

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGÜN BİR IŞIK KONTROLLÜ T7-PROMOTORU-GFP İFADE SİSTEMİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE GFP İFADESİNİN İNCELENMESİ

Ege SOYDEMİR

Danışman Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN

Ağustos

2019

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ege Soydemir

İmzası

## ONAY

Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin danışmanlığında Ege Soydemir tarafından hazırlanan bu çalışma 05/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Erkan Yurtçu

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ÖZGÜN BİR IŞIK KONTROLLÜ T7 PROMOTORU-GFP İFADE SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE GFP İFADESİNİN İNCELENMESİ

Ege SOYDEMİR

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN

Mikrobiyal biyoteknolojinin önemli alanlarından biri sentetik biyoloji ve genetik mühendisliği araçları kullanılarak mikrobiyal hücre fabrikaları ile rekombinant protein üretimidir. Sentetik biyoloji araçları birçok vektör ve genetik devreyi içermektedir. Bu çalışmada pDawT ve pATG adı verilen iki farklı genetik mühendisliği aracı olan vektör üretilmiş ve test edilmiştir. Bu iki vektör aynı mikrobiyal hücre içerisine ko-transforme edilip pDawT+pATG genetik devresi tamamlanmıştır. pDawT plazmidinden T7 RNA polimeraz enzimi ~400nm uzun dalga UV ışığı indüklenmesi ile üretilmekte ve üretilen T7 RNA polimeraz, pATG plazmidi üzerinde bulunan  $P_{T7}$  promotorundan, bu promotorun kontrol ettiği genin transkripsiyonunu başlatmaktadır. Bu çalışmada *E. coli* DH5 $\alpha$  bakterisinde,  $P_{T7}$  kontrolünde EGFP üretilmiş ve hücreler FITC filtresinde floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Görüntülenen hücrelerin RGB ve HSV piksel yoğunluğu ve dağılımı analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Üretilen pDawT+pATG genetik devresi ile birçok farklı bakteri veya mayada kullanılabilecek özgün bir optokontrollü rekombinant protein üretim aracı üretilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Rekombinant protein, genetik devre, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , mikrobiyal hücre fabrikaları, T7 RNA polimeraz, T7 promotoru pDawn, EGFP, SLiCE klonlama, sentetik biyoloji

## ABSTRACT

MSc Thesis

### DEVELOPMENT OF A NOVEL OPTO-REGULATED T7 PROMOTER-GFP EXPRESSION SYSTEM AND INVESTIGATION OF GFP EXPRESSION

Ege SOYDEMİR

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Evren Doruk ENGİN

Recombinant protein production with microbial cell factories using synthetic biology and genetic engineering is one of the hot topics of microbial biotechnology. Many vectors and genetic circuits are used as synthetic biology tools. In this thesis study, we have produced plasmids pDawT and pATG as two different genetic engineering tools for recombinant protein production. pDawT+pATG genetic circuit is completed by co-transforming these plasmids into microbial cell factories. pDawT component of this genetic circuit is responsible for transcription of T7 RNA Polymerase gene by inducing with ~400nm long range UV. The produced T7 RNA polymerase enzyme then initiates the transcription of EGFP from P<sub>T7</sub> promoter of the second component of the genetic circuit, pATG plasmid. In this thesis study we produced EGFP with pDawT+pATG genetic circuit in *E. coli* DH5 $\alpha$  and visualized the cells under fluorescent microscopy via FITC filter. After imaging of the cells, the images' RGB and HSV pixel density and distribution are analyzed and compared. With the produced pDawT+pATG genetic circuit, a novel opto-regulated recombinant protein production tool is produced that can be used widely.

**Keywords:** Recombinant proteins, genetic circuit, microbial cell factories, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , T7 RNA polymerase, T7 promoter, pDawn, EGFP, SLiCE cloning, synthetic biology

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans kariyerimde bana daima destek olan, kendimi akademik olarak birçok projede ve tezimde geliştirmemi sağlayan, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk Engin'e,

Tez aşamam sürecinde çalışmaya başladığım ve bana bu süreçte destek olan ve bu çalışma için zamanımı verimli kullanmama olanak sağlayan Başkent Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Bölümü, Bölüm Başkanı Prof. Dr. Özlem Darcansoy İşeri'ye,

Eğitim öğrenim hayatım boyunca sıfır noktasından şu anda bulunduğum noktaya kadar gelmemde en büyük destekçim olan, çok sevgili, babam Selim Soydemir ve annem Ayşe Pervin Soydemir'e, hayatım boyunca bana rol model olan abim Cem Soydemir'e ve çok sevgili eşi Ceren Tan Soydemir'e ve bu tezin yazım tarihinden sadece üç ay önce dünyaya gelmiş ve her hareketi beni mutlu eden biricik yeğenim Can Soydemir'e,

Ve teşekkür etmeye kelimelerimin yetmeyeceği, en zor ve yoğun günlerim dahil her anımda yanımda olan ve daima olacağından emin olduğum Aylin Dedeoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Ege Soydemir

