Çizelge 2. 2. Kullanılan kitler	33
Çizelge 2. 3. Kullanılan cihazlar	33
Çizelge 2. 4. <i>chiA</i> gen bölgesi primer dizileri	38
Çizelge 2. 5. PCR bileşenleri ve miktarları.....	39
Çizelge 2. 6. PCR Basamakları	39
Çizelge 2. 7. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim	40
Çizelge 2. 8. Ligasyon basamağında kullanılan bileşenler ve miktarlar	41
Çizelge 2. 9. Vektörlerin restriksiyon endonükleazlar ile kesimi	44
Çizelge 2. 10. SDS-PAGE bileşenleri ve miktarları	48
Çizelge 2. 11. cDNA sentezi bileşenleri ve miktarları.....	50
Çizelge 2. 12. cDNA PCR bileşenleri ve miktarları	50
Çizelge 2. 13. qPCR bileşenleri ve miktarları.....	51
Çizelge 2. 14. qPCR Basamakları	51
Çizelge 2. 15. Kullanılan tampon çözeltiler.....	52
Çizelge 3. 1. Genomik DNA izolasyonu sonucu değerleri	58
Çizelge 3. 2. Total RNA izolasyon sonuçları.....	65
Çizelge 3. 3. qPCR sonuçları CT değerleri	67
Çizelge 3. 4. Enzim aktivite sonuçları	68
Çizelge 3. 5. pH-absorbans tablosu.....	69
Çizelge 3. 6. Sıcaklık-absorbans tablosu.....	70
Çizelge 3. 7. <i>chiA</i> enzim LD ₅₀ değerleri.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. a) Karides dış iskeleti üzerinde kitin görüntüsü, b) dış iskelet kitininin katmanlı görüntüsü, c) kitinin helikoidal görüntüsü, d) kitin nanofibril demetleri, e) kitinin kimyasal bileşimi (Hou vd., 2021'den türkçeleştirilmiştir.)	20
Şekil 1. 2 Kitin yapıları görüntüsü (Berezina, 2016'dan türkçeleştirilmiştir.)	21
Şekil 1. 3. Enzim ana grupları sınıflandırılması (de Souza Vandenberghe vd., 2020'den türkçeleştirilmiştir.)	23
Şekil 1. 4. Kitin yapısını bozmak için <i>S. marcescens</i> 'in sinerjistik olarak kullandığı kitinazlar ve yardımcı enzimler (Jana, 2017)	26
Şekil 1. 5. Kitinazların uygulama alanları (Singh vd., 2021'den türkçeleştirilmiştir.)	27
Şekil 1. 6. <i>M. persicae</i> nimf görüntüsü (AphidTrek, 2022)	29
Şekil 1. 7. <i>M. persicae</i> yetişkin görüntüsü (AphidTrek, 2022)	30
Şekil 1. 8. CABI'ye göre <i>M. persicae</i> 'nin dünya üzerinde dağılım haritası (CABI, 2022)	31
Şekil 2. 1. <i>S. marcescens</i> GBS19 çizgi plaka ekim petri görüntüsü	35
Şekil 2. 2. a) <i>C. sapidus</i> , b) <i>C. sapidus</i> kabuk, c) <i>C. sapidus</i> kurutulmuş kabuk görüntüleri	37
Şekil 2. 3. Gen bölgesi ve klonlama vektörünün ligasyonunun sanal görüntüsü	42
Şekil 2. 4. Gen bölgesi ve ekspresyon vektörünün ligasyonunun sanal görüntüsü ...	46
Şekil 2. 5. BSA standart grafiği	47
Şekil 2. 6. a) Laboratuvara getirilen patlıcan fideleri, b) 1 haftalık patlıcan fideleri, c) 3 haftalık patlıcan fideleri	54
Şekil 2. 7. <i>M. persicae</i> istila edilmiş patlıcan yaprağı	54
Şekil 2. 8. a) 3 tekrarlı doz denemeleri, b) Yaprak bitleri inkübasyonu	56
Şekil 2. 9. chiA kristal yapısı	57

Şekil 3. 1. Genomik DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.....	58
Şekil 3. 2. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1) PCR sonucu chiA gen bölgesi.....	59
Şekil 3. 3. a) Transformasyon sonrası mavi-beyaz koloniler, b) Transformasyon kontrolü yalnızca mavi koloniler.....	60
Şekil 3. 4. Marker Goldbio 1 kb DNA Ladder (D010-500), 1) BamHI ile tekli kesim pBluescript II KS (+), 2) Rekombinant plazmitin HindIII-BamHI ile ikili kesimi, 3) Kesilip saflaştırılmış chiA gen bölgesi.....	60
Şekil 3. 5. NGS sekans sonucu klonlama vektörü+chiA gen bölgesi simülasyonu...	61
Şekil 3. 6. chiA gen bölgesi-NGS sekans karşılaştırma.....	62
Şekil 3. 7. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1) HindIII ile tekli kesim pET-22b (+), 2) Rekombinant pET-22b (+)'nin HindIII-BamHI ile ikili kesimi, 3) Kesilip saflaştırılmış chiA gen bölgesi	63
Şekil 3. 8. NGS sekans sonucu ekspresyon vektörü+chiA gen bölgesi simülasyonu	64
Şekil 3. 9. Marker Pierce Unstained Protein MW Marker (26610), 1) Temizlenmiş lizat, 2) Yıkanmış lizat 3) Protein 1. Elüsyonu, 4) Protein 2. elüsyonu.....	65
Şekil 3. 10. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1) Total RNA 1. elüsyon, 2) Total RNA 2. elüsyon	66
Şekil 3. 11. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1-2) cDNA PCR agaroz jel görüntüsü.....	67
Şekil 3. 12. qPCR sonucu erime eğrisi.....	68
Şekil 3. 13. Optimum pH grafiği.....	69
Şekil 3. 14. Optimum sıcaklık grafiği	71
Şekil 3. 15. chiA enziminin (kaba ve saf) farklı konsantrasyonlarda <i>M. persicae</i> üzerine insektisidal etkileri	72
Şekil 3. 16. chiA proteini ile kitin molekülü arasında etkileşim.....	73
Şekil 3. 17. <i>S. marcescens</i> GBS19 chiA aminoasit sekansı.....	74
Şekil 3. 18. chiA proteinleri filogenetik ağaç	74
Şekil 3. 19. <i>S. marcescens</i> GBS19 chiA gen sekansı.....	75
Şekil 3. 20. chiA proteinleri aminoasit benzerliği.....	76

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
AMP	Ampisilin
bp	Baz Çifti
BSA	Bovine Serum Albumin
CAZy	Karbonhidrat-Aktif Enzim Veritabanı
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
CT	Döngü Eşiği
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNS	3,5-Dinitrosalisilik Asit
dNTPs	DNA Nükleotid Bazları
<i>g</i>	Göreceli Santrifüj Kuvveti
gr	Gram
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
IPTG	İzopropil β-d-1-Tiyogalaktopiranosid
IRAC	İnsektisit Direnç Eylem Komitesi

kDA	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	Ortalama Öldürücü Doz
M	Molarite
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Normalite
ng	Nanogram
NGS	Yeni Nesil Dizileme
nm	Nanometre
OD	Optik Densite
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ppm	Milyonda Bir Birim
Q-PCR	Gerçek Zamanlı PCR
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
s	Saniye
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Birim
UV	Ultraviyole

V	Volt
X-GAL	5-Bromo-4-Chloro-3-Índolyl-Beta-D-Galacto-Pyranoside
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama



1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki artışla birlikte besin maddelerine duyulan ihtiyaç da artmakta ve tarımsal üretimi geliştirmeyi hedefleyen çalışmalar daha fazla destek bulmaktadır (SETA, 2019; FAO, 2017). Tarımsal hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, kimyasal yöntemler %95'in üzerinde bir paya sahiptir (Arslan ve Çiçekgil, 2018). Tarım zararlıları ile mücadelede etkili kimyasalları ulusal kaynaklar ile üretmek; ülkemizin tarımsal ürünlerinin kalitesini arttırmak ve dünya besin pazarında ulusal ürünlerin talebine katkı sağlamak amacıyla hizmet eder (Doğan ve Karpuzcu, 2018; FAO, 2017). Tarımsal mücadelede en etkili kimyasal yöntemlerden biri de tarımsal zararlıların yapısını etkilemeye yönelik kullanılan enzimlerdir. Özellikle hastalık yapıcı böcek türleri ile mücadelede kitinaz enzimin aktif üretimi ve kullanımına yönelik yapılan iyileştirme ve üretim çalışmaları son yıllarda giderek önem kazanmakta, bu alandaki projeler ulusal ve uluslararası kaynaklar tarafından desteklenmektedir (Doğan ve Karpuzcu, 2018).

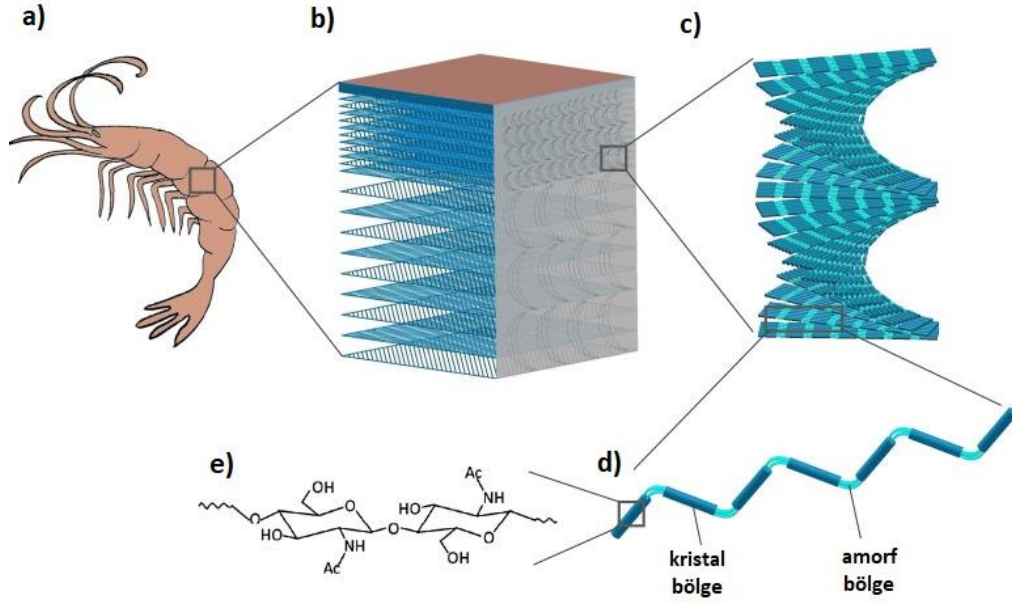
Günümüzde enzimler; süt ürünleri, biyomedikal, tarım veya ilaç alanlarında başta olmak üzere, hemen hemen her sektörde yaygın olarak kullanılan ve endüstriyel alanda geniş uygulama yelpazesine sahip olan önemli biyomoleküllerdir. Endüstriyel enzimlerin mikrobiyal üretimine yönelik uygulamalar son yıllarda muazzam bir artış göstermiştir. Endüstriyel enzim satışlarının küresel pazardaki rolü, 2015 yılında 3.74 milyar dolar olduğu bilinmektedir (Liu ve Kokare, 2017). Önümüzdeki yıllarda ise bu pazar büyüklüğünün 5 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Endüstriyel enzimlerin uygulama alanlarına yönelik pazar segmentasyonu, gıda çalışmaları ve hayvan yeminin üretimi açısından pazarın %34'lük bir kısmına sahipken, deterjan ve temizleyicilerin endüstriyel enzim kullanımına yönelik yaklaşımı ise pazar payında %29 etkinlik göstermektedir (Binod vd., 2013).

Kitinazlar; bakterilerde, mantarlarda, yüksek bitkilerde, kabuklularda ve bazı omurgalılarda bulunarak, çeşitli görevleri yerine getirmektedir (Kuzu, 2008). Ayrıca farklı sektörlerde de kitinaz kullanımına sıkça rastlanmaktadır. Örneğin; kozmetik, tıp, ziraat, kâğıt sanayi ve tekstil endüstrisinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra gıda endüstrisinde, ambalaj uygulamalarında, antimikrobiyal koruyucularda ve kaplama materyallerinin oluşturulmasında da etkinlik göstermektedir.

Kabuklu su ürünlerinin işlenmesi ve atıklarının ayrıştırılması gibi çok farklı alanlarda da önem arz eden kitinazların endüstriyel üretimini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalar çoklu alanlarla etkileşimine sahiptir. Tüm bu gelişmeler dikkate alındığında kitinaz enziminin mikrobiyal üretime; endüstri ve mikrobiyal teknoloji alanında yoğun ilgi duyulmaktadır. Bu ilginin sebebi kitinazın yalnızca geniş uygulama alanına sahip olması değil, aynı zamanda etkili üretim yöntemindeki boşluğu doldurabilecek potansiyelde olmasından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple kitinazların geleceği, üretimdeki artış ile doğrudan ilgilidir. Kitinaz üretimi için farklı tipte substratlar, endüstriyel enzimlerin büyük ölçekli üretimlerinde ve çeşitli ürünlerin geliştirilmesi için de kullanılan katı hal fermantasyonu gibi kimyasal yöntemler kullanılmaktadır (Nampoothiri vd., 2004). Bunun yanı sıra kitinaz enziminin endüstriyel hidrolizi korozif reaktiflerin kullanılması ile elde edilmektedir (Stoykov ve ark., 2015). Ancak dünyada ve ülkemizde çok az sayıda kitinaz enzimi ticari olarak temin edilebilir durumdadır. Kitinaz üretime yönelik çalışmaların artırılması, tarımsal ve endüstriyel katkıları da beraberinde getirebilir. Kitinaz kullanımının etkili alanlarından birisi de zararlı böcek popülasyonlarının oluşturduğu zararı azaltmak için canlı organizmalardan faydalanarak yapılan ekonomik, güvenilir ve başarılı bir yöntem olan biyolojik mücadeledir. Son yıllarda kitinaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve yeni yeteneklere sahip rekombinant suşların oluşturulması biyolojik mücadele kapsamında olumlu etkiler sağlamıştır (Hansoylu, 2003).

1.1. Kitin

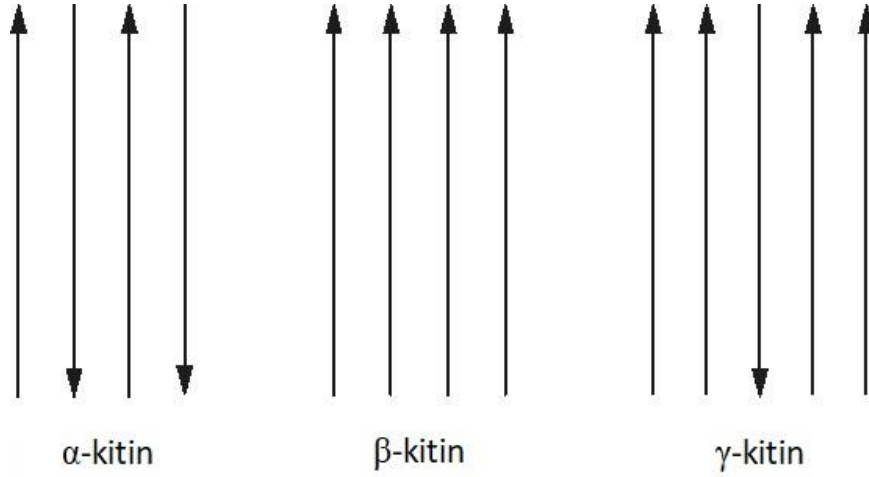
Kitin, doğada bulunan en yaygın polisakkarittir ve yıl boyunca yaklaşık selüloz kadar üretildiği tahmin edilmektedir. Yapısal olarak eklembacaklıların dış iskeletlerinde, nematod yumurtalarının kabuklarında ve mantarların hücre duvarlarında bulunur. Böcek büyümesi ve morfogenez, kitin içeren yapıları yeniden şekillendirme kabiliyetine kesinlikle bağlıdır. Bu amaçla, böcekler tekrar tekrar farklı dokularda kitin sentezleri ve kitinolitik enzimler üretirler. Kitin sentezinin koordinasyonu ve parçalanması, gelişim sırasında katılan enzimlerin sıkı kontrolünü gerektirir (Merzenfonder vd., 2003).



Şekil 1. 1. a) Karides dış iskeleti üzerinde kitin görüntüsü, b) dış iskelet kitininin katmanlı görüntüsü, c) kitinin helikoidal görüntüsü, d) kitin nanofibril demetleri, e) kitinin kimyasal bileşimi (Hou vd., 2021'den türkçeleştirilmiştir.)

1.1.1. Kitinin Yapısı

Kitinin üç formu vardır: α , β ve γ kitin (Şekil 1.2.). Esas olarak yengeç ve karides kabuklarından elde edilen α formu yaygın olarak dağılmıştır. Hem α hem de β kitin / kitosan ticari olarak temin edilebilir. α -kitin zincirleri anti-paralel şekilde hizalanmıştır. α -kitinindeki anti-paralel düzenleme, güçlü hidrojen bağına yol açar ve sonuç olarak onu daha kararlı hale getirir. Kalamar gibi yumuşakçalardan elde edilen β -formu paralel olarak düzenlenirken, γ -formu iki paralel ve bir anti-paralel kitin ipliği içerir (Sikorski vd., 2009). Kitin suda, organik çözücülerde ve asitlerde yüksek oranda çözünmez. Bu, ayrı zincirler arasındaki kitin fibrillerindeki hidrojen bağı, çapraz bağı yapı ve liflerin oluşumundan sonra meydana gelen işlem ile açıklanabilir. Saf kitinin çözünürlüğü kaynağa, izolasyon yöntemine, çapraz bağlamaya, kristallik derecesine ve artık proteine bağlıdır. Saf kitin, protein bileşenlerini uzaklaştırmak için sodyum hidroksit ve demineralizasyon sağlamak için hidroklorik asit kullanılarak eklem bacaklıların dış iskeletleri gibi doğal kaynaklardan elde edilebilir (Moe, 2001).



Şekil 1. 2 Kitin yapıları görüntüsü (Berezina, 2016'dan türkçeleştirilmiştir.)

1.1.2. Kitinin Kullanım Alanları

Kitin; biyolojik olarak parçalanabilir, biyo-emilebilir, antibakteriyel, yara iyileştirici ve düşük immünojenisiteye sahiptir. Bu nedenle biyomedikal uygulamaları hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Bu doğrultuda, malzeme biliminde, mikrobiyolojide, tarımda hayvan yemlerinde, gıda katkı maddelerinde, kozmetikte, tekstil endüstrisinde, fotoğraf ürünlerinde, daha güçlü lifler yapmak için kağıt yapımında, endüstriyel atık su arıtımında fenoller ve boyar maddeleri uzaklaştırmakta, ağır metalleri şelatlamakta ve proteinli atıkları topaklaştırmakta, ilaç dağıtım sistemlerinde, doku mühendisliğinde ve biyonanoteknoloji gibi farklı alanlarda çok geniş bir uygulama yelpazesi bildirilmiştir (Khoushab vd., 2010). Aynı zamanda tıbbi uygulamalarda; farmasötik ürünlerde ilaç verme ve sürekli salım sistemleri, yara iyileşmesi hızlandırıcılar, bandajlar, yanık tedavisi, iyileştirici dermatit, yapay böbrek zarları, cerrahi yardımcı maddeler, oftalmoloji, bakteriyostatik ve fungistatik, sperm öldürücü, anti-kanser uygulamaları, anti-tümör ajanları, hayvan hücrelerini hareketsizleştirme kabiliyeti ve HIV protein üretimini yavaşlattığı gösterilmiştir (Whitehead, 1997).

1.1.3. Kitin Biyosentezi

Birçok organizma, onları çevreleyen koruyucu hücre duvarlarının veya dış iskeletlerin yapısal bir bileşeni olarak kitini kullanır. Bu yapılar, koruyucu rollerini yerine getirmelerini sağlayan belirli yapısal ve mekanik özelliklere sahip hafif ve dayanıklı kompozitlerdir. Bu karmaşık yapıların sentezi aşağıdaki adımları içerir;

- i. kitinin hücre içi veya hücre dışı ortam ile interfazda sentezlenmesi,

- ii. kitin moleküllerinin hücre dışı boşluğa taşınması,
- iii. kristalize olmayan kitinin bir kısmının kimyasal modifikasyonu ve diğer moleküllerle ilişkisi,
- iv. bileşenlerin geri kalanı tarafından kaplanan modifiye edilmemiş kitinin kristalleşmesi (Ortaya çıkan supramoleküler yapı, viskoelastik mekanik özellikler kazanır),

kompozitin, bileşenleri arasında ikincil kovalent bağların oluşumu ve farklı maddelerin birikmesi yoluyla olgunlaşması (Ruiz-Herrera ve Martinez-Espinoza., 1999)

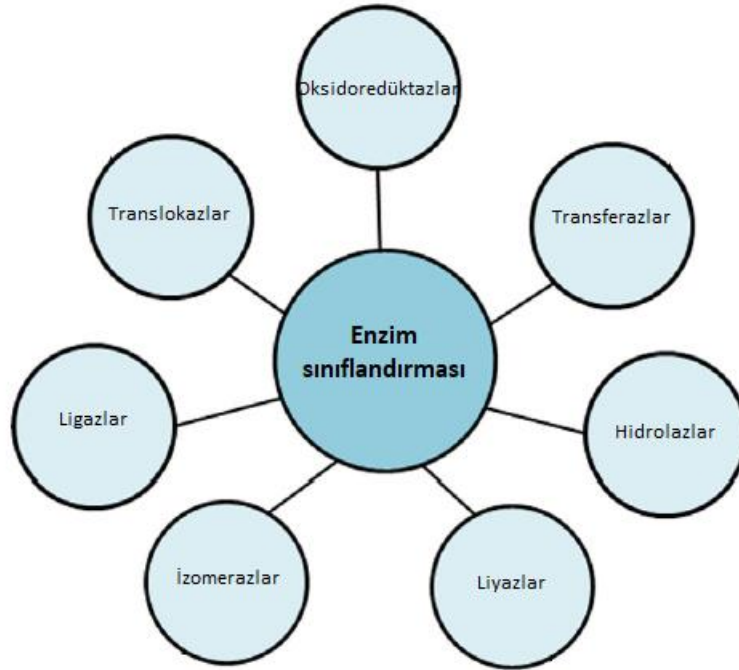
1.2. Enzimler

Tüm biyokimyasal reaksiyonların, spesifik aktivasyon güçleri nedeniyle katalitik özelliklere sahip proteinler olan enzimler tarafından katalize edildiği iyi bilinmektedir. Enzimler katalizörlerdir, yani kalıcı değişime uğramadan kimyasal reaksiyonların daha hızlı ilerlemesine neden olan maddelerdir. Ek olarak, katıldıkları kimyasal reaksiyon türlerine özeldirler. Enzim özgüllüğü genellikle duyarlı bağlara bağlı grupların doğası tarafından belirlenir. Enzimler, substratları ile belirli hassas bağlar etrafında elektronik konfigürasyonda değişikliklere neden olacak şekilde stereospesifik bir tarzda birleştikleri için spesifik aktivatörlerdir. Yüksek sıcaklık ve aşırı pH ile denatüre edilirler. Fizyokimyasal durumları ve kimyasal reaksiyonlar üzerindeki etkileri, belirgin şekilde pH, iyonik kuvvet, sıcaklık ve inhibitör veya aktivatörlerin varlığına veya yokluğuna bağlıdır (Tabatabai, 1994).

1.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Numaralandırılması

Çok önemli bir biyokatalizör türü olan enzimler, organizmaların yaşam aktivitelerinin korunmasında hayati bir role sahiptir. Metabolizma, beslenme, enerji dönüşümü ve yaşam süreciyle yakından ilişkili diğer birçok kimyasal reaksiyona hükmetmektedirler. Enzimlerin çoğu protein, diğerleri ise ribonükleik asit yapıdadır. Bugüne kadar, enzim sınıflarının ve alt sınıflarının tahmini üzerine yapılan araştırmalar her zaman kimyasal özü protein olan enzime odaklanmıştır; yani, enzimleri sınıflandırmak için hesaplama modelleri kullanıldığında, benimsenen özellik çıkarma yöntemi her zaman proteinler için olmaktadır (Tao vd., 2020). Kataliz ettikleri reaksiyonlar, her sınıfa dahil olan ana enzim grubu ve bazı özellikleri dahil

olmak üzere 7 enzim sınıfı tanımlanmıştır (de Souza Vandenberghe vd., 2020). Enzim sınıflarının isimlendirilmesi, enzimin ana sınıfını, alt sınıfını, alt sınıfını ve substrat sınıfını tanımlayan dört bölümden oluşmaktadır. Bilim adamları tarafından tasarlanan sınıflandırıcıların çoğu, enzimleri alt sınıf seviyesine göre sınıflandırabilmektedir. Son yıllarda, enzimleri substrat sınıfı seviyesine sınıflandırabilen sınıflandırıcıların ortaya çıktığını belirtmek gerekmektedir (Tao vd., 2020).



Şekil 1. 3. Enzim ana grupları sınıflandırılması (de Souza Vandenberghe vd., 2020'den türkçeleştirilmiştir.)

1.2.2. Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzimler doğal katalizörlerdir. Canlı organizmalar tarafından, yaşam için gerekli olan muazzam ve çeşitli kimyasal reaksiyonların oranını artırmak için üretilirler. DNA replikasyonu ve transkripsiyonu, protein sentezi, metabolizma ve sinyal iletimi gibi yaşam için gerekli tüm süreçlerde yer alırlar. Özel kimyasal dönüşümler gerçekleştirme yetenekleri, onları endüstriyel süreçlerde giderek daha kullanışlı hale getirmiştir.

Enzimler, teknik kullanım, gıda üretimi, hayvan beslenmesi, kozmetik, ilaç tedavisi ve araştırma ve geliştirme araçları olarak çeşitli alanlarda uygulanır. Şu anda, yaklaşık 4000 enzim bilinmektedir ve bunlardan yaklaşık 200 tanesi mikrobiyal orijinal tip

ticari olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, gerçekten endüstriyel ölçekte sadece yaklaşık 20 enzim üretilmektedir. Enzim üretim biyokimyasının, fermantasyon proseslerinin ve geri kazanım yöntemlerinin daha iyi anlaşılmasıyla, artan sayıda endüstriyel enzim öngörülebilir. Dünya enzim talebi yaklaşık 12 büyük üretici ve 400 küçük tedarikçi tarafından karşılanmaktadır. Toplam enzimlerin yaklaşık %75'i, Danimarka merkezli Novozymes, ABD merkezli DuPont ve İsviçre merkezli Roche gibi üç büyük enzim şirketi tarafından üretilmektedir. Enzim pazarı oldukça rekabetçidir, küçük kar marjlarına sahiptir ve teknolojik olarak yoğundur (Li vd., 2012).

