

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BRUSELLOZA KARŞI ENDEMİK *BRUCELLA ABORTUS*'TAN
REKOMBİNANT OMP25 PROTEİNİ ELDESİ**

TUĞBA ATABEY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. TULİN ARASOĞLU**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BRUSELLOZA KARŞI ENDEMİK *BRUCELLA ABORTUS*'TAN
REKOMBİNANT OMP25 PROTEİNİ ELDESİ

Tuğba ATABEY tarafından hazırlanan tez çalışması 28.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Ayten ERDEM
İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül ERDEMİR ÜSTÜNDAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu çalışma, TÜBİTAK'ın 116S471 numaralı projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her zaman bana yol gösteren ve destek olan danışman hocam Doç. Dr. Tülin Arasoğlu'na;

Bilgi ve fikirleriyle sürekli yanımda olan Doç. Dr. Serap Derman, Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül Erdemir Üstündağ, Dr. Öğr. Üyesi Emel Ordu, Arş. Gör. Hasan Demirci ve Tayfun Acar'a;

Aynı laboratuvarında olmaktan büyük keyif aldığım çalışma arkadaşlarım, neşemi kederimi paylaştığım gönül dostlarım Kübra Trabzonlu, İlkül Akmayan, Gülşah Akbaş, Sefanur Erdöl, Arş. Gör. Şayan Poyraz, Sinem Kurt, Akın Sunulu, Caner Ertürk, Hatice Nur Aydın, Büşra Gümüş, Emrah Bertan ve hayatıma dokunan ismini sayamadığım bütün güzel kalplere içtenlikle teşekkür ediyorum, huzurlu bir hayat diliyorum.

Çok değerli, sevgili babamı rahmetle anıyor, her koşulda desteklerini esirgemeyen canım annem ve ağabeyime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Aralık, 2018

Tuğba ATABEY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTIMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER	4
2.1 Rekombinant DNA Teknolojisi.....	4
2.2 Rekombinant Farmasötikler	5
2.3 Klonlama ve Protein İfadesinin İndüklenmesi	6
2.3.1 Vektörler	7
2.3.2 Transformasyon	9
2.3.3 Protein İfadesinin İndüklenmesi	9
2.3.4 Protein Saflaştırılması	10
2.4 Bruselloz Hastalığı	12
2.5 Hastalık Etmeni: <i>Brucella</i>	13
2.5.1 <i>Brucella abortus</i>	17
2.6 Bruselloz Hastalığıyla Mücadele Yöntemleri ve Aşılama	17
2.7 Omp25 Proteini ve Özellikleri	21
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOD.....	23

3.1	Materyal.....	23
3.1.1	Kullanılan Cihazlar	23
3.1.2	Kullanılan Mikroorganizma Suşları.....	24
3.1.3	Genomik ve Plazmit DNA İzolasyonları	24
3.1.4	PZR ve Elektroforez Reaktifleri	24
3.1.5	PZR Ürününün Saflaştırılması.....	25
3.1.6	Klonlama ve Ekspresyon	25
3.1.7	Proteinlerin SDS-PAGE ile Analizi ve Boyama.....	25
3.1.8	Western Reaktifleri	25
3.1.9	Protein Pürifikasyonu.....	25
3.2	Metot	26
3.2.1	<i>Brucella abortus</i> Tip 3 İzolatının Stok Kültürünün Yapılması	26
3.2.2	<i>Brucella abortus</i> 'tan Genomik DNA İzolasyonu	27
3.2.3	DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi.....	27
3.2.4	Omp25 Gen Bölgesi İçin Primer Tasarımı	28
3.2.5	Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	29
3.2.6	Agaroz Jelde Yürütme	30
3.2.7	Jel Ekstraksiyonu	30
3.2.8	Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit ile Klonlama	31
3.2.9	Transformasyon	35
3.2.10	Koloni PZR.....	35
3.2.11	Plazmit DNA İzolasyonu.....	36
3.2.12	Rekombinant Plazmit DNA Dizi Analizi	37
3.2.13	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyon ve Ekspresyon	37
3.2.14	Örnek Hazırlama ve SDS-PAGE.....	38
3.2.15	Coomassie Boyaması.....	39
3.2.16	Western Blot Analizi	39
3.2.17	Afinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırma.....	41
3.2.18	Protein Konsantrasyon Tayini	44
BÖLÜM 4		
DENEYSEL SONUÇLAR		
46		
4.1	<i>Brucella abortus</i> 'tan Genomik DNA İzolasyonu.....	46
4.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	46
4.3	Jel Ekstraksiyonu.....	47
4.4	Transformasyon.....	48
4.5	Koloni PZR.....	49
4.6	Plazmit DNA İzolasyonu.....	50
4.7	Rekombinant Plazmit DNA Dizi Analizi	50
4.8	SDS-PAGE.....	52
4.9	Western Blot Analizi	53
4.10	Saflaştırma	54
4.11	Protein Konsantrasyonu ve Saflığının Değerlendirilmesi.....	56
BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		
58		
KAYNAKLAR		
63		



SİMGE LİSTESİ

bç	Baz çifti
dk	Dakika
g	Gram
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
Mb	megabaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
rpm	Dakikada dönme hızı
sn	Saniye
V	Volt
x g	Yerçekimi ivmesi ile çarpım
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Derece santigrat

KISALTMA LİSTESİ

Amp	Ampisilin
<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>B. canis</i>	<i>Brucella canis</i>
<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>B. neotoma</i>	<i>Brucella neotoma</i>
<i>B. ovis</i>	<i>Brucella ovis</i>
<i>B. suis</i>	<i>Brucella suis</i>
BCA	Bicinchoninic acid
KOB	Koloni oluşturan birim
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
LPS	Lipopolisakkarit
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
miRNA	mikro RNA
Omp	Outer membrane protein
PBS	Phosphate buffered saline
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleikasit
rOmp25	Rekombinant Omp25
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TNF	Tümör nekrozis faktör
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	pET klonlama sisteminde ekspresyon kontrolünün şematik gösterimi 10
Şekil 2.2	Poli-His tag'daki komşu rezidüer ile Ni-NTA matriksinin etkilişemi ve imidazol-histidin moleküllerinin kimyasal yapıları 11
Şekil 2.3	<i>Brucella</i> LPS tabakasının şematik gösterimi 14
Şekil 3.1	Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel metotların akış şeması 26
Şekil 3.2	Vektör haritası ve özellikleri 32
Şekil 3.3	Klonlama reaksiyonun şematize gösterimi 34
Şekil 4.1	Endemik <i>Brucella abortus</i> biovar tip 3 strainin izole genomik DNA görüntüsü 46
Şekil 4.2	Endemik <i>Brucella abortus</i> biovar tip 3 straini PZR reaksiyonu sonucu elde edilen amplikon ürünü 47
Şekil 4.3	Endemik <i>Brucella abortus</i> biovar tip 3 straini saf Omp25 gen bölgesi amplikon ürünü 48
Şekil 4.4	Rekombinant kolonileri içeren petri görüntüsü 49
Şekil 4.5	Koloni PZR sonuçları 49
Şekil 4.6	Plazmit DNA jel görüntüsü 50
Şekil 4.7	BLASTn sonucu 51
Şekil 4.8	BLASTx sonucu 51
Şekil 4.9	Omp25 dizi bilgileri kullanılarak UPGMA testi ile oluşturulan filogenetik ağaç 52
Şekil 4.10	pET-TOPO102 vektörü içeren ve içermeyen BL21 (DE3) <i>E. coli</i> konukçusundaki ekspresyon profili 53
Şekil 4.11	41 kDa büyüklüğündeki Omp25 ifade edilmesi sonrası Western blot analizi 53
Şekil 4.12	Kolon ile native şartlarda saflaştırılan rekombinant protein 54
Şekil 4.13	Kolon ile denatüre şartlarda saflaştırılan rekombinant protein 55
Şekil 4.14	Kolon ile denatüre şartlarda, solüsyonlarda %10 gliserol kullanılarak saflaştırılan rekombinant protein 55
Şekil 4.15	Ultrafiltrasyon ve diyaliz ile saflaştırılan rekombinant protein SDS-PAGE görüntüsü 56
Şekil 4.16	Eldesi gerçekleştirilen rOmp25 ile ticari rOmp25'in saflığının karşılaştırıldığı SDS- PAGE görüntüsü 57

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1 Omp25 gen bölgesinin çoğaltılması için kurulan PZR reaksiyonu	29
Çizelge 3.2 PZR koşulları	30
Çizelge 3.3 Vektör özellikleri	32
Çizelge 3.4 Klonlama reaksiyonu	34
Çizelge 3.5 Koloni PZR	35
Çizelge 3.6 Koloni PZR döngü koşulları	36
Çizelge 4.1 Clustal W programıyla yapılan karşılaştırılma sonucu elde edilen gen dizilimi benzerlik oranları	52
Çizelge 4.2 BCA protein miktar tayini kiti ile elde edilen toplam protein sonuçları ...	56

BRUSELLOZA KARŞI ENDEMİK *BRUCELLA ABORTUS*'TAN REKOMBİNANT OMP25 PROTEİNİ ELDESİ

Tuğba ATABEY

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Bruselloz; insanlarda sayısız organı etkileyerek spesifik ve/veya spesifik olmayan belirtilerle hastalık yapan, laboratuvarından kaynaklı bakteriyel enfeksiyon ajanı olarak son yıllarda insidansı yükselen, hayvanlarda sıklıkla yavru atımı (düşükler) ve süt veriminin azalması gibi faktörlerden dolayı ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet veren, ayrıca biyoterörizm saldırılarında kullanılan zoonotik bir hastalıktır. Bu hastalıktan korunmak için; insanlarda uygulanabilecek herhangi bir aşının geliştirilmemiş olması, hayvanlarda ise kullanılan aşuların virulansı azaltılmış canlı aşı olması sebebiyle yeni teknolojik yaklaşımlarla etkin aşuların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu amaçla sunulan tez çalışmasında *Brucella abortus* straininin dış membranında yer alan immunojenik özellikteki dış membran proteini Omp25'in, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak eldesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, öncelikle Erzurum İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden temin edilen endemik *B. abortus* tip 3 straininin Omp25 gen bölgesi uygun primerlerle amplifiye edildikten sonra pET102/D-TOPO plazmitine klonlanmıştır. DNA sekans analizi vektörün başarılı bir şekilde oluşturulduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, yapılan filogenetik analiz, ilgili genin diğer *Brucella* suşları ile yakın bir genetik ilişkiye sahip olduğunu göstermiştir. Omp25 genini taşıyan plazmitler, *E.coli* BL21 (DE3) strainine tranforme edilerek ekspresyon gerçekleştirilmiştir. Total protein içeriğinden rOmp25 proteini Ni-NTA afinite kromatografisi yöntemi ile denatüre koşullarda saflaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen son ürünlerdeki toplam protein konsantrasyonu BCA metodu ile 0,50 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Tüm bu aşamalarda gerekli doğrulamalar yapılmış ve son ürün ticari olarak satın alınan rOmp25 ile karşılaştırılmıştır.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, Omp25, aşı, rekombinant protein, *Brucella abortus*



**RECOMBINANT OMP25 PROTEIN PRODUCTION FROM
ENDEMIC *BRUCELLA ABORTUS* AGAINST BRUCELLOSIS**

Tuğba ATABEY

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Tülin ARASOĞLU

Brucellosis is a zoonotic disease that affects numerous organs in humans and causes disease with specific and/or nonspecific symptoms, has increasing incidence recently as an bacterial infection agent originating from laboratory, causes serious economical losses due to factors such as miscarriages and the decrease in milk yield in animals, and moreover used in bioterrorism attacks. To prevent this disease, it is needed to develop effective vaccines with new technological approaches because of the lack of any vaccine that can be applied in humans and the vaccine used in animals is live vaccine with decreased virulence.

In this thesis, the immunogenic outer membrane protein Omp25, which is located in the outer membrane of *Brucella abortus* strain, was obtained by using recombinant DNA technology. In the study, the Omp25 gene region of the endemic *Brucella abortus* type 3 strain provided by Erzurum Provincial Directorate of Food, Agriculture and Livestock was amplified with suitable primers and then cloned into the pET102 / D-TOPO plasmid. DNA sequencing analysis confirmed that the vector was successfully established. Also, phylogenic analysis showed the gene of interest has a near genetic relation with other *Brucella* strains. The plasmids carrying the Omp25 gene were transformed into *E.coli* BL21 (DE3) strain and expression was performed. rOmp25 protein was purified from total protein contents by Ni-NTA affinity chromatography method in denaturing conditions. The total protein concentration of the final pure product was calculated as 0.50 mg/mL with BCA method. The necessary validations were made at all these stages and the final product was compared with the commercially purchased rOmp25.

Keywords: Brucellosis, Omp25, vaccine, recombinant protein, *Brucella abortus*



YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği alanındaki gelişmeler, genlerin fonksiyonlarının ve lokasyonlarının tanımlanması, izolasyon, klonlama, dizileme tekniklerindeki ilerlemeler rekombinant DNA teknolojisinin kullanımını gerektiren biyoteknolojik çalışmaların sayısında artışa yol açmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi DNA fragmentlerinin istenilen kombinasyonlarda bir araya getirilmesiyle hücreye veya organizmaya yeni bir özellik kazandırma, yeni türler ya da biyokimyasallar elde etmeyi mümkün kılar. Günümüzde bu teknoloji insan hayatına özellikle gıda, çevre ve sağlık alanlarında birçok yenilik ve kolaylık sağlamıştır [1], [2], [3]. Halk sağlığını etkileyen önemli hastalıkların tanı ve tedavilerinde önemli atılımlar yapılmasını sağlamıştır. Bu atılımlar arasında insülin, eritropoetin gibi hayati öneme sahip hormonların genetik olarak modifiye edilmiş bakterilerde yüksek miktarda üretimi ve deneysel amaçla kullanılmak üzere mutant farelerin geliştirilmesi sayılabilir [3]. Hücre ve organizmada yapısal ve fonksiyonel çeşitli görevi proteinlerin terapötik, tanı veya aşılama amaçlı üretimi bu yolla sağlanmaktadır. Günümüzde rekombinant temelli yaklaşık 400 farmasötik protein başarılı bir şekilde üretilmiş ve piyasaya sunulmuştur [4]. Yine araştırma aşamasında olan birçok aşı yüksek saflıkta rekombinant proteinleri veya patojen alt ünitelerini içermektedir. Nitekim insanlarda kullanılan hepatit B aşısı bu teknoloji ile maya hücresinde üretilmekte ve yüksek miktarda immunojenik özelliği olması dolayısıyla efektif olarak kullanılmaktadır [5].

Bruselloz; Gram (-), fakültatif, intraselüler *Brucella* bakterisinin sebep olduğu, çiftlik hayvanlarında yavru atımı, düşük süt verimi, düşük fertilitate gibi patolojilerle seyreden, hayvan yetiştiricilerini ekonomik zarara uğratan bir hayvan hastalığıdır [6]. İnsanlarda

ise bruselloz; akut inflamasyona yol açarak ateş, baş ağrısı, halsizlik gibi semptomlarla seyretmektedir [7]. Tedavi için insanlarda uzun süreli kombine antibiyotik tedavisi gerekir [8]. Hayvanlarda hastalıkla mücadele edilmesinde; genel hijyenik tedbirlerin uygulanması, enfekte hayvanların sürüden çıkarılması ve aşılama gibi koruyucu tedbirlerin uygulanması gerekmektedir [9]. Hayvanlarda kullanılan smooth *B. abortus* S19, *B. melitensis* Rev.1 ve smooth olmayan *B. abortus* RB51 aşılarının; canlılığı azaltılmış suşları içermesi, özellikle gebe hayvanlarda fetüs atılımı üzerinde istenilen etkiyi gösterememesi, aşılanmış hayvanlarda yalancı pozitifliklerin tespiti, süt verimini azaltması, aşı suşunun bölgede yayılması, virulansı geri çevirme veya artırma potansiyelleri, insanları enfekte etmeleri gibi dezavantajları nedeniyle yeni nesil aşı/aşı adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır [10]. Bu sebeple biyolojik açıdan korunmuş ve hastalığa karşı koruyucu özelliklere sahip antijenler özellikle bakteriyel yüzey antijenleri, patojen-konakçı arasındaki ilk teması sağlamaları dolayısıyla öncelikli aşı aday molekülleridir [11].

Brucella türlerinde yüksek derecede korunmuş olan Omp25, dış membran proteinlerinden biridir. Bu proteinin; insan vücudunda makrofajlar tarafından indüklenen TNF- α (tümör nekrozis faktör alfa) üretimini inhibe ettiği [12], [13], *Brucella* membranının permeabilitesinde gerekli olduğu ve *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. ovis* strainlerinin virülansında etkili olduğu bildirilmiştir [14], [15], [16]. Benzer şekilde Omp25 geninin çok miktarda ekspresyonunun sağlandığı *B. suis*'in insan makrofaj hattında çeşitli miRNA'ları upregüle ederek IL-12 üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir [17] Bundan dolayı Omp25' in virulans bir faktör olduğu ve böyle mutantların yeni canlı atenue aşı straini olarak kullanılabilmesi ve koruyuculuğunun günümüzde kullanılan canlı atenue aşı straini *B. melitensis* Rev.1 ile aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir [15], [18].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında Bruselloza karşı koruyucu özelliği olduğu düşünülen Omp25 geninin klonlanması, ifadesi ve proteinin saf bir şekilde eldesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için belirlenen hedefler aşağıdaki gibidir:

- *Brucella abortus* biyotip 3 izolatından genomik DNA izolasyonu
- Omp25 gen bölgesinin amplifikasyonu
- Protein ifadesi için ekspresyon vektörüne klonlanması

- Prokaryotik ekspresyon sistemine (*Escherichia coli*) transformasyonu
- Endemik rekombinant saf Omp25 proteininin eldesi ve doğrulanması

1.3 Hipotez

Literatürde çeşitli hastalıklara karşı koruyucu özelliğe sahip antijenik aşu ve aşu adaylarının, var olan canlı aşuların sebep olduğu güvenlik endişelerinin önüne geçtiği gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında endemik *Brucella abortus* biyotip 3 izolatından rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak elde edilmesi planlanan saf Omp25 proteininin, hayvanlarda bruselloza karşı koruma sağlamak amaçlı, canlı aşu suşlarına alternatif olarak kullanılabilieceği öngörülmektedir.



GENEL BİLGİLER

2.1 Rekombinant DNA Teknolojisi

Biyoteknoloji, son yıllarda genetik mühendisliği tekniklerinin gelişmesiyle büyük bir ilerleme kaydetmiştir. Bütün karakterleri kodlayan genlerin tanımlanması, izolasyon, klonlanma ve dizilenmesinin günümüzde rahatlıkla yapılabilmesi, biyoteknolojiye hizmet eden ve rekombinant DNA teknolojisi adı verilen çalışma alanının yükselişe geçmesini sağlamıştır.

Genetik mühendisliği, genetik materyalin istenilen ve planlanan sonuçları verecek şekilde manipüle edilmesi demektir. Genetik modifikasyon veya genetik manipülasyon olarak da adlandırılan genetik mühendisliği, bir organizmanın genlerinin biyoteknoloji kullanılarak doğrudan manipülasyonudur. Yeni DNA, rekombinant DNA yöntemlerini kullanarak ya da DNA'yı yapay olarak sentezleyerek ilgili genetik materyalin izole edilmesi ve kopyalanmasıyla elde edilir. DNA fragmentlerinin izole edilip daha sonra farklı kombinasyonlarda biraraya getirilmesi genetik mühendisliği uygulamalarının temel prensibini oluşturmaktadır. İlk rekombinant DNA molekülü, 1972 yılında Paul Berg tarafından maymun virüsünden SV40 ile lambda virüs DNA'sını birleştirerek yapılmıştır [19]. Genlerin yerleştirilmesinin yanı sıra süreç, genleri çıkarmak veya "nakavt etmek" için de kullanılabilir.

Rekombinant DNA teknolojisi ise; bir hücrenin, organizmanın veya popülasyonun kalıtsal özelliklerini değiştirmek amacıyla genetik materyalin manipülasyonuna olanak sağlayan bilimsel metot, prosedür ve teknolojilerin gelişimi ve uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Bu teknoloji yeni türler veya biyokimyasallar elde etmek amacıyla canlı organizmaların spesifik genetik ünitelerini kesme ve ardından rekombine

etme uygulamalarını kapsayan, biyolojinin alt dalıdır. Günümüzde bu teknoloji insan hayatına birçok yenilik ve kolaylık getirmiş durumdadır. Özellikle, insan hayatını tehdit eden en temel üç faktör olan yiyecek sıkıntısı, çevresel kirlilik ve sağlıkla ilgili sorunlara yeni ve kalıcı çözümler getirmektedir. Tarımda, genetiği değiştirilmiş organizmaların üretimi ve piyasaya sürülmesiyle çeşitli hastalık ve çevresel koşullara dirençli ve artan dünya nüfusunun ihtiyacını karşılayacak nitelik ve miktarda ürün geliştirilmesi sağlanmıştır [1]. Endüstrileşmenin sebep olduğu çevre kirliliği ve endüstriyel atıkların sulara karışması deniz yaşamını dolaylı olarak da insan hayatını etkilemektedir. Genetik mühendisliği stratejileri; atıkların biyoyakıta dönüşümü, petrol sızıntısı, karbon ve toksik atıkların bertarafını mümkün kılmaktadır [2], [20], [21], [22]. Rekombinant aşı ve farmasötik ürünler birçok hastalığın tanı ve tedavisinde güvenle kullanılmaktadır. Sağlık alanındaki yapılan en büyük atılımlar arasında insülin, eritropoetin gibi hayati öneme sahip hormonların genetik olarak modifiye edilmiş bakterilerde üretimi ve deneysel amaçla kullanılmak üzere mutant farelerin geliştirilmesi sayılabilir [3].

2.2 Rekombinant Farmasötikler

Bütün canlı organizma hücreleri, çeşitli fizyolojik sistemlerde katalizör, sinyal ajanı ya da yapısal komponent olarak görev almak üzere binlerce protein üretmektedir. Bu proteinler, aminoasit dizisindeki ya da konformasyonundaki değişiklikler sonucu fonksiyonlarını kaybedebilirler. Fonksiyonel protein eksikliği, çeşitli hastalık ve patolojilere sebep olabilmektedir [23],[24],[25]. Bu eksikliği gidermek amacıyla terapötik proteinlerin, tanıda kullanılmak üzere monoklonal antikorların ya da aşılama için antijenik proteinlerin biyolojik sistemlerde rekombinant üretimi sağlanmaktadır [26]. Günümüzde rekombinant temelli yaklaşık 400 farmasötik protein başarılı bir şekilde üretilmiş ve piyasaya sunulmuştur. Bir o kadar da geliştirme aşamasında aday farmasötik protein olduğu düşünülürse gelecek yıllarda bu sayının katlanarak artacağı öngörülmektedir [4].

Başlangıçta bakteriyel ve viral kaynaklı hastalıklara karşı kullanılan aşılar çoğunlukla zayıflatılmış veya inaktive edilmiş patojenler iken immünoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, genomik ve proteomik çalışmalarındaki ilerlemeler vaksinoloji alanına yeni perspektifler kazandırmıştır. Günümüzde çocuk felci, tetanoz, kızamık, difteri, hepatit B vakalarına karşı koruma sağlamak için antikor aracılı immun yanıt oluşumunu sağlayan

zayıflatılmış veya inaktive edilmiş organizma aşuları kullanılmaktadır [5], [27], [28]. Kronik enfeksiyonlara sebep olan hücre içi patojenlerde hücre aracılı immun yanıtı uyarmak çok önemli ve söz konusu klasik aşı stratejileriyle bir o kadar zordur. Ayrıca zayıflatılmış aşular zaman zaman duyarlı bireylerde patojeniteye sebep olma potansiyeli taşımaktadır [29].

Rekombinant aşular bir veya birden fazla antijenin adjuvan ile veya bakteriyel/viral vektörler olarak uygulanması yoluyla immun yanıt oluşturmayı hedeflemektedir. Rekombinant aşı geliştirmede en önemli nokta, özellikle intraselüler ve kronik enfeksiyona sebep olan organizmalara karşı uygun immun yanıtın oluşmasını sağlamaktır [29]. Son yıllarda koruyucu antijenlerin tanımlanması ve aşı geliştirmede kullanılmasına yönelik çeşitli rasyonel ve deneysel yaklaşımlar geliştirilmiştir [30], [31]. Etkif aşuların geliştirilmesi, söz konusu antijenin uygun immun yanıtı indükleyeceği bir sistem veya adjuvanla kombinasyonunu gerekli kılar.

Günümüzde araştırma aşamasında olan birçok aşı yüksek saflıkta rekombinant proteinleri veya patojen alt ünitelerini içerir. Rekombinant protein aşularına verilecek en klasik örnek insanlarda hepatit B'ye karşı koruma amaçlı kullanılan aşıdır. Bu aşının hazırlanması hepatit B yüzey antijeninin maya hücresinde rekombinant olarak üretimi ve virüs benzeri partiküller olarak paketlenmesi aşamalarını içerir. Yüksek miktarda immunojenik özelliği olması bu aşıyı etkif olarak kullanılabilir kılmaktadır [5].

Moleküler biyoloji ve genetik alanındaki ilerlemeler DNA aşularının dizaynı ve uygulanmasını mümkün kılmıştır. Bu uygulamada çeşitli antijenleri kodlayan çıplak DNA molekülünün kas dokusuna enjeksiyonu ile immun yanıt oluşumu sağlanır [32], [33], [34]. DNA aşuları plazmitin çoğalması için replikasyon orijini, güçlü bir promotör, çoklu klonlama bölgesi ve seçici markır içerir [32], [33]. Bu sistemin işleyiş prensibi antijenlerin, doğal bir enfeksiyonda olduğu gibi konakçı organizmanın hücreleri tarafından eksprese edilmesine dayanır. Böylece sitoplazmada üretilen proteinler fragmentler haline getirilerek immun sisteme sunulur [32], [33], [34].

2.3 Klonlama ve Protein İfadesinin İndüklenmesi

Gen klonlama, DNA parçasının bir vektöre (plazmit, faj vb.) aktarılarak daha sonra hücrenin replikasyon mekanizması ile çoğaltılması demektir. Klonlama prosedürünün ilk aşaması ilgili gen fragmentini aktaracak uygun vektör seçimidir. DNA fragmentinin plazmit (vektör) ile ligasyonu çoğunlukla ligaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilir. Daha

sonraki aşama donör DNA'yı içeren rekombinant plazmitin konakçı hücreye (örneğin; *E. coli*) transformasyonu ve pozitif transformantların uygun yöntemlerle seçilimidir [35].