Ankara 2019

## İÇİNDEKİLER

|   |                    |
|---|--------------------|
| <b><u>ETİK BEYAN</u></b> .....  | <b><u>i</u></b>    |
| <b><u>ÖZET</u></b> .....  | <b><u>iii</u></b>  |
| <b><u>ABSTRACT</u></b> .....  | <b><u>iv</u></b>   |
| <b><u>TEŞEKKÜR</u></b> .....  | <b><u>v</u></b>    |
| <b><u>ŞEKİLLER DİZİNİ</u></b> .....   | <b><u>ix</u></b>   |
| <b><u>ÇİZELGELER DİZİNİ</u></b> .....   | <b><u>xiv</u></b>  |
| <b><u>SİMGELER DİZİNİ</u></b> .....   | <b><u>xvii</u></b> |
| <b><u>1. GİRİŞ</u></b> .....  | <b><u>1</u></b>    |
| <b><u>2. KURAMSAL TEMELLER</u></b> .....  | <b><u>2</u></b>    |
| <b>2.1. BAKTERİLERDE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ</b> .....                          | <b>2</b>           |
| 2.1.1. REKOMBİNANT PROTEİNLER .....   | 2                  |
| 2.1.2. MİKROBİYAL HÜCRE FABRİKALARI .....   | 3                  |
| 2.1.3. GENETİK DEVRELER VE BİLEŞENLERİ .....  | 4                  |
| <b>2.2. MOLEKÜLER KLONLAMA VE REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİLERİ</b> 10                  |                    |
| 2.2.1. SLİCE KLONLAMA .....   | 12                 |
| <b>2.3. DENEY TASARIMI</b> .....  | <b>14</b>          |
| 2.3.1. T7 RNA POLİMERAZ GENİ .....  | 14                 |
| 2.3.2. YEŞİL FLORESAN PROTEİN (EGFP) GENİ .....                                     | 14                 |
| 2.3.3. ÜRETİLEN VEKTÖRLER .....   | 15                 |
| 2.3.4. <i>ESCHERİCHIA COLI</i> DH5A TRANSFORMASYONLARI VE KOLONİ PCR İLE KONTROLLER |                    |
| 18  |                    |
| 2.3.5. ~400NM UZUN DALGA ULTRAVİYOLE IŞIK İLE İNDÜKSİYON SİSTEMİNİN TASARIMI        | 19                 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.6. ~400NM UZUN DALGA UV IŞIK İLE EGFP ÜRETİMİ VE KONTROLÜ.....              | 19        |
| <b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>   | <b>24</b> |
| <b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>  | <b>25</b> |
| <b>4.1. MATERYAL .....</b>  | <b>25</b> |
| 4.1.1. KULLANILAN BAKTERİ SUŞLARI.....  | 25        |
| 4.1.2. KULLANILAN VEKTÖRLER .....   | 26        |
| 4.1.3. BAKTERİ BESİYERLERİ.....   | 29        |
| 4.1.4. BİYOKÜTLE TESPİTİ .....  | 30        |
| 4.1.5. POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ .....   | 30        |
| 4.1.6. DNA VE PLAZMİD İZOLASYONU / SAFLAŞTIRMASI .....                          | 32        |
| 4.1.7. İZOLE EDİLEN VE SAFLAŞTIRILAN VEKTÖRLERİN LİNEERİZASYONU .....           | 33        |
| 4.1.8. INSERT VE VEKTÖR DNA ANALİZİ .....                                       | 33        |
| 4.1.9. SLİCE LİZATI HAZIRLAMA.....  | 34        |
| 4.1.10. SLİCE KLONLAMA .....  | 34        |
| 4.1.11. ~400NM UZUN DALGA UV SİSTEMİ HAZIRLANIŞI VE GFP ÜRETİMİ .....           | 34        |
| 4.1.12. pDAWT VE PATG PLAZMİDLERİ İLE GFP ÜRETİMİNİN TESPİTİ .....              | 35        |
| <b>4.2. YÖNTEM.....</b>   | <b>38</b> |
| 4.2.1. MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLER.....  | 39        |
| 4.2.2. GENETİK DEVRENİN OLUŞTURULMASI .....                                     | 40        |
| 4.2.3. ~400NM UZUN DALGA UV FERMENTÖR SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI .....            | 52        |
| 4.2.4. ~400NM UZUN DALGA UV İLE EGFP ÜRETİMİ VE GENETİK DEVRENİN KONTROLÜ<br>55 |           |
| 4.2.5. GÖRÜNTÜ ANALİZİ .....  | 60        |
| <b><u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>                                       | <b>61</b> |



|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>5.1. GENETİK DEVRENİN OLUŞTURULMASI.....</b>  | <b>61</b>         |
| 5.1.1. INSERT DNA’LARIN ÜRETİMİ VE HAZIRLANMASI.....   | 61                |
| 5.1.2. VEKTÖRLERİN HAZIRLANMASI .....  | 63                |
| 5.1.3. SLİCE İLE GENETİK DEVRENİN TAMAMLANMASI .....   | 66                |
| <b>5.2. EGFP ÜRETİMİ VE ANALİZİ .....</b>  | <b>69</b>         |
| 5.2.1. ÜREME EĞRİLERİ .....  | 69                |
| 5.2.2. BRADFORD ANALİZİ .....  | 70                |
| 5.2.3. SDS PAGE.....   | 72                |
| 5.2.4. HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ VE ANALİZİ .....  | 74                |
| <b><u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>  | <b><u>100</u></b> |
| 6.1. TARTIŞMA.....   | 100               |
| 6.2. SONUÇ.....  | 105               |
| <b><u>KAYNAKLAR.....</u></b>   | <b><u>107</u></b> |
| <b><u>EKLER .....</u></b>  | <b><u>116</u></b> |
| <b>EK-1 KULLANILAN MAKİNE TEÇHİZAT LİSTESİ .....</b>   | <b>116</b>        |
| <b>EK-2 OPENS CAD İLE 3D BASILAN PARÇALARIN KODLARI.....</b>   | <b>116</b>        |
| <b>EK-3 ARDUİNO IDE’DE YAZILAN ~400NM UZUN DALGA UV FERMENTÖR SİSTEMİNİN ÇALIŞMASI İÇİN GEREKLİ KOD.....</b> | <b>119</b>        |
| <b>EK-4 COMPUTER VİSİON 2 KÜTÜPHANESİ İLE PYTHON DİLİNDE JUPYTERLAB’DA YAZILAN HSV ANALİZ YAZILIMI .....</b> | <b>120</b>        |
| <b><u>ÖZGEÇMİŞ .....</u></b>   | <b><u>120</u></b> |
| <b><u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>   | <b><u>126</u></b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Örnek genetik anahtar çalışma prensipleri. İndükleyici moleküller represörün promotoru baskılamasını inhibe ederek gen transkripsiyonunu başlatır .....  | 6  |
| Şekil 2.2. pDawn plazmidinin ışık protein üretim mekanizması. MCS, (çoklu klonlama bölgesi) .....   | 9  |
| Şekil 2.3. SLiCE klonlama temel basamakları. 1) PZT ile SLiCE primer uçlu insert DNA'nın hazırlanması ve vektör kesimi. 2) Kesilmiş vektör ve insert DNA'nın SLiCE lizati ( $\lambda$ Red Rekombinaz) ile klonlanması ..... | 13 |
| Şekil 2.4. pDawT plazmidi ve üretimi.....   | 16 |
| Şekil 2.5. pATG plazmidi ve üretimi .....   | 17 |
| Şekil 2.6. pDawT ve pATG plazmidlerinin bir aradaki çalışma prensibi .....  | 18 |
| Şekil 2.7. Bakteri üreme eğrisi ve üreme fazları. a. Lag fazı, b. Log fazı, c. Durgun faz, d. Ölüm fazı .....   | 21 |
| Şekil 4.1. pDawn plazmidi genetik haritası.....   | 26 |
| Şekil 4.2. pACYC184 plazmidi genetik haritası .....   | 27 |
| Şekil 4.3. pET28aEGFP plazmidi genetik haritası .....   | 28 |
| Şekil 4.4. pGLO plazmidi genetik haritası .....   | 29 |
| Şekil 4.5. 3D basılan (a) beher kapağı.ve (b) manyetik karıştırıcı tepsisi.....   | 53 |
| Şekil 4.6. UV fermentör sisteminin Fritzing programında çizilen devre tasarımı .....  | 54 |
| Şekil 4.7. UV fermentör sistemi (A) elektrik devresi (B) çalışırken.....  | 55 |
| Şekil 5.1. T7RNAP ve P <sub>T7</sub> +EGFP insert DNA parçalarının PZT ile üretim sonuçları, %1 agaroz jel elektroforez görüntüsü .....   | 61 |
| Şekil 5.2. Insert DNA PZT ürün saflaştırmalarının spektrofotometrik sonuçları .....   | 62 |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 5.3. pDawn ve pACYC184 plazmid izolasyonlarının spektrofotometrik analizi .....   | 63 |
| Şekil 5.4. PEG çöktürülerek saflaştırılan plazmidlerin spektrofotometrik analizi .....  | 65 |
| Şekil 5.5. pDawn SLiCE klonlama kontrolü, %1 agaroz jel elektroforezinde koloni PZT sonuçları .....   | 67 |
| Şekil 5.6. pATG SLiCE klonlama kontrolü, %1 agaroz jel elektroforezinde koloni PZT sonuçları .....  | 68 |
| Şekil 5.7. pDawT + pATG sistemi ile EGFP üreten hücrelerin üreme eğrileri.....  | 70 |
| Şekil 5.8. BSA standart eğrisi.....   | 71 |
| Şekil 5.9. Farklı kondisyonlarda üretilen EGFP örneklerinin SDS PAGE Coomassie boyama görüntüleri. Protein ladder; Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200kDa) (New England Biolabs) .....  | 73 |
| Şekil 5.10. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 20/256 UV ve 40/256 UV ışık yoğunluğunda indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pDawT + pATG hücreleri. A. 20/256 UV'de 6 saat, B. 20/256 UV'de 12 saat C. 20/256 UV'de 24 saat, D. 40/256 UV'de 6 saat, E 40/256 UV'de 12 saat, F. 40/256 UV'de 24 saat indüklenmiş hücreler.....     | 74 |
| Şekil 5.11. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 80/256 UV ve 100/256 UV ışık yoğunluğund <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pDawT + pATG hücreleri. A. 80/256 UV'de 6 saat, B. 80/256 UV'de 12 saat C. 80/256 UV'de 24 saat, D. 100/256 UV'de 6 saat, E 100/256 UV'de 12 saat, F. 100/256 UV'de 24 saat indüklenmiş hücreler.....             | 75 |
| Şekil 5.12. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen A. <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (negatif kontrol) B. İndüklenmemiş <i>E. coli</i> pDawT + pATG hücreleri .....  | 76 |
| Şekil 5.13. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 0.05mM ve 0.1mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen <i>E. coli</i> BL21-pET28aGFP hücreleri. A. 0.05mM IPTG ile 6 saat, B. 0.05mM IPTG ile 12 saat C. 0.05mM IPTG ile 24 saat, D. 0.1mM IPTG ile 6 saat, 0.1mM IPTG ile 12 saat, F. 0.1mM IPTG ile 24 saat indüklenmiş hücreler ..... | 77 |