1.3. Kitinazlar

Farklı organizmalar, sahip oldukları çeşitli substrat özgüllükleri ve çeşitli fonksiyonlarda kullanmak üzere yararlı özellik gösteren birçok hidrolitik enzim üretir. Kitinazlarda bunlardan biridir. Kitinazlar, bakterilerde beslenme ve parazitizmde görev alırken, protozalarda, mantarlarda ve omurgasızlarda morfogenezde rol oynarlar. Bitkiler ve omurgalılar için ise kitinazlar savunma mekanizmasında görev alırlar. Ayrıca yakın zamanda insan serumunda kitinaz aktivitesi tanımlanmıştır ve bu aktivitenin sebebi olası mantar patojenlerine karşı kitinazın savunmada rol oynayabilecek olmasıdır (Patil vd., 2000).

1.3.1. Kitinazların Sınıflandırılması

Glikozid hidrolazlar (GH), glikozidik bağların hidrolizinden sorumlu protein ailesini oluşturur. Biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalar için yaygın önemleri nedeniyle, GH'ler şimdiye kadar CAZy veritabanında bulunan biyokimyasal olarak en iyi karakterize edilmiş enzim setini oluşturmaktadır. Bu veritabanına göre GH'ların sınıflandırılmış 135 adet ailesi vardır (Cantarel vd., 2009). Kitinazlar (EC 3.2.1.14) ise bu 135 aileden 18. (GH18) ve 19. (GH19) ailelere dahildir (Mizuno vd., 2008). Bu aileler, katalitik alanlarının amino asit dizilerinde ve katalitik mekanizmalarında farklılık gösterir. GH18 kitinazlarının katalitik alanı bir (β / α)₈ TIM-barrel katlanır ve substrat destekli bir tutma mekanizması kullanır. GH-19 kitinazlarının katalitik alanı ise büyük ölçüde α -helikstir ve tek bir değişim çevirme mekanizması kullanır. GH18 kitinazları prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunurken, GH19 kitinazları çoğunlukla

gelişmiş bitkilerde ve *Streptomyces* sp. gibi bazı bakterilerde bulunur (Suginta vd., 2016).

GH18 ailesi kitinazlar, çeşitli kitin ve kitin barındırmayan üreticilerden karakterize edilmiştir. Bakteriler, mantarlar ve böcek kitinazları bu ailenin en çeşitli üyeleridir. Bu üyeler, gelişimsel fonksiyonlar için veya savunma mekanizmaları olarak kitini bozmak için bir kitinaz karışımının sinerjik olarak salgılandığı oldukça etkili bir kitin hidrolizi mekanizması geliştirmiştir. Bu sinerjik özellik, özellikle dört kitinolitik enzime kadar üreten *S. marcescens*'de deneysel olarak kanıtlanmıştır (Oyeleye ve Normi, 2018).

1.3.2. *Serratia marcescens* ve Ürettiği Kitinazlar

S. marcescens gram negatif (-), yüksek düzeyde kitinaz enzimi üreten ve bu kitinazı salgılayan bir bakteri türüdür. Test edilen 100 organizma arasında en etkili kitinaz üreticisi olarak belirlenmiştir ve kitinaz üretiminin genetik temeli üzerine yapılan araştırmaların hedefi haline gelmiştir (Sundheim vd., 1988).

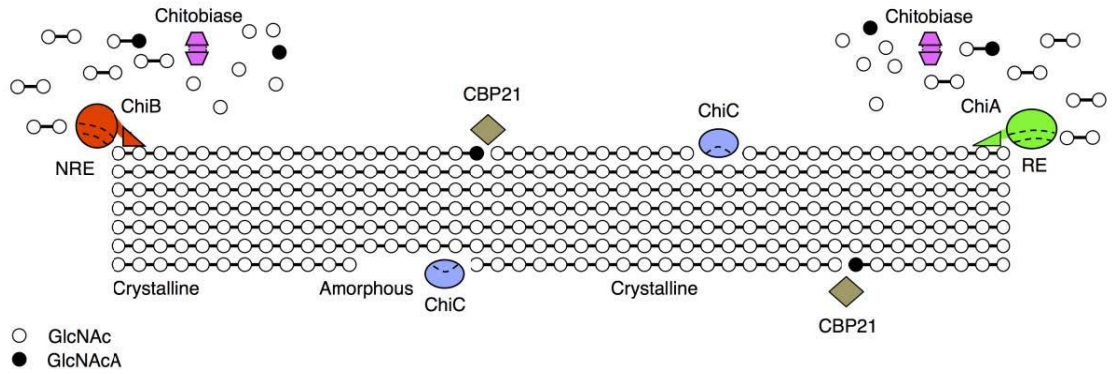
Çizelge 1. 1. *S. marcescens* taksonomik hiyerarşi (ITIS, 2022)

Bilimsel Sınıflandırma	
Üst Alem	<i>Bacteria</i>
Şube	<i>Pseudomonadota</i>
Sınıf	<i>Gammaproteobacteria</i>
Takım	<i>Enterobacterales</i>
Aile	<i>Yersiniaceae</i>
Cins	<i>Serratia</i>
Tür	<i>S. marcescens</i>

Bakterilerin kitinaz üretme sebebi, azot ve karbonu besin kaynağı olarak kullanmasını sağlamak olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda bu enzim esas olarak kitinin parçalanması ve bir enerji kaynağı olarak kullanılmasında görev almaktadır. Aynı zamanda *S. marcescens* hastane enfeksiyonlarında rol oynamaktadır ve Amerika Birleşik Devletlerinde'ki bakteriyemi vakalarının %1,4'ünden sorumludur. 5-40 °C sıcaklıklar arasında ve 5-9 aralığında değişen pH seviyelerinde büyüebilmektedir. Diğer gram negatif (-) bakterilerden kazein hidrolizi gerçekleştirme kabiliyetine sahip olması bakımından ayrılır (Rebecca vd., 2013).

S. marcescens gibi bazı bakterilerin kitinaz enzimleri, çeşitli fitopatogenik fungusların sebep olduğu bitki hastalıklarının biyolojik kontrolü için potansiyel ajanlardır. Bu enzimler fungus hücre duvarında bulunan kitini hidrolize etmekte ve böylece fungusların büyümesini inhibe etmektedir. Bunun yanısıra kitinazlar gibi fungal önleyici enzimler, gıda endüstrisinde tohum koruyucu maddeler ve patojen funguslara karşı direnç için potansiyel kullanımları sebebiyle büyük bir biyoteknolojik yöne sahiptir (Hamid vd., 2013).

GH'larda işlemselliği incelemek amacıyla ideal model sistem, *S. marcescens* kullanılarak geliştirilmiş kitinolitik bir sistemdir. *S. marcescens*, işlemsel chiA, işlemsel chiB ve işlemsel olmayan chiC olmak üzere 3 adet GH18 ailesi kitinazı üretir. Bunların yanı sıra, bir GH20 ailesi kitobiaz ve bir litik polisakarit monooksijenaz (CBP21) olmak üzere iki yardımcı enzim üretir. Şekil 1.4.'de gösterildiği gibi, kristal haldeki kitini çözünür şekerlere parçalamak için sinerjistik olarak hareket eder (Jana, 2017).

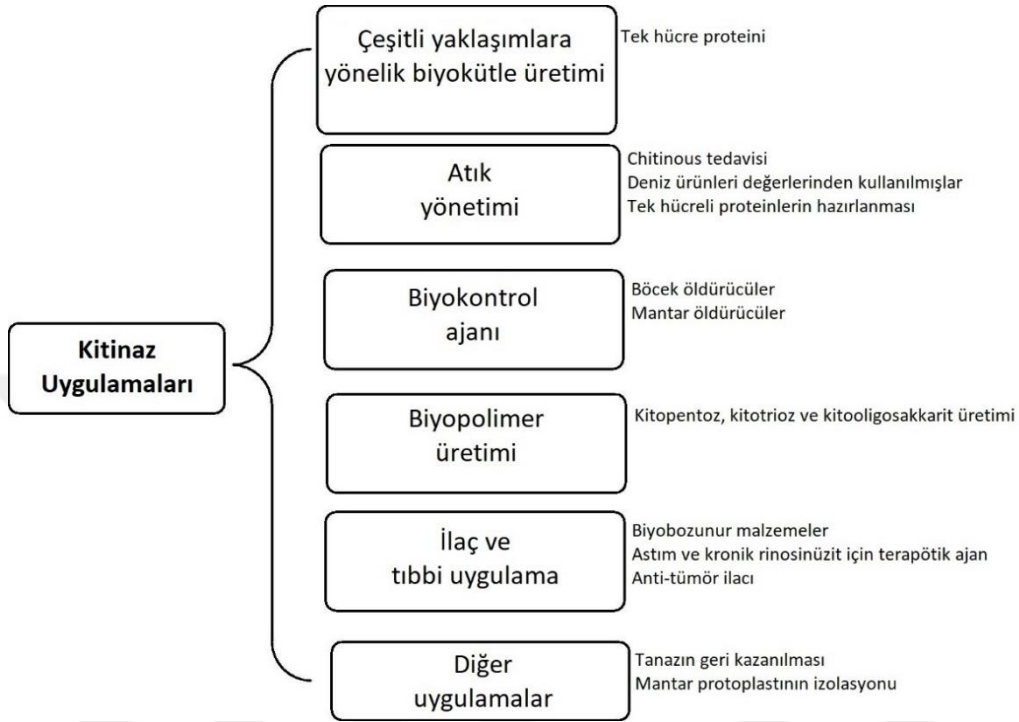


Şekil 1. 4. Kitin yapısını bozmak için *S. marcescens*'in sinerjistik olarak kullandığı kitinazlar ve yardımcı enzimler (Jana, 2017)

Şekil 1.4.'de, kitin substratı (GlcNAc), polimer zincirleri boş daire olarak gösterilmiştir. Burada chiC, erişilebilir zincir uçları oluşturmak için glikozidik bağları hidrolize eder. chiA ve chiB, zincir uçlarına indirgeyici veya indirgeyici olmayan uçtan bağlanır ve disakkaritler üretmek için sırayla glikozidik bağları hidrolize eder. Kitobiaz, disakkaritleri monosakkaritlere dönüştürürken CBP21, chiC gibi, bir polimer zincirin rastgele bir noktasına saldırır ve aldonik asit (GlcNAcA) üretmenin yanı sıra zincir uçları oluşturmak için bakır aracılı kataliz yoluyla glikozidik bağı parçalar (Jana, 2017).

1.3.3. Kitinazların Uygulama Alanları

Kitinazlar tarım, gıda, tıp ve biyoteknoloji gibi birçok alanda önemli uygulamalar göstermiştir. Bu enzimler çevre dostu, ekonomik ve tehlikeli olmadığı için sahada yaygın olarak uygulanabilir.



Şekil 1. 5. Kitinazların uygulama alanları (Singh vd., 2021'den türkçeleştirilmiştir.)

1.3.3.1. Böcek Kontrolünde Kitinazlar

Bitkileri istila eden böcekleri kontrol etmek için çeşitli kimyasal pestisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kullanımlarının yüksek toksisite gibi birçok dezavantajı vardır, bu da birçok hastalığa ve çevresel bozulmaya neden olur (Kumar vd., 2019). Alternatif olarak, biyo-pestisitlerin düşük toksisite, biyolojik olarak parçalanabilirlik, daha iyi uyumluluk ve çevre dostu olma gibi birçok avantajı vardır. Kitinazların böcekler üzerindeki etkisi, kütikül ve böceklerin peritrofik matrisi (PM) üzerindeki tükenme ile açıklanabilir. PM, böcek sindiriminde ve orta bağırsak fizyolojisinde hayati bir rol oynar, orta bağırsak epitelini gıda korozyonundan korur ve patojen enfeksiyonlara karşı fiziksel bir bariyeri temsil eder. Bu gözlemler, mikrobiyal kitinazın haşere biyokontrolü için etkili bir şekilde kullanılabileceğini ve dolayısıyla mahsul verimini artırabileceğini doğrulamıştır. Başka bir deyişle, kitinaz enzimleri çevre dostu mantar ilaçları ve böcek öldürücüler olarak potansiyel uygulamaları kabul edilmiştir (Gomaa, 2021).

1.3.3.2. Endüstriyel Açıdan Kitinazlar

Kitinazların çeşitli endüstriyel ve tarımsal uygulamaları vardır. Kitinazların kitini bozma yeteneği, onları kirliliğin tedavisi için değerli kılar. Ek olarak, kitinazlar mantar protoplast jenerasyonunda, tek hücreli protein üretiminde, biyoaktif kitooligosakkaritlerin hazırlanmasında ve kabuklu deniz ürünleri atıklarının parçalanmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, kitinazlar insan sağlığı hizmetlerinde, mantar hastalığı tedavisinde ve antifungal kremlerde katkı maddesi olarak kullanılabilir (Dahiya vd., 2006).

1.3.3.3. Biyokontrol Ajanı Olarak Kitinazlar

Kimyasal böcek öldürücülerin ve pestisitlerin olumsuz etkileri ve patojenik mikropların dirençli suşlarının gelişmesi, günümüzde biyolojik kontrol yöntemlerine olan ilgiyi arttırmıştır. Düşük maliyet ve bitkilerin yaşayabilirliğini artırma yeteneği, biyokontrol ajanı mikroorganizmalara daha fazla dikkat çekmektedir (Sharma vd., 2009). Kitinazlar, bitkilerde çok çeşitli mantar, viral ve böcek patojenlerine karşı bir savunma eylemi sağlar. Böylece, biyoinsektisitler ve biyopestisitler olarak verimli bir şekilde kullanılabilirler. Kitinazların anti-fungal özelliği, kitin üzerindeki hidrolitik etkisinden kaynaklanmaktadır. Kitinazlar ayrıca bitkiler tarafından salgılanan patojenle ilişkili proteinlerden biri olarak tanımlanmıştır. Hasat sonrası hastalıklar, bazı mikroorganizmaların güçlü antifungal etkileri nedeniyle kitinazların yardımıyla da kontrol edilebilir. Gıda koruması, hücre duvarına zarar veren ve spor çimlenmesini önleyen kitinaz kullanılarak da yapılabilir, bu nedenle gıda bozulmasını azaltabilir. Bakterilerden elde edilen kitinolitik enzimler, kitin birikimi girişimi eğilimleri nedeniyle biyoinsektisidal bir ajan olarak incelenmiştir. Bu nedenle, bu çalışmalar çeşitli bakteri ve mantar kitinazlarının biyolojik kontrol ajanları olarak yararlı rolünü göstermektedir (Singh vd., 2021).

1.4. *Myzus Persicae*

M. persicae (şeftali yaprak biti), tarım ve bahçe bitkileri için ekonomik olarak önemli bir zararlıdır çünkü bu yaprak biti bitki besinleriyle beslenerek doğrudan ve birçok virüs vektörünü taşıyarak dolaylı zarara neden olur. Bu türün dağılımı, konakçı aralığı, bitki hasarı mekanizmaları, yaşam döngüsü, dağılıma kapasitesi ve insektisitlere karşı direnç geliştirme yeteneği de dahil olmak üzere bir haşere olarak durumunu artıran bir

dizi faktör vardır (Bass vd., 2011). Ne yazık ki, yeşil şeftali yaprak biti organofosfatlar, karbamatlar ve piretroidler de dahil olmak üzere birçok kimyasal böcek ilacına karşı çoklu direnç geliştirmiştir. Ayrıca, pestisitlerin aşırı kullanımı çevre kirliliğinin yanı sıra insan ve diğer organizmaların sağlığı üzerinde zararlı etkilere yol açmıştır (Lee vd., 2015). *M. persicae*, hem dünya çapında bir dağılıma sahip son derece kozmopolit bir türdür hem de ekonomik açıdan önemli birçok mahsul bitkisi de dahil olmak üzere 40 farklı bitki ailesinde 400'den fazla türden oluşan bir ev sahibi yelpazesine sahip oldukça polifagot bir türdür (Bass vd., 2014).

Çizelge 1. 2. *M. persicae* taksonomik hiyerarşi (ITIS, 2022)

Bilimsel Sınıflandırma	
Alem	<i>Animalia</i>
Şube	<i>Arthropoda</i>
Sınıf	<i>Insecta</i>
Takım	<i>Hemiptera</i>
Alt Takım	<i>Sternorrhyncha</i>
Aile	<i>Aphididae</i>
Cins	<i>Myzus</i>
Tür	<i>M. persicae</i>



Şekil 1. 6. *M. persicae* nimf görüntüsü (AphidTrek, 2022)

1.4.1. *M. persicae* Yaşam Döngüsü

Yaşam döngüsü, soğuk kışların varlığına bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. Gelişim hızlı olabilir, tam bir nesil için genellikle 10 ila 12 gün ve ılıman iklimlerde 20'den fazla yıllık nesil rapor edilmiştir. Uygun konukçu bitkilerin kalıcı olmadığı yerlerde yaprak biti *Prunus* türleri üzerinde yumurta aşamasında kışı geçirir. İlkbaharda, bitki dormansiyi kırıp büyümeye başladıktan kısa bir süre sonra yumurtalar çatlar ve nimfler çiçekler, genç yapraklar ve gövdelerle beslenir. Birkaç nesil sonra, kışı geçiren *Prunus* türlerinden gelen kanatlı dağıtıcılar, nimfleri yaz konukçuları üzerine bırakır. Soğuk iklimlerde, erginler sonbaharda *Prunus* türlerine geri döner, burada çiftleşme gerçekleşir ve yumurtalar bırakılır. Yumurta üretimiyle sonuçlanan sonbahar nesli dışındaki tüm nesiller partenogenetiktir (Anstead, 2015).

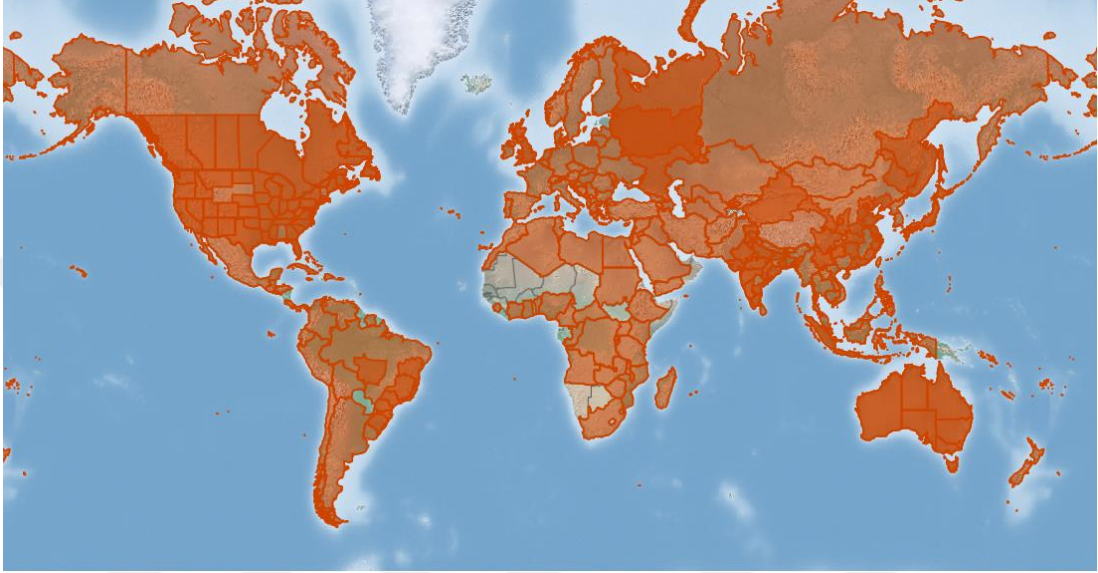


Şekil 1. 7. *M. persicae* yetişkin görüntüsü (AphidTrek, 2022)

1.4.2. *M. persicae* Zararları

Doğrudan besleme hasarı bodurluğa ve kök ağırlığının azalmasına neden olabilir, ancak çoğu ürünlerdeki popülasyonlar, kloroz veya yaprak kıvrılması gibi belirgin semptomlara ve ilişkili isli küflü bol miktarda bal çiy üretimine neden olan seviyelere ulaşmaz. Bununla birlikte, patatesler üzerindeki doğrudan hasardan önemli verim kayıpları ortaya çıkabilir (Sexson vd., 2005). İlkbaharda ise şeftalide ve seralardaki biber ve çiçek bitkilerinde yaprakların gözle görülür şekilde bozulması meydana gelebilir. *M. persicae*, patateslerin yetiştirildiği her yerde büyük bir zararlıdır. Yaprak rulosu ve yumru çürüklüğü nekrozuna neden olan patates yaprağı virüsünün (PLRV) en önemli vektörüdür. Tohumluk patatesler PLRV için düşük toleransa sahiptir ve

düşük yaprak biti popülasyonları çok zararlı olabilir. Pancar sarılarına bağlı şeker pancarındaki verim kayıpları, enfeksiyon mevsimin başlarında meydana gelirse daha ciddidir ve %30-50'ye kadar çıkabilir, hasat edilen şekerde bulunan safsızlıklarda da bir artış olabilir. Şeftalide (birincil konakçı), yaprak biti genç yaprakların ve nektarinlerin bükülmesine, genç meyvelerin çukurlaşmasına ve renk değişikliğine neden olur (Barbagallo vd., 2007).



Şekil 1. 8. CABI'ye göre *M. persicae*'nin dünya üzerinde dağılım haritası (CABI, 2022)

1.5. Amaç ve Kapsam

Tez çalışmasının amacı, *S. marcescens* GBS19 izolatına ait kitinaz A'nın *M. persicae*'ya karşı biyolojik mücadelede kullanımının biyolojik ve çevre dostu bir çözüm önerisi olarak ortaya konmasıdır. Projenin çıkış noktası olan bu amaç doğrultusunda, tez çalışmasında *S. marcescens* GBS19 izolatı genomu içerisinde bulunan kitinaz A gen bölgesinin, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak çoğaltılması, çoğaltılan genin klonlanması sonrasında ekspresyonu ile kitinaz enziminin üretiminin sağlanması, enzim ve substrat arasında etkileşimin ne ölçüde gerçekleştiğinin ileri simülasyon programları ile belirlenmesi daha sonrasında da elde edilen enzimin aktivite tayini testlerine tabii tutulması ve son olarak *M. persicae* üzerine insensetisidal aktivite testi gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Kullanılan kimyasallar

Kimyasal İsmi	Marka
Acetic Acid	Merck
Acrylamide/Bisacrylamide	Sigma
Agar Bacteriological	Sigma
Agarose	Biomax
Ampicilin	Thermo Scientific
Bovine Serum Albumin	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
Chitin-azure	Sigma
Coomassie Brillant Blue G-250	Sigma
EDTA	AppliChem
Ethidium Bromide	Thermo Scientific
FastDigest BamHI	Thermo Scientific
FastDigest HindIII	Thermo Scientific
FastStart Essential DNA Green Master Mix	Roche
Glycerol	Sigma
High Fidelity Master Mix	Ampliqon
IPTG	Gold Biotechnology
Isopropanol	Merck
Loading Buffer	Ampliqon
Mercaptoethanol	Sigma
NaOH	Merck
Nutrient Broth	Merck
pBluescript II KS (+)	Fermentas

PCR Grade water	Ampliqon
pET-22b (+)	Fermentas
SDS	Merck
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific
TAE	Ecotech Biotechnology ClearBand
Tryptone	Sigma
X-GAL	Thermo Scientific
Yeast Extract	Sigma

2.1.2. Kullanılan Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Kullanılan kitler

Kit İsmi	Marka	Katalog Numarası
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	Thermo Scientific	#K0721
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific	#K0691
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific	#K0701
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific	#K0502
Protino Ni-TED 150 Packed Columns	Machery-Nagel	#745100.10
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific	#K1622
GeneJET RNA Purification Kit	Thermo Scientific	#K0732

2.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 3. Kullanılan cihazlar

Cihaz İsmi	Marka ve Model
Çalkalamalı İnkübatör	Daihan Sci. IS-20R
Elektroforez Sistemi	Consort midi-plus horizontal unit EHS1300

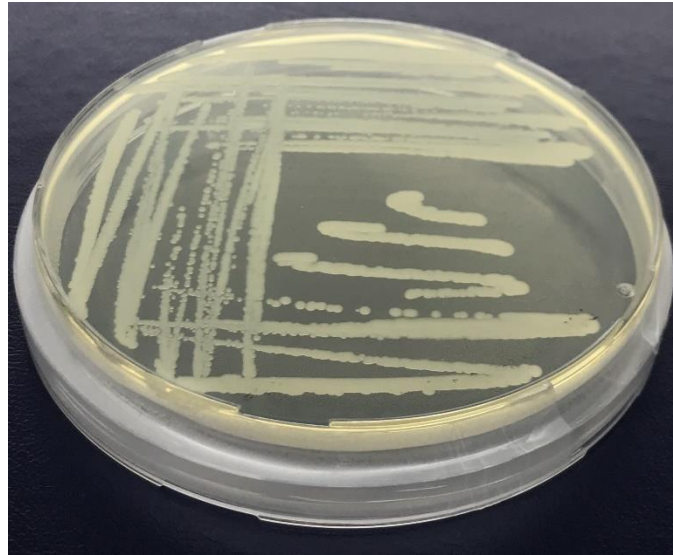
Elektroporasyon Sistemi	Bio-Rad Gene Pulser Xcell Total System
Etüv	Elektromag M6040P
Hassas Terazi	A&D Company HR-250AZ
Jel Görüntüleme Sistemi	Quantum Vilber Lourmat
Mikrodalga Fırın	Vestel MW20-S
Otoklav	Nüve OT40L
Otomatik Pipet Seti	Thermo Sci. Finepipette 2
PCR Cihazı	Blue-Ray Biotech TurboCycler Lite
pH Metre	Thermo Sci.Star A211
Real Time PCR Sistemi	Roche LightCycler 96 SW
Santrifüj	Elektromag
SDS-PAGE Sistemi	Thermo Sci. Owl Dual-Gel Vertical P8DS
Shaker	Thermo Sci. Compact Digital Mini
Soğutmalı İnkübatör	Elektromag M7040R
Soğutmalı Santrifüj	Nüve NF-800R
Su Banyosu	Mikrotest MSB-30
Ultrasonik Su Banyosu	İsolab
UV Spektrofotometre	Thermo Sci. Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer
UV Transimülatör	Daihan Scientific WUV-M20
Vortex	Four'es
Buzdolabı	Vestel NF450
-80°C Buzdolabı	New Brunswick Sci. U410