2.3.1 Vektörler

Yabancı bir DNA parçasını konak hücre içerisine taşıyan ve burada çoğalmasını sağlayan DNA parçalarına vektör denir. Vektörlerin sahip olmaları gereken önemli özellikler aşağıda sıralanmıştır.

- Replikasyon orijinine sahip olmalıdır. Bu sayede kendi kendisini eşleyebilir.
- Seçici gen taşınmalıdır. Gen aktarımının doğruluğunu ve başarısını teyit etmeyi sağlar.
- Restriksiyon kesim bölgeleri içermelidir. Farklı restriksiyon enzimleri tarafından tanımlanabilen bu bölgeler genin vektöre klonlanmasını kolaylaştırır.
- Uygun boyutta olmalıdır. Çok büyük vektörler fiziksel kuvvet, pipetleme ve çevresel faktörlere duyarlı olduğundan manipülasyon ve saklama işlemlerinden olumsuz etkilenebilir.
- Bazı durumlarda aktarılan genin istenilen bölgeye aktarıldığını kontrol eden DNA seçicileri kullanılır.

En sık kullanılan taşıyıcı vektörler; plazmit, bakteriyofaj, kosmit ve yapay kromozomal vektörlerdir [36], [37].

1. Plazmitler

Plazmitler çoğu bakteride doğal olarak bulunan, kendi kendini eşleyebilen, halkasal, süper sarmallı DNA molekülleridir [9]. Klonlama ve ekspresyon için çok tercih edilen prokaryotik sistemlerde taşıyıcı olarak kullanılan plazmitler bir veya birden fazla antibiyotiğe dirençlidir. Bu direnç mekanizmaları sayesinde etkin transformantların seçilimi sağlanmaktadır [9].

2. λ bakteriyofajı

Taşıyıcı vektör olarak virüs λ fajı kullanılabilir. 49 kb boyutunda çift iplikli bir yapıya sahiptir. Her iki ucunda da, 12 nükleotitlik komplementer diziler bulunur. Bu uçlar "cos" (yapışkan-cohesive) olarak isimlendirilir. Enfekte olmuş hücrede, cos bölgesi içerisinde DNA zinciri kopyalanır, faj içerisinde paketlenir [38].

3. Kozmid vektör

Plazmitlerin ve fajların belli bölgelerinin kullanılarak oluşan hibrid vektörlere kozmid denir. Kozmidler 25-35 kb arasında DNA dizisi kopyalamak için uygundur. λ fajlarındaki yapışkan uçlara (cos bölgelerine) sahiptirler. λ fajının cos bölgeleri pBR322 plazmitinin tet/r geni içerisine klonlanır. Amp/r geni içerisinde ise insert edimiş herhangi birşey bulunmamaktadır. Yabancı DNA molekülü küçük parçalara kesilir ve cos bölgesinin içine aktarılır. Tetrasiklin duyarlılığı ve ampisilin dirençliliğine göre seçim sağlanır [39].

4. Yapay kromozomlar

Büyük DNA parçalarını (1 Mb'dan daha fazla) klonlamak üzere yapay kromozom vektörleri geliştirilmiştir. Ökaryotik DNA kütüphaneleri oluşturulurken tercih edilir. Bu tip taşıyıcılar klonlama bölgesi, replikasyon orijini, seçici markır, telomer ve sentromer bölgeleri içerir [40].

5. Mekik ve ekspresyon vektörleri

Klonlanan genin ekspresyonu için tasarlanan vektörlerdir. Mekik vektörler iki veya daha fazla konakta replike olabilen ve varlığını kararlı bir şekilde sürdürebilen vektörler olarak tanımlanır. Ekspresyon vektörleri ise klonlanan genin yüksek seviyede ekspresyonunu sağlayan ve ekspresyon için düzenleyici bileşenler içeren vektörlerdir.

Prokaryotik sistemlerde rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılan ekspresyon vektörlerinden bir tanesi pET ekspresyon sistemidir. Bu vektörler kolay indüklenebilir T7 promotör bölgesi içerir. İlgili gen bu promotör bölgesinin aşağı kısmına klonlanır. Ekspresyonun başlaması için hücrede bakteriyofaja ait T7 polimerazın indüklenmesi gerekmektedir. T7 polimerazın kontrollü bir şekilde üretimi ise IPTG ile indüklenen başka bir promotör (*lacUV5*) ile sağlanır. Normalde lacI geninin ürünü olan lac represör molekülü, T7 polimeraz üretimini baskılayarak IPTG bu baskıyı ortadan kaldırarak hücrede T7 polimeraz miktarını artırır. T7 polimeraz da ilgili proteinin üretimini başlatmak üzere kendi promotörüne bağlanır [41], [42], [43].

Ekspresyon vektörleri yapılacaksa indüklenebilir transkripsiyonel promotörler, translasyon başlangıç bölgesi (TIRs) ve transkripsiyonel ve translasyonel sonlandırıcılar bulunmalıdır [44], [45].

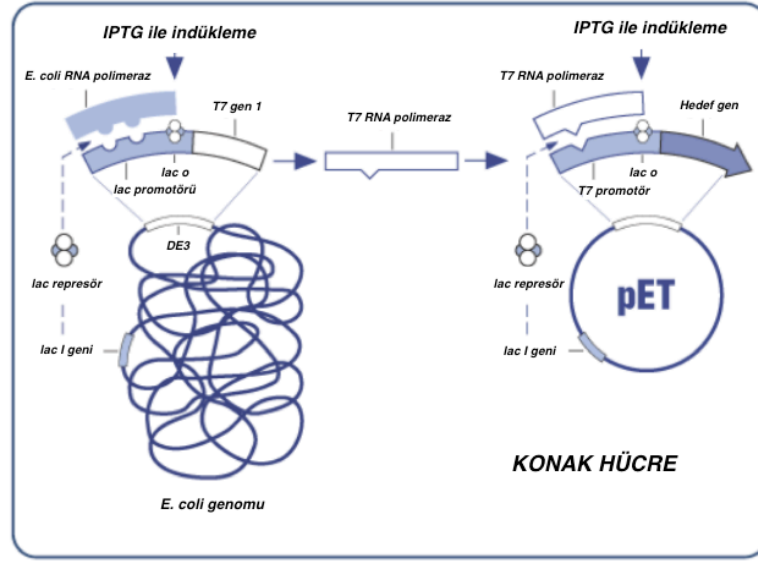
2.3.2 Transformasyon

Klonlamanın ardından yabancı DNA parçasını taşıyan vektörün konakçı organizmaya aktarımına transformasyon denir. Transformasyonun ilk aşamasında 0 derece sıcaklıkta ekzojenik DNA, katyonların etkisiyle hücre duvarına yapışır. Daha sonra sıcaklık 0°C'den 42°C'ye çıkarıldığında, hücre duvarından sitoplazmaya girer. DNA'nın hücre içerisine rahat girişinin sağlanması için hücrenin kompetan hale getirilmesi gerekir. Hücre; Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , ya da Rb^{+} gibi katyonlar kullanılarak kompetan hale getirilebilmektedir. Kompetan hücre hazırlamak için farklı metotlar vardır; kalsiyum klorür ($CaCl_2$), rubidium klorür ($RbCl$) ve transformasyon stok solüsyonu (TSS) metotları en çok bilinen ve kullanılan metotlardır [46], [47].

Transforme olmuş hücreleri transforme olmamış hücrelerden ayırt etmek için vektör üzerinde bulunan seçici antibiyotik direnç genleri kullanılır. Vektörü alan hücreler antibiyotik içeren besiyerinde hayatta kalırken almayan hücreler aynı ortamda yaşayamazlar [48]. İçeri alınan vektörün ilgili geni içerip içermediği de ön doğrulama ve çift yönlü DNA dizileme metotları kullanılarak tespit edilir [49].

2.3.3 Protein İfadesinin İndüklenmesi

İlgili gen bölgesinin vektöre doğru oryantasyonda klonlandığı doğrulandıktan sonra plazmit vektör, protein ekspresyonunun indükleneceği konakçı organizmaya transforme edilir. Lac operonu, daha önce bahsedildiği üzere IPTG ile düzenlenerek T7 promotör kontrolünde ilgili dizinin transkripsiyonu başlar. Ortamda bulunan IPTG, T7 polimerazın üretimini baskılayan lac represörüne bağlanır ve lac operotöründen tetramerik represörü çıkarır. Böylece miktarı artan T7 polimeraz T7 promotöre bağlanır ve heterolog olarak üretilen proteinin gen dizisinin transkripsiyonu sağlanır [50], [51].



Şekil 2.1 pET klonlama sisteminde ekspresyon kontrolünün şematik gösterimi [52]

2.3.4 Protein Saflaştırılması

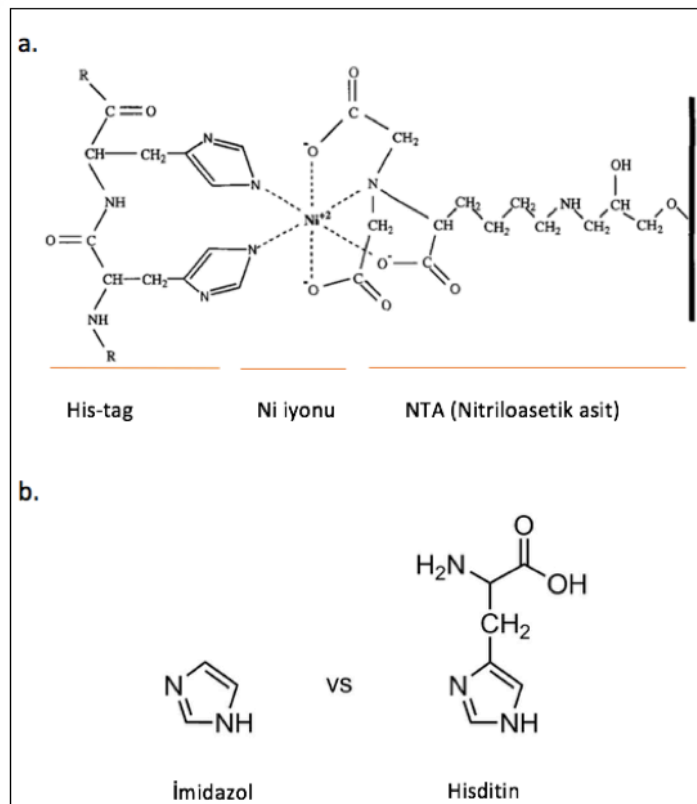
Yapısal proteinlerin veya enzimlerin doku veya hücrelerden saf halde izole edilmesi daha sonraki deneylerin doğru sonuçlar vermesi açısından oldukça önemlidir. Proteinin yüksek miktarda ve saf halde elde edilebilmesi için en doğru yöntemin seçilmesi, gerekirse birden fazla metodun kombine bir şekilde kullanılması gerekmektedir [53], [54].

Saflaştırma için uygulanacak ilk adım hücre veya dokuların uygun tampon ortamda parçalanarak hücre bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin açığa çıkarılmasıdır. Bakteri hücresi ile çalışılırken lizis tampon içerisinde homojenize edilen hücreler kimyasal, enzimatik veya mekanik yollarla parçalanır. Santrijüf ile protein haricindeki hücre komponentleri uzaklaştırılır. Elde edilen süpernatant saflaştırma protokolü için başlangıç materyali olur [53], [54].

Protein saflaştırma için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar kromatografi, elektroforetik yöntemler, santrifügasyon, diyaliz, ultrafiltrasyon yöntemleridir [54], [55]. Kullanılacak ayırma yöntemi proteinin yüküne, molekül büyüklüğüne, çözünürlüğüne veya spesifik bağlanma bölgelerinin varlığına göre seçilir. Molekül büyüklüğüne göre protein ayırma için santrifüjleme, jel filtrasyon, diyaliz, ultrafiltrasyon yöntemleri tercih edilirken, protein yüküne bağlı ayırım yapılırken iyon değişimi kromatografisi, eletroforez, izoelektrik fokuslama yapılabilir. Proteinin bulunduğu tampon çözeltisinin pH, iyonik şiddet veya dielektrik sabitinin herhangi

birinin değiştirilmesi suretiyle çözünürlük özellikleri değiştirilerek protein ayırımı sağlanabilir. Son olarak spesifik bağlanma durumuna göre ayırma için en iyi bilinen yöntem afinite kromatografisidir.

Rekombinant protein çalışmalarında en çok tercih edilen sistem hareketsiz metal afinite kromatografisi (IMAC)'dir. Proteinin terminallerinden birine metal iyon resinlerine afinitesi olan histidin kuyrukları takılarak koenzim bağlı agaroz taneciklerine spesifik olarak bağlanması sağlanır. Kolon dolgu maddesi olarak genellikle polihistidin bölgesi ile etkileşimi bilinen nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz kullanılır. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi NTA, nikel iyonunun içerdüğü 6 ligand bağlanma bölgesinden dördüne bağlanmaktadır ve geri kalan 2 bağlanma bölgesi de His-tag ile etkileşime girmektedir. Lizatta bulunan diğer proteinler bu koenzime bağlanma özelliğine sahip olmadığı için yıkamayı gideceklerdir. Kolona bağlı proteinin kolondan ayrılması için histidin ile yarışacak yüksek miktarda imidazol kullanılır. Şekil 2.2'de histidin ve imidazol moleküllerinin kimyasal yapıları da gösterilmektedir. Saflaştırmadan sonra tuz, imidazol ve denatüre şartlarda uygulanan protokoller için denatürant maddelerin uzaklaştırılması için diyaliz veya ultrafiltrasyon yapılır [56], [57].



Şekil 2.2 Poli-His tag'daki komşu rezidüer ile Ni-NTA matriksinin etkileşimi (a) ve imidazol-histidin moleküllerinin kimyasal yapıları (b)

2.4 Bruselloz Hastalığı

Bruselloz; Gram (-), fakültatif , intraselüler *Brucella* bakterisinin sebep olduğu bir hayvan hastalığıdır [6]. Özellikle altı bakteri türünün hayvanlarda yaygın olarak hastalık yaptığı bilinmektedir. Bunlar en çok tercih ettikleri konakçı organizmayla birlikte; *B. abortus* (sığır), *B. melitensis* (keçi), *B. suis* (domuz), *B. canis* (köpek), *B. ovis* (koyun), and *B. neotoma*'dır (çöl faresi) [58]. Hastalık, hasta hayvanın vücut sıvısıyla direkt temas veya süt ürünlerinin tüketimi ile insanlara geçebilmekte ve akut veya kronik enfeksiyona sebep olabilmektedir. Enfekte bir işletmede çalışanların, enfeksiyona yakalanmalarına sebebiyet verdiğiinden bir meslek rahatsızlığı olarak da görülür. *Brucella* mikrobuyla karşılaşmış olan çiftlikte yaşayan insanlar hayvanlarla doğrudan temasta bulunmasalar dahi, enfeksiyondan etkilenebilirler [59]. Latin Amerika, Orta Doğu, Afrika, Asya, Akdeniz Havzası gibi dünyanın birçok yerinde endemik olarak görülmektedir [60]. Ancak hastalığın sık görüldüğü yerlerde tanısı konulmamış ve rapor edilmemiş birçok vaka bulunmaktadır [61]. Arasoğlu ve arkadaşları tarafından 2010 yılında tamamlanan projenin sonuçları da resmi kayıtlarda görülen enfeksiyon sayısının gerçeği yansıtmadığını açık bir şekilde ortaya koymuştur [62]. Hastalığın çabuk yayılması, kontrol ve mücadelesinin güçlüğü, tedavisinin uzun süre alması ve masraflı olması, hayvansal protein kaynaklarına olan olumsuz etkisi, hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretine engel teşkil etmesi ve çoğunluğu kırsal kesimde bulunan kısıtlı imkanlara sahip hayvan yetiştiricilerinin sosyo-ekonomik gelişmesini engellemesi gibi nedenlerden dolayı, bu hastalık ülkemiz için oldukça önemlidir [59].

Hayvanlarda düşük ya da fetüsün prematüre atımı, süt veriminde azalma ve düşük fertiliteye dolayısıyla hayvan yetiştiricilerini ekonomik kayba uğratmaktadır. Süt ve süt ürünleri endüstrisine zarar vermektedir. Plasenta iltihabı ve epididimis, testis iltihabı hastalığın en yaygın sonuçlarıdır [63], [64]. İnsanlarda bruselloz akut inflamasyona yol açarak ateş, baş ağrısı, halsizlik gibi semptomlarla seyretmektedir [7]. İnsanlarda inkübasyon periyodu 1-3 haftadır, ancak bazen birkaç ay da olabilir [65].

Brucella ile, enfekte ürünlerin tüketimi, vücut sıvısıyla temas veya hava yoluyla bulaştıktan sonra doğuştan gelen immun sistemin fagositik hücreleri tarafından yutulur [66]. Endozom, litik enzimleri içeren lizozomal yapılarla füzyon oluşturur. Sonuçta konakçı organizma hücresi tarafından yutulan virulent *Brucella* bakterilerinin parçalanarak etkisiz hale getirilmesi beklenir. Ancak sayısal olarak yutulan *Brucella* bakterilerinin %30 kadarı lizizden kaçarak hücre içinde hayatına devam eder [67].

İntramakrofajik *Brucella* önce lenf düğümleri daha sonra da lenf sistemi aracılığıyla bütün vücuda yayılır. Deneysel enfeksiyonlarda inokülasyondan sonra uygulama bölgesine yakın olan lenf düğümlerinin vücudun diğer bölümlerinden çok daha fazla *Brucella* barındırdığı görülmüştür [66]. Yine deneysel bir sığır enfeksiyonunda konjonktival (göz) inokülasyon sonrası 2-4 gün içinde tükürük bezleri içindeki lenf bezlerinde kolonizasyonun olduğu gözlemlenmiştir. En erken 15. günde dalakta enfeksiyon oluşumu, 22-29. günler arasında da diğer lenf düğümlerinde, dokularda ve gebe hayvan uterusunda kolonizasyon kaydedilmiştir [68]. Literatür bilgisine dayanılarak bakterinin gebe hayvanda plasentada bulunan trofoblast hücrelerini hedef olarak düşüklere sebep olduğu, gebelik durumu söz konusu olmadığında ise konakçı hücre olarak makrofajı tercih ettiği söylenebilir [66].

Brucella mikroorganizmasının vücuttan temizlenmesi kombine antibiyotik tedavisini gerektirdiğinden çoğunlukla başarılı sonuçlar alınamamaktadır. Hayvanlar etkeni gizli olarak taşımaya devam ettiklerinden enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadırlar. Dolayısıyla hem ekonomik olmaması hem de taşıyıcılığın önlenememesi nedeniyle hayvanlarda tedavi önerilmeyen bir yaklaşımdır [69]. Dünya Sağlık Örgütü tarafından hayvanlarda hastalıkla mücadele edilmesinde; genel hijyenik tedbirlerin uygulanması, karantina, enfekte hayvanların sürüden çıkarılması (test ve kesim) ve aşılama gibi koruyucu tedbirlerin uygulanması gerektiği belirtilmektedir [70], [71], [72]. Ancak; hayvan mera alanlarının ortak olması, hayvanlarla ilgili gerekli sağlık kontrollerinin etkin şekilde yapılamaması ve hayvan yetiştiricilerinin eğitim düzeyi gibi faktörlerden dolayı ülkemizde hastalıkla mücadelede en etkin uygulamanın aşılama olduğu görülmektedir.

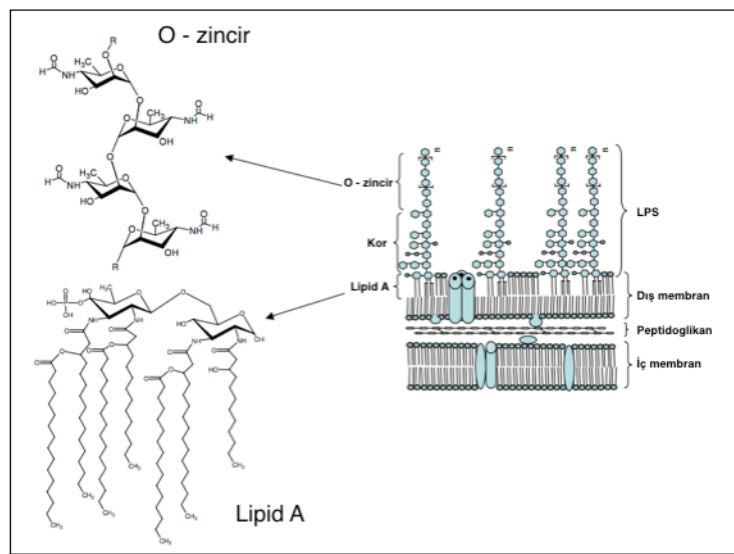
2.5 Hastalık Etmeni: *Brucella*

Brucella; küçük koko-basil veya kısa çomak şeklinde morfolojiye sahip, $0.5-0.7 \times 0.6-1.5$ µm boyutlarında, genellikle tek olarak bulunan, nadiren de küçük zincir ya da gruplar oluşturan, makrofajlar içerisinde ürediği için fakültatif intraselüler karakter gösteren, sporsuz, bakteriyolojik boyalarla çabuk boyanabilen Gram (-) patojen bir bakteridir. Kamçı veya pilileri olmadığından hareketsizdir. *Brucella* aerobik bir bakteridir Ancak birçok suşu büyümek için %5-10 karbondioksite ihtiyaç duyar. Optimal üreme ısısı 37 °C'dir Ancak 10 ile 40 °C arasında büyüebilirler. Optimal pH değeri 6.6-7.4 aralığındadır. Katalaz pozitifdir. Genellikle oksidaz pozitif olmasına rağmen, negatif suşları da bulunmaktadır [73].

Birçok suşun beslenme ihtiyacı oldukça komplekstir. Et özütü, triptoz gibi kompleks pepton, glikoz, tuz, çeşitli aminoasitler, tiamin, nikotinamid, demir ve magnezyum iyonları içeren medyumlarda iyi ürerler. Serum ve kan büyüme olumlu bir şekilde etkiler [73].

Sıvı besiyerlerinde büyüme; eğer şiddetli olarak çalkalama yapılmazsa genellikle zayıftır. Katı besiyerlerinde ise *Brucella* kolonileri inkübasyondan 2-3 gün sonra gözle görülebilir, ancak 4-5 gün sonra 1-2 mm büyüklüğe ulaşır [70], [71], [74].

Brucella birçok hayvan türünde ve insanlarda da hastalığa sebep olabilmektedir. Genomu iki halkasal kromozomdan oluşur. Sadece *B. suis* biovar 3 suşu tek büyük kromozom içerir. Aslında genetik olarak monospesifik olan *Brucella* biovarları büyük kısmı korunmuş genomun delesyon, insersiyon barındıran ve yeniden düzenlenmiş versiyonlarıdır [73]. *Brucella* türünün ana virülens faktörü olan LPS tabakası Lipid A, kor polisakkarit ve O-zincir kısımlarından oluşur. Hidrofobik Lipid A bölgesi 2 tip aminoglikoz içerir [75]. Lipid A, KDO (2- keto-3-deoksitulosonik asit) aracılığıyla D-glikoz, D-mannoz ve 6-amino 6-deoksiglikoz (quinovosamine)'dan meydana gelen kor polisakkarite bağlanır [76]. S formlarında bulunan O-zincir kısmı yaklaşık 100 residülü 1,2-linked 4,6-dideoksi-4-formamido- α -D-manopiranosil tekrarından oluşan bir homopolimerdir ve kor polisakkarit yapısına bağlıdır [77]. Lipid A tabakasına gömülü veya bağlı birçok dış membran proteini bulunmaktadır. Bu proteinlerden kimisi porin aktivitesi gösterirken, kimisi lipoprotein veya fosfolipid yapıda olabilmektedir [78].



Şekil 2.3 *Brucella* LPS tabakasının şematik gösterimi [79]

Lipopolisakkarit zinciri; o-polisakkarit zincirini (major yüzey antijeni) ihtiva etmesine göre smooth (S-LPS) veya rough (R-LPS) yapısında olabilir [70]. S ve R formlarında en önemli yüzey antijenleri dış membranda bulunur. S formlarında hücre duvarı, hücrenin kuru ağırlığının %21'ini oluştururken bu oran R formlarda %14'tür. S formlarında hücre duvarının yaklaşık %37'si protein, %14'ü karbonhidrat, %18'i lipid, %0,4'i muramik asit ve %0,1'i de 2-keto-3-deoksiktulosonik asit (KDO)'tir. R formları için ise bu oranlar protein için %47,5, karbonhidrat için %13, lipid için %17, muramik asit için %0,4 ve 2-keto-3-deoksiktulosonik asit için de %0,1 şeklindedir [80].

Bakterinin smooth ve rough formlarının başlangıçtaki patojen-konakçı etkileşiminde farklı mekanizmalar kullandığı bilinmektedir. O zinciri enfekte konakçıların antikor cevabında bir immunodominant antijendir ve *S Brucella* türleri tarafından sebep olunan infeksiyonların serolojik tanısında major antijenik determinanttır [81][82]. *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* türleri smooth veya rough yapısında olabilirler. O zincir bakımından mutant smooth türler kullanılarak yapılan in vivo çalışmalarda virülansın azaldığı görülmüştür [83]. O zinciri, *Brucella* türlerinde M ve A serotiplerinin oluşumunda önemlidir [72] ve S- *Brucella* suşlarının antijenik profilleri (A veya M dominant) kendi O-zincir yapılarıyla bağlantılıdır. Bu zincirin daha önce de belirtilen 100 rezidülü yapısında, M serotiplerinde her 5 rezidüde bir tane α -1,3 bağı bulundururken; A serotiplerinde ise çoğunlukla α -1,2 bağı bulundurur [70]. Bağlardaki farklılık LPS epitoplarının şeklini etkiler.

Dış membran proteinleri potansiyel immünojenler ve koruyucu antijenler olarak tanımlanır. Moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılan Omp'lerden 88 kDa ve 94 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar grup 1 minör proteinleri, 36-38 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar grup 2 porin proteinleri, 31-34 ve 25-27 kDa moleküler ağırlığa sahip olanlar grup 3 proteinler olarak sınıflandırılmışlardır [84].