Şekil 5.14. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 0.2mM ve 0.5mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücreleri. A. 0.2mM IPTG ile 6 saat, B. 0.2mM IPTG ile 12 saat C. 0.2mM IPTG ile 24 saat, D. 0.5mM IPTG ile 6 saat, 0.5mM IPTG ile 12 saat, F. 0.5mM IPTG ile 24 saat indüklenmiş hücreler ..... 78

Şekil 5.15. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 1.0mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücreleri. A. 1.0mM IPTG ile 6 saat, B. 1.0mM IPTG ile 12 saat C. 1.0mM IPTG ile 24 saat, indüklenen hücreler..... 79

Şekil 5.16. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 0.67mM ve 1.33mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri. A. 0.67mM arabinoz ile 6 saat, B. 0.67mM arabinoz ile 12 saat C. 0.67mM arabinoz ile 24 saat, D. 1.33mM arabinoz ile 6 saat, 1.33mM arabinoz ile 12 saat, F. 1.33mM arabinoz ile 24 saat indüklenmiş hücreler indüklenen hücreler ..... 80

Şekil 5.17. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 3.33mM ve 6.66mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri. A. 3.33mM arabinoz ile 6 saat, B. 3.33mM arabinoz ile 12 saat C. 3.33mM arabinoz ile 24 saat, D. 6.66mM arabinoz ile 6 saat, 6.66mM arabinoz ile 12 saat, F. 6.66mM arabinoz ile 24 saat indüklenmiş hücreler indüklenen hücreler ..... 81

Şekil 5.18. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 13.3mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri. A. 13.3mM arabinoz ile 6 saat, B. 13.3mM arabinoz ile 12 saat C. 13.3mM arabinoz ile 24 saat, indüklenen hücreler ..... 82

Şekil 5.19. Bütün örnek görüntülerinin tüm piksellerindeki G (yeşil) değerleri ortalamaları ..... 83

Şekil 5.20. Bütün örnek görüntülerinin tüm piksellerindeki R (kırmızı) değerleri ortalamaları ..... 83

Şekil 5.21. Bütün örnek görüntülerinin tüm piksellerindeki B (mavi) değerleri ortalamaları ..... 84

|   |    |
|---|----|
| Şekil 5.22. 20/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar.....   | 85 |
| Şekil 5.23. 40/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar.....   | 86 |
| Şekil 5.24. 80/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar.....   | 87 |
| Şekil 5.25. 100/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar.....  | 88 |
| Şekil 5.26. Sırasıyla EGFP geni ya da devreyi içermeyen boş DH5 $\alpha$ hücreleri ve pDawT-pATG genetik devresini içeren fakat UV ile indüklenmemiş BL21 hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar ..... | 89 |
| Şekil 5.27. 0.05mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar .....   | 89 |
| Şekil 5.28. 0.1mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar .....  | 90 |
| Şekil 5.29. 0.2mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar .....  | 91 |
| Şekil 5.30. 0.5mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar .....  | 91 |

|   |    |
|---|----|
| Şekil 5.31. 1.0mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar .....                    | 92 |
| Şekil 5.32. 0.67mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar .....          | 93 |
| Şekil 5.33. 1.33mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar .....          | 93 |
| Şekil 5.34. 3.33mM ve 6.66mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar..... | 94 |
| Şekil 5.35. 13.3mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar .....          | 95 |
| Şekil 5.36. Saturation-hue değerlerine göre piksel dağılımlarını gösteren 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası .....  | 96 |
| Şekil 5.37. Hue-value değerlerine göre piksel dağılımlarını gösteren 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası .....   | 97 |
| Şekil 5.38. Saturation-value değerlerine göre piksel dağılımlarını gösteren 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası.....   | 98 |
| Şekil 5.39. Saturation-value 2D histogramlarındaki dağılımlarının karşılaştırılması ve birbirlerine yakınlıklarını ortaya çıkartan dendogram.....   | 99 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 2.1. Örnek plazmidlerin, kopya sayıları, replikasyon orijinleri ve uyumsuzluk grupları. ....  | 8  |
| Çizelge 2.2. Deney grubu tasarımı, UV yoğunluğu ile zaman tablosu .....   | 20 |
| Çizelge 4.1. Besiyeri tarifleri.....  | 30 |
| Çizelge 4.2. Kullanılan primer çiftleri. (a) T7 RNA Polimeraz geni üretimi ve pDawn plazmidine klonlanması için gerekli primer çifti. (b) P <sub>T7</sub> -EGFP amplifikasyonu ve pACYC184 plazmidine klonlanması için gerekli primer çifti. (c) T7 RNA Polimeraz geni ileri primerinin SLiCE klonlama için gerekli olan pDawn plazmidini pR promotörünün aşağı bölgesine homolog dizi. (d) T7 RNA polimeraz geni geri primerinin SLiCE klonlama için gerekli olan pDawn plazmidini çoklu klonlama bölgesi sonu C-terminus bölgesine homolog dizi. (e) P <sub>T7</sub> -EGFP dizisinin pACYC184 plazmidini kloramfenikol (CAT) kasetinin promotör bölgesinin başına homolog dizi. (f) P <sub>T7</sub> -EGFP dizisinin pACYC184 plazmidini kloramfenikol (CAT) kasetinin sonuna homolog dizi. .... | 31 |
| Çizelge 4.3. Alkalin lizis I, II ve III çözeltileri için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.....   | 32 |
| Çizelge 4.4. Silika filtre ile DNA saflaştırması için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.....  | 33 |
| Çizelge 4.5. Agaroz jel elektroforez deneyleri için gerekli olan elektroforez tamponu tarifi .....  | 34 |
| Çizelge 4.6. Bakteriden total protein izolasyonu için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.....  | 35 |
| Çizelge 4.7. Protein saflaştırma protokollerinde kullanılan bağlanma ve elüsyon tamponları çözeltileri ve stok konsantrasyonları. ....  | 36 |
| Çizelge 4.8. Bradford testi için kullanılan Bradford ayırıcı çözeltileri ve stok konsantrasyonları.....   | 36 |