2.2. Yöntemler

2.2.1. *Serratia Marcescens* GBS19 İzolatı Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, GeneJET Genomic DNA Purification Kit kullanılarak yapılmıştır. *S. marcescens* GBS19 suşu gram negatif (-) bir bakteri olduğundan protokol bu bilgiye göre şekillendirilmiştir. Koloidal kitinli katı besiyerinde büyütülmüş bakteriden tek koloni alınarak 5 mL LB besiyerine ekilmiştir ve 37°C 180 rpm'de inkübasyona bırakılarak 16 saat büyütülmüştür. İnkübasyondan sonra sıvı

kültürün 2 mL'si 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı dökülmüştür. Pelet 180 µL Digestion Solution içinde yeniden süspanse edilmiştir. 20 µL Proteinase K Solution eklenmiştir ve homojen hale gelene kadar pipetlenerek iyice karıştırılmıştır. Çalkalamalı kuru blok ısıtıcıda 56°C'de 60 rpm'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Karışım üzerine 20 µL RNase A Solution eklenmiştir ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Numuneye 200 µL Lysis Solution eklenerek homojen bir karışım elde edinceye kadar vortekslenmiştir. 400 µL %50 etanol eklenmiştir ve pipetlenerek karıştırılmıştır. Hazırlanan lizat ependorf tüp içeren saflaştırma kolonuna aktarılmıştır. Kolon 6000 x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolonun altındaki ependorf atılmıştır ve kolon yeni bir ependorf tüpe yerleştirilmiştir. 500 µL Wash Buffer I eklenerek 8000 x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Ependorfa aktarılan sıvı (akış) dökülmüştür ve ependorf kolona geri yerleştirilmiştir. 500 µL Wash Buffer II eklenerek 14000 x g'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Etanol kalıntısını engellemek amacıyla ek adım olarak 18000 x g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır ve akış içeren ependorf atılarak kolon yeni bir ependorf içerisine yerleştirilmiştir. Genomik DNA'yı elute etmek için kolonun merkezine 100 µL Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrası 8000 x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolon atılmıştır ve saflaştırılmış DNA'yı içeren ependorf sonraki uygulamalar için -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. 1. *S. marcescens* GBS19 çizgi plaka ekim petri görüntüsü

2.2.2. Spektrofotometrik Analiz ve Agaroz Jel Elektroforezi

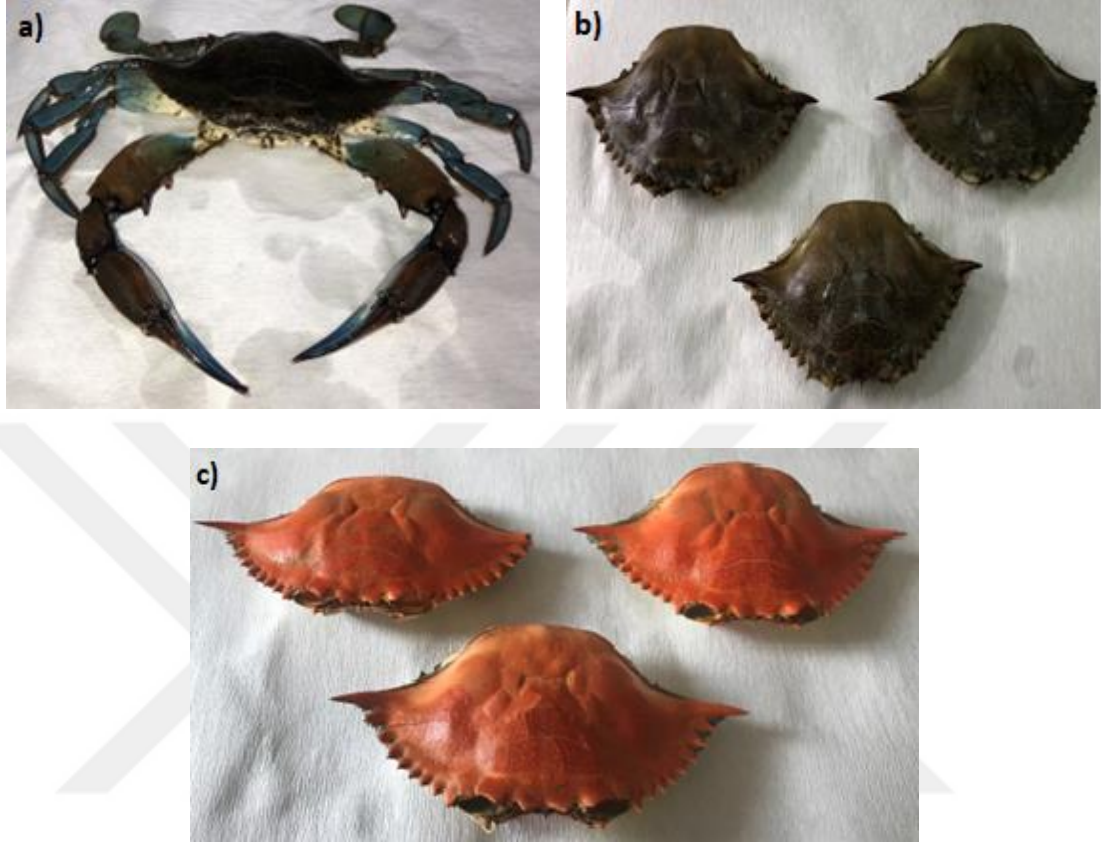
Elde edilen genomik DNA miktarı ve saflığı ölçmek amacıyla spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Aynı zamanda genomik DNA'nın başarılı bir şekilde izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için agaroz jel elektroferez işlemi gerçekleştirilmiştir. İlk olarak hassas terazi ile 1 g agaroz tartılıp 100 mL 1X TAE tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanarak çözülmüştür. Sıcaklık yaklaşık 50°C'ye geldiğinde içerisine 5 µL (0,5 µg/mL) etidyum bromür eklenmiştir ve jel dökme tepsinine dökülüp 30 dk katılaşması beklenmiştir. Katılaştıktan jelden taraklar çıkartılıp 1X TAE tamponu içeren elektroferez içerisine yerleştirilmiştir. İlk kuyucuğa GeneRuler 1 kb DNA markeri yüklenmiştir ve hemen ardından diğer kuyucuklara 10 µL DNA ve 2 µL yükleme tamponu homojen hale getirilip yüklenmiştir. Jel 90 V sabit akımda 50 dakika boyunca yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında jel, görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir (Görmez, 2011).

2.2.3. Kolloidal Kitin Hazırlanması

2.2.3.1. Mavi Yengeç Kabuklarından Kitin Elde Edilmesi

Kullanılacak olan *Callinectes sapidus* (Mavi yengeç)'ler, Muğla'nın Ortaca ilçesine bağlı Dalyan mahallesi balık pazarından temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen mavi yengeçlerin kabukları gövdelerinden dikkatli bir şekilde ayrılmıştır. Kabuklar distile su ile yıkandıktan sonra filtre kâğıdı yardımıyla fazla sudan arındırılmıştır. Sonrasında etüv içerisinde 70°C'de 24 saat kurumaya bırakılmıştır. 24 saat tamamlandıktan sonra kurumuş kabuklar havanda öğütülerek toz haline getirilmiştir. Yengeç kabuklarından kitin ve kitosanın çıkarılması amacı ile ilk olarak kabuklardan proteinlerin arındırılması işlemi yapılmıştır. Bu işlem, 2.5 N'lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi kullanılarak kabukların 6 saat boyunca çözelti içerisinde bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Proteinlerinden arındırılmış kabuklar distile su ile yıkanmıştır ve filtre kağıdından süzülerek 70°C'de 4 saat kurumaya bırakılmıştır. Ardından kabuklarda bulunan minerallerin uzaklaştırılması için kurutulmuş kabuklar 6 saat 1.7 M hidroklorik asit (HCl) çözeltisinde bekletilmiştir. Aynı şekilde proteinlerden arındırma işleminden sonra kullanılan kurutma yöntemi tekrarlanmıştır. Daha sonra renksizleştirme işlemi amacıyla örnekler beyaz hale gelene kadar güneş ışığı altında bekletilmiştir. Örneklerin beyaz hale getirilmesinin ardından asetil gruplarının uzaklaştırılması için %40'lık NaOH çözeltisi içerisinde 2 saat bekletilmiştir ve filtre

kâğıdı yardımıyla süzülerek etüv içerisinde 60°C’de kurumaya bırakılmıştır (Chang vd., 1997). Proteinlerden ve minerallerden arındırılarak toz haline getirilmiş kitin kullanıma hazır biçimde +4°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2. 2. a) *C. sapidus*, b) *C. sapidus* kabuk, c) *C. sapidus* kurutulmuş kabuk görüntüleri

2.2.3.2. Kitinin Koloidal Hale Getirilmesi

Elde edilen toz halindeki kitinden 2 g tartılarak beher içerisine konulmuştur. Üzerine yavaş yavaş 40 mL konsantre HCl eklenmiştir ve manyetik karıştırma ile kitin çözdürülmüştür. Sonrasında çözelti içerisine 100 mL distile su eklenerek kitinin çöktürülmesi sağlanmıştır. Çözelti haline gelen örnekler +4°C’de 5000 x g’de 20 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet distile su içerisinde çözdürülmüştür. Bu işlem çözeltinin pH’sı 3.5 üzerine çıkana kadar tekrarlanmıştır (Hsu ve Lockwood, 1975). Koloidal hale getirilen kitin 15 mL’lik falkon tüplerine alınmıştır ve falkon tüplerinin etrafı ışık geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Aktivasyon deneylerinde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

2.2.4. chiA Gen Bölgesine Spesifik Primer Tasarımı

Full genom sekansı elimizde bulunan *S. marcescens* GBS19 (NCBI Assembly: GCA_021474915)'a ait chiA gen bölgesini çoğaltmak amacıyla ileri ve geri primerleri tasarlanmıştır. Primer tasarımı yapılırken, PCR ürünü ve kullanacağımız klonlama-ekspresyon vektörlerine ligasyonu kolaylaştırmak amacıyla kısıtlama enzimlerinin dizileri primerlerin 5' uçlarına eklenmiştir. Kısıtlama enzimleri seçilirken vektörlerin çoklu klonlama bölgelerinde (MCS) bulunma durumları ve kullanılacak gen bölgelerindeki yokluğuna dayalı olarak dikkatli bir şekilde seçim yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda kısıtlama bölgeleri HindIII (5'...AAGCTT...3') ve BamHI (5'...GGATCC...3') olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda enzimlerin saflaştırılma basamağında kullanılacak olan histidin etiketli pET-22b(+) vektörüne klonlanacak gen bölgelerinin stop kodunu bulundurmaması gerekmektedir. Bu amaçla gen bölgelerinin sonlarında bulunan TAA stop kodonları primerler tasarlanırken elimine edilmiştir. Primer tasarımları Primer3 programı kullanılarak yapılmıştır. Primerlerin listesi ve dizileri verilmiştir (Çizelge 2.4.). İleri ve geri primerler Oligomer (Ankara) firması tarafından sentezlenmiştir.

Çizelge 2. 4. chiA gen bölgesi primer dizileri

Primerler ve Kesim Enzimleri	Sekanslar	Uzunluk (bp)
chiA-Fw (BamHI)	5'-CCC <u>GGATCC</u> ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTG-3'	33
chiA-Rv (HindIII)	5'-CCC <u>AAGCTT</u> TTTGAACGCCGGCGCTGTT-3'	27

2.2.5. chiA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

İzole edilen *S. marcescens* GBS19 genomik DNA'sı PCR reaksiyonlarında şablon olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonları, 50 µL son hacimde gerçekleştirilmiştir. 0.2 mL PCR tüpü içerisine 25 µL 2X High Fidelity Master Mix, 1 µL (10 µM) ileri primeri, 1 µL (10 µM) geri primeri, 4 µL (200 ng) genomik DNA eklenmiştir ve PCR grade water ile 50 µL'ye tamamlanmıştır (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2. 5. PCR bileşenleri ve miktarları

Komponent	Vol/Reaksiyon	Son Konsantrasyon
2X Master Mix	25 µL	1X
İleri Primer (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Geri Primer (10 µM)	1 µL	0.2 µM
Genomik DNA	4 µL	200 ng
PCR Grade water	19 µL	-
Toplam Hacim	50 µl	-

Reaksiyon bir termal cycluser kullanılarak 35 döngü amplifikasyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. *chiA* gen bölgesini çoğaltmak için her bir döngüde kullanılan sıcaklık ve süreler; 94°C’de 1 dk denatürasyon, 65°C’de 1 dk tavlama, 72°C’de 2 dk uzama ve 72°C’de 10 dk son uzama şeklindedir. Reaksiyonlar ilk olarak 3 dk boyunca 94°C’lik başlangıç denatürasyon sıcaklığı ile başlatılmıştır (Çizelge 2.6.). Reaksiyon sonucunda oluşan PCR ürünü, görselleştirilmek amacıyla 0.5 µg/mL etidyum bromür (EtBr) içeren %0,8’lik agaroz jelde 90 V’ta 50 dk boyunca yürütülmüştür.

Çizelge 2. 6. PCR Basamakları

chiA			
Basamak İsmi	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94	3	1
Denatürasyon	94	1	35
Tavlama	65	1	
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	10	1

2.2.6. *chiA* Gen Bölgesi ve Klonlama Vektörünün Kesim Enzimleri ile Muamelesi

PCR sonucu çoğaltılan *chiA* gen bölgesi ve klonlamada kullanılacak olan pBluescript II KS (+) vektörü ligasyon basamağında kullanılmak üzere kesim enzimleri ile muamele edilmiştir. Kesim reaksiyonlarında kullanılacak enzimler, FastDigest HindIII ve FastDigest BamHI firmanın verdiği protokole göre hesaplama yapılarak reaksiyona katılmıştır. PCR ürünleri ve plazmid DNA için kullanılan miktarlar gösterilmiştir (Çizelge 2.7).

Çizelge 2. 7. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim

Bileşenler	Plazmid DNA (pBluescript II KS (+))	PCR Ürünü (chiA)
Nuclease Free Water	14 µL	16 µL
10X FastDigest Green Buffer	2 µL	2 µL
DNA	2 µL	10 µL
FastDigest HindIII	1 µL	1 µL
FastDigest BamHI	1 µL	1 µL
Toplam Hacim	20 µL	30 µL

Plazmid DNA'nın kesilmesi için gerekli olan bileşenler tüp içerisine konulmuştur ve kesim enzimlerinin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C'de kuru blok ısıtıcı içerisinde 15 dk boyunca tutulmuştur. İnkübasyon sonrası enzimlerin inaktivasyonu için ise 80°C'de 10 dk bekletilmiştir. Aynı işlem PCR ürünleri için de gerçekleştirilmiştir fakat HindIII enziminin plazmid DNA'dan farklı olarak PCR ürünlerini sindirme süresi 20 dk olduğu için 37°C'de 20 dk bekletilmiştir. Reaksiyonlardan sonra kesim ürünleri 90 V'da %1'lik agaroz jel'de 50 dk yürütülmüştür ve jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

2.2.7. Kesilmiş PCR Ürünü ve Klonlama Vektörünün Saflaştırılması

Kesim enzimleri ile muamele edilmiş PCR ürünü ve plazmid DNA'nın ligasyon basamağında kullanılmak üzere saflaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesilen PCR ürünü saflaştırılması için GeneJET PCR Purification Kit kullanılmıştır. Her bir PCR ürünü için 100 µL örnek ependorf tüp içerisine konulmuştur ve üzerine 1:1 hacminde Binding Buffer eklenmiştir. Çözelti pipetaj yardımıyla iyice karıştırılmıştır. Homojen hale gelen karışım saflaştırma kolonuna aktarılmıştır. 45 sn 14000 x g'de santrifüjlenmiştir ve santrifüj sonrası akış atılmıştır. Kolona 700 µL Wash Buffer eklenmiştir ve 14000 x g'de 45 sn santrifüjlenmiştir. Aynı şekilde akış atılmıştır ve kolon, tüp üzerine tekrar yerleştirilmiştir. Etanol kalıntılarını ortadan kaldırmak amacıyla kolon 1 dakika boyunca 18000 x g'de santrifüj edilmiştir. Kolon temiz bir ependorf tüp içerisine alınmıştır ve kolon merkezine 50 µL Elution Buffer eklenerek 14000 x g'de 1 dk santrifüjlenmiştir. Elüsyon yapılan saflaştırılmış PCR ürünü ligasyonda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

Kesilen plazmid DNA'nın saflaştırılması için ise GeneJET Gel Extraction Kit kullanılmıştır. UV Transimülatör üzerinde görüntülenen 70 µL örnek içeren jel kuyucuğu temiz bir neşter yardımıyla kesilmiştir. Daha önceden darası alınmış ependorf tüp içerisine koyulmuştur ve tartılmıştır. Jel diliminin ağırlığı kadar 1:1 hacminde Binding Buffer eklenmiştir ve 60°C'de jel dilimi tamamen eriyene kadar inkübasyona bırakılmıştır. Jel tamamen çözündükten sonra çözelti saflaştırma kolonuna aktarılıp 1 dk 14000 x g'de santrifüjlenmiştir ve alt kısım atılmıştır. Kolona 700 µL Wash Buffer eklenmiştir ve aynı şekilde 1 dk santrifüjlenip akış atılmıştır. Boş kolon kalan yıkama tamponunu çıkarmak amacıyla 1 dk daha ekstra olarak santrifüjlenmiştir. Son olarak kolona 50 µL Elution Buffer eklenmiş ve 14000 x g'de 1 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Saflaştırılan plazmit DNA ligasyon basamağına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

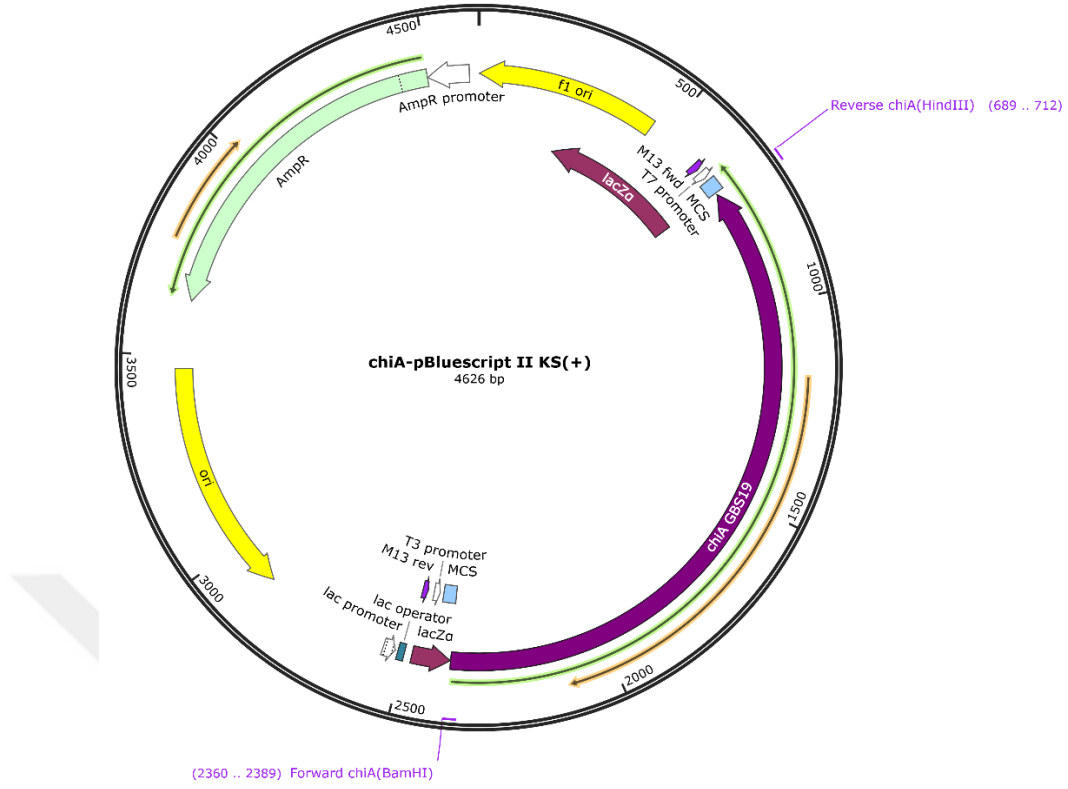
2.2.8. Saf chiA Ürününün pBluescript II KS (+) Vektörüne Ligasyonu

Saflaştırılmış ürünlerin konsantrasyonları spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Kullanılacak miktarlar <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> kullanılarak hesaplanmıştır. Bu değerler doğrultusunda ligasyon için kullanılan miktarlar verilmiştir (Çizelge 2.8.).

Çizelge 2. 8. Ligasyon basamağında kullanılan bileşenler ve miktarlar

Bileşenler	Miktarlar
T4 DNA Ligase (5U/µL)	1 µL
2X Reaction Buffer	10 µL
pBluescript II KS (+) (20 ng/µL)	3 µL
Saf chiA PCR Ürünü (50 ng/µL)	3 µL
Nuclease Free Water	3 µL
Toplam Hacim	20 µL

0.2 mL PCR tüpü içerisinde karıştırılan ligasyon bileşenleri 16°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda chiA gen bölgesinin klonlama vektörüne insert edilmiş hali Snapgene uygulaması kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 2.3.).



Şekil 2. 3. Gen bölgesi ve klonlama vektörünün ligasyonunun sanal görüntüsü

2.2.9. Elektrokompentant Bakteri Hazırlama

Klonlama için kullanılacak *Escherichia coli* TOP10 ve ekspresyon basamağında kullanılacak *E. coli* BL21(DE3) bakterileri gece boyunca sıvı LB kültürde 180 rpm 37°C’de büyütülmüştür. Üretilen bakterilerin her birinden 1’er mL alınarak falkon içerisinde öncesinde hazırlanan 50 mL boş LB besiyerlerine ayrı ayrı eklenmiştir. Bakterileri içeren falkonlar çalkalamalı inkübatörde 37°C’de 255 rpm’de OD₆₀₀ değeri 0,6 oluncaya kadar büyütülmüştür. Bu işlem sırasında her yarım saatte bir OD₆₀₀ ölçümü yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 0,6’ya geldiğinde üretim sonlandırılmıştır ve buz üzerine alınıp 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 4000 x g’de 15 dk boyunca +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır ve oluşan bakteri pelleti 50 mL soğuk %10 gliserol çözeltisi ile çözülmüştür. Süspansiyon hale gelen örnekler 15 dk boyunca 4000 x g’de +4°C’de santrifüjlenmiştir. Süre sonunda süpernatant dökülüp pellet 25 mL soğuk %10 gliserol çözeltisi ile çözülmüştür ve aynı şekilde santrifüj edilip süpernatant kısmı atılmıştır. Tekrarında 4 mL %10 gliserol çözeltisinde süspansiyon edilip santrifüjlenmiştir ve süpernatant kısmı atılmıştır. Son olarak pellet 1 mL %10 gliserol çözeltisi ile süspansiyon edilmiştir ve

kompetan hale getirilmiş bakteriler 30 µL şeklinde alikotlanarak -80°C'de transformasyon işlemine kadar saklanmıştır (Bio-Rad, 2022)

2.2.10. Ligasyon Ürününün Elektrokompentan Bakteri (One Shot TOP10)'ye Transformasyonu

Bu işlem Bio-Rad Gene Pulser Xcell Total System cihazı kullanılarak yapılmıştır. -80°C'de muhafaza edilen kompetan bakteri buz üzerine alınmıştır ve eritilmiştir. 0.2 cm'lik elektroporasyon küveti de buz üzerine alınmıştır. Boş bir ependorf tüpü içerisine 30 µL kompetan bakteri ve 2 µL ligasyon ürünü eklenmiştir. İyice karıştırılıp 1 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Cihaz üzerinde ana ekrandan bakteri protokolü seçilmiştir. Bakteri-ligasyon karışımı buz üzerindeki küvete aktarılmıştır ve küvet ShockPod'a yerleştirilip hazne kapağı kapatılmıştır. Pulse tuşuna basılmıştır ve işlem bittikten sonra küvet haznedan çıkarılmıştır. Küvet içerisine oda sıcaklığına getirilmiş 1 mL SOC medium eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır. Karışım ependorf tüpe alınmıştır ve 1 saat boyunca 225 rpm'de 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında transforme edilen bakteri süspansiyonlarından 20 µL alınıp AMP (100 µg/mL) +X-GAL (20 mg/mL) +IPTG (100 mM) içeren LB katı besiyerine ekilmiştir ve petriyerler 16 saat boyunca 37°C'de büyümeye bırakılmıştır. 16 saat sonra mavi beyaz koloni seçimi yapılarak pozitif (beyaz) koloniler seçilmiştir. Burada mavi beyaz koloni seçimi yapabilmek için lacZ geni içeren pBluescript II KS (+) klonlama vektörü seçilmiştir.

2.2.11. Transforme Bakterilerden Plazmit DNA İzolasyonu

Transformasyon işlemi sonrası petriyerlerden seçilen beyaz koloniler içerisinden plazmit DNA izolasyonu GeneJET Plasmid Miniprep Kit kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak pozitif koloniler 4 mL sıvı LB+AMP besiyerine ekilmiştir ve 225 rpm'de 14 saat 37°C inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası bakteriler 6800 x g'de oda sıcaklığında 2 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan pellete 250 µL Resuspension Solution eklenerek tamamen süspansiyon edilmiştir ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp içerisine 250 µL Lysis Solution eklenmiştir ve solüsyon viskoz ve hafif berrak hale gelene kadar tüp ters düz edilerek karıştırılmıştır. Sonrasında tüpe 350 µL Neutralization Solution eklenmiştir ve hızlıca tüp ters düz edilerek bakteri lizati bulanık hale gelene kadar karıştırılmıştır. Hücre kalıntılarını ve kromozomal DNA'yı çöktürmek için 5 dk 13.000 x g'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası sıvı faz kolona aktarılmıştır. Kolon 1 dk santrifüjlenmiştir ve akış atılıp toplama tüpüne geri

yerleştirilmiştir. Kolon içerisine 500 µL Wash Solution eklenip 45 sn 13.000 x g'de santrifüj yapılmıştır ve aynı şekilde akış atılıp kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Bu adım tekrarlanmıştır ve ek olarak etanol kalıntılarından kurtulmak için 1 dk daha santrifüj yapılmıştır. Son olarak kolon yeni bir santrifüj tüpüne alınmıştır ve kolon içerisine 50 µL Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 2 dk beklenmiştir. İnkübasyon sonrası 2 dk boyunca 13.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Spektrofotometre kullanılarak izole edilen plazmit DNA'nın saflık ve konsantrasyonu ölçülmüştür ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

2.2.12. Gen Bölgesinin Sekanslanması

Transforme geni içeren plazmit DNA'ların sekanslarının doğruluğunun saptanması için örnekler Ficus Biyoteknoloji (Ankara) firmasına gönderilmiştir. Gen bölgelerini içeren vektörlerin sekanslanması şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Sıralama kitaplığı Nextera XT DNA Kitaplığı Hazırlama Kiti kullanılarak hazırlanmıştır ve sıralama, Illumina NovaSeq 6000 platformu tarafından eşleştirilmiş uç (PE) 2x150 baz okumaları olarak yapılmıştır.