Yapılan çalışmalarda hücre içi patojen olan *Brucella*'nın opsonize olduğu zaman fagosit içerisine Fc reseptör aracılığıyla girdiği, opsonize olmayan organizmanın ise fibronektin veya lektin reseptöre bağlandığı görülmüştür [85], [86], [87]. Fc reseptör aracılığıyla hücre (profesyonel fagosit) içine alınan bakterinin çok daha etkin bir şekilde elimine edildiği anlaşılmıştır [88]. Profesyonel fagositlerden olan makrofaj yuttuğu bakteriyi çoğu zaman fagolizozomlar aracılığıyla sindirebilirken trofoblast hücreleri internal *Brucella*'yı elimine etmek konusunda o kadar yetenekli değildir. Bu sebeple enfekte trofoblast hücreleri, içerisinde oldukça fazla miktarda canlı *Brucella* bakteri hücreleri

barındırır. İki hücre tipinde de bakteriyel replikasyon membrana bağlı bir kompartmanda meydana gelir [89]. Endoplamik retikuluma benzeyen bu kompartmanın replikasyon niş olarak tercih edilmesinin sebebinin kompleks besinlere rahat ulaşım sağlamak olduğu tahmin edilmektedir [90]. Bakterinin konak olarak trofoblast hücrelerini seçmesinin de yine metabolik olarak oldukça aktif bu hücrelerin ürettiği protein ve büyümeyi stimüle eden metabolitlerden faydalanmak olduğu düşünülmektedir [91]. *Brucella abortus*'un LPS tabakası aracılığıyla insan nötrofil hücrelerini erken dönemde öldürdüğü görülmüştür. Bunu NADPH-oksidad aktivasyonu, dolaylı olarak ROS (Reaktif Oksijen Türleri)'ların artışı ve akabinde nötrofil hücresinde DNA hasarına sebep olma yoluyla gerçekleştirildiği gösterilmiştir [92]. Yine *Brucella abortus* enfekte monositler aracılığıyla kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine sızabilmekte, beyin epitel hücrelerini enfekte ederek nörobruselloza sebep olabilmektedir [93].

Dış membranın oluşumu ve bütünlüğünün korunması açısından öneme sahip BvrR/BvrS iki-bileşenli sistemin *Brucella*'nın internalizasyonunda büyük ölçüde etkili olduğu bilinmekte ve bu da membran protein ve yapılarının patojeniteye katkı sağladığı sonucunu doğurmaktadır. BvrR/BvrS bakımından mutant ve dolayısıyla bazı dış membran proteinleri ile lipopolisakkarit (LPS) yapısının üretiminin olmadığı suşlarda internalizasyonun olmadığı ve bakterinin konakçı hücre yüzeyine yapışık bir şekilde kaldığı görülmüştür [94], [95].

Fare modellerinde yapılan immünizasyon çalışmalarında *Brucella*'nın doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklık sistemini simultane olarak harekete geçirdiği ve özellikle IFN- γ ile karakterize edilen Th1 yanıtının kolonizasyonu yavaşlatarak sonuçta enfeksiyonu temizlemede önemli rol oynadığı görülmüştür [96]. Makrofajları aktive ederek fagositik aktiviteyi uyaran IFN- γ 'nin monoklonal antikorla nötralizasyonu sonucu BALB/c, CBA ve C57BU6 fare hatlarında dalak kolonizasyonunun arttığı, enfekte BALB/c hattına rekombinant IFN- γ uygulamasının ise kolonizasyonu azalttığı bulunmuştur [97]. IFN- γ salımında çoğunlukla CD4+ T hücreleri sorumlu olsa da, CD8+ T hücreleri, $\gamma\delta$ T hücreleri, doğal öldürücü hücreler de söz konusu sitokinin üretimi ve salımına katkı sağlar [98], [99]. IFN- γ dışında farklı immun sistem bileşenlerinin de enfeksiyonunun kontrol altına alınmasında rol oynadığı bilinmektedir. IL12 ve TNF- α sitokinler brusellozun kontrolünde görev alırlar ve IFN- γ 'nin etkinliğini artırarak kolonizasyonu azaltırlar [100], [101].

Edinilmiş bağışıklık sistemi bileşenleri olan, antijen sunan hücreler, Th1 hücreleri, sitotoksik T hücreleri hastalıkla mücadelede aktif olarak iş görürler [102]. CD4+ ve CD8+ hücrelerin hastalığın farklı safhalarında savunmada etkili olduğu görülmüştür. Örneğin, CD8+ T hücreleri hastalığın erken aşamalarında enfeksiyonun kontrol altına altına alınmasına katkı sağlarken, CD4+ hücreleri uzun dönemde koruma sağlar [98]. Hücre içi bakteriyel enfeksiyonlarda antikor aracılı immun yanıtın çok etkili ve koruyucu olmadığı bilinmektedir [98], [103]. *Brucella* enfeksiyonlarında da kimi zaman antijen sunarak hücresel aracılı immun yanıtı harekete geçiren humoral bağışıklığın, hastalığı yok edici direkt bir etkisinin olmadığı, hatta yapılan bir çalışmaya göre Th1 yanıtı zayıflattığı görülmüştür. Buna da B hücrelerinin ürettiği IL-10 ve TGF- β (transforme edici büyüme faktörü) sitokinlerinin sebep olduğu ortaya çıkmıştır [104].

2.5.1 *Brucella abortus*

Morfolojik ve kültürel özellikler, cins için açıklandığı gibidir. Bu türün doğal olarak tercih ettiği konaklar sığır ve diğer boynuzlularlardır. At, deve, koyun, geyik, köpek, insan ve diğer türler de enfekte olabilir. Hamile hayvanda genellikle plasenta iltihabı ve yavru atımı görülür. Tavşan, kobay ve fare de dahil olmak üzere laboratuvar hayvanları için patojeniktir. R suşlar genellikle virulent olmamasına rağmen, farelerin inokülasyondan sonra bir süre daha dalaktaki mikroorganizmaları koruduğu görülmüştür [91].

2.6 Bruselloz Hastalığıyla Mücadele Yöntemleri ve Aşılama

Bruselloz hastalığının tanısı hayvanlarda ve insanlarda genellikle serolojik yöntemlerle yapılır. İnsanlarda tedavi için uzun süreli kombine antibiyotik tedavisi gerekmektedir. Hastalığın iyileşmesi birkaç haftadan birkaç aya hatta birkaç yıla kadar sürebilir [8]. İntraselüler bir bakteri türü olan *Brucella*, konakçı organizmanın immün hücreleriyle yakın ilişki içindedir ve immün sistemi manipüle ederek tanı ve tedaviyi zorlaştırarak kronik enfeksiyona sebep olabilmektedir [105]. ABD'nin büyük kısmında sağlıklı hayvanların aşılama ve hasta olanların ayıklanması yoluyla bruselloz büyük ölçüde temizlenmiştir [9], [106]. Ancak bu yaklaşım hastalığın endemik olarak görüldüğü bazı ülkelerde çeşitli sebeplerden ötürü kullanılamamaktadır. Bu sebepler ekonomik olanakların kısıtlı olması veya kültürel inançlar şeklinde sıralanabilir. Hastalığın yayılımının önlenmesi için alınabilecek bütün önlemlere rağmen doğal rezervler olduğu sürece bruselloz önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam edecektir [107], [108]

Bruselloz hastalığının ülkemizde ve dünyada önem arz etmesinin diğer önemli bir sebebi de, insanlarda hastalıktan korunma amaçlı aşı geliştirilmemiş olmasıdır. Hastalığın yayılımını engellemek, çiftlik hayvanları ve insan için tehdit oluşturmasını önlemek için etkili aşuların geliştirilmesi elzemdir. Ayrıca, konvansiyonel antibiyotik tedavileri, konakçıdan *Brucella*'ların eliminasyonu tam olarak sağlayamadığından hastalığın %5-10' oranında nüks ettiği gözlenmektedir. [109], [110] Bütün bunların yanısıra *Brucella*'nın II. Dünya Savaşı'nda biyo-silah olarak kullanılmış olması ve yayılma kolaylığı nedeniyle, günümüzde biyoterörizm ajanı olarak önemini koruduğu da bilinmektedir. [111], [112], [113].

Brucella, immün tespiti önlemek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir;

- Gram (-) bakterilerin yüzeyinde bulunan LPS tabakası, toll-benzeri reseptör 4 (TLR-4) gibi konakçı reseptörleriyle etkileşime girerek güçlü proinflamatuvar yanıt oluştururken, *Brucella* LPS tabakası yan zincirlerinin asilasyonu nedeniyle bu çeşit bir yanıtı sebep olmaz [114], [115], [116].
- *Brucella* LPS tabakası, konağın katyonik bakterisidal peptitlerine karşı direnç kazandırır [117].
- *Brucella*, enfeksiyon sırasında üretilen, doğuştan gelen ve adaptif immünitinin kilit aracı IFN- γ nın makrofaj yanıtını bozarak konakçı savunmasını inaktive eder [118].
- Konakçı hücre içinde lizozom ile füzyonu önlemek için dış membranını fosfatidilkolin ekleyerek modifiye edebilir [119].
- Konak hücre içinde başarıyla çoğalabilmek ve fagozom-lizozom arasındaki füzyonu önlemek için konakçı hücre zarında bulunan lipid yığınlarıyla etkileşime giren siklik β -1,2-glukanları sentezler [120].

Bu çalışmalar *Brucella*'nın konakçıyı ne kadar etkili bir şekilde enfekte ettiğini ve fagositozdan nasıl kurtulduğunu göstermektedir. Hem hayvana hem de insanlığa karşı güvenli ve etkili aşuların geliştirilmesi, brusellozun engellenmesinde önemli bir adım olacaktır.

Günümüzde çiftlik hayvanlarında hastalığa karşı koruma sağlamak için canlılığı azaltılmış suşlar kullanılmaktadır [121]. Bu suşlar organizmada immunizasyonu indüklemekte, antikor oluşumu veya hücre aracılı immun yanıt yollarıyla patojene karşı koruyucu etki sağlamaktadır [122]. Ancak bu aşı suşlarının çeşitli dezavantajları

mevcuttur. Bunlardan ilki olan zayıflatılmış aşı suşu *B. abortus* 19 (S19), 1923 yılında keşfedilmiş, mutant bir suştur [123]. Eritritole fenotipik duyarlılık gösteren bu suşun söz konusu duyarlılığı eritritol katabolik genleri kodlayan 702 baz çifti boyutundaki DNA parçasının delesyonuna atfedilmiştir [124], [125]. S19, 1990'ların ortalarında R formundaki aşı suşu RB51'in geliştirilmesine kadar yarım yüzyıldan uzun bir süredir brusellozun önlenmesi için dünya çapında kullanılmıştır ve hala birçok ülkede kullanılmaya devam edilmektedir [126], [127], [128]. S formunda olan ve anti-LPS antikorlarını indükleyen S19 aşı suşunun en büyük dezavantajı immünize edilen ve doğal olarak enfekte olmuş hayvanlar arasında ayırım yapmanın zor olmasıdır. Suşun LPS tabakası içermesi lipopolisakkarit temelli serolojik testlerin doğru sonuçlar vermesine engel olmaktadır [129]. S19 ile diğer problemler hamile hayvanlarda yavru atımına sebep olması [130] ve insana patojenik olmasıdır [131].

ABD ve birçok ülkede çiftlik hayvanlarında anti-LPS antikor üretimini indüklemeyen R formu RB51 suşunun kullanımını içeren aşılama programları uygulanmaktadır. Anti-LPS antikor cevabını indüklemeyen RB51 suşunun dezavantajları da insana patojenik olması, dolaylı olarak insan brusellozuna sebebiyet vermesi ve bruselloz tedavisinde yaygın kullanılan rifampin antibiyotiğine karşı direnç göstermesi olmuştur [36], [132].

Devam eden süreçte bilimsel çalışmalar, daha iyi performans gösteren aşılar geliştirmek için *Brucella* virülans genlerini tanımlama üzerine yoğunlaşmıştır. Virülans genleri bakımından mutant suşlar geliştirilerek koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Yabani tip *B. abortus* 2308 suşunun *pgk* geni bakımından mutant formu elde edilmiştir. Bu suş S19 ve RB51 kadar koruma sağlamıştır ve O-zincir yapısı bulundurmadığı için anti-LPS antikor üretimini indüklemez. Böylece immunize hayvan ile doğal enfekte hayvan ayırt edilebilir [133].

Diğer bir *Brucella* türü olan *Brucella melitensis*'e karşı seri pasajlama yöntemiyle elde edilmiş attenüe canlı aşılar kullanılmıştır [134]. Bunlardan en önemlisi olan Rev-1'in koyun ve keçileri doğal *Brucella* enfeksiyonuna karşı etkili bir şekilde koruduğu ancak gebe keçiler için çok güvenli olmadığı görülmüştür [135]. Rev-1 aşılması yapılan emziren keçilerin sütünde zaman zaman bakteri görülmüştür [136]. İnsanlara S19 aşı suşundan daha patojeniktir [131]. Anti-O antijen antikorlarını indüklemesi, enfekte ve aşı hayvan ayırımını zorlaştırdığında dezavantaj olarak sayılabilir [137]. Streptomisin içeren besiyerinde seri pasajlama yöntemiyle üretildiği için antibiyotiğe direnç

kazanmıştır. Bu da aşı uygulamalarında kullanılması konusunda şüpheleri beraberinde getirmiştir [137].

Brucelloz ile mücadelede yukarıda sıralanan mevcut aşuların dezavantajlarını içermeyen yeni nesil aşı/aşı adaylarına ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler biyoloji yöntemlerinin gelişmesiyle son yıllarda üzerinde çalışılan ve önemli sonuçlar elde edilen patojen alt ünite aşuları, canlı aşının kullanımıyla ilgili güvenlik endişelerinin önüne geçmiştir. Ancak canlı aşular kadar etkin koruma sağlamak akılcı yeni yaklaşımlar gerektirmektedir. Alt ünite aşuları hayvan enfeksiyonu ve enfeksiyon kaynaklı düşüğe sebep olmaz ve bu nedenle hem hayvanlar hem de insanlar için güvenlidir. Son yirmi yılda brucelloz için bir dizi koruyucu antijen tanımlanmıştır. Enfektif özellik taşımayan alt birim aşular, hayvanlarda immun yanıt oluşturmak için DNA veya saflaştırılmış proteinler olarak formüle edilir. Fare modellerinde *Brucella*'ya karşı koruma sağlanıp sağlanmadığı aşılanmamış ve aşılanmış; bakteri ile enfekte edilmiş gruplar arasında dalak kolonizasyon miktarı karşılaştırılarak belirlenir.

Literatür incelendiğinde birçok antijen ve antijenik fraksiyonlarının aşı adayı olarak değerlendirildiği görülmüştür. Immunojenik rekombinant antijenlerinin seçiminde en kritik basamak, enfeksiyon etkenlerinin yapısal ve biyolojik açıdan korunmuş ve hastalığa karşı koruyucu özelliklere sahip antijenlerinin belirlenmesidir. Bu aşı adaylarından bazıları hücre membranı, hücre duvarı bileşenleri [138], dış membran proteinleri [138], [139], hücre duvarının sıcak sodyum dodesil sülfat (SDS) ekstraktlarının çözünmez fraksiyonları [139], çözünür SDS ekstraktları [140], *Brucella* çözünür antijenleri (BASA) [141], periplazmik proteinler [142], kimyasal olarak modifiye edilmiş *Brucella* proteinleri [143] smooth ve rough LPS tabakaları [144], rekombinant Cu-Zn süperoksit dismutaz (SOD) ve sentetik peptidlerdir [145].

DNA veya saf protein olarak formüle edilen çeşitli alt birim aşuların immunojenik olarak test edildiği çalışmalar oldukça fazladır. Bunlardan bazıları; Bp26 (DNA aşısı/dalak kolonizasyonunda 1,16 log₁₀ azalma (KOB)) [146], Omp16 (protein aşısı/dalak kolonizasyonunda 1,97 log₁₀ azalma) [147], Omp19 (protein aşısı/dalak kolonizasyonunda 1,85 log₁₀ azalma) [147], Omp28 (protein aşısı/dalak kolonizasyonunda 0,97 log₁₀ azalma) [148], Omp31 (DNA aşısı/dalak kolonizasyonunda 1,30-1,45 log₁₀ azalma) [129], P39 (protein aşısı/dalak kolonizasyonunda 1,21-2,48 log₁₀ azalma) [149], S-adenosil-lhomocysteinehidrolase (protein aşısı/dalak kolonizasyonunda 1,13-2,13 log₁₀ azalma) [150] ve Commander'in

2007 yılında yayımladığı çalışmasında DNA aşısı olarak koruyucu özelliklerini araştırdığı ve bu tez çalışmasında da saf protein olarak elde edilen Omp25 'tir (DNA/dalak kolonizasyonunda 2,54 log₁₀ azalma) [18]. Bu alt ünite aşuları ile önemli koruma sağlanabilmesine rağmen, bunların da sınırlamaları vardır. Bahsi geçen aşuların çoğu canlı aşularla karşılaştırıldığında daha az etkilidir ve 2 log₁₀ ünitesinden fazla koruma sağlayamamaktadır. Bu sebeple bağışıklığı sağlamak için takviye gerektirmektedir. Bu takviye söz konusu antijenin uygun immun yanıtı indükleyeceği bir sistem veya adjuvanla kombinasyonu olabilir. Ek olarak, bu çalışmaların çoğu sadece farelerde gerçekleştirildiğinden hayvancılıkta veya insanlarda koruma amaçlı kullanımı için her zaman yeterli bir belirleyici değildir.

Bu bilgiler ışığında sunulan tez çalışmasında, bruselloz hastalığına karşı koruyucu etkisini değerlendirmek üzere endemik *Brucella abortus*'tan rekombinant saf Omp25 proteini üretilmesi hedeflenmektedir.

2.7 Omp25 Proteini ve Özellikleri

Bakteriyel yüzey antijenleri patojen-konakçı arasındaki ilk teması sağlamaları dolayısıyla öncelikli aşı aday molekülleridir [11]. Omp25, *Brucella* bakterilerinin ana dış membran proteinlerinden biridir, türler arasında oldukça korunmuştur [151] ve *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* ve *Brucella ovis*'in virülansında etkili olduğu bildirilmiştir [14], [15], [16]. Bir çalışmada Omp25'in insan makrofaj hücreleri tarafından salınan TNF- α üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir [12], [13]. Benzer şekilde, yabani tip *Brucella* türlerinin TNF- α ve IL-12 salımını inhibe ederek insan dendritik hücre olgunlaşmasını ve antijen sunumunu önlemektedir [152]. Omp25 geninin çok miktarda ekspresyonunun sağlandığı *Brucella suis*'in insan makrofaj hattında çeşitli miRNA'ları (miR-155, -23b and -21-5p) upregüle ederek IL-12 üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir [17]. Omp25 bakımından mutant *Brucella* kullanılarak yapılan immunizasyon çalışmalarında, farede ve sığırdaki virülansın azaldığı görülmüştür [13], [153].

Brucella Omp25 proteinin gen dizisi *E.coli*'ye ait Ompa dizisi ile benzerdir. Boyut olarak farklılık göstermelerine ve homolog olmamalarına rağmen iki protein de β -varil yapısındadır ve fonksiyonlarının benzer olduğu varsayılmaktadır [154]. Topoloji tahminlerine göre Omp25 proteini sekiz adet transmembran β ünitesi barındırır ve büyük bir epitobu yüzeyde bulunmaktadır [81].

Omp25 gen dizisi kullanılarak tasarlanan DNA aşısı immünizasyon çalışmalarında Omp25'in koruyucu özellik gösterdiği bulunmuştur [15], [18]. Bu da Omp25 proteininin rekombinant olarak üretilip bruselloz hastalığına karşı koruma sağlamak amaçlı kullanılabilirliğinin değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır.



MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı- Biorad T100™ Thermal Cyclers
- Yatay elektroforez- Mini-Sub® Cell GT Systems
- Dikey elektroforez- Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems
- Güç kaynağı- Biorad Powerpac Basic
- Western transfer sistemi- Trans-Blot Turbo Transfer System
- Nanodrop- Thermo Scientific NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometers
- Soğutmalı Santrifüj- Hettich Universal 32 R
- Çalkalayıcı- Biosan 3D Sunflower Mini-Shaker
- Hassas terazi- Sartorius
- Manyetik Karıştırıcı- RH basic
- Ph metre- Mettler Toledo Seven Compact/Ion S220
- Mikrodalga- Arçelik
- UV görüntüleme cihazı- Vilber Lourmat UV Camera and transilluminator
- Soğutmalı Etüv- JSR büyük hacimli etüv
- Etüv- Memmert UN55

- Buzdolabı- Arçelik Altus
- Isı bloğu- Inovia Dry Bath
- Sonikatör- Bandelin SONOPULS ultrasonic homogenizers
- Vortex- IKA V1S000
- UV Spektrofotometre- Shimadzu UV 1800
- Kabin- ESCO Class II
- Multiwell plate reader- Biotek Powerwave XS2
- Milipore- Q Gradient Su Cihazı
- -80°C dondurucu- Thermo Scientific FORMA 702

3.1.2 Kullanılan Mikroorganizma Suşları

Endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 straini, Erzurum İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden temin edildi. TOP10 *E.coli* kompetan hücreleri ve BL21 Star™ *E.coli* kompetan hücreleri Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kitin (Invitrogen™, K102-01) ticari alımı ile temin edildi. *Brucella* selektif agar (Liyofilchem) besiyerinde, *E.coli* suşları ise LB broth (Invitrogen) ve agar (Invitrogen) ayrıca klonlama deney aşamasında SOC (Invitrogen) medyumda kültüre edildi. *Brucella* için %10 CO₂ ortamı sağlayabilmek için “BD GasPak™ EZ Pouch Systems” kullanıldı.

3.1.3 Genomik ve Plazmit DNA İzolasyonları

Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research- D6005) ve ZymoPURE™ Plazmit Miniprep Kit (Zymo Research- D4209) reaktifleri kullanıldı.

3.1.4 PZR ve Elektroforez Reaktifleri

Ticari bir firmaya sentezlettirilen primerler kullanılarak PZR BioRad marka Thermacycler cihazında gerçekleştirildi. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL) (Thermo scientific- F530L), dNTP solüsyonu (Himedia- MBT059), agaroz (Sigma-Aldrich), tampon (TAE- Multicell), DNA boyası (Biomatik- A4209), yükleme boyası (Thermo Scientific- R0611), ve DNA markırı (Thermo Scientific 1 kb DNA Ladder- SM0311, Thermo Scientific 100 bp DNA Ladder- SM0241) kullanılan diğer reaktiflerdir.

3.1.5 PZR Ürününün Saflaştırılması

Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research- D4007) reaktifleri kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.6 Klonlama ve Ekspresyon

Klonlama için Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen™, K102-01) reaktifleri, transformasyon seçilimi için Ampisilin antibiyotigi (MB1045G), ekspresyonu indüklemek için IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Bioline-BIO37036) kullanıldı.

3.1.7 Proteinlerin SDS-PAGE İle Analizi ve Boyama

Sonikasyon tamponu hazırlamak için Tris (Himedia) ve KCl (Emsure); SDS-PAGE için Tris-HCl (Multicell), Akrilamid/Bis solüsyonu (Biorad- 1610158), SDS (Multicell), APS (Sigma- Aldric- 08091), TEMED (Sigma- Aldric); yükleme tamponu hazırlamak için Tris-HCl (Multicell), gliserol (Multicell), β -merkaptoetanol (Biomatik), bromofenol mavisi (Biomatik) ve SDS (Multicell); yürütme tamponu hazırlamak için Tris (Himedia), SDS (Multicell) ve glisin (Himedia); son olarak coomassie boyama için coomassie brilliant blue (Biomatik), metanol (Isolab) ve asetik asit kullanıldı (Sigma-Aldrich).

3.1.8 Western Blot Reaktifleri

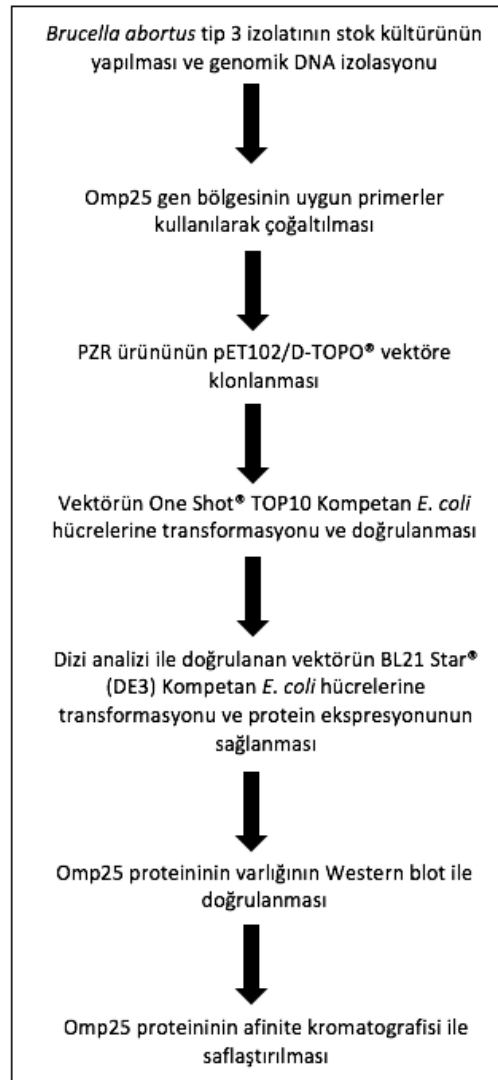
Western analizi için Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry blotlama sistemi, nitroselüloz membran (Thermo Scientific- 88018) ve filtre kağıtları (Thermo Scientific- 88605) kullanıldı. Bloklama, tampon ve yıkama çözeltileri Tris (Himedia), glisin (Himedia), metanol (Isolab), PBS (Sigma-Aldrich), Tween 20 (Sigma-Aldrich), süt tozu (Bioshop-SKI400.500) kullanılarak hazırlandı. Primer ve sekonder antikor olarak sırasıyla His-probe Antibody (H-3): sc-8036 ve Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (31430) tercih edildi. Deteksiyon aşamasında DAB (Thermo Scientific- 34001) ve H₂O₂ (Sigma- Aldric) kullanıldı.

3.1.9 Protein Pürifikasyonu

Native ve denatüre koşullarda saflaştırma yaparken rezin olarak ProBond™ Nickel-Chelating Resin kullanıldı. Bağlanma, yıkama ve elüsyon çözeltileri NaH₂PO₄, İmidazol (Biomatik), NaCl (Himedia), üre (Sigma- Aldric), Triton X-100 (Biomatik),

Tris-HCl (Multicell) ve gliserol (Multicell) kullanılarak hazırlandı. Native şartlarda uygulanan saflaştırma protokolünde hücrelerin üzerine lizozim (Thermo Scientific) eklendi. Saflaştırmanın son aşamasında ultrafiltrasyon ya da diyaliz gerçekleştirildi. Bu aşamada tampon hazırlanırken NaH_2PO_4 (Sigma- Aldric) kullanılırken, filtrasyon için Vivaspin Turbo® 15 (Sartorius) ve diyaliz için de Dialysis tubing cellulose membrane (D9777 Sigma) tercih edildi.