|  |    |
|--|----|
| Çizelge 4.9. SDS PAGE deneylerinde hazırlanan jeller için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.....   | 37 |
| Çizelge 4.10. Örnek yükleme tamponu (Laemmlı tamponu) tarifi (60).....   | 37 |
| Çizelge 4.11. SDS PAGE elektroforez tamponu tarifi. ....   | 37 |
| Çizelge 4.12. SDS PAGE sonucunda elde edilen jellerin coomassie boyama ile boyanması için gerekli olan çözeltiler ve tarifleri. ....   | 38 |
| Çizelge 4.13. T7RNAP amplifikasyonu ve pDawn vektörüne klonlanma için tasarlanan primer çifti. ....  | 41 |
| Çizelge 4.14. T7RNAP geni amplifikasyonu için gerekli olan PZT karışımı konsantrasyonları.....   | 41 |
| Çizelge 4.15. T7RNAP geninin amplifikasyonu için gerekli olan PZT sıcaklıkları ve döngüleri.....   | 42 |
| Çizelge 4.16. P <sub>T7</sub> +EGFP amplifikasyonu için tasarlanan primer çifti.....   | 42 |
| Çizelge 4.17. P <sub>T7</sub> +EGFP bölgesi amplifikasyonu için gerekli PZT karışımı konsantrasyonları .....   | 43 |
| Çizelge 4.18. P <sub>T7</sub> +EGFP bölgesi amplifikasyonu için gerekli olan PZT sıcaklıkları ve döngüleri.....  | 43 |
| Çizelge 4.19. Klonlama kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZT'nin karışımları ve çözeltilerin konsantrasyonları.....  | 50 |
| Çizelge 4.20. Klonlama kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZT'nin sıcaklıkları ve döngüleri.....  | 51 |
| Çizelge 4.21. Bradford testinde kullanılan 96 kuyucuklu plakaya örnek yükleme düzeni ve örnek miktarları. A, B, C sıralarında BSA, D sırasında 20/256UV, E sırasında 40/256UV, F sırasında 80/256UV, G sırasında 100/256UV yoğunluğunda çalışılan deney grupları, H1, H2, H3 kuyularında indüklenmemiş, H7-H12 kuyuları arasında ise referans olarak |    |



|  |    |
|--|----|
| saflaştırılan EGFP örnekleri bulunmaktadır. H4, H5 ve H6 kuyularında ise blank hesaplaması için örnek eklenmemiştir..... | 59 |
| Çizelge 5.1. Bradford analizi için hazırlanan 96-kuyulu plaka düzeni ve 595nm’de alınmiş sonuçlar.....                   | 70 |
| Çizelge 5.2. İşlenmemiş Bradford testi sonuçları, örneklerin miktarları ve konsantasyon değerleri.....                   | 72 |



## SİMGELER DİZİNİ

|                    |   |
|--------------------|---|
| g                  | Gram  |
| L                  | Litre   |
| M                  | Molar   |
| mg                 | Miligram  |
| mL                 | Mililitre   |
| mM                 | Milimolar   |
| µg                 | Mikrogram   |
| µl                 | Mikrolitre  |
| µM                 | Mikromolar  |
| nm                 | Nanometre   |
| bp                 | Baz çifti   |
| CHCl <sub>3</sub>  | Kloroform   |
| NaCl               | Sodyum Klorür   |
| ddH <sub>2</sub> O | Çift distile su   |
| s                  | Saniye  |
| dk                 | Dakika  |
| h                  | Saat  |
| U                  | Ünite   |
| DMSO               | Dimetil sülfoksit   |
| DNA                | Deoksiribonükleik asit  |
| <i>E. coli</i>     | <i>Escherichia coli</i>   |
| IPTG               | İzopropil β-D-tiyogalaktopiranosit                                      |
| P <sub>T7</sub>    | T7 Promotoru  |
| EGFP               | Enhanced Green Fluorescent Protein (Arttırılmış Yeşil Floresan Protein) |

|          |   |
|----------|---|
| DSBR     | Double strand break (Çift zincir kırığı)                                  |
| SDS      | Sodyum dedosil sülfat   |
| SLICE    | Seamless Ligation Cloning Extract   |
| UV       | Ultra-violet (Mor ötesi)  |
| W        | Watt  |
| RGB      | Red Green Blue (Kırmızı Yeşil Mavi)                                       |
| HSV      | Hue Saturation Value (Renk özü, Doğunluk, Parlaklık)                      |
| CRISPR   | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats                 |
| PEG      | Poli etilen glikol  |
| FITC     | Florosein izotiyosiyanat  |
| BSA      | Bovin serum albumin   |
| PZT      | Polimeraz zincir tepkimesi  |
| CHO      | Chinese hamster ovarian hücreleri   |
| ORI      | Replikasyon orijini   |
| TSS      | Transformation and storage solution (transformasyon ve saklama çözeltisi) |
| OD       | Optical density (optik yoğunluk)  |
| $\Delta$ | Delta   |
| $\alpha$ | Alpha   |
| ™        | Trade Mark  |

## 1. GİRİŞ

Mikrobiyal hücre fabrikaları, yüksek dozlarda rekombinant proteinler ya da çeşitli bileşiklerin üretilmesinde, genetik mühendisliği ve sentetik biyoloji ile modifiye edilerek kullanılan hücrelerdir. Bu amaçla kullanılan hücreler arasında en yaygın olarak kullanılan mikrobiyal hücre, hakkında en fazla bilgiye sahip olunan *E. coli*'dir. Aynı zamanda, *E. coli*, ilk olarak rekombinant protein üretimi sağlanan bakteridir. Goeddel ve arkadaşları tarafından 1978 yılında pBR322 plazmidi omurgası kullanılarak bir mikrobiyal hücrede ilk olarak rekombinant protein üretimi sağlanmıştır, üretilen bu rekombinant protein günümüzde hala kullanılan insan insülinidir (1). *E. coli* gibi birçok farklı hücrenin rekombinant protein üretiminde kullanımının denenmesinin yanı sıra, birçok genetik devre de rekombinant protein üretimindeki verimin artırılması için geliştirilmiştir. Genetik devreler plazmidler veya hücrelerin kromozomal DNA'ları üzerinde tasarlanabilmektedir. Plazmid veya kromozomal DNA üzerinden hedeflenen proteinlerin üretimi için, arabinoz, IPTG/laktoz gibi moleküller kontrolünde üretim sağlayan operonlar gibi farklı birçok mekanizma kullanılarak genetik devrelerin temel mekanizmaları ortaya çıkartılır. 2011 yılında Andreas Möglich tarafından tasarlanan pDawn plazmidi bu genetik devrelerden biri olmakta olup, ~470nm mavi ışık kontrolünde hedeflenen genin üretimini sağlamaktadır (2).