2.2.13. Transforme Plazmitin ve pET-22b (+) Ekspresyon Vektörünün Restriksiyon Endonükleazlar ile Mumalesi

Sekans sonucu doğruluğu belirlenmiş plazmit DNA'lar içerisinden klonlanan gen bölgelerinin ve ekspresyon için kullanılacak olan vektörün ligasyona hazır hale gelmesi için restriksiyon enzimleri ile kesilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 9. Vektörlerin restriksiyon endonükleazlar ile kesimi

Bileşenler	Ekspresyon Vektörü (pET-22b (+))	Gen Bölgelerini İçeren Klonlama Vektörü (pBluescript II KS (+))
Nuclease Free Water	14 µL	14 µL
10X FastDigest Green Buffer	2 µL	2 µL
DNA	3 µL	3 µL
FastDigest HindIII	1 µL	1 µL
FastDigest BamHI	1 µL	1 µL
Toplam Hacim	20 µL	20 µL

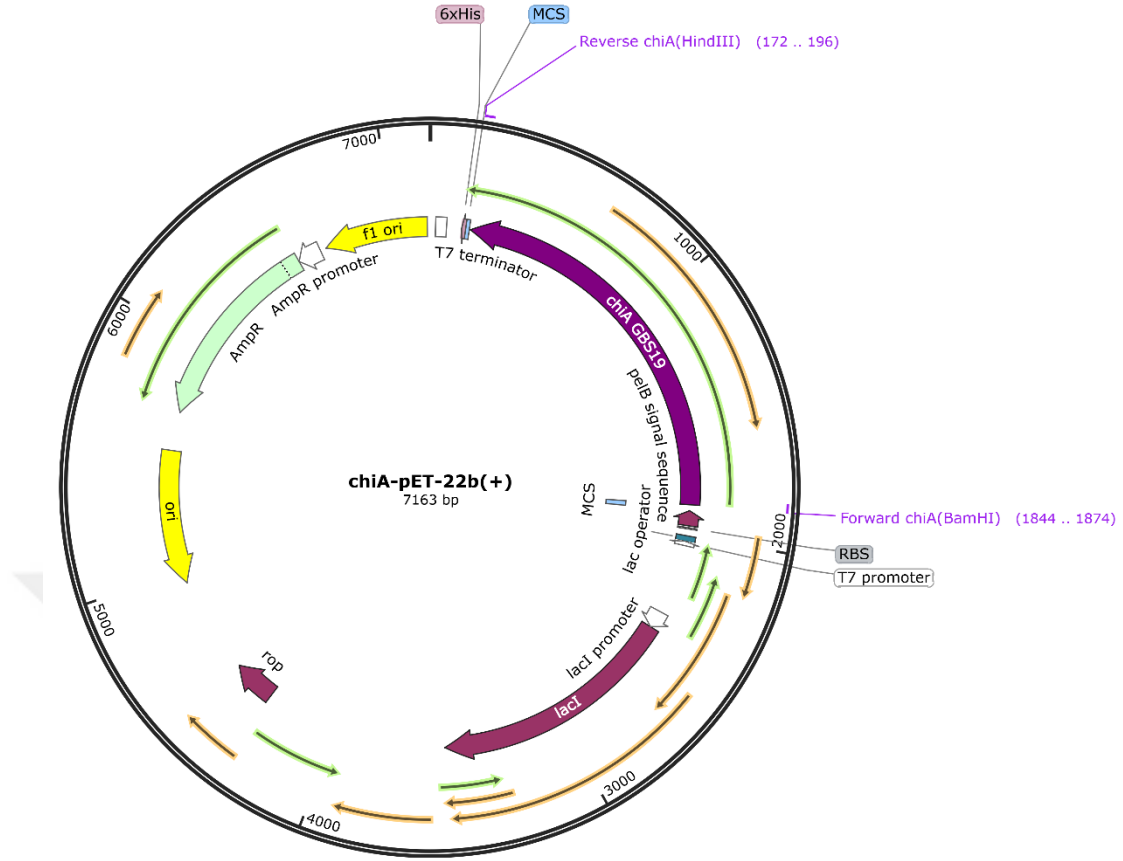
Klonlama ve ekspresyon vektörlerini kesmek için bileşenler 0.2 mL'lik tüpe alınmıştır. Enzimlerin çalışması için 37°C'de 20 dk tutulmuştur. İnkübasyondan sonra kesilen vektörler 90 V'da %0,8'lik agaroz jel'de 40 dk yürütülmüştür ve görüntüleme sistemi kullanılarak görselleştirilmiştir.

2.2.14. Gen Bölgesinin Jelden Ekstraksiyonu ve Ekspresyon Vektörünün Saflaştırılması

Gen bölgelerinin saflaştırılması için GeneJET Gel Extraction Kit kullanılarak işlemler gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon vektörünün saflaştırılması için ise yukarıda anlatıldığı üzere GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır (Bkz. 2.2.7).

2.2.15. chiA Ürününün pET-22b (+) Vektörüne Ligasyonu ve Ligasyon Ürününün *E. coli* BL21(DE3) Elektrokompentan Bakterisine Transformasyonu

Saflaştırılmış chiA geni ve ekspresyon vektörünün konsantrasyonları spektrofotometre de ölçülmüştür. Ligasyon basamağında kullanılacak miktarlar 2.2.8'de belirtildiği üzere hesaplanmıştır ve ligasyon yapılmıştır. Ligasyon sonrasında rekombinant plazmitler elektrokompentan bakteriye tranforme edilmiştir ve 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında petrideki pozitif kolonilerden seçim yapılarak plazmit DNA izolasyonu (Bkz. 2.2.11) yapılmıştır ve chiA genini içeren vektör -80°C'ye kaldırılarak saklanmıştır. chiA gen bölgesinin ekspresyon vektörüne insert edilmiş halini görselleştirmek amacıyla biyoinformatik programı kullanılarak şematize edilmiştir (Şekil 2.4.).



Şekil 2. 4. Gen bölgesi ve ekspresyon vektörünün ligasyonunun sanal görüntüsü

2.2.16. chiA Proteininin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

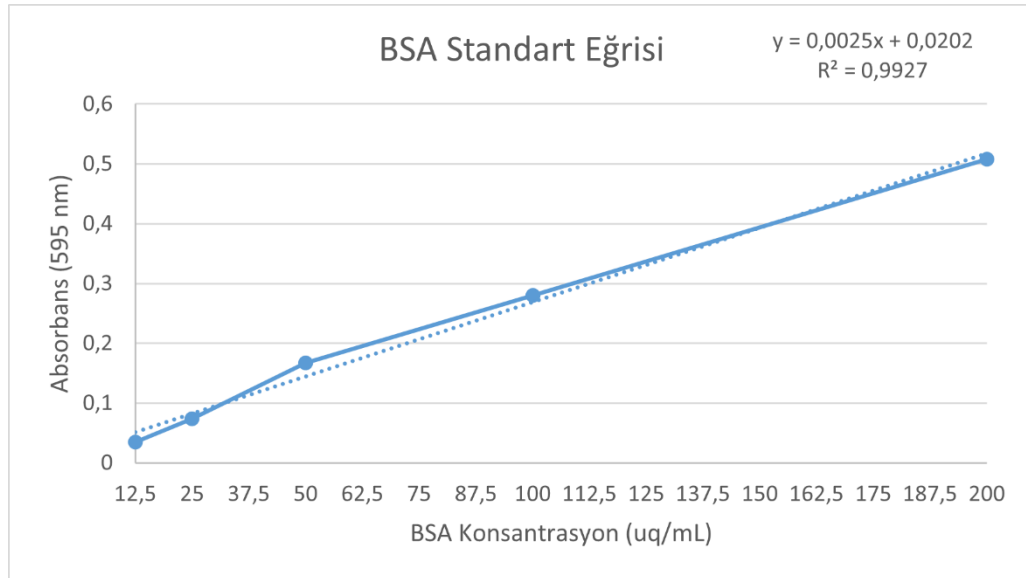
Elde edilen transformantlar AMP (100 µg/mL) içeren 250 mL LB besiyerine ekilmiştir ve OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6'ya ulaşana kadar 37°C'de 225 rpm'de inkübe edilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşıldıktan sonra chiA proteininin ekspresyonu, IPTG (0.5 mM) ilavesiyle 30°C'de indüklenmiştir ve 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 5500 x g'de 4°C'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan yaklaşık 1 g pellet buz üzerinde 3 mL 1X LEW Buffer kullanarak yeniden süspansiyon edilmiştir. Son konsantrasyon 1 mg/mL olacak şekilde lizozim eklenmiştir ve buz üzerinde 30 dk karıştırıcı içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Buz üzerindeki inkübasyon gerçekleştikten sonra örnekler ultrasonik su banyosu içerisinde 10 x 15 s ve aralarda 15 s buz üzerinde inkübasyon olacak şekilde sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ham lizat 4°C'de 30 dk boyunca 10000 x g'de santrifüjlenmiştir. Oluşan pelleti bozmadan süpernatant kısmı temiz bir ependorf tüp içerisine aktarılmıştır. Süpernatant kolona yüklenmeden önce kolonların dengelenmesi için içerisine 320 µL 1X LEW Buffer doldurulmuştur ve yerçekimi ile boşaltması

beklenmiştir. Sonrasında dengelenmiş kolona temizlenmiş süpernatant eklenmiştir ve yerçekimi ile boşalması beklenmiştir. Boşalan kolon 2 defa 320 µL 1X LEW Buffer ile yıkanmıştır. Son olarak elüsyon için 1X Elution Buffer kolon içerisine konularak polihistidin etiketli chiA proteini yeni bir ependorf tüp içerisine aktarılması gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler için Protino Ni-TED 150 Packed Columns kullanılmıştır.

2.2.17. Protein Miktar Tayini ve Toplam Protein Standart Eğrisi

Bradford Yöntemi'ne göre standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılarak protein miktar tayini yapılmıştır (Bradford, 1976).

Standart eğri hazırlanırken ilk olarak BSA, konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde distile su içerisinde çözülmüştür. Çözelti içerisinde 12.5-25-50-100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarında seyreltilmiş standartlar hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlardan 50 µL alınıp ependorf içerisine konulmuştur ve içerisine 150 uL Bradford reaktifi eklenip karıştırıldıktan sonra 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 595 nm'de örneklerin köre göre absorbans değerleri ölçülmüştür. Bulunan absorbans değerlerinden en küçük kareler yöntemi kullanılarak standart eğri çizilmiştir (Şekil 2.5.). Çizilen standart eğri için regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bilinmeyen protein konsantrasyonları bu eğri kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 2. 5. BSA standart grafiği

2.2.18. SDS-PAGE

Çizelge 2. 10. SDS-PAGE bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Running Gel %12	Stacking Gel %4
1.5 M Tris HCl (pH:8.8)	1250 µL	-
0.5 M Tris HCl (pH:6.8)	-	500 µL
%30 Acrylamide/Bis-acrylamide	1500 µL	200 µL
ddH ₂ O	2175 µL	1270 µL
%25 SDS	20 µL	8 µL
%10 APS	50 µL	20 µL
TEMED	5 µL	2 µL
Toplam Hacim	5000 µL	2000 µL

Saflaştırılmış chiA proteininin boyutlarının doğrulanması ve görselleştirilmesi için Çizelge 2.10.'da verilen bileşenler kullanılarak SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. Proteinler Laemmli 2X örnek tamponu içinde 1-1 oranında yeniden süspanse edilmiştir. Süspanse edilen örnekler 95°C'de 5 dk tutulmuştur ve buz üzerine alınmıştır. Jel tankı 1X Running Buffer tamponu ile doldurmuştur ve numunelerin her birinden 30 µg markerden ise 5 µL alınarak jele yüklenmiştir. Örnekler Stacking Gel'den çıkana kadar 60 V'ta yürütülmüştür ve Running Gel'in başlangıç izasına geldiklerinde 120 V'a çıkarılarak numune tamponunun boyası plakanın dibine ulaşana kadar yürütülmüştür (Laemmli, 1970). Bu işlem için Owl Dual-Gel P8DS kullanılmıştır. Örneklerin boyanması ve boyasının alınması Prandeep vd., (2014) kullandığı protokol modifiye edilerek yapılmıştır. Poliakrilamid jel ilk önce bir kap içerisine alınmıştır ve Staining solüsyonu eklenerek 1 dk mikrodalga fırında tutulmuştur, sonrasında 1 saat boyunca çalkalanarak boyanmıştır. Boyamanın ardından jel, distile su ile 3 kez durulanmıştır. Ardından Destaining solüsyonu eklenerek 1 dk boyunca mikrodalga fırında bekletilmiştir. Son olarak protein bantları açıkça görülünceye kadar yavaş yavaş çalkalanarak inkübe edilmiştir.

2.2.19. Rekombinant Plazmiti İçeren *E. coli* BL21(DE3) Bakterilerinden RNA İzolasyonu

chiA gen bölgesinin klonlandığı pET-22b (+) ekspresyon vektörünü içeren *E. coli* BL21(DE3) bakterilerinden RNA izolasyonu yapmak için GeneJET RNA Purification Kit kullanılmıştır. İlk olarak bakteriler, içerisinde bulunan proteini eksprese etmek için çalkalamalı inkübatörde 180 rpm’de 37°C’de OD₆₀₀ değeri 0.4 olana kadar LB besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Bakteriler istenilen büyüklüğe ulaştıklarında son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde IPTG eklenmiştir ve 4 saat boyunca 30°C’de indüklenmiştir. İndüklenen 1.5 mL bakteri kültürü mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır ve 2 dk boyunca 14.000 x g’de santrifüjlenmiştir. Elde edilen pellet, lizozim (0,4 mg/mL son konsantrasyon) ile desteklenmiş 100 µL taze hazırlanmış TE tamponu ile yeniden süspansiyon edilmiştir. Yeniden süspansiyon edilen pellet 25°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. B-mercaptoethanol (1 mL tampon için 20 µL) ile desteklenmiş 300 µL Lysis Buffer eklenmiştir ve 15 s vortekslenerek homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Homojen karışım içerisine 180 µL %96’lık etanol eklenmiştir ve pipetaj yapılmıştır. Elde edilen lizat saflaştırma kolonuna aktarılmıştır ve 1 dk 14.000 x g’de santrifüjlenmiştir. Akış atılmıştır ve kolon içerisine 700 µL Wash Buffer I eklenerek 14.000 x g’de 1 dk santrifüjlenmiştir. Aynı işlem 600 µL Wash Buffer II ile gerçekleştirilmiştir. Yıkama adımının son basamağında 250 µL Wash Buffer II eklenerek 2 dk boyunca 14.000 x g’de santrifüj yapılmıştır ve akış atılıp 1 dk boyunca daha 18.000 x g’de santrifüjlenmiştir. Son olarak kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpü içerisine alınmıştır ve kolonun merkezine 100 µL nuclease free water eklenip 14.000 x g’de santrifüjlenmiştir. Elüsyon sonrasında elde edilen RNA’nın saflığını ve konsantrasyonunu ölçmek amacıyla spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Aynı zamanda izole edilen RNA’nın görüntülenmesi amacı ile agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. İşlemler sonrasında RNA, cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir. Bu işlemler gerçekleştirilirken RNase free reaktifler, pipet uçları ve mikrosantrifüj tüpleri kullanılmıştır.

2.2.20. Total RNA’dan cDNA Sentezi

Bu işlem için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit protokolü kullanılmıştır ve kit içerisinde bulunan protokole göre adımlar gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.11.’de verilen bileşenler sırasıyla buz üzerinde nükleaz içermeyen tüp içerisinde hafifçe karıştırılmıştır ve kısaca santrifüjlenmiştir.

Çizelge 2. 11. cDNA sentezi bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktarlar
Template RNA (180 ng/μL)	2 μL
Oligo (dT) ₁₈ Primer	1 μL
Nuclease free Water	9 μL
5X Reaction Buffer	4 μL
Ribolock RNase Inhibitor (20 U/μL)	1 μL
dNTP Mix (10mM)	2 μL
RevertAid RT (200 U/μL)	1 μL
Toplam Hacim	20 μL

Santrifüj sonrasında örnekler 42°C’de 1 saat inkübe edilmiştir ve reaksiyon 5 dakika boyunca 70°C’de tutularak sonlandırılmıştır. Elde edilen cDNA PCR uygulamasında kullanılmak üzere -80°C’ye kaldırılmıştır.

2.2.21. cDNA’dan PCR

İndüklenmiş kompetan bakteriden izole edilen RNA’dan elde edilen cDNA kullanılarak, chiA gen bölgesinin proteine dönüp dönmediğini kontrol edilmiştir. Bu amaçla cDNA, Çizelge 2.12.’de belirtilen bileşenler kullanılarak PCR reaksiyonuna sokulmuştur. PCR reaksiyonu kurulurken yukarıda verilen basamaklar şeklinde gerçekleştirilmiştir (Bkz. 2.2.5.). PCR sonucu oluşan ürünler agaroz jel elektroforezi kullanılarak yürütülmüştür ve görüntülenmiştir.

Çizelge 2. 12. cDNA PCR bileşenleri ve miktarları

Komponent	Hacim	Son Konsantrasyon
2X Master Mix	25 μL	1X
İleri Primer (10 μM)	1 μL	10 μM
Geri Primer (10 μM)	1 μL	10 μM
cDNA (150 ng)	2 μL	300 ng
PCR Grade water	21 μL	-
Toplam Hacim	50 μl	-

2.2.22. Kantitatif PCR (qPCR)

qPCR reaksiyonları, FastStart Essential DNA Green Master Mix ve Çizelge 2.13.'de belirtilen bileşenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler 3 tekrarlı ve Negatif kontrol eşliğinde yapılmıştır.

Çizelge 2. 13. qPCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktarlar
cDNA (150 ng)	2 µL
Forward Primer (10 µM)	1 µL
Reverse Primer (10 µM)	1 µL
qPCR Master Mix (2x)	10 µL
PCR Grade Water	6 µL
Toplam Hacim	20 µL

Reaksiyonlar kurulurken, Master Mix protokolüne uyulmuştur. Hazırlanan qPCR tüpleri Roche LightCycler 96 SW cihazına yerleştirilmiştir ve Çizelge 2.14.'te verilen basamaklar ile işlem gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. 14. qPCR Basamakları

Basamak İsmi	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Ön İnkübasyon	95	600	1
3 Aşamalı Amplifikasyon	95	20	45
	65	20	
	72	20	
Erime	95	10	1
	65	60	
	95	1	
Soğuma	37	30	1

2.2.23. qPCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yapılan qPCR işleminin amacı yalnızca chiA geninin ekspresyonunu gözlemlemek olduğu için deneyde Housekeeping gen kullanılmamıştır. Bu yüzden Δ CT değeri

hesaplanmamıştır. qPCR sonucunda elde edilen CT (Cycle Threshold) değerleri göz önünde bulundurularak gen ekspresyonu hakkında değerlendirme yapılmıştır.

2.2.24. chiA Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi belirlenirken substrat olarak chitin azure kullanılarak spektrofotometrik tayin yöntemi ile aktivite tayini yapılmıştır. İlk olarak 5 mg/mL chitin azure'den (Mcilvain tamponu pH:5.2 içerisinde) 50 µL alınıp ependorf tüp içerisine konulmuştur ve üzerine aynı oranda pH:7 fosfat tamponu eklenilerek karıştırılmıştır. Enzim miktarı 2 µg olacak şekilde karışım içerisine eklenmiştir ve su banyosunda 40°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Aktivitenin sonlandırılmasından sonra reaksiyon karışımı, 5 dakika boyunca 13.000 x g 'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra köre (chitin azure + tampon) göre absorbans 560 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen ortalama absorbans değeri, üçlü numunelerin ortalamasıdır. Absorbans değerindeki 0.01'lik artış, kitinaz enziminin bir birimi (U) olarak kabul edilmiştir (Ramirez vd., 2004).

2.2.25. chiA Enziminin Optimum pH'sının Belirlenmesi

Çizelge 2. 15. Kullanılan tampon çözeltiler

pH	0.2 M Sitrik Asit (MA:96.05 g/mol) [mL]	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (MA:268.25 g/mol) [mL]	Distile Su [mL]	Toplam Hacim [mL]
3.0	79.6	20.4	100	200
4.0	61.4	38.6	100	200
5.0	48.6	51.4	100	200
	0.2 M NaH ₂ PO ₄ (MA:138.99 g/mol) [mL]	0.2 M Na ₂ HPO ₄ (MA:268.25 g/mol) [mL]		
6.0	87.7	12.3	100	200
7.0	39.0	61.0	100	200
8.0	5.3	94.7	100	200
	0.2 M Glisin (MA:75.05 g/mol) [mL]	0.2 M NaOH (MA:40.0 g/mol) [mL]		
9.0	8.8	50	141.2	200
10.0	32.0	50	118	200

Elde edilen kitinaz enziminin aktivitesinin üzerine pH'nın etkisini ölçmek amacıyla pH 3.0 – 10.0 aralığında Çizelge 2.15.'de verilen tampon çözeltileri kullanılmıştır. Enzimin çalıştığı en iyi pH değerini bulmak için (Bkz. 2.2.24)'de kullanılan aktivite tayin yöntemi kullanılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonucu çıkan absorbans değerleri grafiğe dökülmüştür.

2.2.26. chiA Enziminin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi

Optimum pH değeri belirlenen enzimin çalıştığı en iyi sıcaklığı belirlemek amacıyla 30°C'den başlanılarak 10'ar °C arttırılarak 100°C'ye kadar aktivite ölçümü yapılmıştır. Enzimin en iyi çalıştığı pH:5 tamponundan 50 µL alınarak aynı oranda substrat ile karıştırılmıştır. Üzerine 2 µg chiA enzimi eklenmiştir ve belirtilen sıcaklıklarda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında aktivitelerin ölçülmesi amacıyla spektrofotometrede 560 nm'de ölçüm yapılmıştır ve enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir.

2.2.27. chiA Enziminin Myzus persicae Üzerine İnsektisidal Aktivite Testleri

2.2.27.1. Patlıcan Yapraklarının Hazırlanması

M. persicae için konukçu bitki olarak patlıcan seçilmiştir. Patlıcan fideleri Muğla'nın Köyceğiz ilçesinden temin edilmiş ve laboratuvar ortamına getirilmiştir. Laboratuvar ortamına getirilen fideler oranı 1/3 olacak şekilde torf-perlit karışımli toprağa ekilmiştir. Şeftali yaprak bitlerinin işlenmemiş bitki yapraklarında test edilmesi için patlıcan fideleri içerebilecekleri insektisitlerden arındırmak amacıyla 3 hafta büyütülmüştür. Fideler büyütülürken yaprakların kurumaması için ortam nemli tutulmuştur ve yapraklar direkt güneş ışığına maruz bırakılmamıştır.





Şekil 2. 6. a) Laboratuvara getirilen patlıcan fideleri, b) 1 haftalık patlıcan fideleri, c) 3 haftalık patlıcan fideleri

2.2.27.2.Yaprak Bitlerinin Hazırlanması

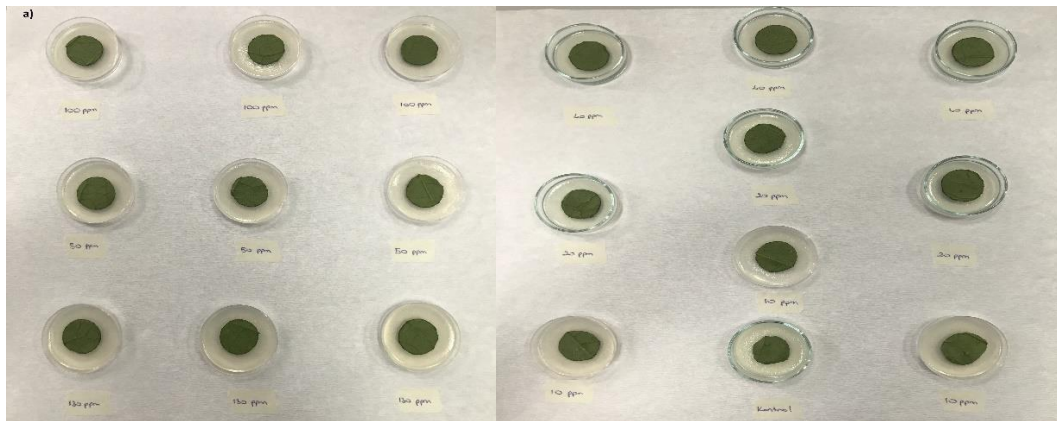
M. persicae zararlısı Malatya Turgut Özal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünden temin edilmiştir. Temin edilen yaprak bitlerinin laboratuvarında üretimi sürdürülmek amacıyla patlıcan yapraklarına bulaştırılmıştır. İstila edilmiş yapraklar üzerinden bitler fırça yardımıyla toplanmıştır.

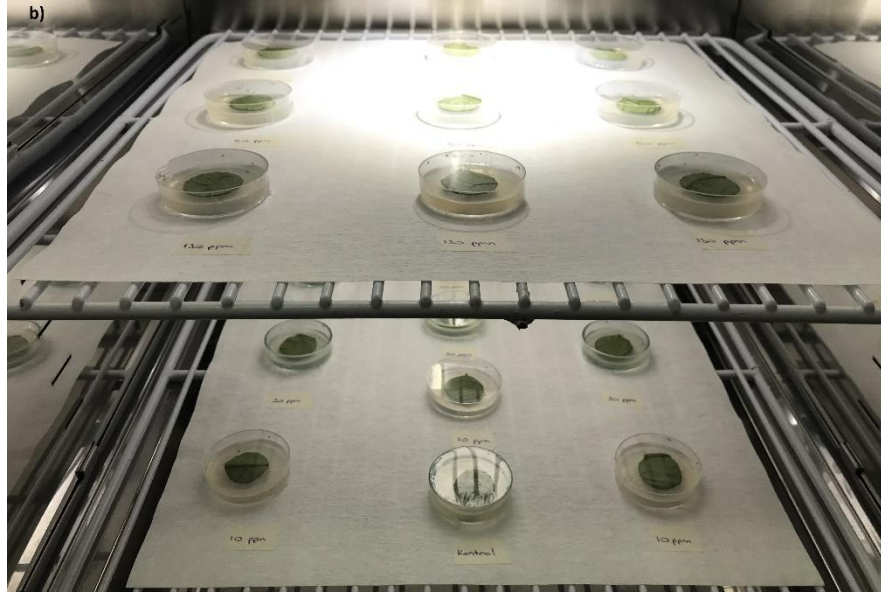


Şekil 2. 7. *M. persicae* istila edilmiş patlıcan yaprağı

2.2.27.3. Aktivite Denemeleri

Saflaştırılmış chiA enziminin *M. persicae* üzerine etkinliği, IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) tarafından önerilen 001 nolu metoda göre belirlenmiştir (IRAC, 2022). Denemede, laboratuvarında hazırlanan insektisit içermeyen patlıcan bitkilerinin yaprakları kullanılmıştır. Yapraklar bir disk ile 3 cm çapında kesilmiştir. Yaprak diskleri, kontrol (saf su) ve enzim (kaba ve saf) konsantrasyonlarına (130 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 40 ppm, 20 ppm ve 10 ppm) 10 saniye daldırılmıştır ve kuruması için (alt yüz üste gelecek şekilde) nemli kurutma kâğıdı üzerinde bir süre bekletilmiştir. Daha sonra 6 cm çapındaki petri kabı içerisine, %2'lik agar hazırlanıp dökülmüştür ve yaprak dokusuna zarar vermeyecek seviyede ılıklığa ulaşınca üzerine enzim konsantrasyonlarına daldırılmış yaprak diskleri, yaprak alt yüzü üste bakacak şekilde petriye yerleştirilmiştir. Sonrasında her bir petri içerisine 5 adet *M. persicae* yetişkinleri yerleştirilmiştir ve 24 saat büyümeye bırakılmıştır. 24 saat sonra yetişkinler yaprak üzerinden fırça yardımıyla toplanmıştır. Ardından petrinin üzeri streç filmle kapatılmıştır ve hava alması amacıyla streç film iğne ile delinmiştir. Petriler, $22 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullarda olacak şekilde inkübe edilmiştir. Petri içerisindeki yapraklar yaklaşık 15 kadar bit ile istila edilene kadar 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petri içindeki bitler el merceği kullanılarak ölü ve canlı olarak kaydedilmiştir. Fırça ile dokunulduğunda tepki vermeyenler ve koordineli hareket edemeyen bitler ölü olarak kabul edilmiştir. Çalışma 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. Test edilen chiA enzimi için LD₅₀ tahminini sağlamak üzere doz yanıt analizi gerçekleştirmek için IBM SPSS programı kullanılarak ölüm verileri değerlendirilmiştir (IRAC, 2022).