3.2 Metot



Şekil 3.1 Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel metotların akış şeması

3.2.1 *Brucella abortus* Tip 3 İzolatının Stok Kültürünün Yapılması

Farklı şehirlerden gelen *Brucella abortus* biyotip 3 izolatları *Brucella* agara ekildi. Mikroaerofilik ortamda, 37°C’de iki gün inkübe edildi. Yeterince üreme gözlemlendikten

sonra besiyeri yüzeyinden öze yardımıyla toplanarak 500 µl PBS içerisinde homojen hale getirilerek 500 µl %30'luk gliserol çözeltisi bulunan vial içerisine alındı. Vortexlenerek 1 saat boyunca -20°C'de bekletildi. Daha sonra -80°C'ye alındı.

3.2.2 *Brucella abortus*'tan Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, Erzurum İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden temin edilen izolat biyotip 3 Br-1 suşunun *Brucella* agar besiyerinde yüksek miktarda üretiminden sonra Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep DNA izolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

1. Biyotip 3 Br-1 suşu öze ile toplanarak PBS içerisinde yeniden homojenize edildi. Hücre yoğunluğu spektrofotometre yardımıyla, OD₆₀₀ değeri 1 olacak şekilde ayarlandı (yaklaşık 10⁹ bakteri/mL).
2. Hücre çözeltisinden 200 µL alınıp ZR BashingBead™ Lysis Tube içerisine konuldu. Üzerine 750 µL Lysis Solution eklenerek 5 dk vortexlendi.
3. ZR BashingBead™ Lysis Tube 1 dk 10,000 g'de santrifüj edildi.
4. 400 µL süpernatant sıvı, toplama tüpü içindeki Zymo-Spin™ IV Spin Filter (turuncu kapaklı)' içerisine alındı. 1 dk 7000 g'de santrifüj edildi.
5. Toplama tüpünde toplanan sıvı üzerine 1200 µL Genomic Lysis Buffer eklendi.
6. Karışımdan 800 µL alınıp toplama tüpü içerisine yerleştirilen Zymo-Spin™ IIC Column üzerine eklendi. 1 dk 10,000 g'de santrifüj edildi.
7. Alt sıvı atılıp 6. adım tekrarlandı.
8. Zymo-Spin™ IIC Column yeni bir toplama tüpüne alınarak kolon üzerine 200 µL DNA Pre-Wash Buffer eklendi. 1 dk 10,000 g'de santrifüj edildi.
9. Alt sıvı atılarak kolon üzerine 500 µL g-DNA Wash Buffer eklendi. 1 dk 10,000 g'de santrifüj edildi.
10. Zymo-Spin™ IIC Column 1.5 ml'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirildi. 35 µL DNA Elution Buffer direkt kolon matriksi üzerine eklendi. 30 sn 10,000 g'de santrifüj edildi. 35 µL genomik DNA elde edildi.

3.2.3 DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

DNA 260 nm, protein 280 nm ve fenol 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. A₂₆₀/A₂₈₀ oranının 1,8-2,2 aralığında olması DNA'nın saf olduğunu gösterir [155]. 35 µl elüsyon buffer içerisinde çözünen genomik DNA miktarı Nanodrop (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüldü. Daha sonra DNA'nın bütünlüğü ve

kalitesi jel elektroforezi ile analiz edildi. Genomik DNA'lar % 0,8 konsantrasyonda agaroz içeren jelde, 100 V'da 50 dk yürütüldü. 1X TAE içerisinde gerekli miktarda agaroz (40 ml için 0,4 gr) mikrodalgada çözüldü. Soğuduktan sonra 20,000X Sybr Safe DNA boyası 1:20,000 seyreltilerek çözelti içerisine eklendi (40 ml için 2 ul boya). Jel donduktan sonra 1 µl 6X yükleme boyası ve 5 µl DNA karıştırılarak kuyulara yüklendi. Örnekler 100 V'da 50 dk yürütüldü. Ultraviyole ışık altında Vilber Lourmat UV Camera and transilluminator cihazı kullanılarak DNA bantları görüntülendi.

3.2.4 Omp25 Gen Bölgesi İçin Primer Tasarımı

Omp25 gen bölgesinin klonlama ve ekspresyonda kullanılmak üzere çoğaltılması için primer tasarımı yapılmıştır. Klonlama ve ekspresyon, Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit kullanılarak yapıldığı için forward primer 5' ucunda pET vektörle tamamlayıcı 4 nükleotidlik bir dizi içerir. Primer tasarımında uygulanan adımlar aşağıda sıralanmıştır.

Omp25 geninin nükleotid dizisinin tespiti (NCBI)

Omp25 geninin ORF bölgesi aşağıdaki gibidir.

```
5'<ATGCGCACTCTTAAGTCTCTCGTAATCGTCTCGGCTGCGCTGCTGCCGTTCTCTGCGACCGCTTTTGCTGCCGACGCCATCCAGGAACAGCCTCCGGTTCCGGCTCCGGTTGAAGTAGCTCCCCAGTATAGCTGGGCTGGTGGCTATAACCGGTCTTTACCTTGGCTATGGCTGGAACAAGGCCAAGACCAGCACCGTTGGCAGCATCAAGCCTGACGATTGGAAGGCTGGCGCCTTTGCTGGCTGGAAGTTCCAGCAGGACCAGATCGTATAACGGTGTTGAAGGTGATGCAGGTTATTCCTGGGCCAAGAAGTCCAAGGACGGCCTGGAAGTCAAGCAGGGCTTTGAAGGCTCGCTGCGTGCCCGCGTTCGGCTACGACCTGAACCCGGTTATGCCGTACCTCACGGCTGGTATTGCCGGTTCGCAGATCAAGCTTAACAACGGCTTGGACGACGAAAGCAAGTTCCGCGTGGGTTGGACGGCTGGTGCCGGTCTCGAAGCCAAGCTGACGGACAACATCCTCGGCCGCGTTGAGTACCGTTACCCAGTACGGCAACAAGAAC TATGATCTGGCCGGTACGACTGTTTCGCAACAAGCTGGACACGCAGGATATCCGCGTCGGCATCGGCTACAAGTTCTAA>3'
```

ORF bölgesini kapsayacak şekilde primer tasarlanması

pET102/D-TOPO vektörü insert genin 5' ucunda His-patch thioredoxine ait gen dizisi ve protein purifikasyonundan sonra bu proteini uzaklaştırmak için kullanılacak

enterokinaz gen bölgesi dizisini içermektedir. Ayrıca 3' ucunda V5 ve 6xHis füzyon tag proteinlerini ifade edecek gen dizileri içermektedir. Primer tasarımı yapılırken 5' ve 3' uçlarında bulunan tag proteinine ait gen dizilerinin çerçeve içinde olmasına dikkat edilir. Bu sebeple primerler insert genin başlangıç ve stop kodonlarını kapsamayacak şekilde tasarlanır.

Forward primer:

5'- CACC-gene spesifik -3'

5'- CACCCGCACTCTTAAGTCTCTCGTAAT -3'

Gene spesifik bölge için Tm: 60,9 °C

Reverse primer:

5'- GAACTTGTAGCCGATGCC -3'

Gene spesifik bölge için Tm: 61,4 °C

NCBI Blast ile tasarlanmak istenen primerlerin organizma DNA'sında hedef bölge dışında başka bir yere bağlanıp bağlanmadığının tespiti, saç tokası ve dimer oluşturup oluşturmadığının tespiti Oligo Analyzer (IDT) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bu aşamalardan sonra tasarımı gerçekleştirilen primerler, ticari olarak sentezletirilmiştir. Liyofilize halde temin edilen bu primerler DNAaz ve RNAaz içermeyen su ile çözülerek 100 µM derişimli stok haline getirildi. Daha sonra 10 kat seyreltilerek derişim 10 µM 'a düşürüldü. Primerler -20°C'de saklandı.

3.2.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL) ve enzim kiti içerisindeki reaktifler kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Çizelge 3.1'de ki bileşenler sırası ile eklendi. Reaktifler ve reaksiyon karışımı buz üzerinde tutuldu. Bu çalışmada kullanılan tüm sarf malzemenin DNaz-free olmasına dikkat edildi.

Çizelge 3.1 Omp25 gen bölgesinin çoğaltılması için kurulan PZR reaksiyonu

Bileşen	Miktar
Nükleazsız su	32,5 µL
5X HF buffer	10 µL

Çizelge 3.1 Omp25 gen bölgesinin çoğaltılması için kurulan PZR reaksiyonu (Devamı)

25 mM dNTP mix	0,4 µL
10 µM forward primer	2,5 µL
10 µM reverse primer	2,5 µL
Kalıp DNA (300 ng)	1,6 µL
Phusion polimeraz	0,5 µL
Toplam	50 µL

Çizelge 3.2 PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	98°C	30 sn	-
	98°C	10 sn	35 döngü
Primer eşleşmesi	61°C	30 sn	
Primer uzaması	72°C	30 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	-
	4°C	∞	-

3.2.6 Agaroz Jelde Yürütme

PZR ürünleri % 1 agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. 40 ml TAE tampon içerisine 0,4 g agaroz eklendi. Mikradalga fırında ısı ile çözüldü. Soğutulduktan sonra çözeltiliye 20,000X Sybr Safe DNA boyası eklendi (40 ml için 2 ul boya). Jel donduktan sonra 1 µl 6X yükleme boyası ve 5 µl DNA karıştırılarak kuyulara yüklendi. İlk kuyucuğa 5 µl DNA markır (100 bç) yüklendi. Örnekler 100 V'da 50 dk yürütüldü. DNA bantları ultraviyole ışık altında görüntülendi.

3.2.7 Jel Ekstraksiyonu

PZR ürünü (45 µl), 9 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Aynı zamanda boyut analizi için 100 bç'lik DNA markır birinci kuyucuğa eklendi. 100 V'da 50 dk yürütüldükten sonra ilgili bant bistüri yardımıyla jelden kesildi. Zymoclean™ Gel

DNA Recovery Kit protokolüne göre aşağıdaki adımlar takip edilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

1. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri tartıldı.
2. Agaroz jelden kesilen parça tüp içerisine konularak tekrar tartıldı ve jel ağırlığı belirlendi.
3. Parça üzerine 3 hacim (örneğin; 100 µl(mg) agaroz jel için 300 µl) ADB (agarose dissolving buffer) konuldu.
4. 55°C'ye ayarlanan ısı bloğu üzerinde jel eriyene kadar inkübe edildi.
5. Erimiş agaroz çözeltisi toplama tübü içerisindeki Zymo-Spin™ Column'a alındı.
6. 60 sn 10,000 g'de santrifüj edilip toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
7. Kolon üzerine 200 µl DNA Wash Buffer konularak 30 sn 10,000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü ve yıkama adımı tekrarlandı.
8. 20 µl DNA Elution Buffer kolon matrisi üzerine bırakıldı. Kolon 1,5 ml'lik temiz mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. 60 sn 10,000 g'de santrifüj edilerek saf DNA elde edildi.
9. DNA miktarı ve saflığı Nanodrop spektrofotometre ile belirlendi.

3.2.8 Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit ile Klonlama

Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit, küt uçlu PZR ürününü hızlı ve etkin bir şekilde vektöre klonlamak ve ardından *E. coli*'de T7 promotörü kontrolünde ekspresyonunu sağlamak için gerekli reaktifleri içeren bir kittir. PZR prosedürünü takiben ligaz ve restriksiyon enzimlerinin kullanımına ihtiyaç yoktur.

Klonlama için tercih edilen pET102/D-TOPO vektör, doğrulama ve saflaştırma aşamalarında kolaylık sağlayacak peptid tagleri (histidin kuyruğu ve thioredoxin bölgesi) içeren rekombinant füzyon protein üretimine olanak sağlar. Ayrıca vektör peptid taglerinin son aşamada kesip çıkarılmasına imkan sağlayan proteaz tanıma bölgeleri içerir.

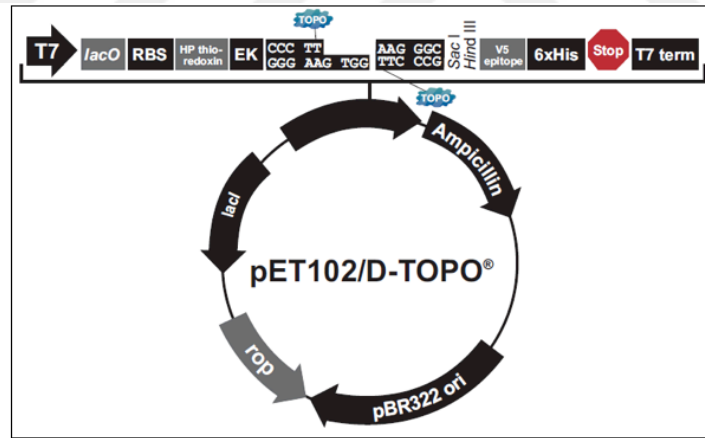
pET102/D-TOPO' N-terminal'inde His-Patch thioredoxin dizisi ve bu peptidi daha sonra ayırmak için Enterokinaz kesim bölgesi; C-terminal'inde ise V5, 6xHis tagleri bulunur.

Thioredoxin; maya, bitki, memeli ve bakterilerde bulunan, 11,7 kDa ağırlığa sahip bir proteindir. Füzyon partneri olarak kullanıldığında translasyon verimini ve bazı durumlarda çözünürlüğü artırdığı bilinmektedir. pET102/D-TOPO[®] vektöründeki thioredoxin proteini metal bağlama domeni içerecek şekilde mutasyona uğratılmıştır. Proteinin 32. pozisyonundaki glutamat ve 64. pozisyonundaki glutamin bakiyesi (aminoasitleri) histidine çevrilmiştir. His-Patch thioredoxin olarak adlandırılan bu yeni protein katlandığında 32. ve 64. pozisyonlardaki histidinler 8. pozisyondaki native histidinle etkileşime geçerek “patch” oluşturur. Bu histidin patch, divalent katyonlara yüksek afinite göstermekte ve metal şelatlama rezinler kullanılarak saflaştırmaya olanak sağlamaktadır.

V5 ((Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr)) ve 6xHis tagleri füzyon proteininin ilgili antikolar kullanılarak doğrulanmasına yardımcı olur. Ayrıca 6xHis tag peptidi yine metal şelatlama resinler kullanılarak saflaştırmaya olanak sağlar.

Vektörün seçim markörü Ampisilin direnç genidir.

Vektör haritası ve özellikleri aşağıdaki gibidir (6315 bç).



Şekil 3.2 Vektör haritası ve özellikleri [156]

Çizelge 3.3 Vektör özellikleri [156]

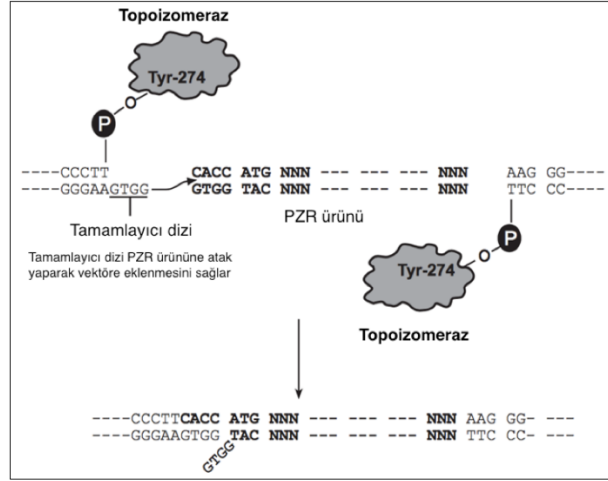
Çeşit	İsim	Başlangıç-sonlanma pozisyonu
Promotör	T7 promoter	209-225
Lac baskılayıcı bağlanma bölgesi	Lac operatör	228-252
Ribozom bağlanma bölgesi	Ribosome binding site (RBS)	282-288

Çizelge 3.3 Vektör özellikleri [156] (Devamı)

Füzyon protein partneri	His-patch (HP) thioredoxin ORF	298-627
Enterokinaz tanıma bölgesi	EK recognition site (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)	643-657
Klonlama bölgesi	TOPO® Cloning site	670-683
Tag	V5 epitope	700-741
Tag	Polyhistidine (6xHis) region	751-768
Terminatör	T7 transcription termination region	783-911
Amp promotörü	<i>bla</i> promoter	1407-1505
Amp direnç geni	Ampicillin (<i>bla</i>) resistance gene	1506-2366
Replikasyon orijini	pBR322 origin	2511-3184
<i>ROP</i> kodlayan bölge	<i>ROP</i> ORF	3552-3743
<i>lac</i> baskılayıcı kodlayan bölge	<i>lacI</i> ORF	5055-6146
Sekanslama için primer bölgesi	T7 forward priming site	209-228
Sekanslama için primer bölgesi	TrxFus forward priming site	607-624
Sekanslama için primer bölgesi	T7 Reverse priming site	822-841

TOPO klonlama reaksiyonu, Vaccinia virüsüne ait Topoizomeraz I enzim mekanizması kullanılarak gerçekleşir. Bu enzim çift zincirli DNA'ya 5'-CCCTT bölgesinden sonra bağlanarak tek zincirde kırık oluşturur. Kırık fosfodiester omurgadan açığa çıkan enerji, kırık zincirin 3' fosfat ucuyla topoizomeraz I'in tirozin bakiyesi (Tyr-274) arasında oluşan kovalent bağ ile korunur. Daha sonra orijinal zincirin 5' hidroksil ucu DNA ile enzim arasındaki fosfo-tirozil bağa atak yaparak enzimin ayrılmasını sağlar.

TOPO klonlamada, bu sistem modifiye edilerek hızlı ve etkin bir klonlama sistemi geliştirilmiştir. PZR ile çoğaltılacak gen için primer tasarlanırken 5' ucuna CACC dizisi eklenir. Bu dizi TOPO® yüklü orijinal zincirin 3' ucundaki GTGG bölgesine tamamlayıcıdır. Söz konusu orijinal zincir PZR ürününe atak yaparak ürünün vektöre doğru oryantasyonda eklenmesini sağlar.



Şekil 3.3 Klonlama reaksiyonun şematize gösterimi

Jel ekstraksiyonu ile saflaştırılan PZR ürünü ve pET102/D-TOPO® vektör için 1:1 molar oranı olacak şekilde ve 15 ng vektör kullanılarak klonlama reaksiyonu kuruldu. “Insilico ligation calculator” [157] web sitesinden vektör ve DNA boyutları, vektör miktarı ve tercih edilen molar konsantrasyon oranı girilerek reaksiyona eklenmesi gereken PZR ürünü (150 ng) miktarına ulaşıldı. Klonlama reaksiyonu Çizelge 3.4’te belirtildiği gibi kuruldu.

Çizelge 3.4 Klonlama reaksiyonu

Saf PRC ürünü	2 µl
Tuz solüsyonu	1 µl
Su	2 µl
Vektör	1 µl
Toplam	6 µl

Reaksiyon kurulduktan sonra oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Buz üzerine alınıp transformasyona geçildi.

3.2.9 Transformasyon

Transformasyon prosedürü aşağıdaki basamaklar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

1. Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit içerisinde gelen One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* hücrelerinden iki vial buz üzerinde eritildi.
2. Tüp içerisinde bulunan 50 µl kompetan hücre üzerine klonlama reaksiyon karışımından 3 µl eklendi. Diğer tüp içerisine de pozitif kontrol olarak 1 µl pUC19 plazmidi ilave edildi.
3. Tüpler buz üzerine alınarak 30 dk inkübe edildi.
4. 42°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 40 sn ısı şoku uygulandı.
5. Tekrar buz üzerine alınarak 2 dk beklendikten sonra üzerine 250 µl S.O.C. medyum eklendi.
6. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de, 200 rpm'de 1 saat kadar çalkalamaya bırakıldı.
7. 100 µg/ml Ampisilin içeren agar petrilere 200 µl ve 50 µl hacimlerde drigalski spatülü ile ekim yapıldı.
8. Petriler 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.10 Koloni PZR

İki ayrı petriden toplam 10 koloni seçilerek Amp içeren petrilere steril kürdan yardımıyla ekildi. Ertesi gün üreyen bakterilerden koloni PZR yapıldı. Kit içerisinde gönderilen sekanslama primerleri kullanıldı. PZR reaksiyon koşulları Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Koloni PZR

Bileşen	Miktar
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Su	10,5 µl
Toplam	25 µl

Koloniler reaksiyon karışımı içine yine steril kürdan yardımıyla inokule edildi. Tablo 3.6'da belirtilen döngü koşullarına göre PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 3.6 Koloni PZR döngü koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	94°C	10 dk	
Denatürasyon	95°C	30 sn	35 döngü
Primer eşleşmesi	51°C	30 sn	
Primer uzaması	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	10 dk	
	4°C	∞	

3.2.11 Plazmit İzolasyonu

100 µg/ml Ampisilin içeren 5 ml LB'ye seçici antibiyotik ile seçilmiş bakteriler inoküle edildi. Bir gece 37°C çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. ZymoPURE™ Plazmit Miniprep Kit protokolüne göre plazmit izolasyonu yapıldı.

1. Gece kültüründen 5 ml alınıp 2800 g'de +4°C'de 20 dk santrifüj edilip besiyeri uzaklaştırıldı. Supernatant atıldı.
2. Hücre pelleti üzerine 250 µl ZymoPURE™P1 solüsyonu eklendi. Pellet vortekslenerek yeniden homojenize edildi.
3. Üzerine 250 µl ZymoPURE™P2 eklendi. 6-8 kez hızlıca ters düz edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi. Solüsyon berrak, mor ve viskoz bir hale geldiğinde hücrelerin lizisi tamamlanmış demektir.
4. Karışımın üzerine 250 µl buz üzerinde soğutulmuş ZymoPURE™P3 solüsyonu eklendi. 3-4 kez ters düz edilerek karıştırıldı. Nötralizasyon sarı renk oluşumundan takip edildi.
5. Lizat buz üzerinde 5 dk bekletildi.
6. Lizat 16,000 g'de 5 dk santrifüj edildi.
7. 600 µl supernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 275 µl ZymoPURE™Binding Buffer eklendi. Ters düz edilerek iyice karıştırıldı.

8. Karışımın tamamı toplama kabı içerisine yerleştirilen Zymo-SpinTMII-P Column'a alındı.
9. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 5000 g'de, 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.
10. Kolon üzerine 800 µl ZymoPURETM Wash 1 eklendi ve 5000 g'de, 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.
11. Kolon üzerine 800 µl ZymoPURETM Wash 2 eklendi ve 5000 g'de, 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.
12. Kolon üzerine 200 µl ZymoPURETM Wash 2 eklendi ve 5000 g'de, 1dk santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı.
13. Kolon, yıkama bufferın tamamen uzaklaşması için 10,000'de 1 dk santrifüj edildi.
14. Kolon temiz 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve matriks üzerine 30 µl ZymoPURETMElution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 10,000 g'de 1 dk santrifüj edilerek plazmit DNA çöktürüldü.

3.2.12 Rekombinant Plazmit DNA Dizi Analizi

İzole edilen plazmit TrxFus forward primer ile birlikte DNA analizine gönderildi. Elde edilen sekans, BLAST kullanılarak *Brucella abortus* referans suşu (Accession no: AM040264) ve diğer *Brucella* türlerinin Omp25 gen dizileri ile hizalandı. Clustal W programıyla yapılan karşılaştırma sonucunda Omp25 sekanslarının gen dizilimi benzerlik oranları belirlendi. Referans suş ile karşılaştırıldığında aminoasit dizisinde ve açık okuma çerçevesinde proteinin üç boyutlu yapısını değiştirecek bir farklılık olup olmadığı kontrol edildi. DNA sekanslarının karşılaştırılmasıyla yapılan filogenetik analizler, türler arası ve tür içi evrimsel ilişkileri, canlılar arasındaki genom benzerlikleri ve farklılıkları hakkında bilgi vermektedir [157]. Filogenetik analizler Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Averages (UPGMA) modeline göre MEGA 7 programında gerçekleştirildi ve filogenetik ağaç oluşturuldu.

3.2.13 *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerine Transformasyon ve Ekspresyon

Koloni PZR sonucunda pozitif çıkan koloniden elde edilen plazmit, hedef proteinin eldesi için BL21 hücrelerine transforme edildi. Transformasyon protokolü kullanılan konukçu organizmanın BL21 (DE3) olması dışında tamamen aynıdır. BL21 (DE3) hücrelerine transformasyondan sonra pozitif kolonilerden bir tane seçilip 100 µg/ml

Amp içeren LB Broth besiyeri içerisine inokule edildi. Bir gece 37°C çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 100 µg/ml Amp içeren 100 ml LB Broth besiyeri içine 1 ml gece kültüründen eklendi. OD₆₀₀ değeri 0,6 olana kadar 37°'de inkübe edildi. 100 mM stok IPTG çözeltisi hazırlamak için 10 ml distile su içerisinde 0,2 g IPTG çözüldü. Kültüre, 1 mM final konsantrasyonu olacak şekilde stok IPTG çözeltisinden 1 ml eklendi. Eş zamanlı olarak rekombinant pET102/D-TOPO plazmitini içermeyen BL21 (DE3) kontrol hücreleri de 1 mM IPTG ile indüklendi. Kültürler 28°'de 5 saat inkübe edildi. 0. ve 5. saatlerde kültürlerden 5'er ml örnek alınarak 6,000 rpm'de 15 dk soğuk santrifüjde (+4°C) çevrildi. Üst sıvı atıldı. Hücreler, SDS-PAGE analizi için -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.14 Örnek Hazırlama ve SDS-PAGE

-20 °C'ye kaldırılan hücre pelletleri çıkarılıp çözüldükten sonra sonikasyon tamponu olarak kullanılan 500 µl 50 mM Tris-KCl (pH 7,5) içinde homojenize edildi. %20'lik güç kullanılarak 10 sn sonikasyon 20 sn bekleme olacak şekilde 6 döngüde sonike edildi. Örnekler +4°C 'de 14,000 devir hızda 20 dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ve pelletler ayrı tüplere hazırlandı. SDS-PAGE, BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Cell'e ait jel elektroforez sistemi kullanılarak hazırlandı. PAGE için %10'luk yürütme jeli ve %5'lik yükleme jeli hazırlandı. Poliakrilamid jeller aşağıda verilen protokollere göre döküldü.