Protein üretiminde en yaygın olarak kullanılan suşlardan biri olan *E. coli* BL21(DE3) suşu, kromozomal DNA'sında T7 RNA polimeraz geni içermektedir ve bu sayede T7 promotörü ( $P_{T7}$ ) kontrolündeki üretim plazmidleri kullanılabilir. Bu çalışmada T7 RNA polimeraz genini kromozomal DNA'sında bulundurmeyen *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu ~400nm ultraviyole ışık kontrolünde T7 RNA polimeraz üreten bir plazmid (pDawT) ve  $P_{T7}$  kontrolünde EGFP üretimi sağlayan başka bir plazmid (pATG) olmak üzere özgün olarak tasarlanan iki plazmidli bir genetik devre ile transforme edilmiştir. Bu sayede, kromozomal DNA'sında T7 RNA polimeraz geni barındırmayan yani protein üretiminde geleneksel olarak kullanılmayan bakterilerde  $P_{T7}$  ile protein üretimi yapılabilen iki basamaktan oluşan bir genetik devre tasarlanmıştır. Bu çalışmada sonuç olarak, oluşturulan iki plazmidli pDawT & pATG genetik devresinin *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerinde EGFP proteininin üretim verimi floresan mikroskop altında görüntülenerek, piksel yoğunluğu ve dağılımı, RGB ve HSV değerleri ölçülerek analiz edilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. BAKTERİLERDE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

#### 2.1.1. REKOMBİNANT PROTEİNLER

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen proteinlere rekombinant proteinler denmektedir. Günümüzde yüzden fazla rekombinant protein terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (3). Bunun dışında üretilen rekombinant proteinler sayesinde çeşitli canlı biyosensörler (rekombinant bakteri hücreleri) de üretilmektedir (4).

1972 yılında Jackson, Symons ve Berg, rekombinant DNA oluşturmak için bakteri restriksiyon enzimi olan *EcoRI* ve DNA ligaz kullanarak restriksiyon endonükleazlar ile rekombinasyonun ilk adımını atmıştır (5). 1973 yılında ise Cohen, Chang ve Boyer, tekrar restriksiyon endonükleazlarını ve DNA ligazı temel alarak bir “fonksiyonel” bir rekombinant DNA üretmiştir. Üretilen bu rekombinant DNA, bir plazmid ve bir antibiyotik direnç geninin birleştirilmesi ile oluşturulmuş ve bir *E. coli* suşuna aktarılmıştır, sonuç olarak ise bu bakterilerin aktarılan antibiyotik direnç genini üretebildiği yani oluşturulan rekombinant DNA'nın fonksiyonel olduğu bulunmuştur (6). Bu çalışmaların sonucu olarak rekombinant DNA teknolojisi ile hedeflenen genlerin, dolayısıyla rekombinant proteinlerin de üretilebileceği ortaya çıkmıştır (7).

Bakterilerde FDA tarafından kabul edilmiş ilk rekombinant protein üretimi de bu sürecin hemen sonrasında gerçekleştirilmiştir. David Goeddel ve Genetech firmasındaki iş arkadaşları, 1978 yılında pBR322 plazmidine insan insülin A ve B proteinlerini ayrı ayrı klonlamış ve *E. coli* bakterisinde bu plazmid üzerinden insan insülini rekombinant proteini üretmiştir (1). Günümüzde birçok başka rekombinant protein de ilaç olarak kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak tekrar *E. coli*'de üretilen insülin reseptörü olan insülin glarjin ve *Chinese hamster ovarian* (CHO) hücre hattında üretilen insan monoklonal antikoru olan adalimumab verilebilir (8,9).

Rekombinant proteinlerinin üretimi için ökaryot ve prokaryot hücreler üretilen proteinlerin yapısı, karmaşık katlanma düzenleri gibi konulara bağlı olarak hücre fabrikaları olarak kullanılmaktadır.

### 2.1.2. MİKROBİYAL HÜCRE FABRİKALARI

CHO gibi memeli hücreleri antikorlar gibi protein katlanması için ökaryotik sistemlere ihtiyaç duyan kompleks proteinler için kullanılmakta iken, daha az katlanma ihtiyacı duyan proteinler ise mikrobiyal hücrelerde üretilmektedir. *E. coli* bakterisi ve *saccharomyces cerevisiae* mayası gibi hücreler konvansiyonel mikrobiyal hücre fabrikalarına örnek olarak verilebilir.

*E. coli*, rekombinant protein üretiminde her zaman en çok çalışılan hücre olmuş ve dolayısıyla hakkında en çok bilgi bilinen organizmalardan biri olmuştur. Hakkında bilinen bilgiler ile ise rekombinant protein üretimi için kullanılan en yaygın hücre olmaya devam etmektedir (10).

#### **Escherichia coli**

*E. coli*, *homo sapiens*'ten sonra hakkında en çok bilgiye sahip olunan ve en çok çalışılan organizmadır (11). Gram-negatif, çubuk şeklinde ve spor üretmeyen bir bakteri olan *E. coli*, insan gibi sıcak kanlı ve bazı sürüngenlerin gastrointestinal florası dahil dünyada birçok yerde bulunmaktadır (12,13). *E. coli* birçok diğer bakteri gibi birçok suşa sahiptir, bu suşlardan bir kısmı patojen olup bir kısmının patojen olmadığı gibi, bir kısmı da biyoteknoloji alanında fazlasıyla kullanılmaktadır. Bazı *E. coli*, suşları protein üretiminde daha yaygın olarak kullanılırken (örneğin *E. coli* BL21), bazı *E. coli* suşları ise transformasyon için verimli ve tasarlanan vektörlerin korunarak çoğaltılması için yaygın olarak kullanılmaktadır (örneğin *E. coli* DH5 $\alpha$ ) (11).