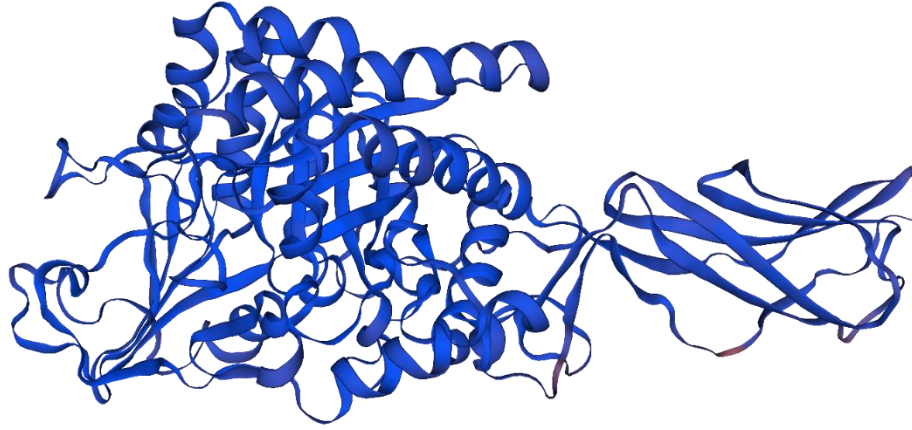


Şekil 2. 8. a) 3 tekrarlı doz denemeleri, b) Yaprak bitleri inkübasyonu

2.2.28. Biyoinformatik Analizler

2.2.28.1. *chiA*-Kitin Bağlanma Kompleksi

Swiss-model üzerinden yapılan modelleme sonucu PDB database’de bulunan *S. marcescens* *chiA* (PDB DOI: 1EHN) enzimi ile *S. marcescens* GBS19’a ait *chiA* enzimi yapısal olarak %98.7 benzerlik göstermiştir ve bu kalıp oluşturmada kullanılarak GBS19’un kitinaz üreten aminoasit sekansına birebir ölçüde baz alınmıştır ve PDB datasına dönüştürülerek sonraki protein-ligand etkileşimini izlemek için modelleme çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 2.9.).



Şekil 2. 9. chiA kristal yapısı

chiA enziminin substratı olan kitin ile etkileşimlerinin moleküler kenetlenme ile belirlenmesi çalışmaları üzerindeki etkileşim bölgeleri chiA proteini, *S. marcescens* GBS19 üzerindeki ilgili sekanslar üzerinden homoloji uyumu ile modellenmiştir. Daha sonra bu modellemede etkileşimi anlamak için ligand olarak kitin molekülünün mol2 verisi kullanılmıştır. Birleştirme odası koordinatları X=-1.8, 68.6, -5.7, Y=56.1, 169.0, 42.7, Z=27.2, 118.8, 18.5 merkezi konuma göre X=-2.5, 63.3, -7.8, Y=69.5, 169.3, 44.2, Z=33.5, 116.3, 18.2 koordinatlarına göre kör yerleştirme yapılmıştır. Daha sonra bu yerleştirmenin doğru sonuç verip vermediği E-DOCK server üzerinde teyit edilmiştir.

2.2.28.2.chiA Proteini Benzerlik Karşılaştırma

S. marcescens GBS19 izolatına ait chiA proteinin NCBI veritabanında bulunan ref_seq chiA proteinleri ile aminoasit benzerliği karşılaştırılmıştır. BLAST sonucunda en fazla benzerlik gösteren 10 farklı proteine ait amino asit dizileri kaydedilmiştir. Kaydedilen diziler Jalview programı kullanılarak Allignment edilmiştir ve görselleştirilmiştir. Aynı zamanda bu aminoasitler ile kendi izolatımıza ait chiA proteini kullanılarak filogenetik ağaç Neighbor joining metodu ile Geneious biyoinformatik programı üzerinden çıkarılmıştır.

3. BULGULAR

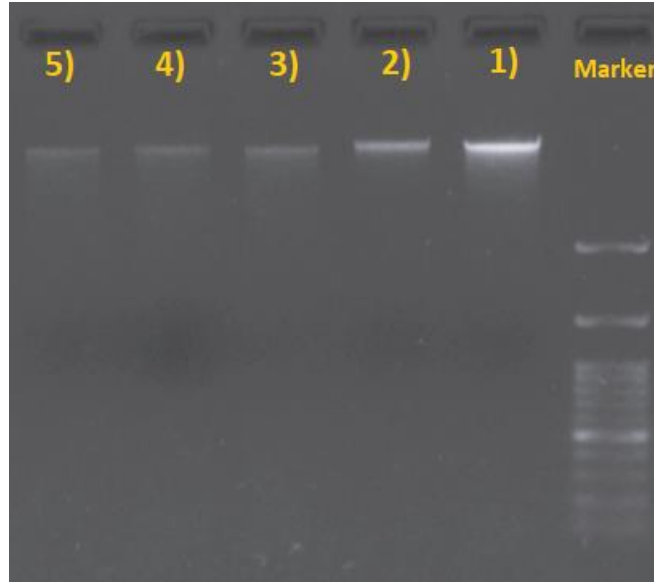
3.1. Genomik DNA İzolasyonu

S. marcescens GBS19'dan izole edilen genomik DNA'lar, spektrofotometre cihazı kullanılarak 260 nm ve 280 nm'de absorbans ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. İzole edilen genomik DNA'lardan uygun olanı, chiA geninin PCR ile çoğaltılması için şablon olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3. 1. Genomik DNA izolasyonu sonucu değerleri

DNA Örneği	OD 260/280	Konsantrasyon (ng/uL)
<i>S. marcescens</i> GBS19	1,82	60 ng/ μ L

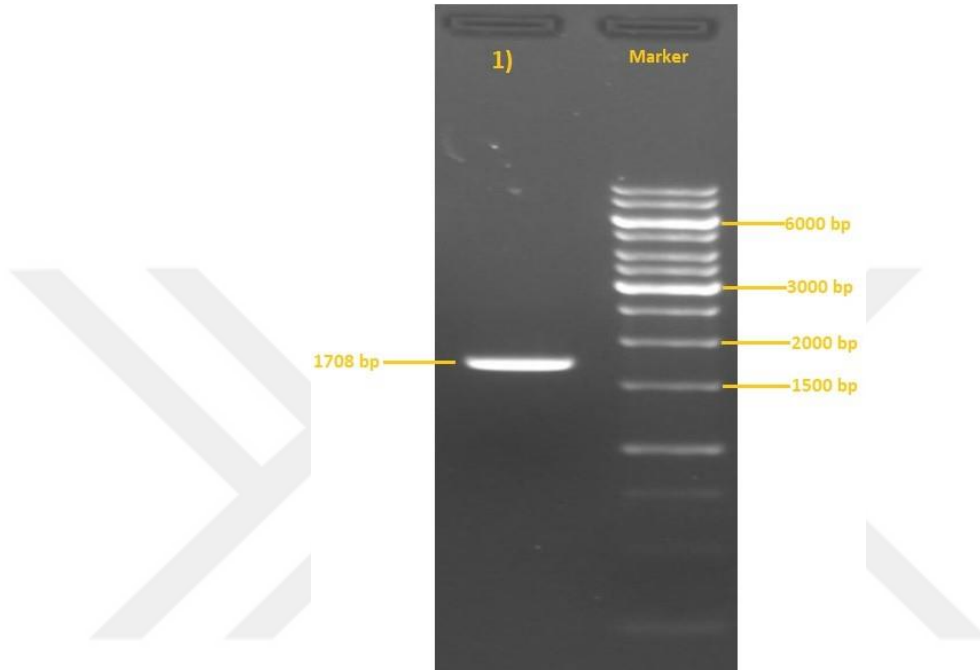
Agaroz jel elektroforez sonucu markerden sonra gelen 1 numaralı kuyucuktaki en yoğun bant veren ve spektrofotometrik olarakta saflığı ve konsantrasyonu doğrulanmış genomik DNA, şablon olarak seçilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3. 1. Genomik DNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü

3.2. chiA Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

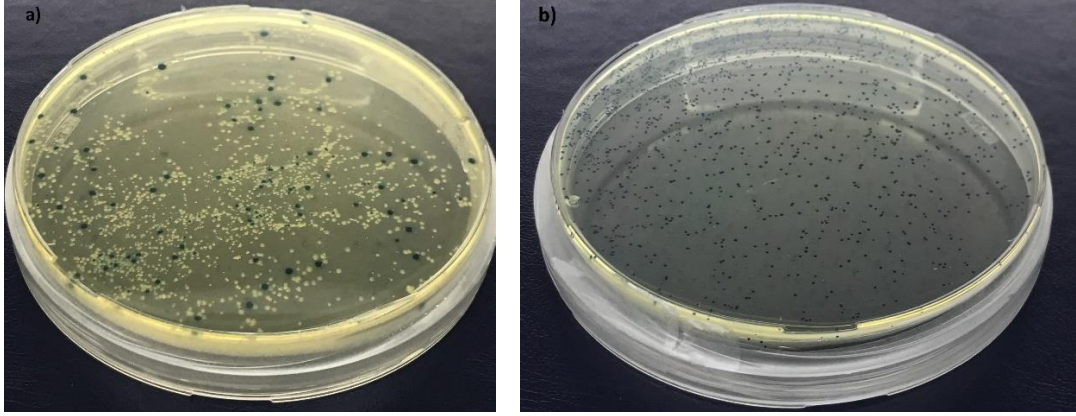
chiA gen bölgesi, tasarlanan primerler (Bkz. 2.2.4.) ile PCR’da çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. *S. marcescens* GBS19’den izole edilen genomik DNA’dan elde edilen chiA genine ait 1708 bp büyüklüğünde gen bölgesi gösterilmiştir (Şekil 3.2.)



Şekil 3. 2. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1) PCR sonucu chiA gen bölgesi

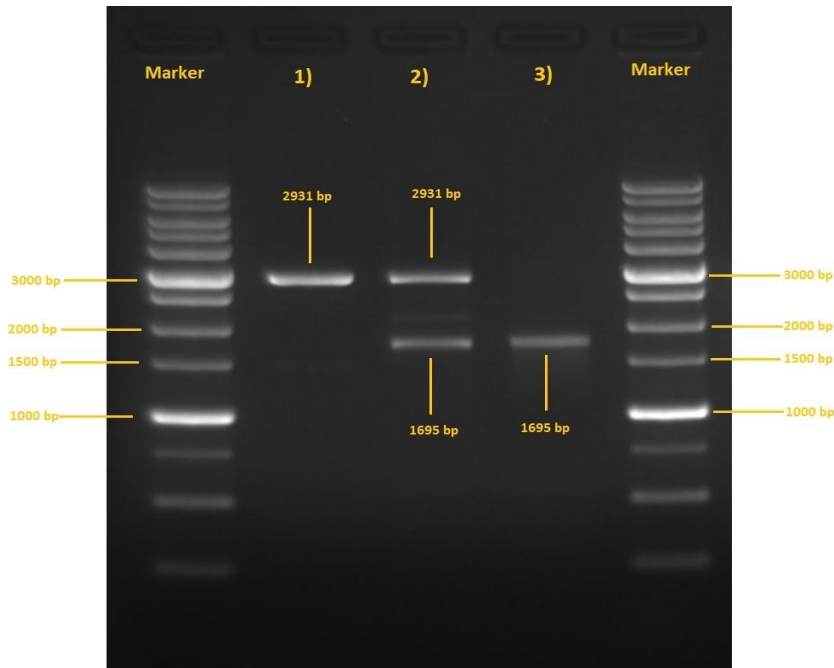
3.3. chiA Gen Bölgesinin Klonlanması

PCR sonucu elde edilen chiA geni ve klonlama vektörü ligasyon basamağına hazırlık için BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir ve saflaştırılmıştır. Sonrasında kesilip saf hale getirilen ürünlerin ligasyonu sağlanmıştır. Ligasyon basamağından sonra geni içeren klonlama vektörü elektroporasyon yöntemiyle kompetan *E. coli* TOP10 bakterisine aktarılmıştır. Transformant bakteriler AMP, IPTG ve X-gal içeren LB katı besiyerine ekilmiştir. Ek olarak transformasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini görmek için gen bölgesini içermeyen sadece plazmit ile de transformasyon işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3.) Mavi-beyaz koloni seçimi yoluyla chiA genini içeren beyaz (+) koloniler seçilmiştir ve plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 3. a) Transformasyon sonrası mavi-beyaz koloniler, b) Transformasyon kontrolü yalnızca mavi koloniler

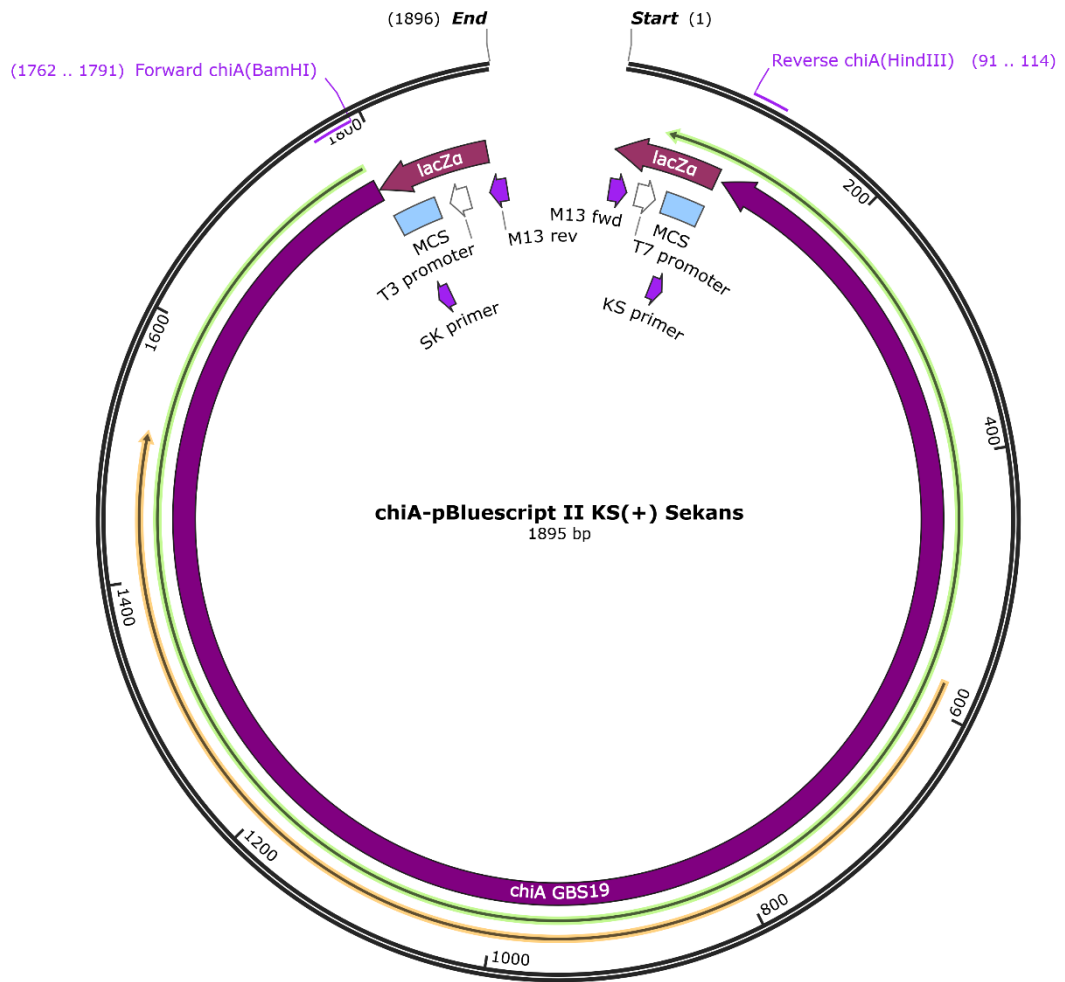
Rekombinant plazmitlerin *chiA* genine sahip olduğu kontrolünün yapılması amacıyla restriksiyon endonükleazlar ile kesim yapılmış ve agaroz jelde yürütülmüştür. Ayrıca kullanılan plazmit BamHI kullanılarak lineer hale getirilmiş ve jel üzerinde bantların karşılaştırılabilmesi için jele yüklenmiştir. Jel sonucuna göre *chiA* geninin klonlama vektörüne başarılı bir şekilde ligasyonu ve kompetan bakteri içerisine transformasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3. 4. Marker Goldbio 1 kb DNA Ladder (D010-500), 1) BamHI ile tekli kesim pBluescript II KS (+), 2) Rekombinant plazmitin HindIII-BamHI ile ikili kesimi, 3) Kesilip saflaştırılmış *chiA* gen bölgesi

3.4. chiA Gen Bölgesi Sekans Analizi

Klonlama vektörü içerisinde bulunan kitinaz gen bölgesine ait dizinin doğruluğunu karakterize etmek için NGS sekans analizi Ficus Biyoteknoloji (Ankara) tarafından yapılmıştır (Ek A). Sekans sonucu Snapgene uygulaması kullanılarak görselleştirilmiştir (Şekil 3.5.). Sonrasında gen dizisi full genom sekans sonucu elimizde bulunan dizi Jalview programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda klonlanan chiA gen bölgesi ile sekans sonucu gelen gen sekansının stop kodonlarının elimine edilmesi sonucu oluşan fark harici %100 uyum gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.6.)



Şekil 3. 5. NGS sekans sonucu klonlama vektörü+chiA gen bölgesi simülasyonu

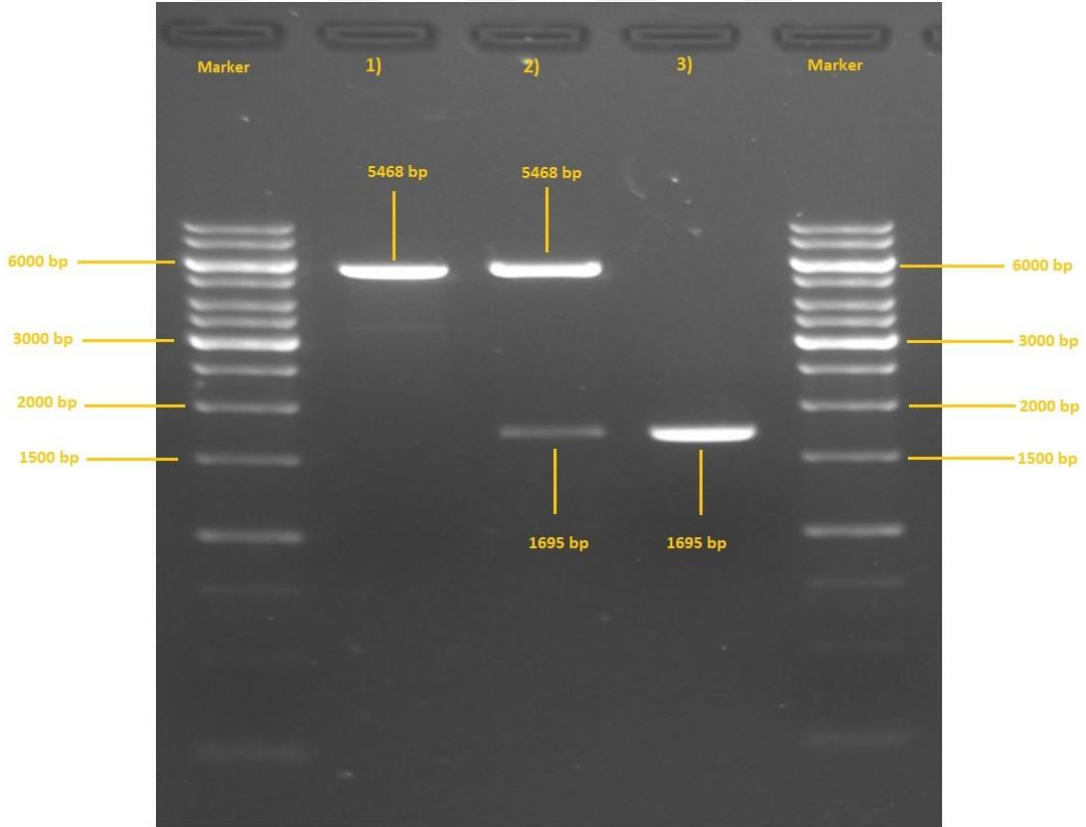


<i>chiA_GBS19/1-166</i>	1	ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGGTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAGGCGCGCGCGCGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGCAACACCAAGTTCCGCATCGTCGAAGTCGATCAGGCGGCCACCGCTTATAATA	154
<i>NGS_seq1-1691</i>	1	ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGGCGCTGGTGATCGGCAGCACGCTGTGTTCCGCGGCGCAGGCGCGCGCGCGGCAAGCCGACCATCGCCTGGGGCAACACCAAGTTCCGCATCGTCGAAGTCGATCAGGCGGCCACCGCTTATAATA	154
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	155	ATCTGGTGAAGGTAAAAATGCCGCGACGTTTTCCGTTCTCTGGAATTTATGGAATGGCGACACCGGCGACGACGGCAAAAAATTTATTAATGGCAAAGAGGCGTGGAGCGGCCCTTCAACCGGCGCTTCCGGTACGGCGAATTTTAAAGTGAA	308
<i>NGS_seq1-1691</i>	155	ATCTGGTGAAGGTAAAAATGCCGCGACGTTTTCCGTTCTCTGGAATTTATGGAATGGCGACACCGGCGACGACGGCAAAAAATTTATTAATGGCAAAGAGGCGTGGAGCGGCCCTTCAACCGGCGCTTCCGGTACGGCGAATTTTAAAGTGAA	308
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	309	TAAAGGCGGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCGTTGTGCAATGCCGACGGCTGCACCGCCAGCGACGCCACCGAAATTTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTGGCGCCGTTGAAAGAGCCGCTGCTGGAAAAGAATAAACCCCTATAAACAG	462
<i>NGS_seq1-1691</i>	309	TAAAGGCGGCCGTTATCAAATGCAGGTGGCGTTGTGCAATGCCGACGGCTGCACCGCCAGCGACGCCACCGAAATTTGGTGGCCGACACCGACGGCAGCCATTGGCGCCGTTGAAAGAGCCGCTGCTGGAAAAGAATAAACCCCTATAAACAG	462
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	463	AATTCGGCAAAGTGGTCGGCTCTTATTTCTGTCGATGGGGCGTTTACGGGCGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCGGCGCAGAACCTGACCCATCTGCTGTACGGCTTTATCCGATCTGCGGCGGCAACGGCATCAACGACAGCCTGAAAG	616
<i>NGS_seq1-1691</i>	463	AATTCGGCAAAGTGGTCGGCTCTTATTTCTGTCGATGGGGCGTTTACGGGCGCAATTTACCGTCGACAAGATCCCGGCGCAGAACCTGACCCATCTGCTGTACGGCTTTATCCGATCTGCGGCGGCAACGGCATCAACGACAGCCTGAAAG	616
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	617	AGATCGAAGGCAGCTTCCAGGCGTTGCAGCGCTCCTGCCAGGGTCCGAGGACTTCAAAGTCTCGATTACGATCCGTTCCGCGCGCTGCAAAAAGCGCAGAAGGGCGTGACCCCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGAT	770
<i>NGS_seq1-1691</i>	617	AGATCGAAGGCAGCTTCCAGGCGTTGCAGCGCTCCTGCCAGGGTCCGAGGACTTCAAAGTCTCGATTACGATCCGTTCCGCGCGCTGCAAAAAGCGCAGAAGGGCGTGACCCCTGGGATGACCCCTACAAGGGCAACTTCGGCCAGCTGAT	770
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	771	GGCGCTGAAGCAGGCGCATCCTGACCTGAAAACTCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCGTTCTTCTTTCATGGGCGACAAGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTCGGTTCGGTGAAGAGTTCCTGCAGACCTGGAAGTTCCTCGAT	924
<i>NGS_seq1-1691</i>	771	GGCGCTGAAGCAGGCGCATCCTGACCTGAAAACTCTGCCGTCGATCGGCGGCTGGACGCTGTCCGACCCGTTCTTCTTTCATGGGCGACAAGGTGAAGCGCGATCGCTTCGTCGGTTCGGTGAAGAGTTCCTGCAGACCTGGAAGTTCCTCGAT	924
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	925	GGCGTGGATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAACGGTGCCAAACCGAACCTGGGCAGCCCGCAGGACGGGGAAACCTATGTGCTGTTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTCCGCGAAACCGGCCGCAAGTATGAGCTGA	1078
<i>NGS_seq1-1691</i>	925	GGCGTGGATATCGACTGGGAGTTCCCGGGCGGCAACGGTGCCAAACCGAACCTGGGCAGCCCGCAGGACGGGGAAACCTATGTGCTGTTGATGAAGGAGCTGCGGGCGATGCTGGATCAGCTGTCCGCGAAACCGGCCGCAAGTATGAGCTGA	1078
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	1079	CCTCCGCCATCAGCGCCGGCAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTCGCGCAGAACTCGATGGATCACATCTTCTGATGAGCTACGACTTCTACGGCGCCTTCGATCTGAAAAACCTGGGGCATCAGACCGCGCTGAATGCCCGGGC	1232
<i>NGS_seq1-1691</i>	1079	CCTCCGCCATCAGCGCCGGCAAGGACAAGATCGACAAGGTGGCTTACAACGTCGCGCAGAACTCGATGGATCACATCTTCTGATGAGCTACGACTTCTACGGCGCCTTCGATCTGAAAAACCTGGGGCATCAGACCGCGCTGAATGCCCGGGC	1232
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	1233	CTGGAACCGGACACCGCCTACACCACGGTGAACGGCGTCAATGCCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAGATCGTGGTCCGACCGCCATGATATGGCCGCGGCTGGACCGGGTGAACGGCTACCAGAACAACATTCGGTTACCGGGC	1386
<i>NGS_seq1-1691</i>	1233	CTGGAACCGGACACCGCCTACACCACGGTGAACGGCGTCAATGCCGCTGCTGGCGCAGGGCGTCAAGCCGGGCAAGATCGTGGTCCGACCGCCATGATATGGCCGCGGCTGGACCGGGTGAACGGCTACCAGAACAACATTCGGTTACCGGGC	1386
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	1387	ACCGCCACCGGGCCGGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGGACTACCGCAAATCGCCAGCCAGTTTCATGAGCGGCGATTGGCAGTACACCTACGACGCCACGGCGGAAGCGCCTTACGTGTTCAAACCTTCCACCGGCGATCTGATCA	1540
<i>NGS_seq1-1691</i>	1387	ACCGCCACCGGGCCGGTTAAAGGCACCTGGGAGAACGGCATCGTGGACTACCGCAAATCGCCAGCCAGTTTCATGAGCGGCGATTGGCAGTACACCTACGACGCCACGGCGGAAGCGCCTTACGTGTTCAAACCTTCCACCGGCGATCTGATCA	1540
<i>chiA_GBS19/1-166</i>	1541	CCTTCGACGATGCCCGCTCGGTGCAGGCCAAGGGCAAGTACGTGTTGGATAAGCAGTTGGGCGGCCGTTCTCCTGGGAGATCGACCGGACAACGGCGATATTTCTCAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAACAGCGCCGGCGTTCAATAA	1692
<i>NGS_seq1-1691</i>	1541	CCTTCGACGATGCCCGCTCGGTGCAGGCCAAGGGCAAGTACGTGTTGGATAAGCAGTTGGGCGGCCGTTCTCCTGGGAGATCGACCGGACAACGGCGATATTTCTCAACAGCATGAACGCCAGCCTGGGCAACAGCGCCGGCGTTCAATAA	1692