Yürütme jeli (%10);

1. 1,5 M Tris-HCl (pH-8,8)- 2,60 ml
2. %30 Akrilamid/Bis Solüsyonu – 3,40 ml
3. Distile Su- 3,80 ml
4. %10'luk SDS- 100 µl
5. APS (10%)- 0,1 ml
6. TEMED- 0,01 ml

Jelin 2/3'ü yürütme jeli olacak şekilde döküldükten sonra üzeri distile su ile kaplanarak polimerleşmesi beklendi. Bu arada yükleme jeli hazırlandı.

Yükleme jeli (%5)

1. 0,5 M Tris-HCl (pH-6,8)- 0,625 ml

2. %30 Akrilamid/Bis Solüsyonu- 0,67 ml
3. Distile Su- 3,60 ml
4. %10' luk SDS- 50 µl
5. APS (10%)- 0,05 ml
6. TEMED- 0,005 ml

Yükleme jel solüsyonu iyice karıştırılıp yürütme jelinin üzerine döküldü ve uygun tarak yerleştirilerek polimerleşmesi beklendi.

Lizis sonrası santrifüjle ayrılan örnekler SDS-PAGE için hazır hale getirildi. Supernatanttan 50 µl alınıp 50 µl örnek tampon (2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2 ml gliserol (100%), 0,4 ml β-merkaptoetanol, 0,02 g bromofenol blue, 0,4 g SDS) ile karıştırıldı. 100 µl distile su içinde homojenize edilen pellet çözeltisi de 100 µl örnek tampon ile karıştırıldı. Supernatant ve pellet örnekleri 95°C'de 5 dk kaynatıldı. Yürütme tankının içerisi yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS) ile doldurulup, jel tankın içerisine yerleştirildi. Hazırlanan jelin tarağı dikkatlice çıkarılıp örnekler tarakların oluşturduğu kuyucuklara 15'er µl hacimde yüklendi. Yürütme tamponunu jelin her tarafına temas etmesi akımın geçmesi açısından önemlidir. Elektrotlar dikkatlice güç kaynağına bağlandı. 80 V'da yarım saat ve akabinde 120 V'da bir buçuk saat yürütme gerçekleştirildi.

3.2.15 Coomassie Boyaması

Örnekler yürütüldükten sonra jel dikkatlice sistemden çıkarıldı. %0,1 coomassie brillant blue, %40 metanol, %10 asetik asit içeren boyama çözeltisine alındı. Bir buçuk saat boyamadan sonra %5 metanol, %7 asetik asit içeren boya uzaklaştırma çözeltisine alınarak arka plandaki boya dağılına kadar bekletildi.

3.2.16 Western Blot Analizi

BL21(DE3) *E. coli* konukçusunda ekspresyonu gerçekleştirilen Omp25 füzyon proteininin varlığı Western Blot yöntemi kullanılarak doğrulandı. Western Blot analizi Bio-Rad Trans-Blot® Semi-Dry sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Membrana aktarılmadan önce SDS PAGE yapılmak üzere daha önce verilen koşul ve oranlarda %10'luk yürütme ve %5'lik yüklemeye jelleri hazırlandı. SDS-PAGE daha önceki SDS-PAGE yürütme protokolüyle birebir aynı yapıldı.

1. Membran, filtre kağıtları ve jel ıslatılmak üzere transfer tamponu hazırlandı.

Transfer tamponu	500 ml
a) 39 mM Glisin	1,46 g
b) 48 mM Tris	2,90 g
c) 1,3 mM SDS	0,20 g
d) %20 Metanol	100 ml

2. Jele uygun biçimde kesilen nitroselüloz membran ve filtre kağıtları 1'er saat, jel de 15 dk transfer tamponunda bekletildi.
3. İki filtre kağıdı arasında akımın geçtiği yöne doğru sırasıyla jel ve membran olacak şekilde sandviç hazırlandı. Kurutma kağıtları, jel ve membran yerleştirildikten sonra hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi.
4. Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi kullanılarak 25 V'da 40 dk aktarım gerçekleştirildi. Blotlamanın etkin bir şekilde gerçekleştiğinin tespit amacıyla jel commasie boya çözeltisi ile boyanmıştır.
5. Membran PBS- Tween 20 (2ml Tween 20 / 1 L PBS) ile 5 dk yıkandı.
6. % 5'lik bloklama çözeltisi (5 gr süt tozu / 100 ml PBS- Tween 20) ile 1,5 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı.
7. Membran PBS- Tween 20 ile 5 dk yıkandı.
8. Daha sonra membran primer His-probe Antibody (H-3): sc-8036 içeren (1:500) %5'lik süt tozu çözeltisinde +4 °C'de, çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.
9. Ertesi gün PBS- Tween- 20 ile 5'er dk'dan üç yıkama yapıldı.
10. Membran, Goat anti-Mouse IgG (H+L) sekonder antikor içeren (1:5000) %5'lik süt tozu çözeltisinde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. PBS- Tween-20 kullanılarak 5'er dk'dan iki yıkama yapıldı.
12. PBS ile 5 dk yıkama yapıldı.
13. Saf su ile son kez 5 dk yıkama yapılarak deteksiyona geçildi.
14. Deteksiyon için 30 mg DAB, 50 ml PBS ve 50 µl H₂O₂ içeren çözelti hazırlandı. Membran bir pens yardımıyla hazırlanan çözelti içerisine batırıldı ve bantlar oluşana kadar beklendi.

3.2.17 Afinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırma

Afinite kromatografisi ile protein saflaştırma native ve denatüre olmak üzere iki ayrı protokolle saflaştırma prosesine tabi tutuldu. Bunun sebebi proteinin native şartlar altında kolona bağlanmaması dolayısıyla elüsyon fraksiyonlarda görülmemesidir.

Native Koşullarda Saflaştırma

BL21(DE3) *E. coli* konukçusunda ekspresyonu gerçekleştirilen Omp25 füzyon proteinini afinite kromatografisi kullanılarak native şartlarda saflaştırıldı. Aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. +4°C’de muhafaza edilen ProBondTM Nickel-Chelating Resin dolaptan çıkarılarak 1 ml kadar kolona alındı. Resinin yer çekimi yardımıyla aşağı çökmesi beklendi ve üst sıvı atıldı.
2. Üzerine 3 ml bağlanma tamponu eklenerek 2 dk yatay pozisyonda çalkalandıktan sonra tekrar dikey pozisyona getirildi. Resinin çökmesi beklenip üst sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Bağlanma tamponu hazırlanırken aşağıdaki bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak distile su içinde çözülüp pH 8’e ayarlandı.

Bağlanma Tamponu	25 ml (pH: 8)
a) 50 mM NaH ₂ PO ₄	0,1 g
b) 10 mM İmidazol	0,01 g
c) 500 mM NaCl	0,73 g

3. 1 litre hücre kültürü 6,000 rpm’de 15 dk soğuk santrifüjde (+4°C) çevrildi. Üst sıvı atıldı. Hücre pelleti 8 mg lizozim eklenmiş 8 ml bağlanma tamponu ile yeniden homojenize edilip, %50 güç kullanılarak 10 sn sonikasyon 20 sn bekleme olacak şekilde 6 döngüde sonike edildi. Sonikasyon sonrası lizat 10,000 rpm’de santrifüj edilerek elde edilen üst sıvı kolona yüklendi. +4°C’de çalkalayıcıda bir saat inkübe edildi. Burada hedef proteine bağlı histidin tag’ler ile kolondaki nikelin kompleks oluşturması ve kolona tutulmasının sağlanmasıdır.
4. İnkübasyon sonunda kolon dikey pozisyona getirilerek resinin çökmesi beklendi. Üst sıvıdan örnek alınıp daha sonra SDS-PAGE analizi yapılmak üzere saklandı. Yıkama tamponları aşağıdaki şekilde hazırlandı. pH 8’e

ayarlandı. 3 kere yıkama yapılarak üst sıvılar alındı. Yine SDS-PAGE analizi için örnek saklandı.

Yıkama Tamponu	25 ml (pH: 8)
a) 50 mM NaH ₂ PO ₄	0,1 g
b) 20 mM İmidazol	0,03 g
c) 500 mM NaCl	0,73 g

5. Purifiye edilmek istenen proteinleri kolondan ayırmak için 1 ‘er ml elüsyon tampon beş ayrı kerede kolona eklendi. Elüsyon tampon aşağıda verilen listeye göre hazırlandı. pH 8’e ayarlandı.

Elüsyon Tamponu	25 ml (pH: 8)
a) 50 mM NaH ₂ PO ₄	0,1 g
b) 500 mM İmidazol	0,8 g
c) 500 mM NaCl	0,73 g

Denatüre Edici Koşullarda Saflaştırma

BL21(DE3) *E. coli* konukçusunda ekspresyonu gerçekleştirilen Omp25 füzyon proteinini afinite kromatografi denatüre edici koşullarda saflaştırıldı. Elüsyonlarda spesifik olmayan proteinlerin varlığı SDS-PAGE ile saptandıktan sonra aynı protokol bağlanma, yıkama ve elüsyon çözeltilerine %10 gliserol eklenerek tekrar edildi. Aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. +4°C’de muhafaza edilen ProBondTM Nickel-Chelating Resin dolaptan çıkarılarak 1 ml kadar kolona alındı. Resinin yer çekimi yardımıyla aşağı çökmesi beklendi ve üst sıvı atıldı.
2. Üzerine 3 ml bağlanma tamponu eklenerek 2 dk yatay pozisyonda çalkalandıktan sonra tekrar dikey pozisyona getirildi. Resinin çökmesi beklenip üst sıvı atıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Bağlanma tamponu hazırlanırken aşağıdaki bileşenler belirtilen miktarlarda tartılarak PBS içerisinde çözülüp pH 7’ye ayarlandı.

Bağlanma Tamponu	25 ml (pH: 7)
a) 8 M Üre	12,01 g
b) 10 mM İmidazol	0,01 g
c) %1 Triton X-100	250 µl

3. 1 litre hücre kültürü 6,000 rpm'de 15 dk soğuk santrifüjde (+4°C) çevrildi. Üst sıvı atıldı. Hücre pelleti 8 ml lizis tamponu ile yeniden homojenize edilip, %50 güç kullanılarak 10 sn sonikasyon 20 sn bekleme olacak şekilde 6 döngüde sonike edildi. Lizis tamponu aşağıdaki şartlara göre hazırlandı. Sonikasyon sonrası lizat 10,000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen üst sıvı kolona yüklendi. +4°C'de çalkalayıcıda bir saat inkübe edildi. Burada hedef proteine bağlı histidin tag'ler ile kolondaki nikelin kompleks oluşturması ve kolona tutunmasının sağlanmasıdır.

Lizis Tamponu	40 ml (pH: 6,5)
a) 8 M Üre	19,2 g
b) 20 mM Tris-HCl	0,1 g
c) 300 mM NaCl	0,7 g
d) 50 mM NaH ₂ PO ₄	0,2 g
e) %1 Triton X-100	400 µl
f) 10 mM İmidazol	0,02 g

4. İnkübasyon sonunda kolon dikey pozisyona getirilerek resinin çökmesi beklendi. Üst sıvıdan örnek alınıp daha sonra SDS-PAGE analizi yapılmak üzere saklandı. Yıkama tamponları iki farklı imidazol konsantrasyonunda aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. 2. adımda anlatıldığı şekilde iki kere yıkama yapılarak üst sıvılar alındı. Yine SDS-PAGE analizi için örnek saklandı.

Yıkama Tamponu	25 ml (pH: 7)
a) 8 M Üre	12,01 g
b) 20+50 mM İmidazol	0,03-0,07 g
c) 500 mM NaCl	0,73 g
d) Triton X-100	250 µl

5. Purifiye edilmek istenen proteinleri kolondan ayırmak için 1'er ml elüsyon tampon beş ayrı kerede kolona eklendi. Elüsyon tampon aşağıda verilen listeye göre hazırlandı.

Elüsyon Tamponu	25 ml (pH: 7)
a) 8 M Üre	12,01 g
b) 500 mM İmidazol	0,8 g
c) 500 mM NaCl	0,73 g
d) Triton X-100	250 µl

Hem native şartlarda hemde denatüre şartlarda elde edilen elüantlar farklı türlerde toplandı ve içerisindeki imidazol ve ürenin uzaklaştırılması, ayrıca 10 kDa'nın altındaki proteinlerin elemine edilmesi ile daha konsantre rOMP25 proteinin (41kDa) eldesi için iki farklı yöntem kullanıldı;

- Ultrafiltrasyon yöntemi; Bu yöntemde 50 ml'lik yaklaşık 9 ml elüant hacmine sahip 10 kDa membran por çapına sahip falkon kullanıldı. Falkon, santrifüj öncesi 20 mM NaH₂PO₄ (pH:8) çözeltisi ile kullanıma hazır hale getirildi. Denatüre edici koşullar altında elde edilen elüantlar bu falkonda biraraya getirilerek 4000 g'de 10 dk santrifüf edildi. Sonrasında 20 mM NaH₂PO₄ (pH:8) çözeltisi birer mL kademeli olarak filtrenin üst haznesine eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Bu işlem yaklaşık beş kez tekrar edildi. Sonrasında kontrollü bir şekilde üst hacim 500 µL kalıncaya kadar santrifüj süresi uzatıldı. Elde edilen çözelti protein konsantrasyonunun belirlenmesi için +4°C de muhafaza edildi.

- Diyaliz yöntemi; Bu yöntemde yaklaşık 10 ml elüant hacmine ve 10 kDa membran por çapına sahip diyaliz torbası kullanıldı. Diyaliz torbası elüantla doldurulduktan sonra ağzı iyice kapatılarak içinde PBS bulunan beher içerisine yerleştirildi. Bir gece oda sıcaklığında sürekli karıştırılmak suretiyle diyaliz işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında diyaliz torbası içerisinde kalan sıvı alınarak içerisindeki protein konsantrasyonunun belirlenmesi için +4°C de muhafaza edildi.

3.2.18 Protein Konsantrasyon Tayini

Protein miktar tayini için BCA (bikinkoninik asit) protein tayin kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde çıkan albumin standart ampülleri kullanılarak 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 25 µg/ml lık standart protein çözeltileri 20 mM Na₂PO₄ içerisinde hazırlandı. Blank (Negatif kontrol) olarak da yine seyreltme yapılan çözelti kullanıldı. 96'lık plate kuyucuklarına 10'ar µl standart protein çözeltileri ve üç tekrarlı olacak şekilde miktarı belirlenmek istenen protein örnekleri eklendi. Kit protokolüne göre 50:1 oranında Solüsyon A ve Solüsyon B karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Her kuyucuğa 200 µl ilave edildi, ardından 37°C' de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında UV spektrofotometre kullanılarak örneklerin absorbansları 562 nm'de ölçüldü. Elde edilen değerler ve standartlardan elde edilen değerler kullanılarak standart eğri grafiği çizildi. Regresyon tahmin denklemi ve R² değeri hesaplandı. R² değerinin 1'e yakın olması sonuçların güvenilir olduğunun

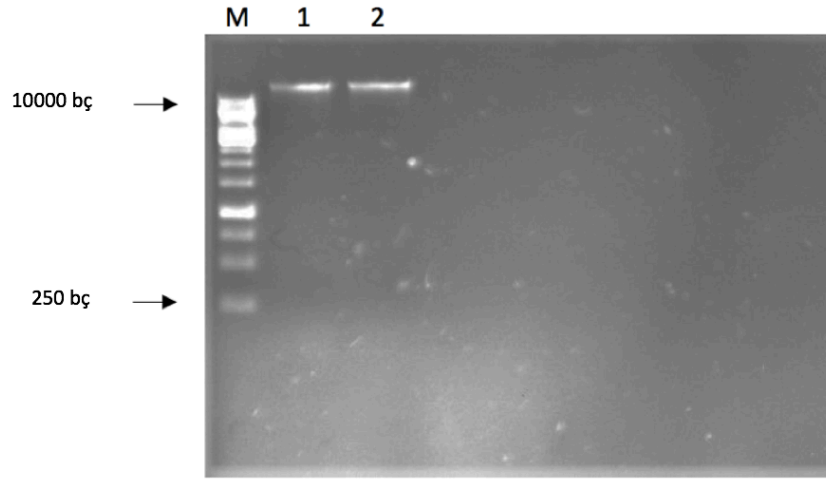
göstergesidir. Denklem üzerinde x değeri yerine protein çözeltilerinin absorbans değerleri yerleştirilerek y değerleri hesaplandı. Elde edilen y değerleri protein konsantrasyonunu ifade etmektedir [158].



DENEYSEL SONUÇLAR

4.1 *Brucella abortus*'tan Genomik DNA İzolasyonu

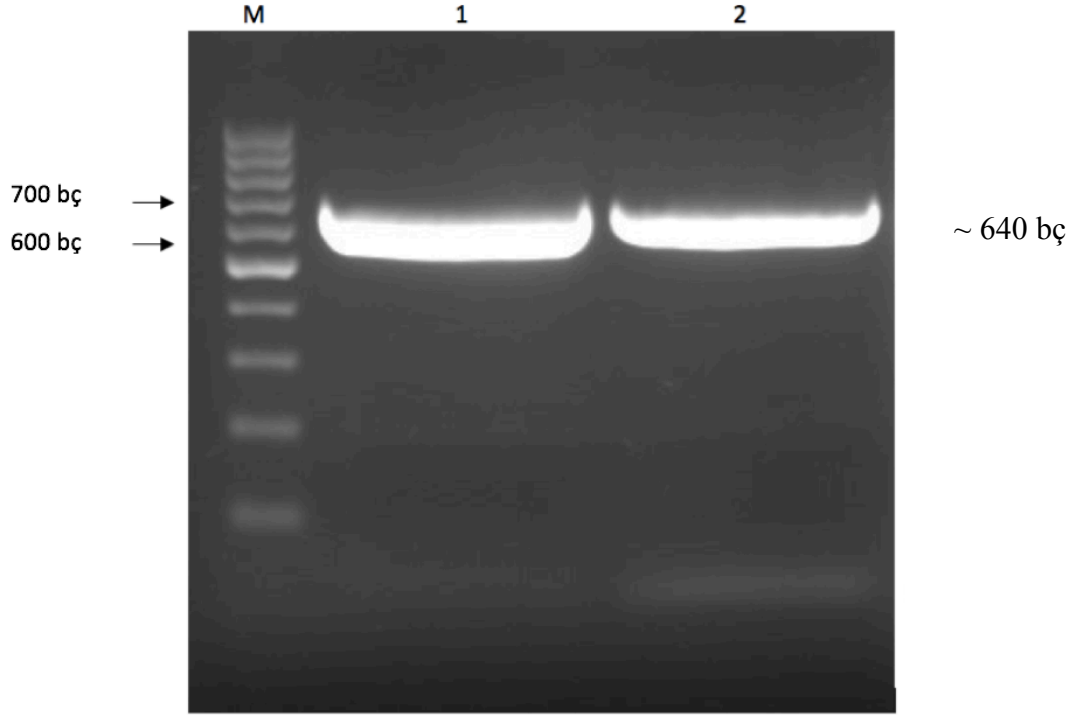
Endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 straininden elde edilen DNA izolasyonunun agaroz jel elektroforez sonucu Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Ayrıca UV spektrofotometre kullanılarak yapılan ölçümde 180 ng/μL genomik DNA tespit edilirken, A260/A280 oranı 1,9 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1 Endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 strainin izole genomik DNA görüntüsü, M: GeneRuler DNA Markır; 1,2: genomik DNA (iki tekrarlı çalışma)

4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

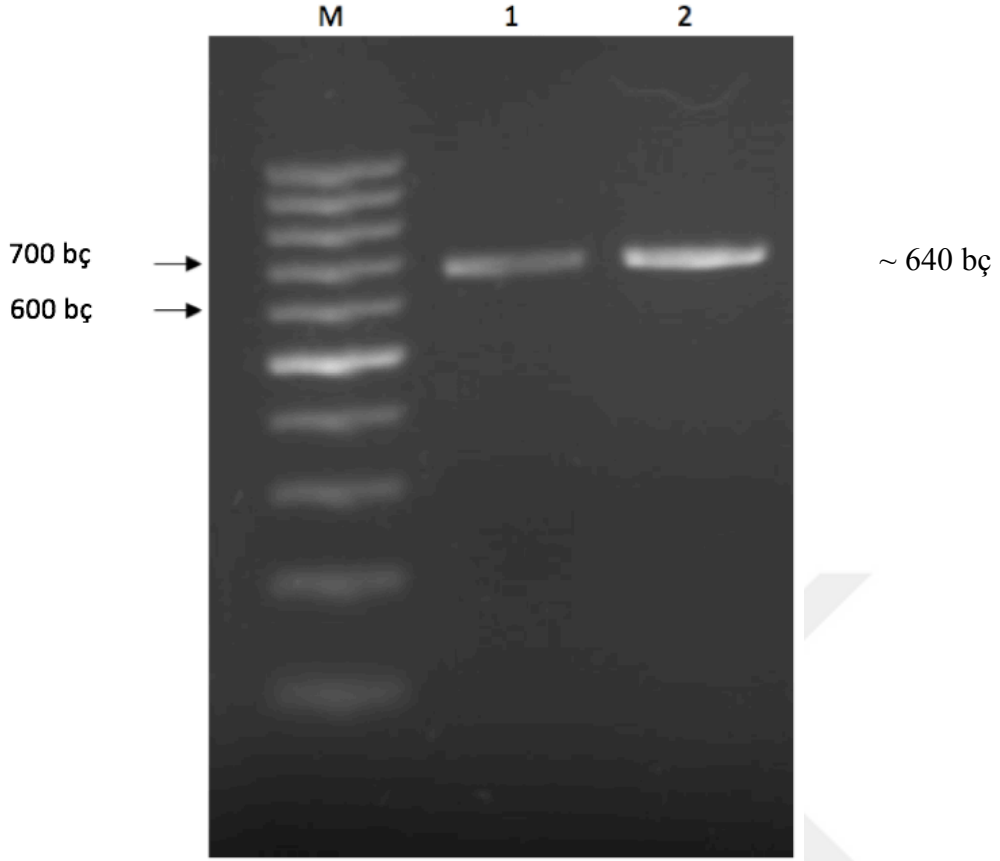
Tasarlanan primerler ve endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 straini DNA'sı ile gerçekleştirilen PZR reaksiyonu sonucu elde edilen amplicon Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Amplicon büyüklüğünün kullanılan marker DNA vasıtasıyla 640 bç olduğu ve istenilen ürün olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 straini PZR reaksiyonu sonucu elde edilen amplikon ürünü, M: GeneRuler DNA Markır; 1,2: PZR ürünleri (iki tekrarlı çalışma)

4.3 Jel Ekstraksiyonu

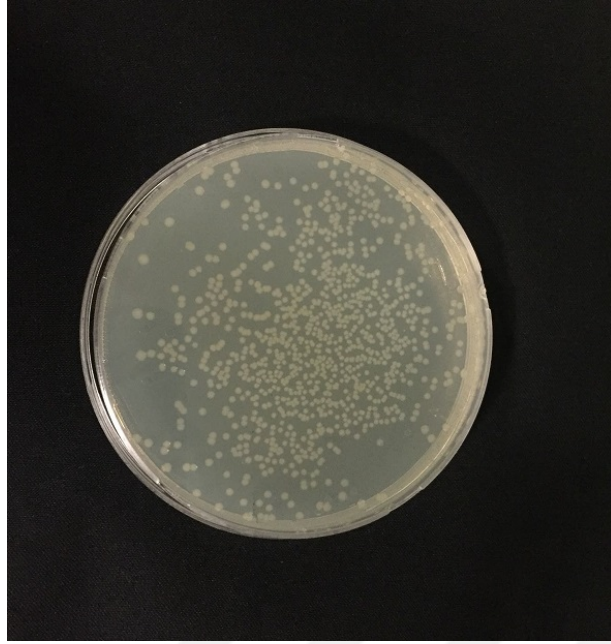
Omp25 gen bölgesini içeren PZR ürünü, jel ekstraksiyonu ile saflaştırıldıktan sonra saf DNA'nın bütünlüğü ve kalitesi agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir (Şekil 4.3). DNA miktarı 80 ng/ μ L olarak UV spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. A260/A280 oranı ise 1,8 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3 Endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 straini saf Omp25 gen bölgesi amplicon ürünü, M: GeneRuler DNA Markır; 1,2: Saf amplicon ürünü (iki tekrarlı çalışma)

4.4 Transformasyon

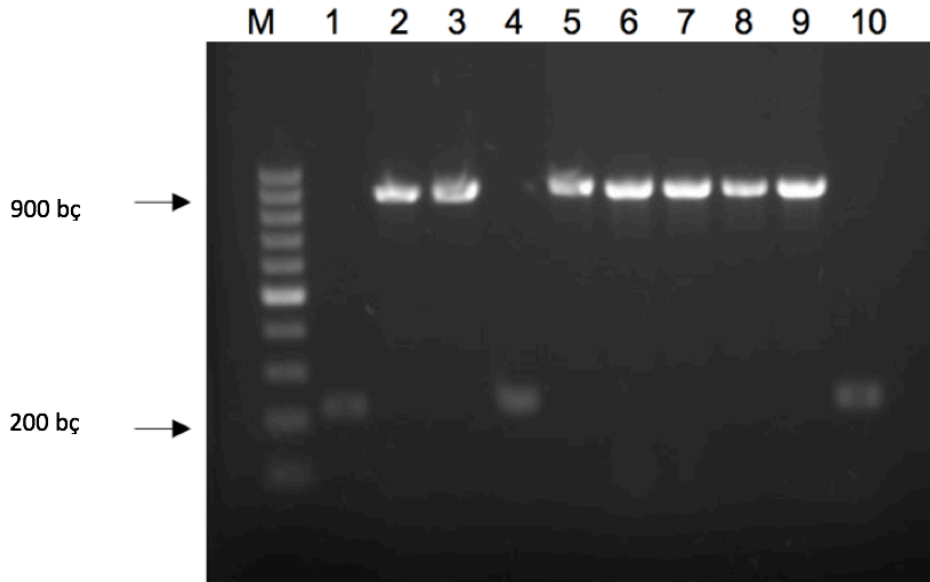
Küt uçlu PZR ürününü hızlı ve etkin bir şekilde vektöre klonlamak ve ardından *E. coli*'de T7 promotörü kontrolünde ekspresyonunu sağlamak için kullanılan Champion™ pET Directional TOPO® Expression kiti ile yöntem kısmında belirtilen basamaklarla klonlama işlemi yapılmıştır. Jel ekstraksiyonu ile saflaştırılan PZR ürünü ve pET102/D-TOPO® vektör için 1:1 molar oranı olacak şekilde ve 15 ng vektör kullanılarak klonlama reaksiyonu kuruldu. Hemen akabinde transformasyon işlemine geçildi. Ardından ampisilin içeren petrilere ekim yapılarak, petriler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Sonuçlar Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Rekombinant kolonileri içeren petri görüntüsü

4.5 Koloni PZR

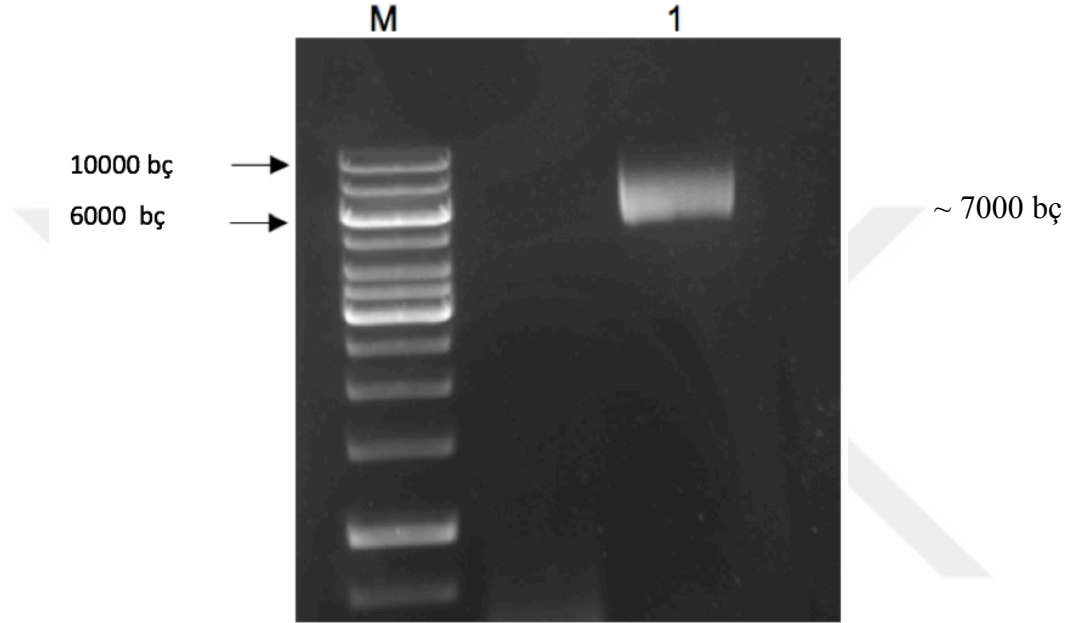
İki ayrı petriden toplam 10 koloni seçilerek antibiyotik içeren petrilere steril kürdan yardımıyla ekilen kolonilerden gerçekleştirilen koloni PZR sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir. 1, 4 ve 10. örnekler dışındaki koloniler Omp25 gen dizisini içeren pozitif kolonilerdir.