#### **Escherichia coli DH5 $\alpha$**

*E. coli* DH5 $\alpha$ , 1983 yılında D. Hanahan tarafından bakteri hücrelerinin transformasyonunda plazmidlerin korunması için kullandığı *E. coli* DH1 suşunu geliştirdiği bir *E. coli* suşudur (14). DH5 $\alpha$  suşu, DH1 suşunun *deoR481* mutasyonuna,  $\Delta(lacZYA-argF)U169$  delesyonuna ve  $\Phi80dlacZ\Delta M15$  eklemesine sahip olan bir transformasyon suşudur (strain DB). DH1 ise

1968 yılında Meselson ve Yuan'ın ürettiği *E. coli* MM294 suşunun *recA*<sup>-</sup> ve *gyrA*<sup>-</sup> mutasyonlarına uğratarak üretilmiştir (14). *recA*<sup>-</sup> ve *gyrA*<sup>-</sup> mutasyonları bu DH1 hücrelerinin DNA tamir mekanizmasına doğrudan etki etmekte ve bu bakteri hücrelerinde plazmid stabilitesini arttırmaktadır (15,16). DH5α suşunda DH1 hücrelerinden farklı olarak bulunan *deoR481* mutasyonu ise DH5α hücrelerine tek karbon kaynağı olarak inozin bulunan minimal besi yerlerinde de üreme özelliğini sağlamaktadır (17,18). Tüm bu mutasyonlar ile DH5α günümüzde hala, transforme edilen plazmidin korunması ve transformasyon gibi hücreleri zorlayıcı durumlara sokan deneylere dayanıklılığı gibi özellikleri ile konvansiyonel olarak en verimli transformasyon suşlarından biri olarak kullanılmaktadır.

### **Escherichia coli BL21(DE3)**

*E. coli* BL21(DE3), 4,557,508 baz çiftlik bir adet halkasal kromozomu bulundurmaktadır (19). DE3 profajı BL21 genomunda λ bağlanma bölgesine bağlanmıştır. DE3 profajının BL21 genomuna kendini entegre etmesi ile BL21(DE3) suşu, *lacUV5* promotörü kontrolünde T7 RNA polimerazının üretimini sağlamaktadır. BL21(DE3) suşunun ürettiği T7 RNA polimeraz enzimi, *E. coli* RNA polimerazından yaklaşık 5-8 kat daha hızlı RNA üretmektedir (20–22). *lacUV5* promotörü ise IPTG veya laktöz molekülleri ile indüklenmektedir. (19,23).

Bu sebeplerle *E. coli* BL21 bakteri suşu IPTG/laktöz ile indüklenerek, P<sub>T7</sub> kontrolünde gen ifade eden plazmidler (örneğin, pET28a) ile rekombinant protein üretimi için tercih edilmektedir.

### **2.1.3. GENETİK DEVRELER VE BİLEŞENLERİ**

Organizmalar için sentetik genetik devreler, genetik transformasyon, seçici belirteçler, vektörler, farklı promotörler ve çeşitli klonlama yöntemleri gibi ileri moleküler biyoloji teknikleri gibi genetik araçlar ve yöntemler ile oluşturulabilmektedir (24). Genetik devrelerin üretiminde kullanılan araçlar hücresel düzenlemede kullanılan araçlardır. Hücresel düzenleme araçları ise hücre DNA'larında kodlu, promotörler, represörler, osilatörler gibi düzenleyici motiflerdir (25). Bu araçlar ile, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar gibi gen aktiviteleri hücre içi ya da dışı sinyaller tarafından düzenlenebilmektedir (24). Biyomolekül üretimleri, metabolik aktivite mühendisliği,

fermentasyon gibi alanlarda hücresel düzenleme araçları hali hazırda kullanılmakta ve bu araçlar genetik devrelere entegre edilerek gen ifadeleri laboratuvar koşullarında kontrol edilebilmektedir (26).

Hücrelerde her gen her zaman ifade edilmemektedir, gen ifadesi birçok epigenetik ve/veya genetik mekanizmalar ile kontrol edilmektedir, bu mekanizmalar ile bir genin ifade edilmesine o genin “açık” olması, bir genin ifade edilmemesine ise o genin “kapalı” olması denmektedir (27). Genlerin açık veya kapalı durumda bulunması bir tıpkı elektrik devrelerindeki gibi bir anahtar ile sağlanmaktadır. Durum elektrik devresi değil canlı sistemler ise bu anahtara “genetik anahtar” denmektedir. Sentetik genetik devreler, genetik anahtarlar kullanılarak üretilmektedir ve hücrelerin belirli bir amaca yönelik modifikasyonu için kullanılmaktadır.

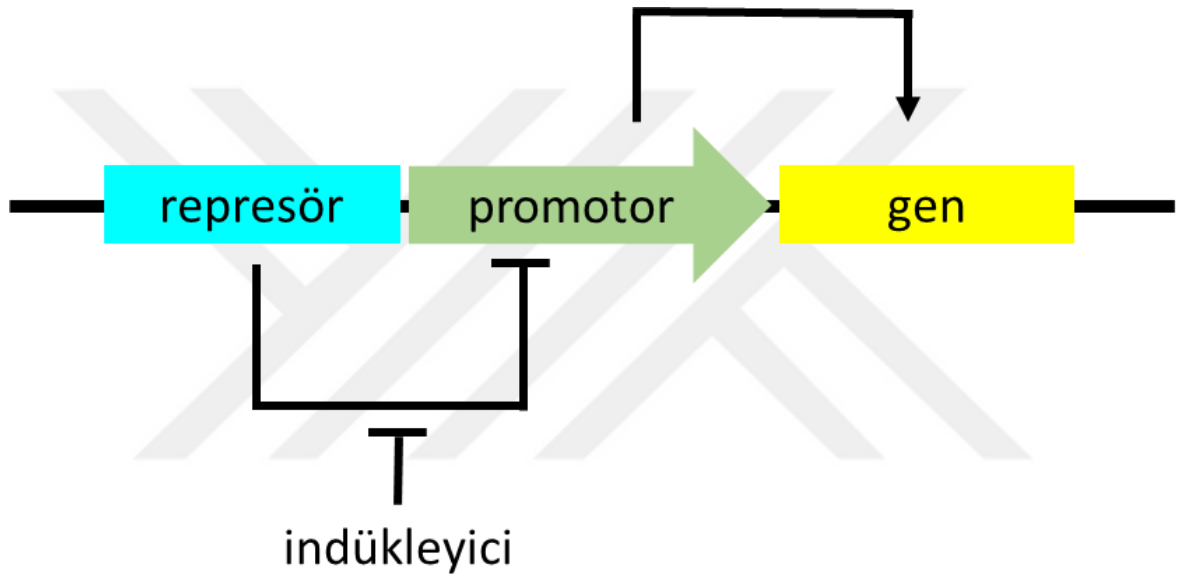
Birçok genetik devre anahtar olarak, kimyasal indükleyici moleküllere cevap veren doğal sistemlerden adapte edilmiş bu moleküllerle indüklenebilen promotorları kullanmaktadır (28). Genetik devreler, transkripsiyonel regülasyon, DNA rekombinasyonu ve transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel regülasyonların bir birleşimi gibi çok çeşitli mekanizmalar kullanır (29–32). Bu tez çalışmasında, transkripsiyonel bir genetik devre üretilmiş ve çalışılmıştır. Transkripsiyonel devreler DNA üzerindeki RNA polimeraz (RNAP) akışını değiştirerek işler. Sentetik devre oluşturulmasında temel alınan, bahsedilen akışı etkileyen birden fazla regülatör bulunur. Örnek olarak, akışı arttırmak veya azaltmak için DNA bağlayıcı proteinler RNAP’yi etkinleştirir veya bloke eder.