Şekil 3. 6. *chiA* gen bölgesi-NGS sekans karşılaştırma

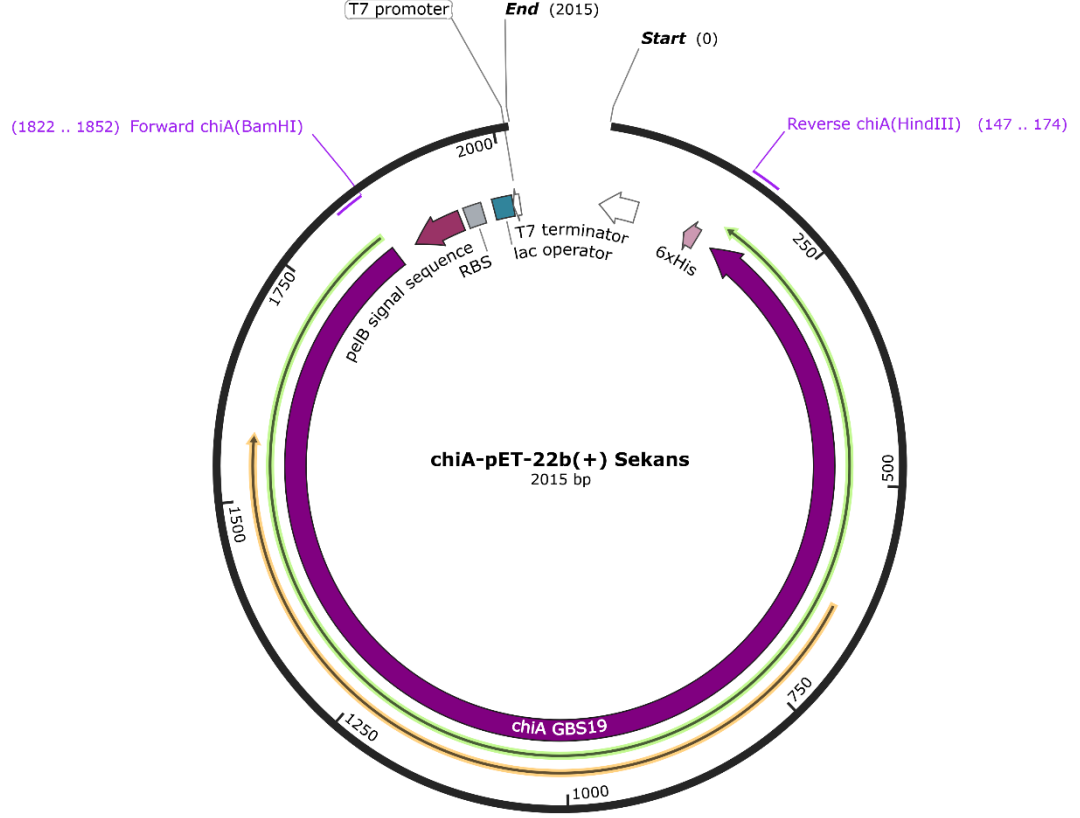
3.5. chiA Gen Bölgesinin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Sekans sonucu elde edilen plazmitlerden chiA gen bölgesinin kesilmesi amacıyla klonlama vektörü BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Kesim sonrasında agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiş ve chiA gen bölgesi jelden izole edilmiştir. Aynı şekilde ekspresyon için kullanılacak pET-22b (+)'de bu enzimler ile kesilmiştir ve temizlenmiştir. Ligasyon basamağı 1:3 vektör/gen oranı olacak şekilde yapılmıştır. Ligasyon ürünü elektrokompentant *E. coli* BL21(DE3) içerisine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası bakteriler AMP içeren LB katı besiyerlerine ekilmiş ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında elde edilen kolonilerden plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmitlerin chiA genini içerip içermediğini saptamak amacıyla HindIII ve BamHI ile ikili kesim yapılmıştır. İkili kesim sonucu chiA gen bölgesinin ekspresyon vektörü içerisinde doğru bir şekilde bulunduğu ortaya konmuştur (Şekil 3.7.)



Şekil 3. 7. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1) HindIII ile tekli kesim pET-22b (+), 2) Rekombinant pET-22b (+)'nin HindIII-BamHI ile ikili kesimi, 3) Kesilip saflaştırılmış chiA gen bölgesi

Aynı zamanda rekombinant plazmit sekanslanmıştır. Sekans sonucu Snapgene uygulaması aracılığıyla görselleştirilmiştir. (Şekil 3.8.). *chiA* genine sahip rekombinant plazmitleri içeren *E.coli* BL21(DE3) kolonilerinden stok alınarak ekspresyon aşamasında kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırılmıştır.

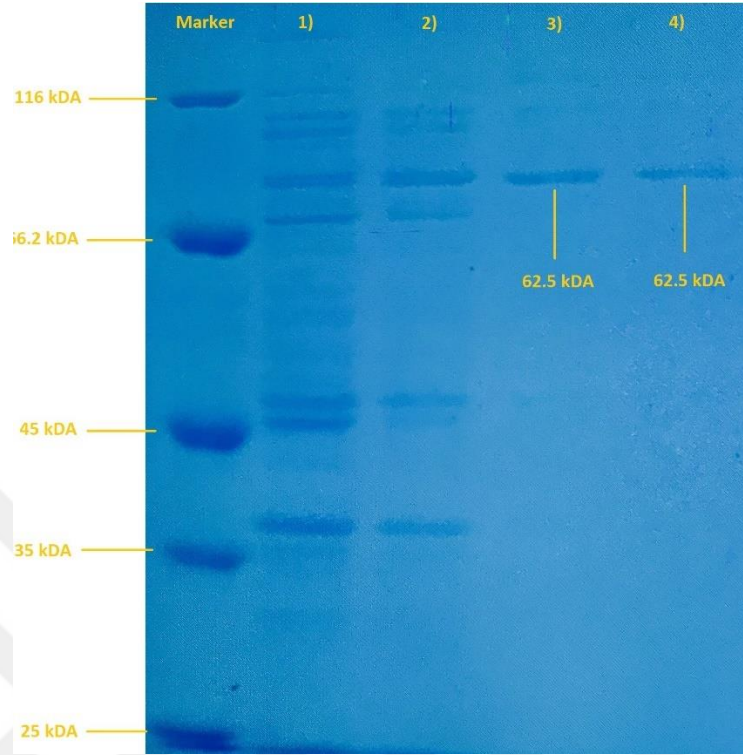


Şekil 3. 8. NGS sekans sonucu ekspresyon vektörü+*chiA* gen bölgesi simülasyonu

3.6. *chiA* Proteinin Ekspresyonu, Saflaştırılması ve SDS-PAGE Analizi

Rekombinant pET-22b (+) plazmitini içeren *E. coli* BL21(DE3) konakçı hücreleri IPTG ile indüklenmiştir. *E. coli* BL21(DE3) suşu, lacUV5 promotörünün kontrolünde T7 RNA polimerazı ifade eden λ DE3 lizojeni içerir. Bu yüzden IPTG ile indüklendiği zaman T7 RNA polimeraz eksprese edilir. Kullandığımız pET-22b (+) ekspresyon vektörü de T7 promotörü içerdiği için yüksek seviyeli bir ekspresyon gerçekleştirilmiştir. *chiA* proteinin ekspresyonundan sonra pET-22b (+) vektöründe bulunan his-taq etiketi sayesinde Ni-NTA afinite kromatografisi kullanarak

saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış protein SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. *chiA* proteini beklenildiği üzere jel üzerinde 62.5 kDA büyüklüğünde bant vermiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3. 9. Marker Pierce Unstained Protein MW Marker (26610), 1) Temizlenmiş lizat, 2) Yıkamış lizat 3) Protein 1. Elüsyonu, 4) Protein 2. elüsyonu

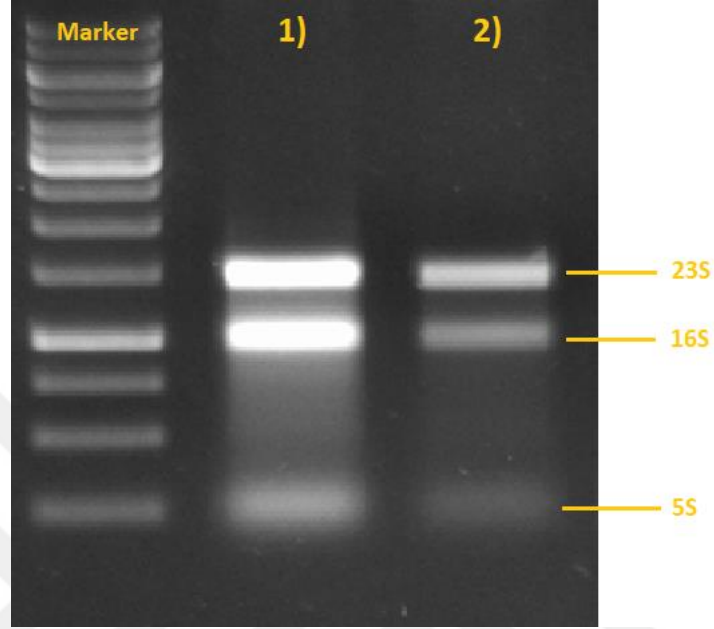
3.7. *E. coli* BL21(DE3)'den Total RNA İzolasyonu

İndüklenmiş bakterilerden izole edilmiş RNA'ların kalitesinin ve konsantrasyonunun ölçülmesi amacıyla spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3. 2. Total RNA izolasyon sonuçları

RNA Örneği	OD 260/280	OD 260/230	Konsantrasyon (ng/uL)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) E1	2,13	2,27	184 ng/ μ L
<i>E. coli</i> BL21(DE3) E2	2,0	2,07	57,6 ng/ μ L

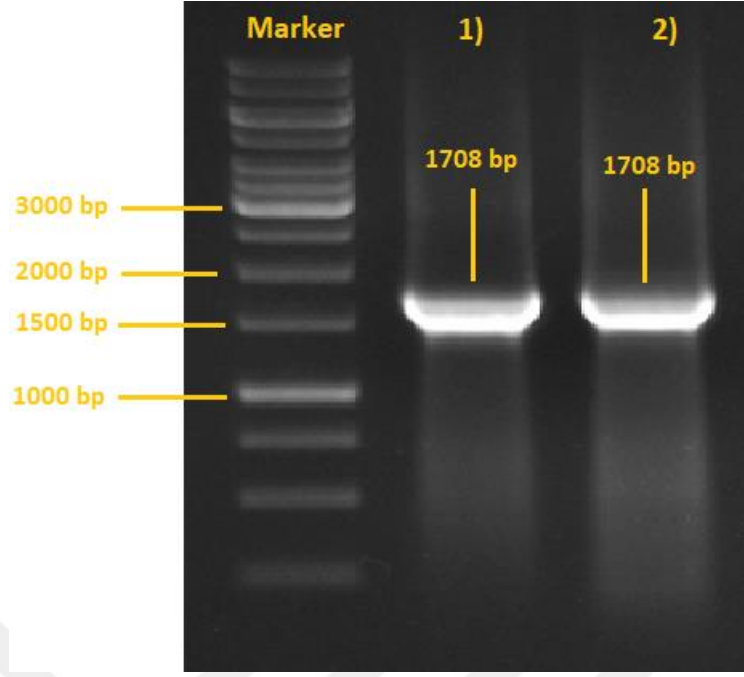
Aynı zamanda agaroz jel elektroforezi kullanılarak RNA'lar görselleştirilmiştir. Elektroforez sonucunda RNA'nın rRNA alt birimleri 3 bant şeklinde jelde görüntülenmiştir. Elde edilen RNA'lar çalışmaya uygun görülüp cDNA sentezinde kullanılmıştır (Şekil 3.10.).



Şekil 3. 10. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1) Total RNA 1. elüsyon, 2) Total RNA 2. elüsyon

3.8. cDNA Sentezi ve cDNA PCR

chiA gen bölgesinin proteine dönüşüp dönüşmediğinin kontrolünü sağlamak amacıyla elde edilen RNA'lar, cDNA'ya dönüştürülmüştür ve elde edilen cDNA'lardan PCR denemeleri kurulmuştur. Normal PCR'da kullanılan bileşenlerden farklı olarak genomik DNA yerine cDNA kullanılarak işlem gerçekleştirilmiştir. PCR sonucu kitinaz gen bölgesi beklenen boyutta ampikon oluşturmuştur (Şekil 3.11.).



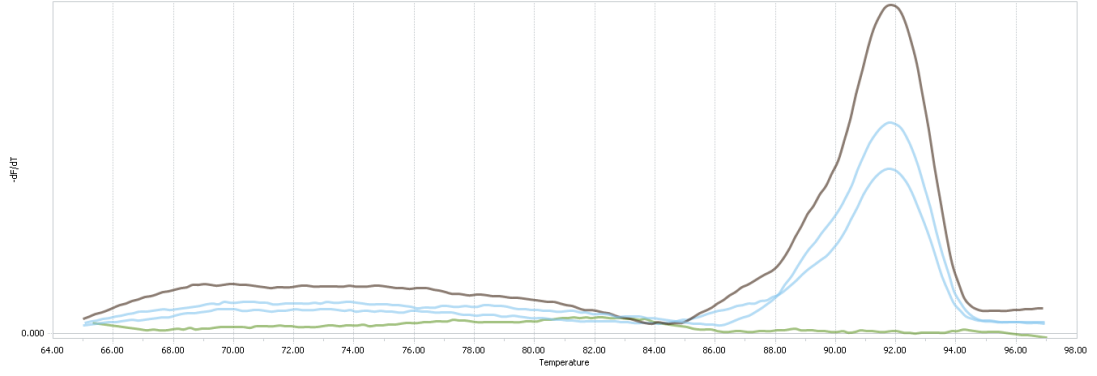
Şekil 3. 11. Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311), 1-2) cDNA PCR agaroz jel görüntüsü

3.9. Kantitatif PCR (qPCR)

Çizelge 3. 3. qPCR sonuçları CT değerleri

Örnek	CT Değeri
chiA 1	14.22
chiA 2	13.92
chiA 3	14.41
Negatif Kontrol 1	-

qPCR sonucu elde edilen CT değerleri verilmiştir (Çizelge 3.3.). Örneklerin erime eğrisinde oluşan tüm pikler aynı zamandadır ve negatif kontrol için ise pik oluşmamıştır (Şekil 3.12.). Buradan yola çıkarak yabancı DNA veya primer dimeri kontaminasyonu gözlemlenmediğine karar verilmiştir. Aynı zamanda chiA gen bölgesinin proteine dönüştüğü sonucuna varılmıştır.



Şekil 3. 12. qPCR sonucu erime eğrisi

3.10. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kitinaz enziminin optimum pH ve optimum sıcaklığının ölçülmesinden önce aktivite gösterip göstermediği denetlenmiştir. Chitin-azure kullanılarak pH:7 tamponunda aktivite testi yapılmıştır. 3 tekrarlı yapılan deney sonucu spektrofotometre’de 560 nm’de ölçülen absorbans değerleri kaydedilmiştir ve ortalaması alınmıştır (Çizelge 3.4.) Elde edilen absorbans değerindeki 0.01’lik artış, kitinaz enziminin bir birimi (U) olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3. 4. Enzim aktivite sonuçları

Örnek (50 uL)	Absorbans Değeri (560 nm)	Unit
chiA 1	0.110	11
chiA 2	0.098	9.8
chiA 3	0.101	10.1
Ortalama	0.103	10.3

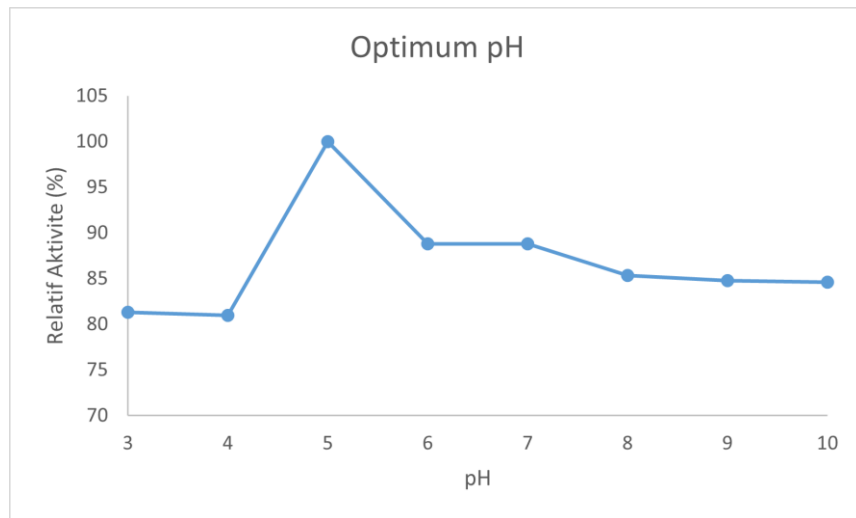
3.10.1. Optimum pH’nın Belirlenmesi

Aktivitesi belirlenmiş chiA enzimi üzerine pH’nın etkisinin belirlenmesi amacıyla pH 3 ve 10 arasındaki tamponlar kullanılarak aktivite ölçümü yapılmıştır. 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilen deneylerin spektrofotometre de yapılan ölçüm sonuçları gösterilmiştir (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3. 5. pH-absorbans tablosu

Tamponlar	Örnek (50 uL)	Absorbans Değeri (560 nm)	Tamponlar	Örnek (50 uL)	Absorbans Değeri (560 nm)
pH:3	chiA 1	0.0932	pH:7	chiA 1	0.110
	chiA 2	0.0953		chiA 2	0.098
	chiA 3	0.0944		chiA 3	0.101
	Ortalama	0.0943		Ortalama	0.103
pH:4	chiA 1	0.0986	pH:8	chiA 1	0.105
	chiA 2	0.0932		chiA 2	0.083
	chiA 3	0.0899		chiA 3	0.109
	Ortalama	0.0939		Ortalama	0.099
pH:5	chiA 1	0.107	pH:9	chiA 1	0.102
	chiA 2	0.118		chiA 2	0.097
	chiA 3	0.123		chiA 3	0.0959
	Ortalama	0.116		Ortalama	0.0983
pH:6	chiA 1	0.108	pH:10	chiA 1	0.101
	chiA 2	0.108		chiA 2	0.0976
	chiA 3	0.093		chiA 3	0.0957
	Ortalama	0.103		Ortalama	0.0981

Elde edilen aktivite sonuçları kullanılarak pH-aktivite grafiği oluşturulmuştur. Grafikten de görüldüğü üzere chiA enzimi pH:5 tamponunda en iyi aktivite göstermiştir (Şekil 3.13.).



Şekil 3. 13. Optimum pH grafiği

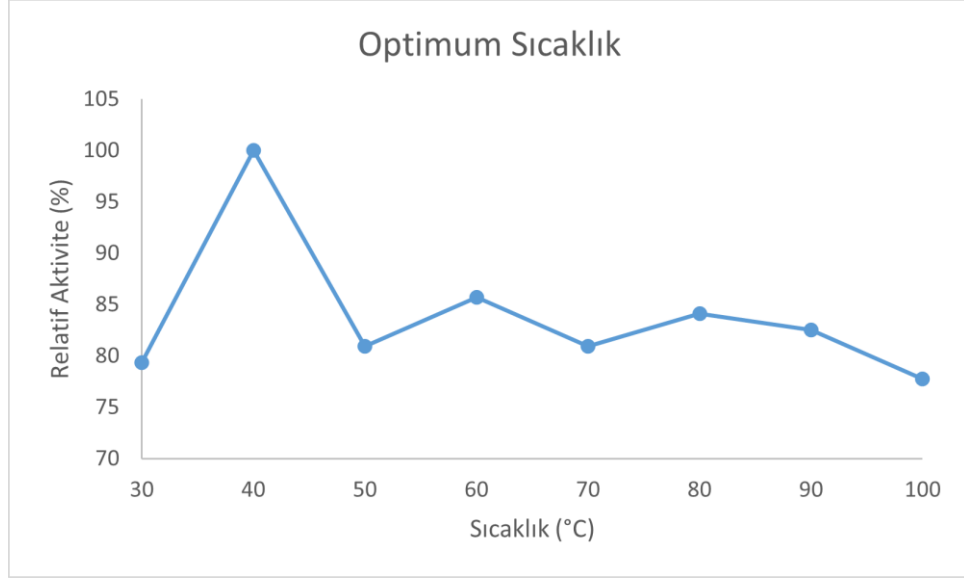
3.10.2. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Kitinaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini ölçmek amacıyla 30°C'den 100°C'ye kadar su banyosu içerisinde enzim aktivitesi bakılmıştır. 30 dk sonunda 3 tekrarlı şekilde yapılan deneyin absorbansları okunmuştur ve ortalaması alınmıştır (Çizelge 3.6.)

Çizelge 3. 6. Sıcaklık-absorbans tablosu

Sıcaklık	Örnek (50 uL)	Absorbans Değeri (560 nm)	Sıcaklık	Örnek (50 uL)	Absorbans Değeri (560 nm)
30°C	chiA 1	0.0987	70°C	chiA 1	0.102
	chiA 2	0.105		chiA 2	0.105
	chiA 3	0.0963		chiA 3	0.99
	Ortalama	0.1		Ortalama	0.102
40°C	chiA 1	0.124	80°C	chiA 1	0.109
	chiA 2	0.118		chiA 2	0.112
	chiA 3	0.136		chiA 3	0.097
	Ortalama	0.126		Ortalama	0.106
50°C	chiA 1	0.113	90°C	chiA 1	0.098
	chiA 2	0.098		chiA 2	0.094
	chiA 3	0.095		chiA 3	0.12
	Ortalama	0.102		Ortalama	0.104
60°C	chiA 1	0.113	100°C	chiA 1	0.086
	chiA 2	0.107		chiA 2	0.1
	chiA 3	0.104		chiA 3	0.108
	Ortalama	0.108		Ortalama	0.098

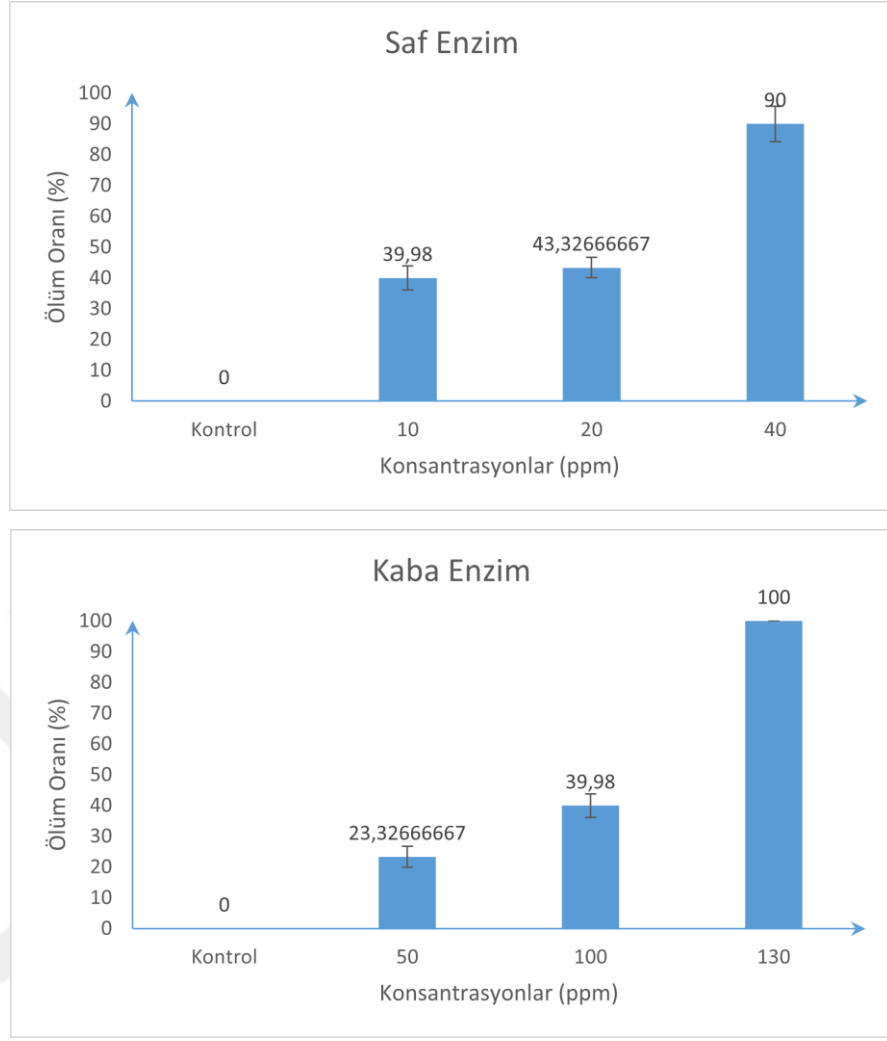
Aynı zamanda elde edilen ortalama değerler kullanılarak sıcaklık-aktivite grafiği oluşturulmuştur. Grafikte de görüldüğü üzere *S. marcescens* GBS19 chiA enziminin çalıştığı optimum sıcaklık 40°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3.14.)