Şekil 4.5 Koloni PZR sonuçları, M: GeneRuler DNA Markır; 1,4,10: Negatif PZR sonucu, 2,3,5,6,7,8,9: Pozitif PZR sonuçları

4.6 Plazmit DNA İzolasyonu

Koloni PZR sonucunda pozitif çıkan kolonilerden bir tanesi seçilerek 100 µg/ml Amp içeren 5 ml LB besiyerine inokülasyonu ve inkübasyonu ile edilen kültürdeki plazmit izolasyonu, ZymoPURE™ Plazmit Miniprep Kiti kullanılarak ve ilgili kit protokolüne göre yapıldı. Plazmit DNA miktarı UV spektrofotometre kullanılarak 50 ng/µl olarak ölçüldü. A260/A280 oranı da 1,7 olarak tespit edildi. Agaroz jel elektroforez sonucu Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Jel görüntüsünde plazmide ait 6957 bç ürün görülmektedir.



Şekil 4.6 Plazmit DNA jel görüntüsü, M: GeneRuler DNA Markır; 1: Plazmit DNA

4.7 Rekombinant Plazmit DNA Dizi Analizi

Rekombinant pET102/D-TOPO® plazmitini taşıyan hücrelerden izole edilen plazmit DNA'ların sekans sonucu BLASTn programı kullanılarak *Brucella abortus* referans suşunun Omp25 gen dizisi (Accession no: AM040264) ile hizalandı. Hizalama sonucunda %99 benzerlik görüldü (Şekil 4.7). BLASTx programı kullanılarak referans suş (Accession no: AM040264) ile yapılan karşılaştırmada aminoasit dizisinde ve açık okuma çerçevesinde proteinin üç boyutlu yapısını değiştirecek herhangi bir farklılık olmadığı tespit edildi (Şekil 4.8). DNA sekans sonucu diğer *Brucella* türlerinin Omp25 gen dizileri ile de hizalandı. Clustal W programı kullanılarak Omp25 sekanslarının gen dizilimi benzerlik oranları belirlendi (Tablo 4.1). Bu oranlara göre endemik Omp25 gen dizilimi diğer *Brucella* türlerinin Omp25 dizileriyle oldukça benzerdir. UPGMA modeline göre MEGA 7 programı ile çizilen filogenetik ağaç Şekil 4.9'da görülmektedir.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1171 bits(634)	0.0	635/636(99%)	0/636(0%)	Plus/Plus
Query 3		CGCACTCTTAAGTCTCTCGTAATCGTCTCGGCTGCGCTGCTGCCGTTCTCTGCCACCGCT		62
Sbjct 706322		CGCACTCTTAAGTCTCTCGTAATCGTCTCGGCTGCGCTGCTGCCGTTCTCTGCCACCGCT		706381
Query 63		TTTGCTGCCGACGCCATCCAGGAACAGCCTCCGGTTCGGGTTGAAGTAGCTCCC		122
Sbjct 706382		TTTGCTGCCGACGCCATCCAGGAACAGCCTCCGGTTCGGGTTGAAGTAGCTCCC		706441
Query 123		CAGTATAGCTGGGCTGGTGGCTATACCGGTCTTTACCTTGGCTATGGCTGGAACAAGGCC		182
Sbjct 706442		CAGTATAGCTGGGCTGGTGGCTATACCGGTCTTTACCTTGGCTATGGCTGGAACAAGGCC		706501
Query 183		AAGACCAGCACCGTTGGCAGCATCAAGCCTGACGATTGGAAGGCTGGCGCCTTTGCTGGC		242
Sbjct 706502		AAGACCAGCACCGTTGGCAGCATCAAGCCTGACGATTGGAAGGCTGGCGCCTTTGCTGGC		706561
Query 243		TGGAAC TTCCAGCAGGACCAGATCGTATACGGTGTGAAGGTGATGCAGGTTATTCTCTGG		302
Sbjct 706562		TGGAAC TTCCAGCAGGACCAGATCGTATACGGTGTGAAGGTGATGCAGGTTATTCTCTGG		706621
Query 303		GCCAAGAAGTCCAAGGACGGCCTGGAAGTCAAGCAGGGCTTTGAAGGCTCGCTGCGTGCC		362
Sbjct 706622		GCCAAGAAGTCCAAGGACGGCCTGGAAGTCAAGCAGGGCTTTGAAGGCTCGCTGCGTGCC		706681
Query 363		CGCGTCGGCTACGACCTGAACCCGGTTATGCCGTACCTCACGGCTGGTATTGCCGGTTTCG		422
Sbjct 706682		CGCGTCGGCTACGACCTGAACCCGGTTATGCCGTACCTCACGGCTGGTATTGCCGGTTTCG		706741
Query 423		CAGATCAAGCTTAACAACGGCTTGGACGACGAAAGCAAGTCCCGCTGGGTTGGACGGCT		482
Sbjct 706742		CAGATCAAGCTTAACAACGGCTTGGACGACGAAAGCAAGTCCCGCTGGGTTGGACGGCT		706801
Query 483		GGTGCCGGTCTCGAAGCCAAGCTGACGGACAACATCCTCGGCCGCGTTGAGTACCGTTAC		542
Sbjct 706802		GGTGCCGGTCTCGAAGCCAAGCTGACGGACAACATCCTCGGCCGCGTTGAGTACCGTTAC		706861
Query 543		ACCCAGTACGGCAACAAGAAGTATGATCTGGCCGGTACGACTGTTTCGCAACAAGCTGGAC		602
Sbjct 706862		ACCCAGTACGGCAACAAGAAGTATGATCTGGCCGGTACGACTGTTTCGCAACAAGCTGGAC		706921
Query 603		ACGCAGGATATCCCGTTCGGCATCGGCTACAAGTTC	638	
Sbjct 706922		ACGCAGGATATCCCGTTCGGCATCGGCTACAAGTTC	706957	

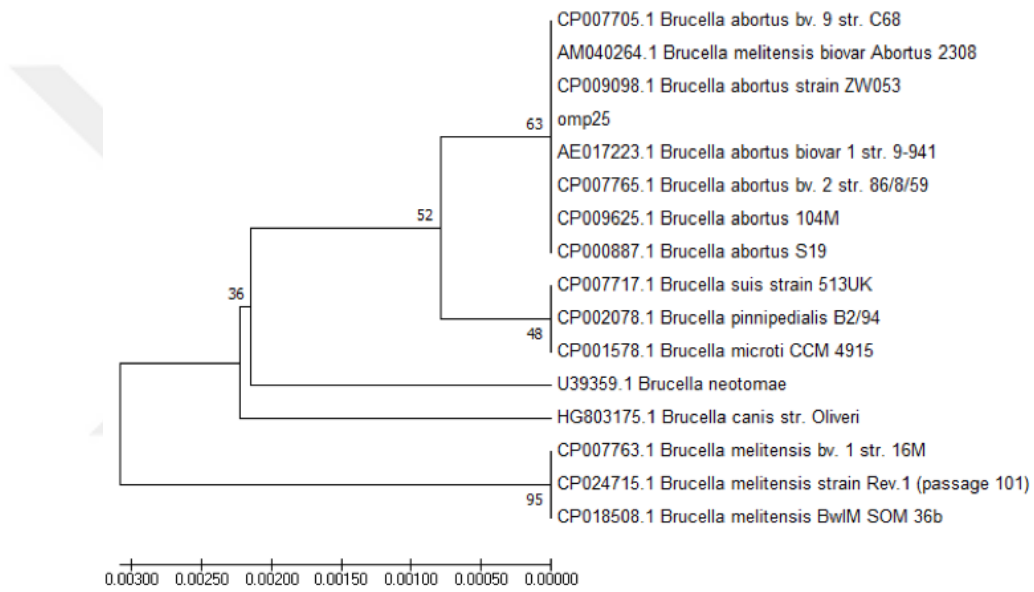
Şekil 4.7 BLASTn sonucu, (Query: Rekombinant Omp25, Sbjct:Referans suş, Accession no: AM040264)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
214 bits(546)	9e-69	Compositional matrix adjust.	105/105(100%)	105/105(100%)	0/105(0%)	+1
Query 202		IKPDDWKAGAFAGWNFQQDQIVYGVGEDAGYSWAKKSKDGLVVKQGFEGSLRVRVGYDLN				381
Sbjct 1		IKPDDWKAGAFAGWNFQQDQIVYGVGEDAGYSWAKKSKDGLVVKQGFEGSLRVRVGYDLN				60
Query 382		PVMPYLTAGIAGSQIKLNNGLDDESKFRVGTAGAGLEAKLTDNI		516		
Sbjct 61		PVMPYLTAGIAGSQIKLNNGLDDESKFRVGTAGAGLEAKLTDNI		105		

Şekil 4.8 BLASTx sonucu, (Query: Rekombinant Omp25, Sbjct:Referans suş, Accession no: AM040264)

Çizelge 4.1 Clustal W programıyla yapılan karşılaştırılma sonucu elde edilen gen dizilimi benzerlik oranları

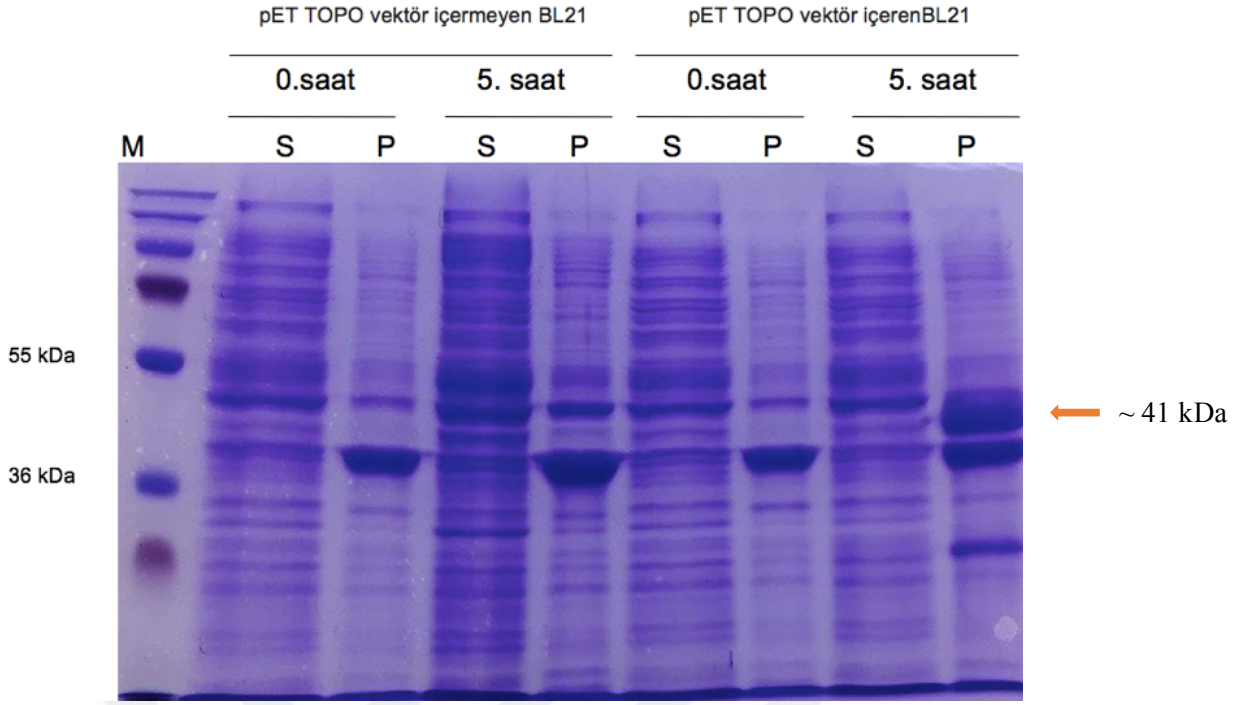
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>B. melitensis</i> str. Rev 1	100.00	100.00	100.00	99.21	99.21	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	99.53
2. <i>B. melitensis</i> BwIM SOM	100.00	100.00	100.00	99.21	99.21	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	99.53
3. <i>B. melitensis</i> bv. 1 str. 16M	100.00	100.00	100.00	99.21	99.21	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	99.53
4. <i>B. canis</i> str. Oliveri	99.21	99.21	99.21	100.00	99.37	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.69	99.69	99.69
5. <i>B. neotomae</i>	99.21	99.21	99.21	99.37	100.00	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.53	99.69	99.69	99.69
6. Omp25	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
7. <i>B. abortus</i> 104M	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
8. <i>B. abortus</i> str. ZW053	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
9. <i>B. abortus</i> bv. 2 str. 86/8/59	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
10. <i>B. abortus</i> bv. 9 str. C68	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
11. <i>B. abortus</i> biovar 1 str. 9-941	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
12. <i>B. abortus</i> S19	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
13. <i>B. melitensis</i> biovar Abortus	99.37	99.37	99.37	99.53	99.53	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.84	99.84	99.84
14. <i>B. pinnipedialis</i> B2/94	99.53	99.53	99.53	99.69	99.69	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	100.00	100.00	100.00
15. <i>B. suis</i> strain 513UK	99.53	99.53	99.53	99.69	99.69	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	100.00	100.00	100.00
16. <i>B. microti</i> CCM 4915	99.53	99.53	99.53	99.69	99.69	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	99.84	100.00	100.00	100.00



Şekil 4.9 Omp25 dizi bilgileri kullanılarak UPGMA testi ile oluşturulan filogenetik ağaç

4.8 SDS-PAGE

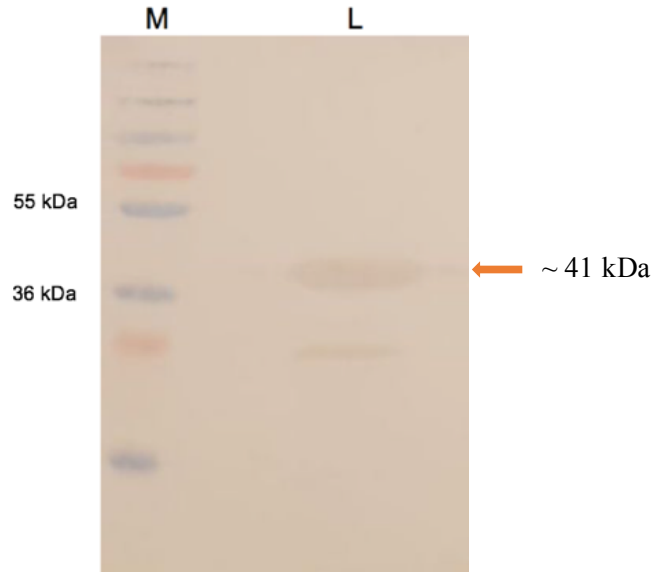
Rekombinant Omp25 proteini translayon verimini ve çözünürlüğü artıran 13 kDa ağırlığındaki thioeredoksin proteini ile füzyon halinde eksprese olmaktadır. Karboksi terminal’indeki 3 kDa'luk Histag ile birlikte toplam protein ağırlığı 41 kDa 'dur. Şekil 4.10’da Omp25 proteinin beklenen büyüklükte eksprese edildiği gösterilmektedir.



Şekil 4.10 pET-TOPO102 vektörü içeren ve içermeyen BL21 (DE3) *E. coli* konukçusundaki ekspresyon profili

4.9 Western Blot Analizi

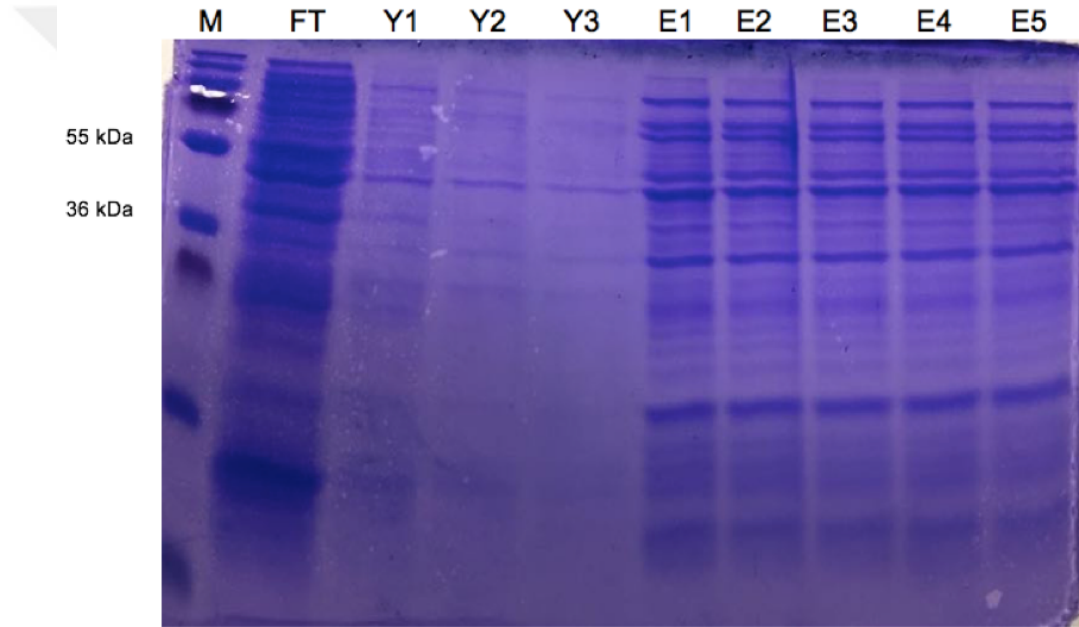
BL21(DE3) *E. coli* konukçusunda ekspresyonu gerçekleştirilen 41 kDa boyutundaki Omp25 füzyon proteininin varlığı Western Blot yöntemi kullanılarak His-probe Antibody (H-3): sc-8036 antikorları ile doğrulandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 41 kDa büyüklüğündeki Omp25 ifade edilmesi sonrası Western blot analizi, M: Protein markır; L: Lizat

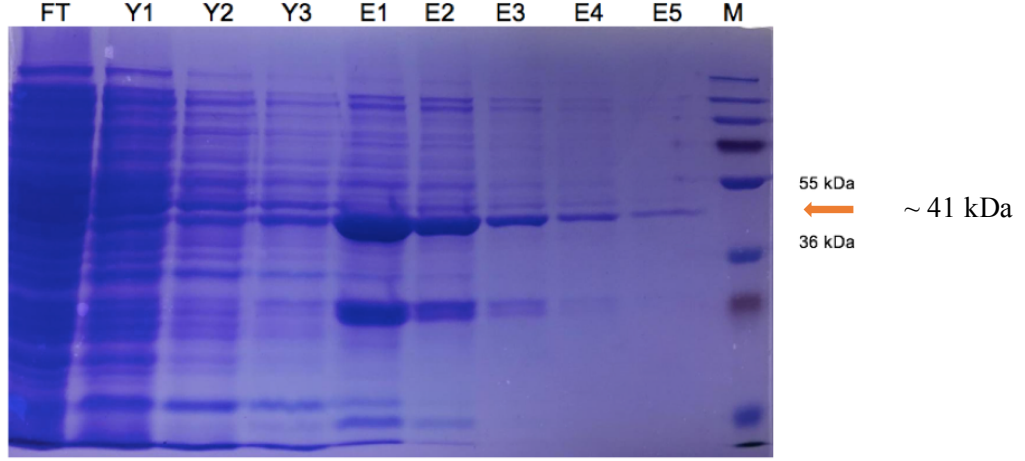
4.10 Saflaştırma

Rekombinant Omp25 proteininin C-terminal'ine eklenen 6 his-tag bölgesi, saflaştırmanın afinite kromatografisi ile yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Kolon dolgu maddesi olarak polihistidin bölgesi ile etkileşimi bilinen nikel nitrilotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz kullanıldı. Native ve denatüre şartlarda ayrı ayrı saflaştırma yapıldı. Native şartlarda gerçekleştirilen saflaştırma işleminde elde edilen yıkama (Y1, Y2, Y3) ve elüsyon fraksiyonlarında (E1, E2, E3, E4, E5) beklenen boyutta (41 kDa) protein bandı gözlenmediğinden (Şekil 4.12) denatüre şartlarda tekrar saflaştırma yapıldı. İmidazol ve üre giderimi ve proteinin konsantre edilmesi için ultrafiltrasyon ve diyaliz metodları uygulandı.



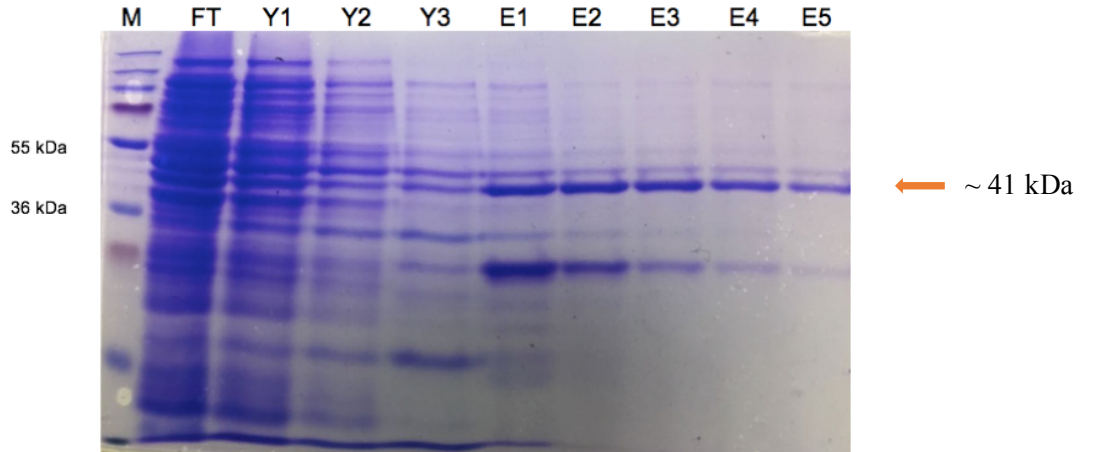
Şekil 4.12 Kolon ile native şartlarda saflaştırılan rekombinant protein, M: Protein markır; FT: Flow through; Y1: Yıkama1; Y2: Yıkama 2; Y3: Yıkama 3; E1: Elüsyon1; E2: Elüsyon 2; E3: Elüsyon 3; E4: Elüsyon 4; E5: Elüsyon 5

Denatüre şartlarda yapılan ilk saflaştırmada protein kolona bağlandı ve elüsyon fraksiyonlarında proteine ait bant görüldü. Şekil 4.13'deki E1 ve E2 elüsyon fraksiyonlarının yüklendiği kuyucuklarda istenilen proteininin yüksek miktarda elde edildiği ancak farklı molekül ağırlıklı spesifik olmayan proteinin bantlarında yoğun olarak bulunduğu saptanmıştır.



Şekil 4.13 Kolon ile denatüre şartlarda saflaştırılan rekombinant protein, M: Protein markır; FT: Flow through; Y1: Yıkama1; Y2: Yıkama 2; Y3: Yıkama 3; E1: Elüsyon1; E2: Elüsyon 2; E3: Elüsyon 3; E4: Elüsyon 4; E5: Elüsyon 5

Literatürde, denatüre edici koşullarda ortama hacimce %10 gliserol ilave edildiğinde spesifik olmayan proteinlerin Ni-NTA kolona tutunmasının engellendiği belirtilmiştir. Bu bilgiden yola çıkılarak gerçekleştirilen ikinci saflaştırma işlemindeki (denatüre şartlarda) yıkama ve elüsyon fraksiyonlarına ait SDS-PAGE sonuçları Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Elüsyon fraksiyonlarında Omp25 proteinine ait bant görüntüleri daha yüksek saflıkta protein elde edildiğini göstermiştir.