Üretilen sentetik genetik devreler sayesinde, hücrelerin ifade etmesi hedeflenen genlerin regülasyonu sentetik olarak sağlanabilmektedir yani hücreler programlanabilmektedir. Programlanan hücreler ilaç üretimi, bioremediasyon, hücrelerin terapötik ajanlar olarak kullanılması, yeni kimyasalların keşfi gibi birçok farklı alana etki edebilmektedir (33).

Sentetik genetik devrelerin elemanları birçok farklı açıdan ele alınarak seçilmeli ve tasarlanmalıdır. Öncelikle bir arada bir denge içerisinde çalışacak genetik devre elemanları seçilmelidir (promotorlar, regülatör proteinler, transkripsiyon faktörleri vb.) Hedeflenen genetik devrelerin, dolayısıyla hücrelerin ve üretilecek proteinin veriminin modellenmesi için işlemsel biyoloji gibi alanlar devreye girmektedir (33). Fakat canlı sistemlerin modellenmesi günümüzde hala işlemsel biyoloji araçlarının yetersizliği sebebi ile zorlu



aşamalara sahiptir (34). Genetik devrelerde kullanılan anahtar mekanizmalarına IPTG/laktoz, arabinoz gibi moleküllerle indüklenen promotorlar örnek verilebilirken, aynı zamanda bu tez çalışmasında kullanılan ışık ile indüklenen promotorlar da bulunmaktadır. (2,35). İndüklenme işlemleri genellikle represörler yardımı ile gerçekleşmektedir. İndüksiyon molekülü ortamda bulunmadığı sürece bir represör üretilmesi istenen geni kontrol eden proteini baskılamaktadır. İndüksiyon molekülleri ise promotorun baskılanmasını inhibe eder ve anahtar kapanarak protein üretimi başlar. Bu anahtarlar sayesinde gen ifadesi istenilen anda başlatılabilmektedir. Genetik anahtarlar mantığı Şekil 2.1.'de açıklanmıştır.



Şekil 2.1. Örnek genetik anahtar çalışma prensipleri. İndükleyici moleküller represörün promotoru baskılamasını inhibe ederek gen transkripsiyonunu başlatır

Sentetik genetik devrelerin üretimi esnasında sahip olması gereken diğer bir eleman ise devrenin verimliliğini test etmek amaçlı gerekli olan floresan proteinler gibi raporcu moleküllerdir. Bu moleküller sayesinde genetik devrenin üretim verimi florometri gibi yöntemler ile ölçülebilir. Fakat floresan proteinlerin degradasyonu sistemin floresan cevabının tespitini sınırlandırabilir. Bu nedenle, floresan proteinlerin tespiti için genetik devreden yüksek bir geri bildirim alınması, yani floresan protein üretiminin yüksek seviyede olması gerekmektedir. (33)

Bahsedilen sentetik genetik devre elemanlarının seçimi tamamlandıktan sonra sentetik genetik devrelerin oluşturulmasında ve sürdürülebilirliğinde çeşitli zorlayıcı faktörler

bulunmaktadır. Sentetik genetik devrelerin içinde bulunduğu ortamın özellikleri gibi başka birçok etmen, bu devreleri doğrudan ya da dolaylı olarak etkilemektedir. Sentetik genetik devrelerin bulunduğu ortam bu durumda hücrel içerik ve çevresel içerik olarak iki ana konuda ele alınabilir.

### **Vektör Antibiyotik Direnci**

Sentetik genetik devreler genellikle vektörler üzerinde tasarlanıp üretilmelidir. Bunun başlıca sebepleri, vektör modifikasyonunun teknik olarak kromozomal modifikasyonlardan daha kolay olması ve tekrar teknik olarak modifiye edilen hücrelerin seçiliminin daha kolay olmasıdır. *In vitro* olarak modifiye edilen bu vektörler, daha sonrasında hücrelere aktarılır (transformasyon). Daha sonra bu hücreler besiyeri bulunan antibiyotikli plaklara ekilerek, üreme sağlanır, sonuç olarak ise sadece içinde antibiyotik direnç kaseti bulunduran vektörlerin bulunduğu hücreler üreyebilir ve bu hücrelerden seçim yapılabilir.

Çift vektör kullanılan transformasyonlarda, kolonilerin seçimi için iki farklı antibiyotik kasetine sahip plazmidler seçilmelidir. Böylece iki farklı antibiyotikli besi yerinde ancak üreme gerçekleşebilecektir.

Aynı zamanda vektörlerin antibiyotik direncine sahip olması hücreleri, o plazmidleri yaşamak için hücre içerisinde bulundurmaya ve üretmeye zorlamaktadır. Böylece plazmid segregasyonunun önüne geçilmektedir.

### **Replikasyon Orijinleri**

Replikasyon orijini, DNA'larda replikasyonun başlaması için gerekli olan replikon enzimlerinin, replikasyonu başlattığı bölgedir. Farklı replikasyon orijini bölgeleri bulunmaktadır (Çizelge 2.1.) ve farklı uyumsuzluk gruplarına üyedir. Her ori uyumsuzluk grubu, hücrel farklı replikasyon enzimlerini ve transkripsiyon faktörlerini kullanmaktadır. Bir ko-transformasyon gerçekleştirmek için seçilecek olan plazmidler, farklı uyumsuzluk gruplarına ait olan orilere sahip olan plazmidlerden seçilmelidir. Örneğin pBR322 ori'si uyumsuzluk grubu A'da bulunmakta iken, p15A ori'si uyumsuzluk grubu B'ye ait olduğundan bu iki ori'ye sahip olan iki plazmid aynı anda hücreye transforme edilerek, hücre tarafından da üretilebilmektedir. Eğer aynı uyumsuzluk grubundaki orilere sahip olan iki plazmid ile ko-transformasyon gerçekleştirilir ise, hücrenin replikasyon mekanizması iki

plazmid için de yeterli olmayacaktır. Böylece plazmidlerden biri üretilirken diğer plazmid üretilmeyecektir. (36,37)

Replikasyon orijinlerinin bir diğer önemli özelliği ise plazmidlerin kopya sayısını ayarlamalarıdır. Hedeflenen plazmid ve proteinin yüksek verimle ve sayıda üretilmesi gerekiyorsa, yüksek kopya sayısında plazmid üretebilecek ori'ye sahip plazmidler seçilmelidir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Örnek plazmidlerin, kopya sayıları, replikasyon orijinleri ve uyumsuzluk grupları.

| Vektör Adı | Kopya Sayısı | ORI    | Uyumsuzluk Grubu |
|------------|--------------|--------|------------------|
| pUC        | ~500-700     | pMB1   | A                |
| pET        | ~15-20       | pBR322 | A                |
| pACYC      | ~10          | P15a   | B                |
| pSC101     | ~5           | pSC101 | C                |
| pDawn      | Düşük Kopya  | pBR322 | A                |

### **pGLO**

Bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol genetik devrelerinden biri pGLO plazmididir. Bu plazmid arabinoz operonu (*araBAD*, *araE*, *araF*) kontrolünde EGFP gen ifadesi sağlamaktadır. Arabinoz operonu, AraC proteininin arabinoza karşı cevabı ile kontrol edilmektedir. AraC proteini kendi üretiminin ifadesini ve ara sistemindeki başka genleri de düzenlemektedir. Arabinoz varlığında AraC proteini  $P_E$ ,  $P_{FGH}$ ,  $P_{BAD}$  ve  $P_J$  promotorlarından mRNA üretimini başlatmaktadır.  $P_{BAD}$  promotor sisteminde AraC proteini arabinoz varlığında gen ifadesini başlatırken arabinoz yokluğunda ise transkripsiyonun inhibisyonundan sorumludur.  $P_C$  promotorunda kontrolünde ise *araC* geni ifade edilmektedir ve arabinoz varlığında ve yokluğunda *araC* geni baskılanır. Bu da AraC proteininin kendi ifadesini baskıladığını göstermektedir. (38–40).