Şekil 3. 14. Optimum sıcaklık grafiği

3.11. *Myzus persicae* Üzerine İnsektisidal Aktivite Testleri

Yaprak daldırma metodu kullanılarak yapılan aktivite denemelerinde 72 saatlik inkübasyon sonunda yaprak üzerinde yaşayan canlı ve ölü bitler sayıldı ve sonuçlar grafik oluşturularak karşılaştırıldı (Şekil 3.15.)



Şekil 3. 15. chiA enziminin (kaba ve saf) farklı konsantrasyonlarda *M. persicae* üzerine insektisidal etkileri

3.11.1. İsektisidal Aktivite Sonuçlarının LD50 Değerleri

İsektisidal aktivite sonuçlarına göre *M. persicae*'lerin %50'sini öldürmek için gerekli enzim konsantrasyonları (LD50) hesaplanmıştır (Çizelge 3.7.) Saflaştırılmamış chiA enziminin saf chiA enzimine göre öldürücülüğünün yaklaşık 5 kat daha düşük olduğu bulunmuştur.

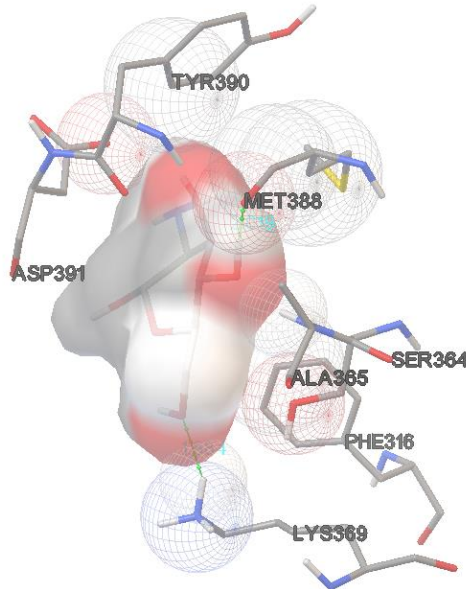
Çizelge 3. 7. chiA enzim LD₅₀ değerleri

Örnek	LD ₅₀
Saf Enzim	15.804 ppm
Kaba Enzim	81.090 ppm

3.12. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

3.12.1. chiA-Kitin Bağlanma

Yapılan analizler sonucu ile chiA ile kitin arasında en yüksek bağlanmanın -4.10 kcal/mol olduğu tespit edilmiştir. Bunun haricinde enzim üzerinde 7 ayrı yerde de bağlanmalar (4.0-3.2 kcal/mol seviyelerinde) gerçekleştiği tespit edilmiş olup en yüksek bağlanmanın gerçekleştiği oda sonuçları burada gösterilmiştir. Yerleştirme sonuçları ile ilgili sonuçlar ve bağlanma şekilleri verilmiştir (Şekil 3.16.) En iyi bağlanma ve etkileşim noktası TYR₃₉₀, MET₃₈₈, ASN₃₉₁, SER₃₆₄, ALA₃₆₅, PHE₃₁₆ ve LYS₃₆₉ koordinatlarında gerçekleşmiştir.



Şekil 3. 16. chiA proteini ile kitin molekülü arasında etkileşim

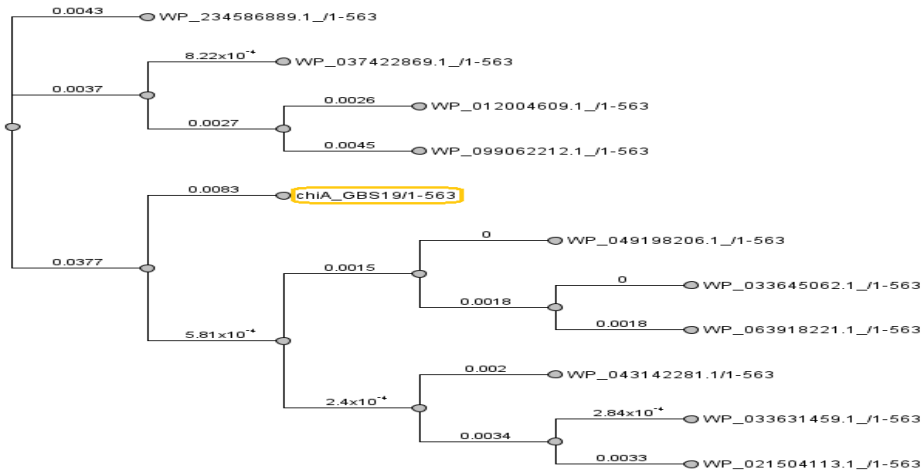
3.12.2. chiA Proteinini Benzerlik Karşılaştırma Sonucu

S. marcescens GBS19 izolatına ait chiA proteinine ait aminoasit dizisi (Şekil 3.17.) ve nükleotid sekansı (Şekil 3.19.) verilmiştir.

>chiA aminoasit sekansı (<i>Serratia marcescens</i> GBS19)			
MRKFNKPLLA	LVIGSTLCSA	AQAAAPGKPT	IAWGNTKFAI VEVDQAATAY NNLVKVKNAA 60
DVSVSWNLWN	GDTGTTAKIL	LNGKEAWSGP	STGASGTANF KVNKGGRYQM QVALCNADGC 120
TASDATEIVV	ADTDGSHLAP	LKEPLLEKNK	PYKQNSGKVV GSYFVEWGVY GRNFTVDKIP 180
AQNLTHLLYG	FIPICGGNGI	NDSLKEIEGS	FQALQRSCQG REDFKVSIHD PFAALQKAQK 240
GVTAWDDPYK	GNFGQLMALK	QAHPDLKILP	SIGGWTLSDP FFFMGDKVKR DRFVGSVKEF 300
LQTWKFFDGV	DIGWEFPGGN	GANPNLGSPQ	DGETYVLLMK ELRAMLDQLS AETGRKYELT 360
SAISAGKDKI	DKVAYNVAQN	SMDHIFLMSY	DFYGAFDLKN LGHQATALNAP AWKPDATYTT 420
VNGVNALLAQ	GVKPGKIVVG	TAMYGRGWTG	VNGYQNNIPF TGTATGPVKG TWENGIVDYR 480
QIASQFMSGD	WQYTYDATAE	APYVFKPSTG	DLITFDDARS VQAKGKYVLD KQLGGLFSWE 540
IDADNGDILN	SMNASLGNSA	GVQ	563

Şekil 3. 17. *S. marcescens* GBS19 chiA aminoasit sekansı

İzolatomuz chiA proteinine en yakın benzerlik gösteren kitinaz proteinleri NCBI veritabanından indirilmiştir ve Neighbor joining yöntemi ile filogenetik ağaç çizilmiştir ve *S. marcescens* GBS19'a ait chiA ağaç üzerinde işaretlenmiştir (Şekil 3.18.). Bu sonuçlara göre kendisine en yakın grupsal dallanmalara göre klonlanarak çalışılan sekans Neighbor Joining analizine göre 83/1000 oranında bir farklılık göstermiştir.

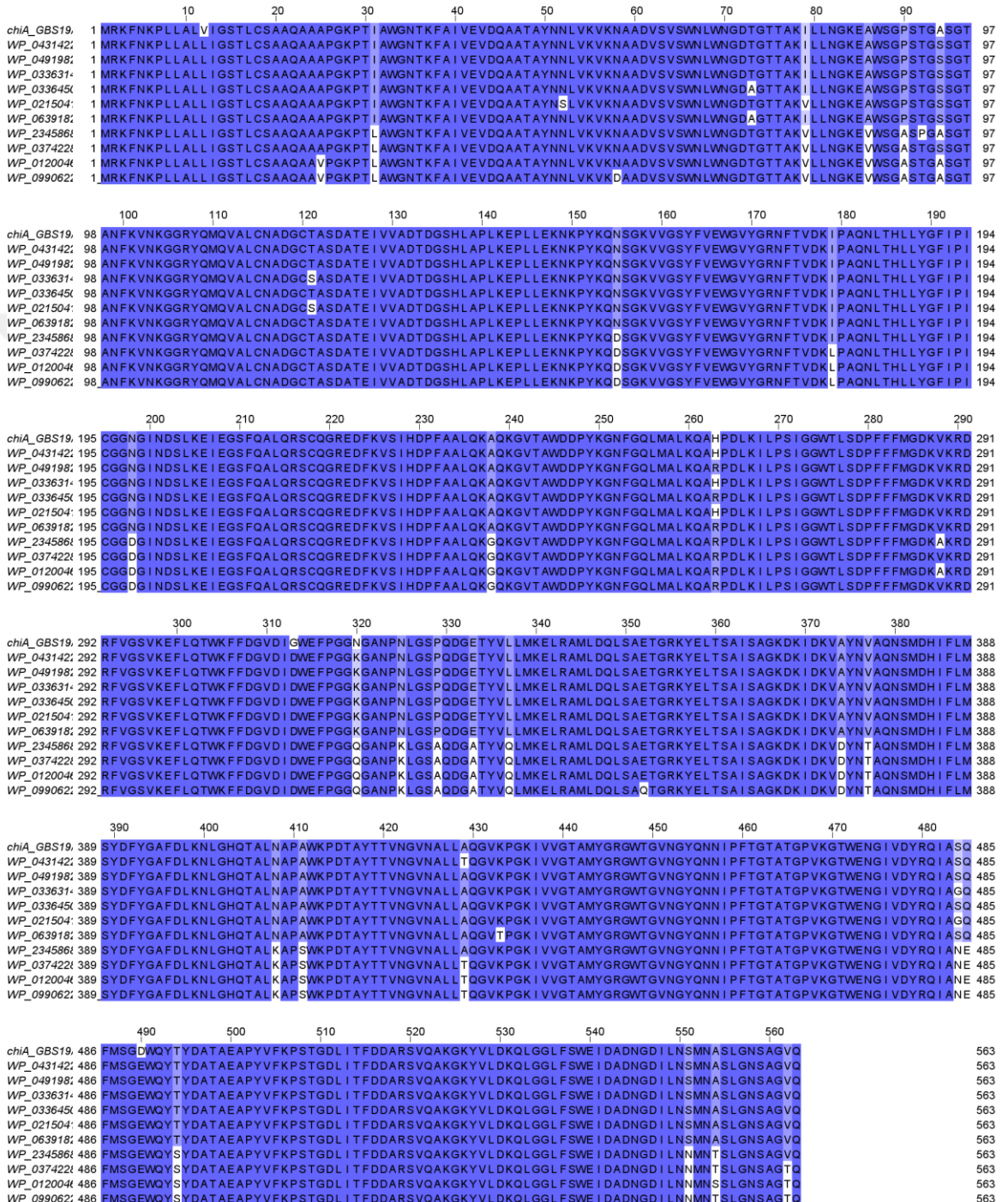


Şekil 3. 18. chiA proteinleri filogenetik ağaç

>chiA gen sekansı (<i>Serratia marcescens</i> GBS19)						
ATGCGCAAAT	TTAATAAACC	GCTGTTGGCG	CTGGTGATCG	GCAGCACGCT	GTGTCCGCG	60
GCGCAGGCCG	CCGCGCCGGG	CAAGCCGACC	ATCGCCTGGG	GCAACACCAA	GTTCGCCATC	120
GTCGAAAGTCG	ATCAGGCGGC	CACCGCTTAT	AATAATCTGG	TGAAGGTAAA	AAATGCCGCC	180
GACGTTTCGG	TCTCCTGGAA	TTTATGGAAT	GGCGACACCG	GCACGACGGC	AAAAATTTTA	240
TTAAATGGCA	AAGAGGCGTG	GAGCGGCCCT	TCAACCGGCG	CTTCCGGTAC	GGCGAATTTT	300
AAAGTGAATA	AAGGCGGCCG	TTATCAAATG	CAGGTGGCGT	TGTGCAATGC	CGACGGCTGC	360
ACCGCCAGCG	ACGCCACCGA	AATTGTGGTG	GCCGACACCG	ACGGCAGCCA	TTTGGCGCCG	420
TTGAAAGAGC	CGCTGCTGGA	AAAGAATAAA	CCCTATAAAC	AGAATTCGGG	CAAAGTGGTC	480
GGCTCTTATT	TCGTCGAGTG	GGGCGTTTAC	GGGCGCAATT	TCACCGTCGA	CAAGATCCCG	540
GCGCAGAACC	TGACCCATCT	GCTGTACGGC	TTTATCCCGA	TCTGCGGCGG	CAACGGCATC	600
AACGACAGCC	TGAAAGAGAT	CGAAGGCAGC	TTCCAGGCGT	TGCAGCGCTC	CTGCCAGGGT	660
CGCGAGGACT	TCAAAGTCTC	GATTCACGAT	CCGTTGCGCG	CGCTGCAAAA	AGCGCAGAAG	720
GGCGTGACCG	CCTGGGATGA	CCCCTACAAG	GGCAACTTCG	GCCAGCTGAT	GGCGCTGAAG	780
CAGGCGCATC	CTGACCTGAA	AATCCTGCCG	TCGATCGGCG	GCTGGACGCT	GTCCGACCCG	840
TTCTTCTTCA	TGGGCGACAA	GGTGAAGCGC	GATCGCTTCG	TCGGTTCGGT	GAAAGAGTTC	900
CTGCAGACCT	GGAAGTTCTT	CGATGGCGTG	GATATCGGCT	GGGAGTTCCC	GGGCGGCAAC	960
GGTGCCAACC	CGAACCTGGG	CAGCCCAGCAG	GACGGGGAAA	CCTATGTGCT	GTTGATGAAG	1020
GAGCTGCGGG	CGATGCTGGA	TCAGCTGTCC	GCGGAAACCG	GCCGCAAGTA	TGAGCTGACC	1080
TCCGCCATCA	GCGCCGGCAA	GGACAAGATC	GACAAGGTGG	CTTACAACGT	CGCGCAGAAC	1140
TCGATGGATC	ACATCTTCCT	GATGAGCTAC	GACTTCTACG	GCGCCTTCGA	TCTGAAAAAC	1200
CTGGGGCATC	AGACCGCGCT	GAATGCGCCG	GCCTGGAAAC	CGGACACCGC	CTACACCACG	1260
GTGAACGGCG	TCAATGCGCT	GCTGGCGCAG	GGCGTCAAGC	CGGGCAAGAT	CGTGGTCCGGC	1320
ACCGCCATGT	ATGGCCGCGG	CTGGACCGGG	GTGAACGGCT	ACCAGAACAA	CATTCCGTTC	1380
ACCGGCACCG	CCACCGGGCC	GGTTAAAGGC	ACCTGGGAGA	ACGGCATCGT	GGACTACCGC	1440
CAAATCGCCA	GCCAGTTCAT	GAGCGGCGAT	TGGCAGTACA	CCTACGACGC	CACGGCGGAA	1500
GCGCCTTACG	TGTTCAAACC	TTCCACCGGC	GATCTGATCA	CCTTCGACGA	TGCCCCGCTCG	1560
GTGCAGGCCA	AGGGCAAGTA	CGTGTGATG	AAGCAGTTGG	GCGGCCTGTT	CTCCTGGGAG	1620
ATCGACGCGG	ACAACGGCGA	TATTCTCAAC	AGCATGAACG	CCAGCCTGGG	CAACAGCGCC	1680
GGCGTTCAAT	AA					1692

Şekil 3. 19. *S. marcescens* GBS19 chiA gen sekansı

Aminoasit verisi kullanılarak NCBI veritabanında bulunan diğer kitinaz proteinleri ile aminoasit sekansları karşılaştırılmıştır. Elimizdeki izolata ait chiA proteini diğer proteinlere göre 12, 313 ve 490. aminoasitlerde tamamen farklılık göstermiştir (Şekil 3.20.).



Şekil 3. 20. chiA proteinleri aminoasit benzerliği

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kitin doğada yaygın olarak dağılmıştır ve yengeçler ve karidesler gibi kabukluların kabuklarının, böceklerin dış iskeletlerinin ve çeşitli mantarların hücre duvarlarının önemli bir bileşenini oluşturur. Son yıllarda çeşitli özellikleri ve çok çeşitli potansiyel endüstriyel uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Bhattacharya vd., 2007).

Kitinazlar (EC 3.2.1.14), N-asetilglukozamin (GlcNAc) 'nin çözünmez doğrusal β -1,4 bağlı bir polimeri olan kitinin hidrolitik bozulmasını katalize eden glikozil hidrolazlardır (Bhattacharya vd., 2007). Genel olarak, GH18 kitinazlar bakterilerde, mantarlarda, virüslerde, hayvanlarda ve bazı bitkilerde bulunabilirken, GH19 enzimleri esas olarak bitkilerde ve nematodlarda ve nadiren bakterilerde tanımlanmıştır (García-Fraga vd., 2015).

Sentetik pestisitlerin yoğun kullanımının çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi, bitki hastalıklarını ve zararlılarını kontrol etmek için çevre dostu uygulamalar arayışını teşvik etmiştir. Bunlar arasında, faydalı organizmaları veya ürünlerini (biyoaktif moleküller veya hidrolitik enzimler) kullanmaya dayanan biyokontrol, en büyük vaadi tutar ve bütünleşmiş haşere yönetiminin bir ayağı olarak kabul edilir. Kitinazlar ise bu amaç için özellikle çekicidir, çünkü fungus öldürücü, böcek öldürücü ve nematoidal aktiviteleri vardır (Berini vd., 2018) Biyopestisit pazarı hala toplam küresel bitki koruma pazarının küçük bir bölümünü temsil etmektedir (2016 yılında tahmini değeri 2,78 milyar dolardır), ancak çok hızlı bir şekilde büyümesi ve 2022 yılının sonuna kadar 6,55 milyar dolara ulaşması ve büyüme oranının %15,34 olması beklenmektedir (Chen, 2017).

Kitinin doğadaki dağılımı sayesinde, kitinazlar son zamanlarda böcekleri, fungusları ve nematodları aynı anda kontrol edebildikleri için entegre haşere yönetimi stratejilerinde umut verici biyopestisitler olarak olası kullanımlarına dikkat çekmişlerdir (Berini vd., 2016). Böceklerde bağırsak ve dış iskelet yapısı içerdikleri kitin polimerleri sebebi ile, kitinaz tarafından hedef alınan önemli kısımlardandır. Bu sebeple mikroorganizmalar tarafından üretilen kitinaz enzimi zararlı böceklerin mücadelesinde kullanılabilme potansiyeli olan mikrobiyal ajanlardır (Sulaman, 2020).

Bugüne kadar, *Bacillus licheniformis* LHH100, *Chitinibacter* sp. GC72, *Bacillus holodurans* C-125, *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T, *Serratia*

proteamaculans 568, *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Bacillus altitudinis* KA15, *Paenibacillus barengoltzii*, *Cohnella* sp. A01, *Serratia marcescens* B4A, *Hydrogenophilus hirschii* KB-DZ44, *Xenorhabdus nematophila* HB310 gibi bakteri suşlarına ait kitinaz genleri klonlanmış ve heterolog olarak ifade edilmiştir (Laribi-Habchi vd., 2015; Gao vd., 2015; da Silva vd., 2014; García-Fraga vd., 2015; Purushotham ve Podile, 2012; Lobo vd., 2013; Asmani vd., 2020; Yang vd., 2016; Aliabadi vd., 2016; Babashpour vd., 2012; Bouacem vd., 2018; Liu vd., 2019). Gram (-) negatif bakteriler arasında *S. marcescens*, doğada kitinin en etkili bozucularından biri olarak kabul edilir ve kitinaz işlemselliğini incelemek için model bir sistem olarak kullanılır (Vaaje-Kolstad vd., 2013). Bu çalışmada da topraktan izole edilmiş ve full genom sekansı Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı kütüphanesinde bulunan *S. marcescens* türüne ait GBS19 (Assembly Number: GCA_021474915) suşu kullanılmıştır. *S. marcescens*'e ait chiA'nın β -kitini chiB ve chiC'den çok daha verimli bir şekilde bozduğu bilinmektedir. Benzer bir gözlem α -kitinin bozulması için de yapılmıştır. Buradan elde edilen veri ile, chiA'nın yüksek aktivitesinin, kristalin substrata katalitik verimliliğinden daha fazla erişme konusundaki üstün bir yeteneğinden kaynaklandığı anlaşılabilir (Suzuki vd., 2002). Literatür taramasından elde edilen bilgi doğrultusunda bu çalışmada *S. marcescens* GBS19 chiA proteini çalışılmıştır.

S. marcescens GBS19 bakteri izolatının içerdiği chiA gen bölgesinin kopyalanması amacıyla gene spesifik primerler tasarlanmıştır ve PCR aracılığıyla çoğaltılmıştır. Çoğaltılan gen bölgesi pBluescript II KS (+) vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan gen bölgesinin doğruluğunu saptamak amacıyla klonlar NGS sekans analizine gönderilmiştir ve gelen sonuçlar değerlendirilmiştir. Firmadan gelen sekans sonuçları ve elimizde bulunan gen bölgesinin sekansı karşılaştırıldığında 1692 bp'lik chiA gen bölgesinin vektör içerisine baz kaybı veya değişimi olmadan klonlandığı doğrulanmıştır. Bu değerlendirmeler sonucu izolatımızın sahip olduğu chiA proteini NCBI veritabanında bulunan ref_seq kitinaz proteinleri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda; veritabanındaki *S. marcescens* kitinaz proteinine (WP_043142281) %98,93, *S. nematodiphila* kitinaz proteinine (WP_033631459) %98,76, *S. surfactantfaciens* kitinaz proteinine (WP_063918221) %98,58, *S. entomophila* kitinaz proteinine (WP_234586889) %95,20 ve *S. grimesii* kitinaz proteinine (WP_037422869) %94,85 benzerlik göstermiştir.

Horn vd., (2006) çalışmalarında, *S. marcescens* BJL200 suşu kitinazlarını konak olarak *E. coli* kullanarak klonlamış ve eksprese etmişlerdir. Aynı şekilde Suzuki vd., (2002); Hult vd., (2005) yaptıkları çalışmalarda *S. marcescens* 2170 izolatından kitinazları klonlama ve ekspresyon için *E. coli* konağını kullanmışlardır. Literatür taramalarında bulunan çalışmalardan yola çıkılarak verimli sonuçlar elde edilmesi sebebiyle bu çalışmada, klonlama aşamasında konak olarak *E. coli* TOP10 ekspresyon aşamasında ise *E. coli* BL21(DE3) suşu kullanılmıştır.

Klonlama basamağından sonra ekspresyon aşaması için kitinaz gen bölgesi T7 RNA polimeraz promotoruna sahip pET-22b (+) vektörüne klonlanmıştır ve *E. coli* BL21(DE3) bakterisinde protein ekspresyonu yapılmıştır. Eksprese edilen chiA proteini, vektör içerisinde bulunan his-taq etiketi sayesinde Ni-NTA afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. SDS-PAGE analizi ile saflaştırılan chiA proteininin his-taq kuyruk dahil sahip olduğu büyüklük 62,5 kDA olarak doğrulanmıştır. Bunun yanısıra rekombinant *E. coli* BL21(DE3) bakterisi RNA'sı kullanılarak chiA gen bölgesinin proteine dönüşüp dönüşmediği cDNA PCR ile kontrol edilmiştir ve agaroz jel üzerinde 1708 bp olarak beklenen boyutta bant görülmüştür. Gen ekspresyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek amacıyla ise qPCR yapılmıştır ve erime eğrisinde oluşan piklere göre genin eksprese olduğu sonucuna varılmıştır.

Elde edilen saf chiA enziminin aktivitesi ölçüldükten sonra enzimin çalıştığı optimum pH ve sıcaklık değerleri hesaplanmıştır. 3-10 pH aralığında yapılan ölçümlerde belirgin bir şekilde farklılık görülmemiştir bununla birlikte pH:5 de enzim aktivitesi daha yüksek ölçülmüştür. Okay ve Alshehri (2020), *S. marcescens* Bn10'dan izole ettikleri chiA proteini için optimum pH'yı 9 (alkali) bulmuşlardır. Aynı şekilde Aggarwal vd., (2016) *S. marcescens*'den izole ettikleri kitinaz proteinine ait optimum pH'yı 9 olarak bildirmişlerdir. Benzer biçimde Danışmazoğlu vd., (2015), *S. marcescens*'den chiA izole etmişlerdir ve optimum pH'sını 8 olarak bulmuşlardır. Buna nazaran Babashpour vd., (2012) yaptıkları çalışmada *S. marcescens* B4A'dan saflaştırdıkları chiA'nın optimum pH'sını 6 (asidik) olduğunu belirlemişlerdir. Nawani ve Kapadnis, (2001)'in çalıştıkları *S. marcescens* NK1 izolatına ait kitinaz en iyi aktiviteyi pH:6,2'de göstermiştir. Başka bir çalışmada Li vd., (2020), *S. marcescens*'den saflaştırdıkları chiA enzimine ait optimum pH'yı 6 bulmuşlardır. Zarei vd., (2011), çalışmalarında *S. marcescens* B4A izolatını kullanmışlardır fakat chiA enziminin optimum pH'sını Baboshour vd., (2012) yaptığı çalışmaya göre farklı

olarak pH:5 bulmuşlardır. Moon vd., (2017), ise *S. marcescens* PRNK-1'den izole ettikleri kitinaz enzimin optimum pH'sını 5,5 bulmuşlardır. Literatür taramalarında *S. marcescens* bakterisine ait farklı izolatların sahip oldukları chiA enziminin optimum pH'sının'da farklı olabileceği görülmüştür.