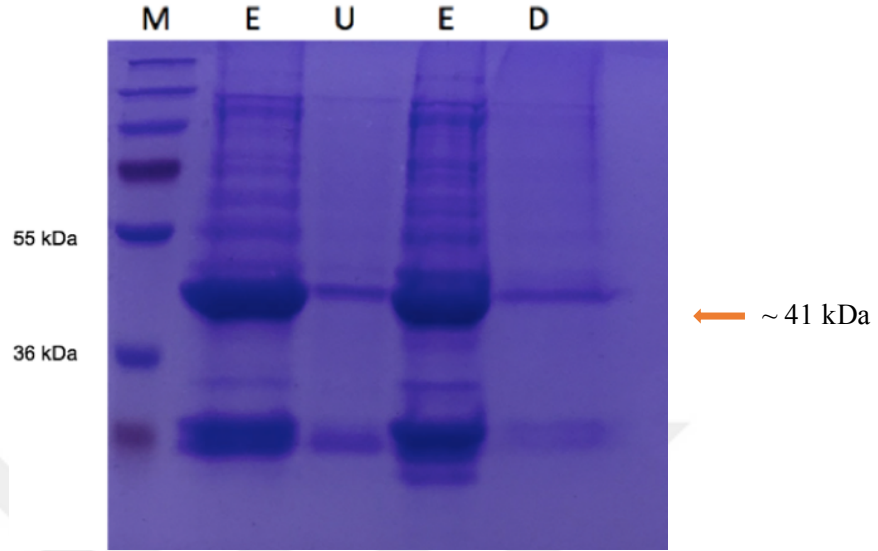


Şekil 4.14 Kolon ile denatüre şartlarda, solüsyonlarda %10 gliserol kullanılarak saflaştırılan rekombinant protein

M: Protein markır; FT: Flow through; Y1: Yıkama1; Y2: Yıkama 2; Y3: Yıkama 3; E1: Elüsyon1; E2: Elüsyon 2; E3: Elüsyon 3; E4: Elüsyon 4; E5: Elüsyon

Denatüre şartlarda gerçekleştirilen ikinci saflaştırma işlemindeki düşük miktarda var olan farklı molekül ağırlıklı ve spesifik olmayan protein bantlarının giderilmesi amacıyla sonraki aşamada ultrafiltrasyon ve diyaliz metodları uygulanmıştır (Şekil

4.15). Şekilde görüldüğü gibi elüantta (E) bulunan Omp25 proteinine ait bant kalınlığının, hem ultrafiltrasyon (U) hem de diyaliz (D) örneklerinin yüklendiği kuyucuklarda azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.15 Ultrafiltrasyon ve diyaliz ile saflaştırılan rekombinant protein SDS-PAGE görüntüsü, M: Protein markır; E: Elüant; U: Ultrafiltrasyon sonrası jel görüntüsü; D: Diyaliz sonrası görüntüsü

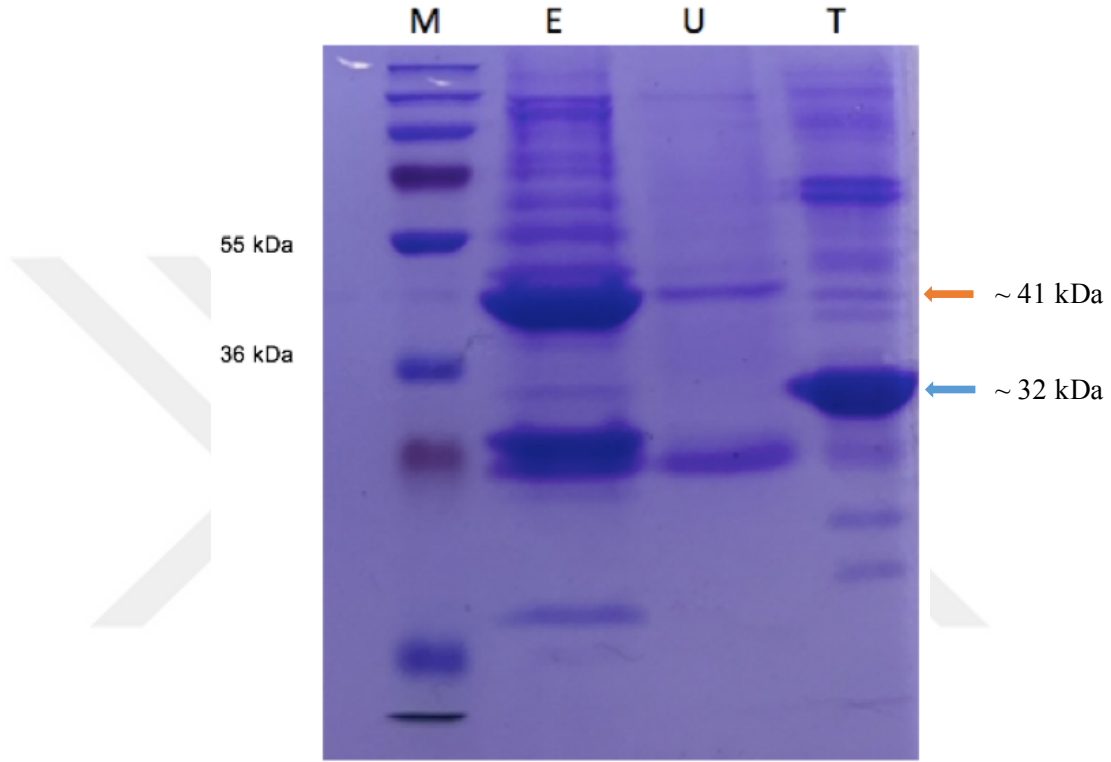
4.11 Protein Konsantrasyonu ve Saflığının Değerlendirilmesi

Afinite kromatografi tekniği ile denatüre şartlarda elde edilen elüant ile ultrafiltrasyon ve diyaliz sonrası elde edilen çözeltilerin toplam protein miktarı BCA protein tayin kiti ile tespit edilmiş ve sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Total protein miktarının tespiti çalışmasında ticari olarak elde edilen rOmp25 proteini de analiz edilerek karşılaştırılma yapılmış ve sonuç aynı tabloda gösterilmiştir. BCA yöntemiyle elde edilen sonuçlar, diyaliz ya da ultrafiltrasyon uygulaması sonrasında total protein miktarının önemli ölçüde azaldığını göstermiş ve SDS-PAGE görüntülerinde elde edilen sonuçları doğrulamıştır (Şekil 4.15).

Çizelge 4.2 BCA protein miktar tayini kiti ile elde edilen toplam protein sonuçları

Örnek	Konsantrasyon	Toplam hacim
Elüant	2,36 mg/mL	1 mL
Ultrafiltrasyon	0,5 mg/mL	1 mL
Diyaliz	0,6 mg/mL	1 mL
Ticari rOmp25	1,97 mg/mL	1 mL

Aynı örneklerin protein saflığı SDS-PAGE yöntemi kullanılarak tayin edilmiş, sonuçlar ticari rOmp25 ile karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.16’da gösterilmiştir. Ticari olarak satın alınan rOmp25 proteini N-terminal’inde 10xHis tag ve C-terminal’inde Myc-tag bulundurmaktadır. Tahmini olarak beklenen protein ağırlığı 27,8 kDa olmasına rağmen jelde 32 kDa boyutunda protein bandı görülmektedir. Bunun protein yükünden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.



Şekil 4.16 Eldesi gerçekleştirilen rOmp25 ile ticari rOmp25’in saflığının karşılaştırıldığı SDS- PAGE görüntüsü, M: Protein markır; E: Elüant; U: Ultrafiltrasyon sonrası jel görüntüsü; T: Ticari rOmp25 görüntüsü

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bruselloz; küçük, Gram (-) kokobasilus olarak intraselüler yaşam yeteneğine sahip *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Bu hastalık, hayvanlarda yavru atma ve azalan fertilitite ile karakterizedir ve ayrıca insanlarda dalgalı ateş, artrit ve osteomyelit gibi semptomlarla birlikte kronik enfeksiyonlarla karakterizedir [159]. Hastalığın tedavisine yönelik olarak hayvanlarda enfekte olanların yok edilmesi veya enfekte olmamışların aşılama uygulanırken, insanlarda ticari olarak temin edilebilecek bir aşı olmadığından uzun süreli yoğun antibiyotik tedavisi kullanılmaktadır. Bununla birlikte hayvanların korunmasına yönelik uygulanan aşılar, canlı atenüe aşılar olup gebe hayvanlarda düşüğe neden olma, insanlar için patojenik olma, antibiyotiklere dirençli olma ve lipopolisakkarid bazlı serolojik testlerde çapraz reaksiyon dolayısıyla yanlış serolojik yanıtların oluşması gibi kısıtlamalara sahiptir [160]. Son yıllarda yürütülen birçok proje; *Brucella* proteomunda immün proteomik yaklaşımlar kullanılarak yeni immünojenleri tanımlamayı hedeflemektedir [81]. Yeni aşı adaylarının seçimi ve üretimi, yeni aşuların uygulanması yönelik temel pratik bir yaklaşım ve eradikasyon programlarının da köşe taşıdır [62], [81]. *Brucella* türlerinin dış membranında lokalize olan ve üç büyük gruba ayrılan proteinler immünojenik ve koruyucu antijenler olarak tanımlanmıştır [62], [81]. Grup 3 proteinleri arasında yer alan ve yaklaşık 25 kDa büyüklüğündeki Omp25, *Brucella spp*'nin major dış membran proteinlerinden biridir [62]. Literatürde, *B. abortus* Omp25 mutanı ile enfekte edilen farelerde hastalık virulansının azaldığı gösterilerek bu bölgenin önemli bir virulans faktörü olabileceği rapor edilmiştir [62]. Ayrıca Omp25'in, *B. suis* ile enfekte insan makrofajlarında TNF- α üretimini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Yine Omp25 geninin ektopik ekspresyonunun sağlandığı *Brucella suis*'in insan makrofaj hattında çeşitli

miRNA'ları (miR-155, -23b and -21-5p) upregüle ederek IL-12 üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir [17]. *B. melitensis* Omp25 proteini ile hazırlanan DNA aşısının farelerde virülan *B. melitensis* tehdidine karşı koruyuculuk özelliği gösterdiği görülmüştür [146]. Bu bilgilerden yola çıkılarak *Brucella abortus* biovar tip 3 straininden izole edilen ve klonlanan Omp25 geni, ülkemizde büyükbaş hayvanlara koruyucu amaçlı uygulanan *B. abortus* S19 aşısına alternatif yeni bir rekombinant bir aşının tasarlanması için aday olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında ilk aşamada Erzurum İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nden temin edilen endemik *Brucella abortus* biovar tip 3 straininin genomik DNA izolasyonu yapılmış ve Omp25 gen bölgesi uygun primerlerle polimeraz zincir reaksiyonu ile başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Sonrasında küt uçlu Omp25 ampliconu hızlı ve etkin bir şekilde vektöre klonlamak ve ardından *E. coli*'de T7 promotörü kontrolünde ekspresyonunu sağlamak için Champion™ pET Directional TOPO® Expression kiti kullanılmıştır. İmmünolojik çalışmalarda yüksek düzeyde rekombinant protein üretiminin önemi nedeniyle, Omp25 geni, füzyon pET102/D-TOPO ekspresyon vektöründe klonlanmıştır. Literatürde, Omp25 proteinin ekspresyon sonrası sitozölde inklüzyon cisimciği oluşturduğu rapor edildiği için proje sonucunda elde edilecek rOmp25 proteinin çözünürlüğünün artırılması ve yüksek saflıkta elde edilmesi amacıyla PET vektör sistemi tercih edilmiştir. Bu sistem *E. coli*'deki rekombinant proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilmiş en güçlü sistemlerden biridir. [159]. Klonlama için tercih edilen pET102/D-TOPO vektör, ekspresyonu sağlanan proteinin doğrulanması ve saflaştırma aşamalarında kolaylık sağlayacak peptid tagleri (N-terminal'inde His-Patch thioredoxin dizisi ve bu peptidi daha sonra ayırmak için proteaz tanıma bölgesi olan Enterokinaz kesim bölgesi; C-terminal'inde ise V5, 6xHis tagleri) içeren rekombinant füzyon protein üretimine olanak sağlar. Bu vektörde yer alan thioredoxin; maya, bitki, memeli ve bakterilerde bulunan, 11,7 kDa ağırlığa, füzyon partneri olarak kullanıldığında translasyon verimini ve bazı durumlarda çözünürlüğü artırdığı bilinen bir proteindir. Ayrıca bu protein, divalent katyonlara yüksek afinitenin sağlanması ve metal şelatlama rezinleri ile saflaştırılmanın kolaylaştırılması için mutasyona uğratılmıştır. İlaveten bu vektörün V5 ile 6xHis tagleri protein doğrulama ve saflaştırma aşamalarında hem ilgili antikolar hem de metal şelatlama rezinler ile kolaylıkla bağlanmasından dolayı ilgili prosesleri kolaylaştırmaktadır. Bu vektöre klonlama reaksiyonunda, ligaz ve restriksiyon enzimlerinin kullanımına ihtiyaç yoktur.

TOPO klonlamada, bu sistem modifiye edilerek hızlı ve etkin bir klonlama sistemi geliştirilmiştir. PZR ile çoğaltılacak gen için primer tasarlanırken 5' ucuna CACC dizisi eklenir. Bu dizi TOPO® yüklü orijinal zincirin 3' ucundaki GTGG bölgesine tamamlayıcıdır. Söz konusu orijinal zincir PZR ürününe atak yaparak ürünün vektöre doğru oryantasyonda eklenmesini sağlar. Klonlama işlemi sonrası yapılan koloni PCR ve plazmit sekanslama işlemleri ile klonlamanın bütünlüğünü doğrulanmıştır. İlgili sekans ürünü BLASTn programı kullanılarak *Brucella abortus* referans suşu ve diğer *Brucella* türlerinin Omp25 gen dizileri ile hizalandı. Clustal W programıyla yapılan karşılaştırma sonucuna göre endemik Omp25 gen dizilimi diğer *Brucella* türlerinin Omp25 dizileriyle oldukça benzerdir ve *Brucella abortus* referans suşu ile %99 benzerlik göstermektedir. BLASTx programı ile aminoasit dizisinde ve açık okuma çerçevesinde proteinin üç boyutlu yapısını değiştirecek herhangi bir farklılık olmadığı da tespit edilmiştir. Bu çalışmada ülkemiz saha strainine ait Omp25 gen bölgesi ve bundan elde edilecek rOmp25 proteinin literatürde yer alan proteinden farklı olabileceği hipotezinde yer verilmiş ve beraberinde endemik rOmp25 proteinin eldesinin ülkemizdeki brusellozis eradikasyonunda daha başarılı sonuçlara ulaşılmasında büyük katkılar sağlayacağı öngörülmüştür. Ancak sekanslama sonuçları göstermiştir ki; ülkemiz Erzurum yöresine ait *Brucella abortus* biovar tip 3 straininin Omp25 gen bölgesi literatürde yer alan referans *Brucella abortus* straini ile aynı dizilime sahiptir. İlgili genin diziliminin aynı olması bu bölgeden elde edilecek proteinin şekil ve fonksiyonunun yönünden de literatürde yer alan referans Omp25 proteinin ile benzer olacağını göstermektedir.

pET102+Omp25 ürünü istenilen rekombinant protein üretimi için, T7 RNA polimerazı içeren *E. coli* BL21 (DE3) suşuna transforme edilerek IPTG ilavesiyle başarılı bir şekilde eksprese edildi. rOmp25 proteini; 25 kDa ağırlığındaki Omp25 proteini ve ilgili vektörde bulunan 13 kDa ağırlığındaki thioedoksin proteini, 3 kDa'luk Histag ile birlikte toplam 41 kDa'lık protein olarak elde edilmiş ve sonuç SDS-PAGE de görüntülenmiştir. Elde edilen 41 kDa boyutundaki Omp25 füzyon proteininin doğrulanması amacıyla His-probe antikoru ile Western blot çalışması gerçekleştirilmiş ve sonuç doğrulanmıştır.

Çalışmamızın en önemli basamaklarından biri olan rOmp25 proteinin saflaştırılması aşamasında, bakteri kültüründen native ve denatüre şartlarda protein eldesi olmak üzere iki farklı uygulama yapılmıştır. Ahmed ve arkadaşlarının çalışması [161] esas alınarak

rOmp25 proteininin çözünür olabileceği düşüncesiyle native şartlarda gerçekleştirilen saflaştırma sonucunda elüsyon fraksiyonlarında SDS-PAGE' de beklenen molekül ağırlığına karşılık gelen bant elde edilememiştir. Ancak denatüre şartlarda gerçekleştirilen proses sonrası SDS-PAGE'de istenilen bant gözlenmiştir. Bundan dolayı çalışmamızda elde edilen rOmp25 proteinin hücre sitozolünde inklüzyon cisimciği oluşturduğu, çözünür özellikte olmadığı tespit edilmiştir. Yousefi ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda da benzer özellikte rOmp25 proteini elde etmişlerdir [159]. Denatüre edici şartlar altında gerçekleştirilen saflaştırma çalışmasında elüantta yüksek miktarda rOmp25 yanısıra spesifik olmayan proteinlerin de Ni-NTA kolona tutunduğu ve safsızlığa neden olduğu gözlemlendiğinden denatürasyon koşullarına hacimce %10 gliserol ilave edilerek büyük oranda bu safsızlıklar giderilmiştir. Denatüre şartlarda elde edilen elüantta bulunan imidazol ile ürenin ve gliserol kullanımı ile uzaklaştırılmayan proteinlerin (Mw<10 kDa) giderilmesi amacıyla diyaliz ve ultrafiltrasyon yöntemleri uygulanmıştır. İşlem sonrasında elde edilen numuneler; SDS-PAGE analizi ile ticari olarak satın alınan rOmp25 proteini ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. BCA metodunda, denatüre şartlarda elde ettiğimiz elüanttaki toplam protein miktarı 2,36 mg/mL ve ticari Omp25 proteini de 1,97 mg/mL olarak tespit edilmiş, ancak diyaliz ve ultrafiltrasyon uygulamalarından sonra toplam protein miktarında önemli bir azalma tespit edilmiştir (sırasıyla 0,6 ve 0,5 mg/mL). Diyaliz ve ultrafiltrasyon yöntemlerinde 10 kDa'un altındaki moleküllerin geçişine izin verecek por çapına sahip materyal kullanıldığından belirli bir miktar protein kaybı beklenen ve istenilen bir sonuçtur. Nitekim çalışmada kontrol grubu oluşturması amacıyla her iki yöntemin alt sıvılarından alınan örneklerden yapılan BCA testi sonuçlarında, sırasıyla, 0,25 mg/mL ve 0,35 mg/mL protein tespit edilmiştir. Ancak alt sıvılarda tespit edilen toplam protein miktarı ile diyaliz ya da ultrafiltrasyon metotları için elde edilen toplam protein miktarı birlikte düşünüldüğünde elüanttaki protein miktarına kıyasla önemli bir kaybın olduğu görülmektedir. Bunun sebebinin kullanılan yöntemlerde üretilen rOmp25 proteinin agregat oluşturarak membrana yapışması olduğu düşünülmektedir. İlaveten, üretilen rOmp25 (41 kDa) ve ticari rOmp25 (32 kDa-farklı tag taşıyor olmasından dolayı) proteinin SDS-PAGE yöntemiyle yapılan karşılaştırmasında; bant profilleri, gliserol uygulamalı elüanttaki rOmp25 (41 kDa) proteinin bant kalınlığının ticari Omp25'ten daha yüksek miktarda olduğunu ve daha saf olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak proje kapsamında endemik rekombinant Omp25 proteini başarılı bir şekilde üretilmiş ve ticari rOmp25'ten çok daha saf olarak eldesi başarılmıştır. Elde

edilen endemik rOmp25 proteininin ülkemiz brusellozis tanı ve tedavisinde kullanılabilmesi için, ileriki çalışmalarda projelendirilmek suretiyle aşı prototipi geliştirilme çalışmaları, immünohistokimyasal bir test aracı olarak tanıya yönelik çalışmalar ve proteine spesifik anti-Omp25 monoklonal antikorlarının eldesi çalışmalarında kullanılması planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] Khan, S. Ullah, M.W. Siddique, R. Nabi, G. Manan, S. Yousaf, M. ve Hou, H., (2016). "Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life", International Journal of Genomics, 2:1-14.
- [2] Ullah, M.W. Khattak, W.A.Ul-Islam, M. Khan, S. ve Park, J.K., (2015). "Encapsulated yeast cell-free system: a strategy for cost-effective and sustainable production of bio-ethanol in consecutive batches", Biotechnology and bioprocess engineering, 20: 561-575.
- [3] Lomedico, P.T., (1982). "Use of recombinant DNA technology to program eukaryotic cells to synthesize rat proinsulin: a rapid expression assay for cloned genes", Proceedings of the National Academy of Sciences, 79: 5798-5802.
- [4] Global Data, (2015). www.globaldata.com, 19 Kasım 2015.
- [5] Plotkin, S.A., (2001). "Immunologic correlates of protection induced by vaccination", The Pediatric Infectious Disease Journal, 20: 63-75.
- [6] Bercovich, Z., (2000). "The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: A review", Veterinary Journal, 22: 123-130.
- [7] Castaño, M.J. ve Solera, J., (2009). "Chronic brucellosis and persistence of *Brucella melitensis* DNA", Journal of Clinical Microbiology, 47: 2084-2089.
- [8] Ariza, J. Bosilkovski, M. Cascio, A. Colmenero, J.D. Corbel, M.J. Falagas, M.E. Memish, Z.A. Roushan, M.R.H. Rubinstein, E. ve Sipsas, N.V., (2007). "Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations", PLOS Medicine, 4: e317.
- [9] Ebel, E.D. Williams, M.S. ve Tomlinson, S.M., (2008). "Estimating herd prevalence of bovine brucellosis in 46 USA states using slaughter surveillance", Preventive Veterinary Medicine, 85: 295-316.
- [10] Yang, X. Skyberg, J.A. Cao, L. Clapp, B. Thornburg, T. ve Pascual, D.W., (2013). "Progress in Brucella vaccine development", Frontiers in biology, 8: 60-77.
- [11] Robinson, A. ve Melling, J., (1993). "Envelope structure and the development of new vaccines", Journal of Applied Bacteriology, 74: 43-51.
- [12] Delpino, M.V. Estein, S.M. Fossati, C.A. Baldi, P.C. ve Cassataro, J., (2007). "Vaccination with Brucella recombinant DnaK and SurA proteins induces

- protection against *Brucella abortus* infection in BALB/c mice", *Vaccine*, 25: 6721-6729.
- [13] Jubier-Maurin, V. Boigegrain, R.A. Cloeckaert, A. Gross, A. Alvarez-Martinez, M.T. Terraza, A. Liautard, J. Köhler, S. Rouot, B. ve Dornand, J., (2001). "Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages", *Infection and immunity*, 69: 4823-4830.
- [14] Bowden, R. Cloeckaert, A. Zygmunt, M. ve Dubray, G., (1995). "Outer-membrane protein-and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*", *Journal of medical microbiology*, 43: 344-347.
- [15] Bowden, R. Cloeckaert, A. Zygmunt, M. ve Dubray, G., (1998). "Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*", *Journal of medical microbiology*, 47: 39-48.
- [16] Goel, D. ve Bhatnagar, R., (2012). "Intradermal immunization with outer membrane protein 25 protects Balb/c mice from virulent *B. abortus* 544", *Molecular immunology*, 51: 159-168.
- [17] Cui, B. Liu, W. Wang, X. Chen, Y. Du, Q. Zhao, X. Zhang, H. Liu, S.-L. Tong, D. ve Huang, Y., (2017). "Brucella Omp25 Upregulates miR-155, miR-21-5p, and miR-23b to Inhibit Interleukin-12 Production via Modulation of Programmed Death-1 Signaling in Human Monocyte/Macrophages", *Frontiers in Immunology*, 8: 708.
- [18] Commander, N.J. Spencer, S.A. Wren, B.W. ve MacMillan, A.P., (2007). "The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes", *Vaccine*, 25: 43-54.
- [19] Jackson, D.A. Symons, R.H. ve Berg, P., (1972). "Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69: 2904-2909.
- [20] Ullah, M.W. Khattak, W.A. Ul-Islam, M. Khan, S. ve Park, J.K., (2014). "Bio-ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation using an encapsulated reconstituted cell-free enzyme system", *Biochemical engineering journal*, 91: 110-119.
- [21] Khattak, W.A. Ul-Islam, M. Ullah, M.W. Yu, B. Khan, S. ve Park, J.K., (2014). "Yeast cell-free enzyme system for bio-ethanol production at elevated temperatures", *Process Biochemistry*, 49: 357-364.
- [22] Khattak, W.A. Ullah, M.W. Ul-Islam, M. Khan, S. Kim, M. Kim, Y. ve Park, J.K., (2014). "Developmental strategies and regulation of cell-free enzyme system for ethanol production: a molecular prospective", *Applied microbiology and biotechnology*, 98: 9561-9578.
- [23] Vajo, Z. Fawcett, J. ve Duckworth, W.C., (2001). "Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes: insulin analogs", *Endocrine reviews*, 22: 706-717.

- [24] Cutting, G.R., (2005). "Modifier genetics: cystic fibrosis", *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 6: 237-260.
- [25] Weatherall, D., (2001). "Phenotype—genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias", *Nature reviews genetics*, 2: 245-255.
- [26] Assenberg, R. Wan, P.T. Geisse, S. ve Mayr, L.M., (2013). "Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research", *Current opinion in structural biology*, 23: 393-402.
- [27] Ada, G., (2005). "Overview of vaccines and vaccination", *Molecular Biotechnology*, 29: 255-271.
- [28] Robinson, H.L. ve Amara, R.R., (2005). "T cell vaccines for microbial infections", 11: 25-32.
- [29] Nascimento, I. and Leite, L.C., (2012). "Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45: 1102-1111.
- [30] Sette, A. ve Rappuoli, R.J.I., (2010). "Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics", *Immunity*, 33: 530-541.
- [31] Cardoso, F.C. Pacifico, R.N. Mortara, R.A. Oliveira, S.C., (2006). "Human antibody responses of patients living in endemic areas for schistosomiasis to the tegumental protein Sm29 identified through genomic studies", *Clinical & Experimental Immunology*, 144: 382-391.
- [32] Wolff, J.A. Malone, R.W. Williams, P. Chong, W. Acsadi, G. Jani, A. ve Felgner, P.L., (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo", *Science*, 247: 1465-1468.
- [33] Ulmer, J.B. Donnelly, J.J. Parker, S.E. Rhodes, G.H. Felgner, P.L. Dwarki, V. Gromkowski, S.H. Deck, R.R. Dewitt, C.M. ve Friedman, A.J.S., (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein", *Science*, 259: 1745-1749.
- [34] Oliveira, S. Rosinha, G. De-Brito, C. Fonseca, C. Afonso, R. Costa, M. Goes, A. Rech, E. and Azevedo, V., (1999). "Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32: 207-214.
- [35] De, S., (2016). *Basic Concept of Recombinant DNA Technology*: Createspace Independent Publishing Platform.
- [36] Schurig, G.G. Roop II, R.M. Bagchi, T. Boyle, S. Buhrman, D. ve Sriranganathan, N., (1991). "Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*", *Veterinary microbiology*, 28: 171-188.
- [37] Inoue, H. Nojima, H. ve Okayama, H., (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids", *Gene*, 96: 23-28.
- [38] Kaufman, R.J., (2000). "Overview of vector design for mammalian gene expression", *Molecular biotechnology*, 16: 151-160.
- [39] Ish-Horowicz, D. ve Burke, J., (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning", *Nucleic Acids Research*, 9: 2989-2998.

- [40] Brown, W.R. Mee, P.J. ve Shen, M.H., (2000). "Artificial chromosomes: ideal vectors?", Trends in biotechnology, 18: 218-223.
- [41] Bell, C.E. ve Lewis, M., (2000). "A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator", Nature Structural and Molecular Biology, 7: 209-214.
- [42] Daber, R. Stayrook, S. Rosenberg, A. ve Lewis, M., (2007). "Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors", Journal of molecular biology, 370: 609-619.
- [43] Sørensen, H.P. ve Mortensen, K.K., (2005). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*", Journal of biotechnology, 115: 113-128.
- [44] Baneyx, F., (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*", Current opinion in biotechnology, 10: 411-421.
- [45] Jonasson, P. Liljeqvist, S. Nygren, P.A. ve Ståhl, S., (2002). "Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*", Biotechnology and applied biochemistry, 35: 91-105.
- [46] Froger, A. ve Hall, J.E., (2007). "Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method", Journal of Visualized Experiments, 6: e253.
- [47] Chan, W.T. Verma, C.S. Lane, D.P. ve Gan, S.K., (2013). "A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*", 33: e00086.
- [48] Garrett, R.A., (2000). The ribosome: structure, function, antibiotics, and cellular interactions: American Society for Microbiology.
- [49] Mullis, K.B., (1990). "Recombinant DNA technology and molecular cloning", Scientific American, 262: 181-231.
- [50] Miller, J.H., (1978). "The lacI gene: its role in lac operon control and its use as a genetic system", Cold Spring Harbor Monograph Archive, 31-88.
- [51] Jacob, F. ve Monod, J., (1961). "On the regulation of gene activity", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 26: 193-211.
- [52] Walker, D., (2007). Solving problems in bacterial protein expression, <https://www.kent.ac.uk/bio/seminars/FIREBio/NovogenMerck.pdf>, 19 Kasım 2018.
- [53] Hoffmann, A. ve Roeder, R., (1991). "Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies", 19: 6337-6338.
- [54] Bornhorst, J.A. ve Falke, J.J., (2000). "Purification of proteins using polyhistidine affinity tags", Methods in Enzymology, 326: 245-254.
- [55] Rigaut, G. Shevchenko, A. Rutz, B. Wilm, M. Mann, M. ve Séraphin, B., (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration", 17: 1030-1032.
- [56] Cuatrecasas, P., (1970). "Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads", Journal of Biological Chemistry, 245: 3059-3065.

- [57] Porath, J. Carlsson, J. Olsson, I. ve Belfrage, G., (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation", *Nature*, 258: 598-599.
- [58] Nielsen, K., (1990). *Animal Brucellosis*: CRC Press.
- [59] Adıgüzel, B., (2001). "Erzurum'a Bağlı Köylerden Toplanan Süt Ürünlerinde *Brucella abortus* antikorlarının ELISA ile Araştırılması", Doktora, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- [60] Pappas, G. Papadimitriou, P. Akritidis, N. Christou, L. ve Tsianos, E.V., (2006). "The new global map of human brucellosis", *The Lancet Infectious Diseases*, 6: 91-99.
- [61] Godfroid, J. Cloeckert, A. Liautard, J.P. Kohler, S. Fretin, D. Walravens, K. Garin-Bastuji, B. ve Letesson, J.J., (2005). "From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis", 36: 313-326.
- [62] Arasoğlu, T. Güllüce, M. Özkan, H. Adıgüzel, A. ve Şahin, F., (2013). "PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey", *Turkish Journal of Medical Sciences*, 43: 501-508.
- [63] Xavier, M. Paixão, T. Poester, F. Lage, A. ve Santos, R.L., (2009). "Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*", *Journal of Comparative Pathology*, 140: 149-157.
- [64] Silva, T.M. Paixão, T.A. Costa, É.A. Xavier, M.N. Sá, J.C. Moustacas, V.S. den Hartigh, A.B. Neta, A.V.C. Oliveira, S.C. ve Tsois, R., (2011). "Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice", *Infection and Immunity*, 79: 1706-1717.
- [65] Varasada, R.N., (2003). Seroprevalence of brucellosis in cattle, buffalo and human being in central Gujarat, Doktora, Anand Agricultural University, Anand, Gujarat, India.
- [66] Enright, F.M., (1990). *Animal Brucellosis*: CRC Press
- [67] Gorvel, J.P. ve Moreno, E., (2002). "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication", *Veterinary Microbiology*, 90: 281-297.
- [68] Payne, J.M., (1959). "The pathogenesis of experimental brucellosis in the pregnant cow", *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 78: 447-463.
- [69] Commander, N. ve Spencer, S., (2014). *Brucellosis DNA vaccine*, Google Patents.
- [70] Corbel, M.J., (1997). "Brucellosis: an overview", *Emerging infectious diseases*, 3: 213-221.
- [71] Garrido-Abellan, F. Duran-Ferrer, M. Macmillan, A. Minas, A. Nicoletti, P. ve Vecchi, G., (2001). "Brucellosis in sheep and goats (*Brucella melitensis*)", Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.
- [72] Whatmore, A.M. Shankster, S.J. Perrett, L.L. Murphy, T.J. Brew, S.D. Thirlwall, R.E. Cutler, S.J. ve MacMillan, A.P., (2006). "Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp", *Journal of clinical microbiology*, 44: 1982-1993.

- [73] Whitman, W.B., Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria: Wiley Online Library.
- [74] Güllüce, M., (1993). Kars ve çevresinde, sığırlarda, *B. abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçlarının karşılaştırılması, Doktora tezi, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars.
- [75] Weckesser, J. ve Mayer, H., (1988). "Different lipid A types in lipopolysaccharides of phototrophic and related non-phototrophic bacteria", FEMS microbiology reviews, 4: 143-153.
- [76] Bowser, D. Wheat, R. Foster, J. ve Leong, D., (1974). "Occurrence of quinovosamine in lipopolysaccharides of *Brucella* species", Infection and immunity, 9: 772-774.
- [77] Bundle, D. Cherwonogrodzky, J. Gidney, M. Meikle, P. Perry, M. ve Peters, T., (1989). "Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides", Infection and immunity, 57: 2829-2836.
- [78] Dubray, G., (1976). "Localisation cellulaire des polysides des bacteries des genres *Brucella* et *Escherichia* en phase lisse (S) ou rugueuse (R)", Annales de microbiologie, 127: 133-149.
- [79] Cardoso, P.G., (2006). "*Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system", Microbial Cell Factories, 5: 13.
- [80] Kreutzer, D.L. Scheffel, J.W. Draper, L. ve Robertson, D.C., (1977). "Mitogenic activity of cell wall components from smooth and rough strains of *Brucella abortus*", Infection and immunity, 15: 842-845.
- [81] Cloeckaert, A. Vizcaíno, N. Paquet, J.Y. Bowden, R.A. ve Elzer, P.H., (2002). "Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future", Veterinary microbiology, 90: 229-247.
- [82] Caro-Hernández, P. Fernández-Lago, L. de Miguel, M.J. Martín-Martín, A.I. Cloeckaert, A. Grilló, M.-J. ve Vizcaíno, N., (2007). "Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*", Infection and immunity, 75: 4050-4061.
- [83] Allen, C.A. Adams, L.G. ve Ficht, T.A. (1998). "Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival", Infection and immunity, 66: 1008-1016.
- [84] Douglas, J.T. Rosenberg, E. Nikaido, H. Verstrete, D. ve Winter, A., (1984). "Porins of *Brucella* species", Infection and immunity, 44: 16-21.
- [85] Ackermann, M.R. Cheville, N. ve Deyoe, B.L., (1988). "Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19", Veterinary Pathology, 25: 28-35.
- [86] Campbell, G. Adams, L. ve Sowa, B.A., (1994). "Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis", Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 295-306.

- [87] Harmon, B. Adams, L. ve Frey, M., (1988). "Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages", American Journal of Veterinary Research, 49: 1092-1097.
- [88] Gross, A. Terraza, A. Ouahrani-Bettache, S. Liautard, J.P. ve Dornand, J., (2000). "In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells", Infection and immunity, 68: 342-351.
- [89] Pizarro-Cerdá, J. Méresse, S. Parton, R.G. van der Goot, G. Sola-Landa, A. Lopez-Goñi, I. Moreno, E. ve Gorvel, J.-P., (1998). "*Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes", Infection and immunity, 66: 5711-5724.
- [90] Köhler, S. Foulongne, V. Ouahrani-Bettache, S. Bourg, G. Teyssier, J. Ramuz, M. ve Liautard, J.P., (2002). "The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell", Proceedings of the National Academy of Sciences, 99: 15711-15716.
- [91] Meyer, M., (1976). "Evolution and taxonomy in the genus *Brucella*: steroid hormone induction of filterable forms with altered characteristics after reversion", American journal of veterinary research, 37: 207-210.
- [92] Barquero-Calvo, E. Mora-Cartín, R. Arce-Gorvel, V. Juana, L. Chacón-Díaz, C. Chaves-Olarte, E. Guzmán-Verri, C. Buret, A.G. Gorvel, J.-P. ve Moreno, E., (2015). "*Brucella abortus* induces the premature death of human neutrophils through the action of its lipopolysaccharide", PLoS pathogens, 11: e1004853.
- [93] Miraglia, M.C. Rodriguez, A.M. Barrionuevo, P. Rodriguez, J. Kim, K.S. Dennis, V.A. Delpino, M. ve Giambartolomei, G.H., (2018). "*Brucella abortus* traverses brain microvascular endothelial cells using infected monocytes as a Trojan horse", Frontiers in cellular and infection microbiology, 8: 200.
- [94] Sola-Landa, A. Pizarro-Cerdá, J. Grilló, M.J. Moreno, E. Moriyón, I. Blasco, J.M. Gorvel, J.P. ve López-Goñi, I., (1998). "A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence", Molecular Microbiology, 29: 125-138.
- [95] Lopez-Goni, I. Guzman-Verri, C. Manterola, L. Sola-Landa, A. Moriyon, I. ve Moreno, E., (2002). "Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS", Veterinary Microbiology, 90: 329-339.
- [96] Eze, M.O., et al, (2000). "Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro", Infection and immunity, 68 (1): 257-263.
- [97] Zhan, Y. ve Cheers, C., (1993). "Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection", Infection and immunity, 61: 4899-4901.
- [98] Baldwin, C.L. ve Goenka, R., (2006). "Host Immune Responses to the Intracellular Bacteria *Brucella*: Does the Bacteria Instruct the Host to Facilitate Chronic Infection?", Critical Reviews™ in Immunology, 26: 407-442.
- [99] Yingst, S. ve Hoover, D.L., (2003). "T Cell Immunity to Brucellosis", Critical Reviews in Microbiology, 29: 313-331.

- [100] Zhan, Y. ve Cheers, C., (1995). "Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection", *Infection and immunity*, 63: 1387-1390.
- [101] Murphy, E.A. Parent, M. Sathiyaseelan, J. Jiang, X. ve Baldwin, C.L., (2001). "Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 32: 85-88.
- [102] Skendros, P. Pappas, G. ve Boura, P., (2011). "Cell-mediated immunity in human brucellosis", *Microbes and Infection*, 13: 134-142.
- [103] Bellaire, B.H. Roop, R.M. ve Cardelli, J.A., (2005). "Opsonized Virulent *Brucella abortus* Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, LAMP-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes", *Infection and immunity*, 73: 3702-3713.
- [104] Goenka, R. Parent, M.A. Elzer, P.H. ve Baldwin, C.L., (2011). "B Cell-deficient Mice Display Markedly Enhanced Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus*", *The Journal of Infectious Diseases*, 203: 1136-1146.
- [105] Avila-Calderón, E.D. Lopez-Merino, A. Sriranganathan, N. Boyle, S.M. ve Contreras-Rodríguez, A., (2013). "A history of the development of *Brucella* vaccines", *BioMed Research International*, 2013: 743509.
- [106] Treanor, J.J. Johnson, J.S. Wallen, R.L. Cilles, S. Crowley, P.H. Cox, J.J. Maehr, D.S. White, P. ve Plumb, G.E., (2010). "Vaccination strategies for managing brucellosis in Yellowstone bison", *Vaccine*, 28: F64-F72.
- [107] Galindo, R.C. Muñoz, P.M. De Miguel, M.J. Marin, C.M. Labairu, J. Revilla, M. Blasco, J.M. Gortazar, C. ve De la Fuente, J., (2010). "Gene expression changes in spleens of the wildlife reservoir species, Eurasian wild boar (*Sus scrofa*), naturally infected with *Brucella suis* biovar 2", *Journal of Genetics and Genomics*, 37: 725-736.
- [108] Olsen, S., (2010). "Brucellosis in the United States: role and significance of wildlife reservoirs", *Vaccine*, 28: F73-F76.
- [109] Hall, W.H., (1990). "Modern chemotherapy for brucellosis in humans", *Reviews of infectious diseases*, 12: 1060-1099.
- [110] Memish, Z. Mah, M.W. Al Mahmoud, S. Al Shaalan, M. ve Khan, M.Y., (2000). "Brucella bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients", *Journal of infection*, 40: 59-63.
- [111] Pappas, G. Panagopoulou, P. Christou, L. ve Akritidis, N., (2006). "Biological weapons", *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 63: 2229-2236.
- [112] Valderas, M.W. ve Barrow, W.W., (2007). "Establishment of a method for evaluating intracellular antibiotic efficacy in *Brucella abortus*-infected Mono Mac 6 monocytes", *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61: 128-134.
- [113] Audic, S. Lescot, M. Claverie, J.M. ve Scholz, H.C., (2009). "*Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen", *BMC genomics*, 10: 352.
- [114] Bäckhed, F. Normark, S. Schweda, E.K. Oscarson, S. ve Richter-Dahlfors, A., (2003). "Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications", *Microbes and infection*, 5: 1057-1063.

- [115] Haag, A.F. Myka, K.K. Arnold, M.F. Caro-Hernández, P. ve Ferguson, G.P., (2010). "Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1, 2-glucans in *Brucella*-mammalian infections", *International journal of microbiology*, 2010: 124509.
- [116] Dueñas, A.I. Orduña, A. Crespo, M.S. ve García-Rodríguez, C., (2004). "Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp. LPS", *International immunology*, 16: 1467-1475.
- [117] De Tejada, G.M. Pizarro-Cerda, J. Moreno, E. ve Moriyon, I., (1995). "The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides", *Infection and immunity*, 63: 3054-3061.
- [118] Barrionuevo, P. Delpino, M.V. Velásquez, L.N. Samartino, C.G. Coria, L.M. Ibañez, A.E. Rodríguez, M.E. Cassataro, J. ve Giambartolomei, G.H., (2011). "*Brucella abortus* inhibits IFN- γ -induced Fc γ RI expression and Fc γ RI-restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages", *Microbes and infection*, 13: 239-250.
- [119] Conde-Alvarez, R. Grilló, M.J. Salcedo, S.P. De Miguel, M.J. Fugier, E. Gorvel, J.P. Moriyón, I. ve Iriarte, M., (2006). "Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*", *Cellular microbiology*, 8: 1322-1335.
- [120] Arellano-Reynoso, B. Lapaque, N. Salcedo, S. Briones, G. Ciocchini, A.E. Ugalde, R. Moreno, E. Moriyón, I. ve Gorvel, J.-P., (2005). "Cyclic β -1, 2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival", *Nature immunology*, 6: 618.
- [121] Corbel, M. Alton, G. ve Banai, M., (2006). *Brucellosis in humans and animals: World Health Organization & World Organisation for Animal Health*.
- [122] Olsen, S., (2013). "Recent developments in livestock and wildlife brucellosis vaccination", *Revue scientifique et technique*, 32: 207-217.
- [123] Graves, R., (1943). "The story of John M. Buck's and Matilda's contribution to the cattle industry", *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 102: 193-195.
- [124] Sangari, F.J. ve Agüero, J., (1994). "Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus", *Vaccine*, 12: 435-438.
- [125] Sangari, F.J. García-Lobo, J.M. ve Agüero, J., (1994). "The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes", *FEMS microbiology letters*, 121: 337-342.
- [126] Crasta, O.R. Folkerts, O. Fei, Z. Mane, S.P. Evans, C. Martino-Catt, S. Bricker, B. Yu, G. Du, L. ve Sobral, B.W., (2008). "Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes", *PLoS One*, 3: e2193.
- [127] Mukherjee, F. Jain, J. Grilló, M.J. Blasco, J.M. ve Nair, M., (2005). "Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccine strains by bacteriological tests, molecular analysis of ery loci and virulence in BALB/c mice", *Biologicals*, 33: 153-160.

- [128] Wallach, J. Ferrero, M. Victoria Delpino, M. Fossati, C. ve Baldi, P., (2008). "Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina", *Clinical Microbiology and Infection*, 14: 805-807.
- [129] Cassataro, J. Estein, S.M. Pasquevich, K.A. Velikovskiy, C.A. de la Barrera, S. Bowden, R. Fossati, C.A. ve Giambartolomei, G.H., (2005). "Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27-amino-acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *Brucella melitensis* infection", *Infection and immunity*, 73: 8079-8088.
- [130] Smith, L.D. ve Ficht, T.A., (1990). "Pathogenesis of brucella", *Critical reviews in microbiology*, 17: 209-230.
- [131] Spink, W.W. Hall III, J.W. Finstad, J. ve Mallet, E., (1962). "Immunization with viable *Brucella* organisms: results of a safety test in humans", *Bulletin of the World Health Organization*, 26: 409-419.
- [132] Ashford, D.A. Di Pietra, J. Lingappa, J. Woods, C. Noll, H. Neville, B. Weyant, R. Bragg, S.L. Spiegel, R.A. ve Tappero, J., (2004). "Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51", *Vaccine*, 22: 3435-3439.
- [133] Trant, C.G. Lacerda, T.L. Carvalho, N.B. Azevedo, V. Rosinha, G.M. Salcedo, S.P. Gorvel, J.-P. ve Oliveira, S.C., (2010). "The *Brucella abortus* phosphoglycerate kinase mutant is highly attenuated and induces protection superior to that of vaccine strain 19 in immunocompromised and immunocompetent mice", *Infection and immunity*, 78: 2283-2291.
- [134] Elberg, S.S. ve Faunce Jr, K., (1957). "Immunization against brucella infection VI. *Brucella melitensis*: Immunity Conferred on Goats by a Nondependent Mutant from a Streptomycin-Dependent Mutant Strain of 1", *Journal of bacteriology*, 73: 211-217.
- [135] Alton, G., (1966). "Duration of the immunity produced in goats by the rev 1 *Brucella melitensis* vaccine", *Journal of Comparative Pathology*, 76: 242-253
- [136] Banai, M., (2002). "Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations", *Veterinary microbiology*, 90: 497-519.
- [137] Fensterbank, R. ve Marly, J., (1982). "Efficacy of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams", *Annales de recherches veterinaires*, 13: 185-190.
- [138] Montaraz, J. ve Winter, A., (1986). "Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice", *Infection and immunity*, 53: 245-251.
- [139] Winter, A. ve Rowe, G., (1988). "Comparative immune responses to native cell envelope antigens and the hot sodium dodecyl sulfate insoluble fraction (PG) of *Brucella abortus* in cattle and mice", *Veterinary immunology and immunopathology*, 18: 149-163.
- [140] Sterne, M. Trim, G. ve Broughton, E., (1971). "Immunisation of laboratory animals and cattle with non-agglutinogenic extracts of *Brucella abortus* strain 45/20", *Journal of medical microbiology*, 4: 185-194.

- [141] Dzata, G. Confer, A. ve Wyckoff III, J., (1991). "The effects of adjuvants on immune responses in cattle injected with a *Brucella abortus* soluble antigen", *Veterinary microbiology*, 29: 27-48.
- [142] Pugh, G. ve Tabatabai, L.B., (1996). "Variation of *Brucella abortus* 2308 infection in BALB/c mice induced by prior vaccination with salt-extractable periplasmic proteins from *Brucella abortus* 19", *Infection and immunity*, 64: 548-556.
- [143] Stevens, M.G. Tabatabai, L.B. Olsen, S.C. ve Cheville, N.F., (1994). "Immune responses to superoxide dismutase and synthetic peptides of superoxide dismutase in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or RB51", *Veterinary microbiology*, 41: 383-389.
- [144] Tabatabai, L. Pugh, J.G. Stevens, M. Phillips, M. ve McDonald, T., (1992). "Monophosphoryl lipid A-induced immune enhancement of *Brucella abortus* salt-extractable protein and lipopolysaccharide vaccines in BALB/c mice", *American journal of veterinary research*, 53: 1900-1907.
- [145] Tabatabai, L.B. ve Pugh Jr, G.W., (1994). "Modulation of immune responses in Balb/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine", *Vaccine*, 12: 919-924.
- [146] Yang, X. Hudson, M. Walters, N. Bargatze, R.F. ve Pascual, D.W., (2005). "Selection of protective epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination", *Infection and immunity*, 73: 7297-7303.
- [147] Pasquevich, K.A. Estein, S.M. Samartino, C.G. Zwerdling, A. Coria, L.M. Barrionuevo, P. Fossati, C.A. Giambartolomei, G.H. ve Cassataro, J., (2009). "Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection", *Infection and immunity*, 77: 436-445.
- [148] Kaushik, P. Singh, D.K. Kumar, S.V. Tiwari, A.K. Shukla, G. Dayal, S. ve Chaudhuri, P., (2010). "Protection of mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with recombinant OMP28 adjuvanted with CpG oligonucleotides", *Veterinary research communications*, 34: 119-132.
- [149] Al-Mariri, A. Tibor, A. Mertens, P. De Bolle, X. Michel, P. Godefroid, J. Walravens, K. ve Letesson, J.J., (2001). "Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant", *Infection and immunity*, 69: 4816-4822.
- [150] Yang, Y. Yin, J. Guo, D. Lang, X. ve Wang, X., (2011). "Immunization of mice with recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase protein confers protection against *Brucella melitensis* infection", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 61: 159-167.
- [151] Cloeckert, A. Verger, J.M. Grayon, M. Zygmunt, M.S. ve Grepinet, O., (1996). "Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene", *Infection and immunity*, 64: 2047-2055.

- [152] Billard, E. Dornand, J. ve Gross, A., (2007). "*Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion", *Infection and immunity*, 75: 4980-4989.
- [153] Edmonds, M.D. Cloeckaert, A. Booth, N.J. Fulton, W.T. Hagijs, S.D. Walker, J.V. ve Elzer, P.H., (2001). "Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle", *American journal of veterinary research*, 62: 1461-1466.
- [154] Moriyón, I. ve López-Goñi, I., (1998). "Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*", *International Microbiology*, 1: 19-26.
- [155] Manchester, K.L., (1995). "Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids", *Biotechniques*, 19: 208-210.
- [156] Invitrogen, (2010). Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits: MAN0000214.
- [157] Kumar, S. Stecher, G. Li, M. Knyaz, C. Tamura, K., (2018). "MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms", *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547–1549.
- [158] Intron Biotechnology, (2018). SMART™ BCA Protein Assay Kit: 21071.
- [159] Yousefi, S. Tahmoorespur, M. ve Sekhavati, M.H., (2016). "Cloning, expression and molecular analysis of Iranian *Brucella melitensis* Omp25 gene for designing a subunit vaccine", *Research in pharmaceutical sciences*, 11: 412.
- [160] Seleem, M.N. Boyle, S.M. ve Sriranganathan, N., (2010). "Brucellosis: a re-emerging zoonosis", *Veterinary microbiology*, 140: 392-398.
- [161] Ahmed, I.M. Khairani-Bejo, S. Hassan, L. Bahaman, A.R. ve Omar, A.R., (2015). "Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay", *BMC veterinary research*, 11: 275.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tuğba ATABEY
Doğum Tarihi ve Yeri : 23.02.1993, İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : atabeytugba@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Üniversitesi	2016
Lise	Fen Bilimleri	Beyoğlu Anadolu Lisesi	2011

YAYINLARI

Makale

- Ferguson, J. P. Huber, S. D. Willy, N. M. Aygün, E. Goker, S. Atabey, T. ve Kural, C., (2017), “Mechanoregulation of clathrin-mediated endocytosis”, *Journal of Cell Science*, 130: 3631-3636.

Bildiri

- Atabey T., Trabzonlu K., Ordu E., Güllüce M. ve Arasoğlu T., (2018), “In Silico analysis of Omp19 (outer membrane protein) and M23/M37 family peptidase of *Brucella abortus* to identify the potential T cell epitopes”, XV FISV Congress, 18-21 Eylül 2018, Roma.
- Atabey T., Gür G.K., Ordu E., Üstündağ E.A., Güllüce M. ve Arasoğlu T., (2018), “Cloning and Molecular Analysis of Endemic *Brucella abortus* Omp25 Gene”, 4th International Congress on Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018, Eskişehir.
- Trabzonlu K., Atabey T. ve Arasoğlu T., (2018), “Optimization and Follow Up of Cultivation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*”, 4th International Congress on Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018, Eskişehir.
- Moshfeghi E., Atabey T., Findikli N. ve Arasoğlu T., (2018) “Optimization of PCR Method for Simultaneous Detection of Common Mitochondrial DNA Mutations in Human Semen Samples”, 4th International Congress on Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018, Eskişehir.
- Gümüş B., Acar T., Atabey T., Mansuroglu B., Derman S. ve Arasoğlu T., (2018), “Examination of the Antibiofilm Activity of Juglone-PLGA Nanoparticles”, 4th International Congress on Applied Biological Sciences, 3-5 Mayıs 2018, Eskişehir.
- Kadayıfçı M.Ş., Topuzoğulları M., Gökçaya D., Atabey T. ve Arasoğlu T. (2017), “Core-crosslinked Block Copolymer Micelles for Antibacterial Applications”, ANCON, 5-7 Ekim 2017, Ankara.

Proje

- Brusellozis’e Karşı Endemik Rekombinant Omp25 Proteinin Üretimi- TÜBİTAK 1005 Projesi, Bursiyer
- PLGA Enkapsüle Juglon Nanopartiküllerinin Antibiyofilm Aktivitesinin İncelenmesi- NAP Projesi, Araştırmacı