Toprak orjinli *S. marcescens* GBS19 izolatına ait chiA enziminin optimum sıcaklığı 40°C olarak bulunmuştur. Li vd., (2020), Uzak doğu mutfağında kullanılan *Lentinula edodes* (Şitaki mantarı) üzerinden *S. marcescens* türü bakteri izole etmişlerdir. İzole ettikleri bakteriye ait chiA proteini üzerinde yaptıkları çalışmada saflaştırdıkları enzimin optimum sıcaklığını 55°C bulmuşlardır. 2020 yılında Okay ve Alshehri *Balaninus nucum* (Fındık kurdu)'dan izole edilen *S. marcescens* chiA proteini üzerine çalışmışlardır ve çalıştıkları enzimin optimum sıcaklığını 60°C olarak bildirmişlerdir. Danışmazoğlu vd., (2015), ölü *Helicoverpa armigera* (Yeşil kurt) larvaları üzerinden bakteri izolasyonu yapmışlardır ve daha sonra izole ettikleri bakterinin 16s rRNA sonucuna göre *S. marcescens* türü olduğunu belirlemişlerdir. Buldukları bakteriye ait chiA enziminin optimum sıcaklığını 37°C bildirmişlerdir. Literatür taramalarına bakıldığında farklı orjinlerden izole edilen *S. marcescens* bakterisine ait kitinazlar farklı sıcaklıklarda optimum aktivite göstermiştir. Bununla birlikte çalışmamızda izole edilen chiA enziminin optimum sıcaklığının, *M. persicae*'nin ilkbahar ve yaz aylarında dağılım gösterdiği yerlerde bulunan hava sıcaklıklarına yakın olması, tarım zararlısı şeftali yaprak bitine karşı biyolojik mücadelede kullanılabilme potansiyelinin olabileceği görülmüştür. Broadway vd., (1998) yaptıkları çalışmada *Streptomyces albidoflavus* bakterisine ait endokitinazları *M. persicae* zararlısına denemişlerdir ve böceğin hayatta kalım oranını önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Danışmazoğlu vd., (2015), *S. marcescens* Ha-Pink'ten izole ettikleri chiA, *H. armigera* larvaları üzerinde böcek öldürücü aktivite göstermiştir. *B. Laterosporus*'dan saflaştırılmış bir kitinazın ise *Plutella xylostella* (Lahana Yaprakgüvesi) üzerine insektisidal aktivitesinin olduğu belirtilmiştir (Prasanna vd., 2013).

Bugüne kadar, kitinaz üretimi için çeşitli kaynaklar araştırılmıştır ve daha iyi özelliklere sahip birçok kitinaz keşfedilmiştir. Bununla birlikte doğal olarak üretilen kitinazlar endüstriyel formata uymadıkları için endüstriyel uygulamada değillerdir. Bu nedenle genetik mühendisliği, endüstri ve doğal suşlar arasında arabulucu olarak rol oynamıştır. Kitinazların verimliliğindeki artış, vahşi suşlara kıyasla rekombinant organizmalar tarafından belirtilmiştir (Gohel vd., 2004). Kitinazların uygulamaları, biyokontrol ajanı olarak işlev gördüğü tarım gibi çeşitli alanlarda iyi bilinmektedir.

Rekombinant enzim üretim sistemleri artık verimli endüstriyel kitinaz üretimi için umut verici platformlardır (Yan ve Fong, 2015). Mikrobiyal kitinazlar, büyük miktarlarda çeşitli kitinazlar üretme potansiyellerini kanıtlamıştır (Singh vd., 2021). Kitinazların sayısız uygulaması nedeniyle, taleplerinin yakın gelecekte artması beklenmektedir (Poria vd., 2021).

Yapılan çalışmada kitinaz enzimi kullanılarak ürün veriminin artırılması ve ürün kayıplarının azaltılması mümkün olabilir. Kitinazların böceğin kitin tabakasını parçalaması ve bu parçalanma sonucu böceğin beslenmesini ve savunmasını azaltması sebebiyle bitki zararlısı böceklere karşı biyolojik temelli kontrol metodu olarak kullanılma potansiyelleri oldukça yüksektir. Aynı zamanda bitki zararlılarıyla mücadelede kullanılan ilaçlar içerisinde kitinaz enziminin kullanılabilirliği mümkün olduğundan dolayı bu ilaçların üretimi ve birim alandaki etkinliği artırılabilir.

Dünyada ve ülkemizde kitinaz enziminin endüstriyel üretimi oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla kitinaz enziminin ticari teminini arttırmaya yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Elde edilen sonuçlar, mikrobiyal kaynaklı *S. marcescens* GBS19 chiA proteininin *M. persicae* üzerine etkilerini araştırmak için bundan sonraki çalışmalara bir başlangıç olmuştur. chiA proteininin böcek öldürücü etkisi ve hangi tür böceklerde kontrol amaçlı kullanabileceği yeni denemeler kurularak araştırılmalıdır. Söz konusu enzim için biyopestisit olarak kullanım potansiyelinin olduğu, bu tez çalışmasında bilimsel verilerle ortaya konmuştur. Bundan sonraki araştırmalar bu enzimin endüstriyel ve saha uygulama amaçlı kullanımı ile ilgili yeni denemelerle devam edecektir.

KAYNAKÇA

- Aggarwal, C., Paul, S., Tripathi, V., Paul, B., & Khan, M. (2016). Chitinase producing *Serratia marcescens* for biocontrol of *Spodoptera litura* (Fab) and studies on its chitinolytic activities.
- Aliabadi, N., Aminzadeh, S., Karkhane, A. A., & Haghbeen, K. (2016). Thermostable chitinase from *Cohnella* sp. A01: isolation and product optimization. *Brazilian journal of microbiology*, 47, 931-940.
- Anstead, J. A. (2005). Population genetics of knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer)(Hemiptera: Aphididae). University of London, University College London (United Kingdom).
- AphidTrek. "Myzus"
Myzus | AphidTrek
Son Erişim Tarihi 28.05.2022.
- Arslan, S. Çiçekgil, Z., 2018. "Türkiye'de Tarım İlacı Kullanım Durumu ve Kullanım Öngörüsü", TEAD, 4(1), 1-12.
- Asmani, K. L., Bouacem, K., Ouelhadj, A., Yahiaoui, M., Bechami, S., Mechri, S., ... & Jaouadi, B. (2020). Biochemical and molecular characterization of an acidothermostable endo-chitinase from *Bacillus altitudinis* KA15 for industrial degradation of chitinous waste. *Carbohydrate Research*, 495, 108089.
- Babashpour, S., Aminzadeh, S., Farrokhi, N., Karkhane, A., & Haghbeen, D. K. (2012). Characterization of a chitinase (Chit62) from *Serratia marcescens* B4A and its efficacy as a bioshield against plant fungal pathogens. *Biochemical genetics*, 50(9), 722-735.
- Barbagallo, S., Cocuzza, G., Cravedi, P., & Komazaki, S. (2007). 29 IPM Case Studies: Deciduous Fruit Trees. Aphids as crop pests, 651.
- Bass, C., Puinean, A. M., Andrews, M., Cutler, P., Daniels, M., Elias, J., ... & Slater, R. (2011). Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *Bmc Neuroscience*, 12(1), 1-11.
- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., ... & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 51, 41-51.
- Berezina, N. (2016). Production and application of chitin. *Physical Sciences Reviews*, 1(9).
- Berini, F., Caccia, S., Franzetti, E., Congiu, T., Marinelli, F., Casartelli, M., & Tettamanti, G. (2016). Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of *Lepidoptera*. *Pest Management Science*, 72(5), 980-989.

- Berini, F., Katz, C., Gruzdev, N., Casartelli, M., Tettamanti, G., & Marinelli, F. (2018). Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology advances*, 36(3), 818-838.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., & Gupta, R. K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), 21-28.
- Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K. M., Duggal, A., Dey, K., & Pandey, A. (2013). Industrial enzymes-present status and future perspectives for India.
- Bouacem, K., Laribi-Habchi, H., Mechri, S., Hacene, H., Jaouadi, B., & Bouanane-Darenfed, A. (2018). Biochemical characterization of a novel thermostable chitinase from *Hydrogenophilus hirschii* strain KB-DZ44. *International journal of biological macromolecules*, 106, 338-350.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Broadway, R. M., Gongora, C., Kain, W. C., Sanderson, J. P., Monroy, J. A., Bennett, K. C., ... & Hoffmann, M. P. (1998). Novel chitinolytic enzymes with biological activity against herbivorous insects. *Journal of Chemical Ecology*, 24(6), 985-998.
- CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International). 'Myzus persicae (green peach aphid)'.
 Myzus persicae (green peach aphid) (cabi.org)
 Son Erişim Tarihi 27.03.2022.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B, 2009. The Carbohydrate- Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*, 37: D233-8
- Capinera, John L. (October 2005). "Featured creatures". University of Florida website - Department of Entomology and Nematology. University of Florida.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W. R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate research*, 303(3), 327-332.
- Chen, J. (2017). Global markets for biopesticides. *BCC Res*, 7215.
- da Silva, A. F., García-Fraga, B., López-Seijas, J., & Sieiro, C. (2014). Characterization and optimization of heterologous expression in *Escherichia coli* of the chitinase encoded by the *chiA* gene of *Bacillus halodurans* C-125. *Process Biochemistry*, 49(10), 1622-1629.
- Dahiya, N., Tewari, R., & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(6), 773-782.
- DANIŞMAZOĞLU, M., Demir, I., Sezen, K., Muratoğlu, H., & Nalçacıoğlu, R. (2015). Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 78-87.

- de Souza Vandenberghe, L. P., Karp, S. G., Pagnoncelli, M. G. B., von Linsingen Tavares, M., Junior, N. L., Diestra, K. V., ... & Soccol, C. R. (2020). Classification of enzymes and catalytic properties. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (pp. 11-30). Elsevier.
- Doğan, F.N., Karpuzcu, M.E. 2018. “Türkiye’de Tarım Kaynaklı Pestisit Kirliliğinin Durumu ve Alternatif Kontrol Tedbirlerinin İncelenmesi”, *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg.* 2100.
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., ... & Pei, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 295-302.
- FAO, 2017. “The State of Food Security and Nutrition in the World”, Building resilience for peace and food security. Rome
- Gao, C., Zhang, A., Chen, K., Hao, Z., Tong, J., & Ouyang, P. (2015). Characterization of extracellular chitinase from *Chitinibacter* sp. GC72 and its application in GlcNAc production from crayfish shell enzymatic degradation. *Biochemical Engineering Journal*, 97, 59-64.
- García-Fraga, B., Da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. (2015). A novel family 19 chitinase from the marine-derived *Pseudoalteromonas tunicata* CCUG 44952T: Heterologous expression, characterization and antifungal activity. *Biochemical engineering journal*, 93, 84-93.
- Gene Pulser Xcell electroporation system - bio-rad laboratories
4006217A.pdf (bio-rad.com)
Son Erişim Tarihi 21.12.2022
- Gohel, V., Megha, C., Vyas, P., & Chhatpar, H. S. (2004). Strain improvement of chitinolytic enzyme producing isolate *Pantoea dispersa* for enhancing its biocontrol potential against fungal plant pathogens. *Annals of microbiology*, 54(4), 503-515.
- Gomaa, E. Z. (2021). Microbial chitinases: Properties, enhancement and potential applications. *Protoplasma*, 258(4), 695-710.
- Görmez, A. (2011). Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit rekasyonları. *Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, 28-30.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases: an update. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5(1), 21.
- Hansoylu, R. B. (2003). Türkiye topraklarından elde edilen entomopatojen fungus *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. suşlarının biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılması. *Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.*
- Horn, S. J., Sørli, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Vårum, K. M., & Eijsink, V. G. H. (2006). Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(1-2), 39-53.
- Hou, J., Aydemir, B. E., & Dumanli, A. G. (2021). Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 379(2206), 20200331.

- Hsu, S. C., & Lockwood, J. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology*, 29(3), 422-426.
- Hult, E. L., Katouno, F., Uchiyama, T., Watanabe, T., & Sugiyama, J. (2005). Molecular directionality in crystalline β -chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens* 2170. *Biochemical Journal*, 388(3), 851-856.
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 'IRAC Susceptibility Test Methods Series Method No:001.
- <https://irac-online.org/methods/myzus-persicae-adult/>
- Son Erişim Tarihi 01.05.2022.
- Jana, S. (2017). Understanding Glycoside Hydrolase Processivity for Improved Biomass Conversion. University of Kentucky.
- Khoushab, F., & Yamabhai, M. (2010). Chitin research revisited. *Marine drugs*, 8(7), 1988-2012.
- Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A. A., & Kim, K. H. (2019). Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. *Journal of Controlled Release*, 294, 131-153.
- Kuzu, S. B. (2008). Kitinaz Üreten *Bacillus* İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Çukurova, Turkey (in Turkish)).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Laribi-Habchi, H., Bouanane-Darenfed, A., Drouiche, N., Pauss, A., & Mameri, N. (2015). Purification, characterization, and molecular cloning of an extracellular chitinase from *Bacillus licheniformis* strain LHH100 isolated from wastewater samples in Algeria. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1117-1128.
- Lee, W. W., Shin, T. Y., Bae, S. M., & Woo, S. D. (2015). Screening and evaluation of entomopathogenic fungi against the green peach aphid, *Myzus persicae*, using multiple tools. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(3), 607-615.
- Li, J., Zheng, J., Liang, Y., Yan, R., Xu, X., & Lin, J. (2020). Expression and characterization of a chitinase from *Serratia marcescens*. *Protein Expression and Purification*, 171, 105613.
- Li, S., Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.
- Liu, J., NanGong, Z., Zhang, J., Song, P., Tang, Y., Gao, Y., & Wang, Q. (2019). Expression and characterization of two chitinases with synergistic effect and antifungal activity from *Xenorhabdus nematophila*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 1-10.
- Liu, X., & Kokare, C. (2017). Microbial enzymes of use in industry. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 267-298). Academic Press.

- Lobo, M. D. P., Silva, F. D. A., Landim, P. G. D. C., Da Cruz, P. R., De Brito, T. L., De Medeiros, S. C., ... & Grangeiro, T. B. (2013). Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC biotechnology*, *13*(1), 1-15.
- Merzendorfer, H., & Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, *206*(24), 4393-4412.
- Mizuno, R., Fukamizo, T., Sugiyama, S., Nishizawa, Y., Kezuka, Y., Nonaka, T., ... & Watanabe, T. (2008). Role of the loop structure of the catalytic domain in rice class I chitinase. *Journal of biochemistry*, *143*(4), 487-495.
- Moe, C. M. (2001). Chitinase: The vertebrate side of the story. University of Maryland, College Park.
- Moon, C., Seo, D. J., Song, Y. S., Hong, S. H., Choi, S. H., & Jung, W. J. (2017). Antifungal activity and patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide degradation via chitinase produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. *Microbial pathogenesis*, *113*, 218-224.
- Nampoothiri, K. M., Baiju, T. V., Sandhya, C., Sabu, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2004). Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, *39*(11), 1583-1590.
- Nawani, N. N., & Kapadnis, B. P. (2001). One-step purification of chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. *Journal of Applied Microbiology*, *90*(5), 803-808.
- Okay, S., & Alshehri, W. A. (2020). Overexpression of chitinase a gene from *Serratia marcescens* in *Bacillus subtilis* and characterization of enhanced chitinolytic activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *63*.
- Oyeleye, A., & Normi, Y. M. (2018). Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Bioscience reports*, *38*(4).
- Patil, R. S., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology*, *26*(7), 473-483.
- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., & Singh, S. (2021). Current perspectives on chitinolytic enzymes and their agro-industrial applications. *Biology*, *10*(12), 1319.
- Pradeep, G. C., Choi, Y. H., Choi, Y. S., Suh, S. E., Seong, J. H., Cho, S. S., ... & Yoo, J. C. (2014). An extremely alkaline novel chitinase from *Streptomyces* sp. CS495. *Process Biochemistry*, *49*(2), 223-229.
- Prasanna, L., Eijsink, V. G., Meadow, R., & Gåseidnes, S. (2013). A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. *Applied microbiology and biotechnology*, *97*(4), 1601-1611.
- Purushotham, P., & Podile, A. R. (2012). Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568. *Journal of bacteriology*, *194*(16), 4260-4271.
- Ramirez, M. G., Avelizapa, L. R., Avelizapa, N. R., & Camarillo, R. C. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R®, a useful substrate to select chitinolytic

- microorganisms and to evaluate chitinases. *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 213-219.
- Rebecca, L. J., Susithra, G., Sharmila, S., & Das, M. P. (2013). Isolation and screening of chitinase producing *Serratia marcescens* from soil. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 5(2), 192-195.
- Ruiz-Herrera, J., & Martínez-Espinoza, A. D. (1999). Chitin biosynthesis and structural organization in vivo. *Exs*, 87, 39-53.
- SETA, 2019. "Türkiye Tarımına Yeniden Bakış", İstanbul: Turkuvaz Haberleşme ve Yayıncılık.
- Sexson, D. L., Wyman, J., Radcliffe, E. B., Hoy, C. J., Ragsdale, D. W., & Dively, G. P. (2005). Potato. *Vegetable Insect Management*, R. Foster and B. Flood, eds., Meister Publishing, Willoughby, OH, USA, 92-107.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.
- Sikorski, P., Hori, R., & Wada, M. (2009). Revisit of α -chitin crystal structure using high resolution X-ray diffraction data. *Biomacromolecules*, 10(5), 1100-1105.
- Singh, R. V., Sambyal, K., Negi, A., Sonwani, S., & Mahajan, R. (2021). Chitinases production: A robust enzyme and its industrial applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 39(3), 161-189.
- Suginta, W., Sirimontree, P., Sritho, N., Ohnuma, T., & Fukamizo, T. (2016). The chitin-binding domain of a GH-18 chitinase from *Vibrio harveyi* is crucial for chitin-chitinase interactions. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1111-1117.
- Sulaiman, A. (2020). *Viral ve bakteriel kitinazların insektisidal aktivitelerinin karşılaştırılması; kitinazın viral infektiviteye etkisi* (Doctoral dissertation, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Sundheim, L., Poplawsky, A. R., & Ellingboe, A. H. (1988). Molecular cloning of two chitinase genes from *Serratia marcescens* and their expression in *Pseudomonas* species. *Physiological and molecular plant pathology*, 33(3), 483-491.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(5), 1075-1083.
- Tabatabai, M. A. (1994). Soil enzymes. *Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties*, 5, 775-833.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, 8, 89802-89811.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M., & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*—a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *The FEBS journal*, 280(13), 3028-3049
- Whitehead, L. A. (1997). Complex polysaccharide degrading enzyme arrays synthesized by a marine bacterium. University of Maryland, College Park.

- Yang, S., Fu, X., Yan, Q., Guo, Y., Liu, Z., & Jiang, Z. (2016). Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chemistry*, *192*, 1041-1048.
- Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Daliri, M., Noghabi, K. A., ... & Motallebi, A. (2011). Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 1017-1029.





EKLER

EK A. Sekans Analizi

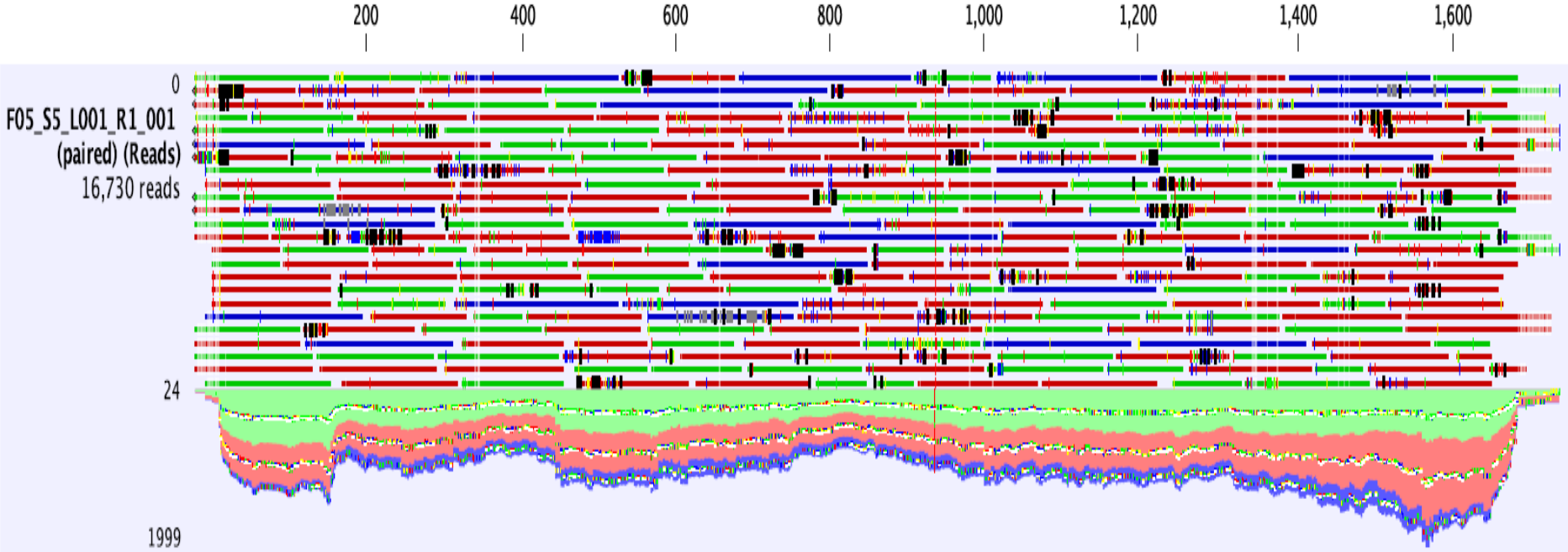




Table of contents

1. Mapping summary report	3
1.1 Summary statistics	3
1.2 Distribution of read length	4
1.3 Distribution of mapped read length	5
1.4 Distribution of un-mapped read length	6
1.5 Paired reads distance distribution	7

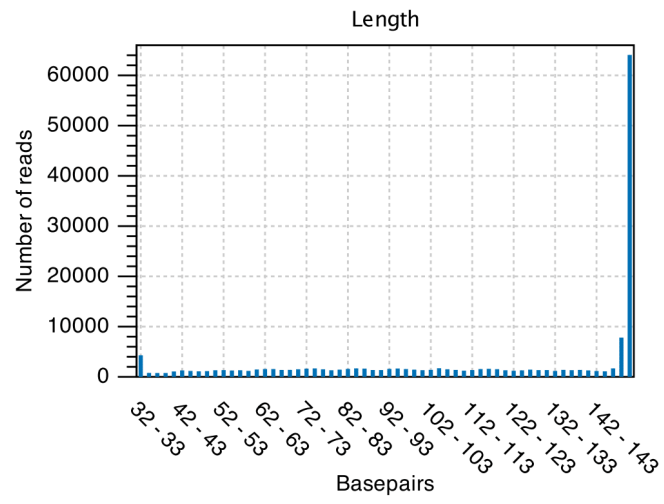
1. Mapping summary report

1.1 Summary statistics

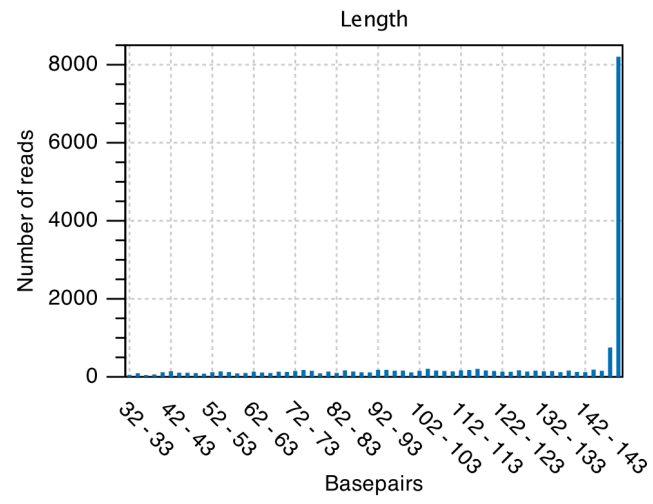
	Count	Percentage of reads	Average length	Number of bases
References	1	-	1,692.00	1,692
Mapped reads	16,730	10.87%	124.59	2,084,316
Not mapped reads	137,142	89.13%	116.83	16,022,948
Reads in pairs	2,980	1.94%	212.52	448,574
Broken paired reads	13,750	8.94%	118.96	1,635,742
Total reads	153,872	100.00%	117.68	18,107,264

Percentage of bases
-
11.51%
88.49%
2.48%
9.03%
100.00%

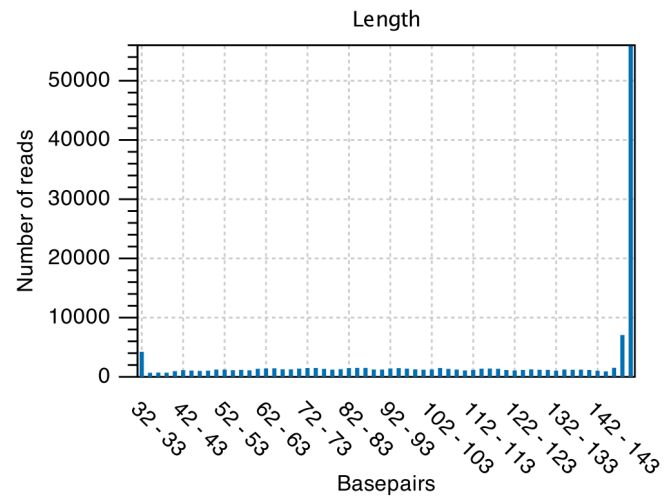
1.2 Distribution of read length



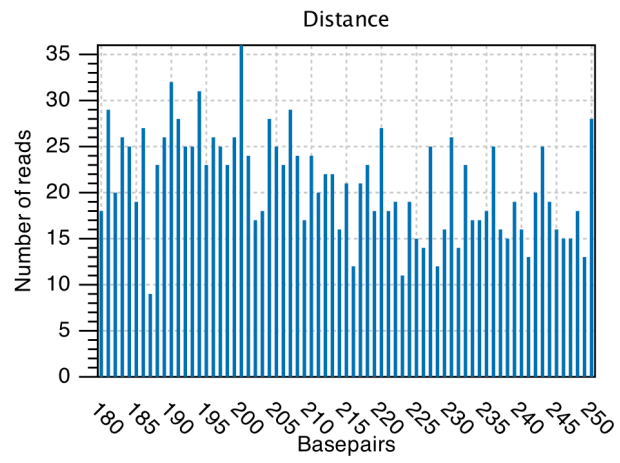
1.3 Distribution of mapped read length



1.4 Distribution of un-mapped read length



1.5 Paired reads distance distribution



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad: A***t C*N
Uyruk: T.C.
Doğum Tarihi: 0*/0*/9*
Medeni Hali: Bekar
Telefon: 0 5*3 **1 3* 5*
E-posta: c*****3@gm**l.c*m

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/ Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Biga Atatürk Anadolu Lisesi	2015
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2019

Yabancı Dil

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

Bilimsel Faaliyetler

Bildiriler

A. Can, A. Baasit, Discrimination of bacterial strains by using repetitive domain Sequences with RFLP, Poster Sunum, 5th Syposium on Euroasian Biodiversity (2021)

Y. Kürüm, A. Korkut & **A. Can** Endless Earth, Microbial Biodiversity, Poster Sunum, 5th Syposium on Euroasian Biodiversity (2021)

A. Can, Ö. Baysal, Full Genom Sekansı Yapılmış *Serratia marcescens* Türüne Ait Yeni Bir Suşun, chiA Gen Bölgesinin Klonlanması, Karakterizasyonu, Ekspresyonu, Enzim Aktivite Tayini ve *Myzus persicae* Üzerine Etkisinin İncelenmesi, XII. Fen Bilimleri Araştırma E-Sempozyumu, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 28 Mayıs 2021.

Deneimler

İsteğe Bağlı Yaz Stajı, Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen Fakültesi- Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü- Genomikler ve Transkriptomikler Araştırma Laboratuvarı (2018)