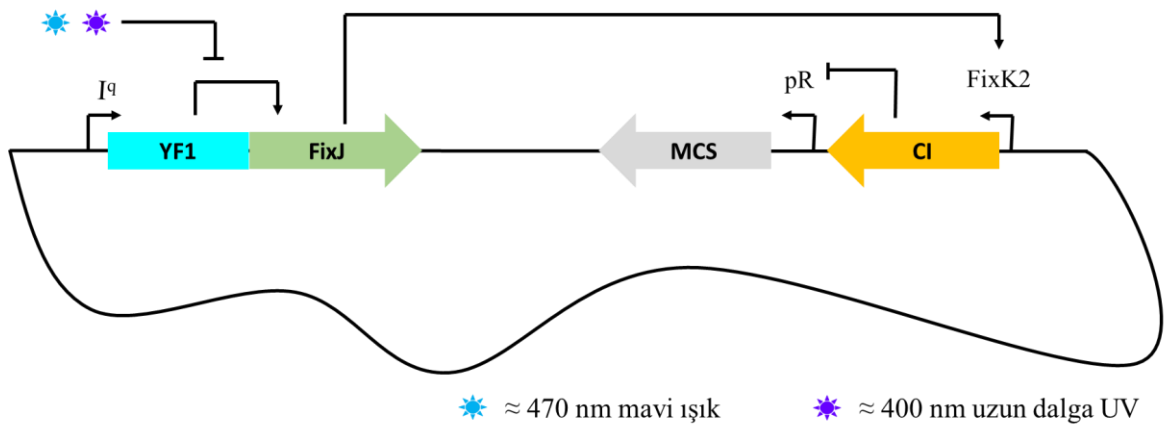
### **pDawn**

Bahsedilen genetik devrelerden bir örnek olan pDawn plazmidini, ilk olarak Andreas Möglich tarafından tasarlanan optokontrollü pDawn ve pDusk plazmidlerinden biridir. pDawn plazmidini ~470nm mavi ışık ile hedef proteinin üretimini sağlamakta iken, pDusk plazmidinde ışık yokluğunda hedef proteinin üretimi sağlanmaktadır (2).

Plazmid mekanizması beş ana bileşenden oluşmaktadır, plazmid omurgası ise bir kanamisin antibiyotik direnç kaseti ve bir pBR322 replikasyon orijinininden oluşmaktadır. Bunlar; YF1 histidin kinaz enzimi, FixJ regülatör proteini, FixK2 promotörü, cI represörü ve pR promotörüdür (2). YF1 histidin kinaz enzimi tekrar Andreas Mögliche tarafından tasarlanmış, mavi ışık ile kontrol edilebilen FixJ regülatör proteininin fosforilasyonundan sorumlu bir ışık-oksijen-voltaj (LOV, light-oxygen-voltage) mavi ışık fotosensörü alt birimi olan proteinidir (41).

Andreas Mögliche *Bradyrhizobium japonicum* bakterisinin oksijen hassas histidin kinaz proteini olan FixL proteininin kemosenör alt birimini, *Bacillus subtilis* bakterisinin sahip olduğu YtvA proteininin LOV mavi ışık sensörü görevi gören alt birimi ile değiştirerek pDawn plazmidinde kullanılan YF1 histidin kinaz enzimini oluşturmuştur. (41,42).

~470nm mavi ışık yokluğunda YF1 enzimi FixJ regülatör proteinini fosforile etmektedir. FixJ regülatörü ise FixK2 promotöründen bir faj represörü olan cI proteinini üretmekte ve cI proteini hedefi olan pR promotörüne balanmaktadır. Hedef protein ise pR promotörü kontrolünde olduğundan, ~470nm mavi ışık yokluğunda cI represörü tarafından pR promotöründen transkripsiyon durdurulur. Mavi ışık varlığında ise YF1 enzimi FixJ'yi fosforile edemez ve dolayısıyla cI represörü üretilmeyeceğinden pR promotöründen hedef protein üretimi gerçekleşir (2).



Şekil 2.2. pDawn plazmidinin ışık protein üretim mekanizması. MCS, (çoklu klonlama bölgesi)

## pACYC184

1978 yılında Chang ve Cohen tarafından üretilen pACYC184 plazmidi, tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotik direnç kasetleri ve p15A replikasyon orijini bulundurmaktadır. Bir klonlama vektörü olarak tasarlanan bu plazmid, kloramfenikol direnç kasetinde *EcoRI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulundurduğundan kloramfenikol direncinin yok edilmesi ve buraya başka bir genin eklenmesi ile klonlamalarda kullanılabilir (43).

## 2.2. MOLEKÜLER KLONLAMA VE REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİLERİ

Moleküler klonlama iki veya daha fazla DNA parçasının birbirleri ile ligasyonuna, ve oluşan yeni DNA'nın bir hücreye aktarılmasına denmektedir. Günümüzde birçok farklı teknik ile moleküler klonlama gerçekleştirilebilmektedir ve hızlı bir şekilde yeni teknikler keşfedilmektedir. Bu çalışmada ilgilenilen moleküler klonlama yöntemlerinde ise vektör ve insert (eklenecek DNA parçası) olmak üzere iki DNA molekülü birbiri ile birleştirilmektedir.

Herhangi bir türün bir DNA sekansı veya genin seklüzyonu ve bu sekansın orijinal DNA sekansında bir modifikasyon yapmadan bir vektöre aktarılması "Moleküler Klonlama" olarak bilinmektedir (44).

Konvansiyonel (geleneksel) klonlama yöntemi, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile gerçekleştirilmektedir. Her restriksiyon endonükleaz enzimi kendine özgün DNA dizilerinden DNA'nın fosfodiester bağlarını keserek DNA üzerinde yapışkan uçlar (sticky ends) veya kör uçlar (blunt ends) oluşturmaktadır. Vektörlere örneğin yapışkan uçlar kullanılarak belirli insert DNA'lar eklenmesi için, öncelikle vektör iki farklı restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilir ve 3' ve 5' uçlarına bu yapışkan uçlara tamamlayıcı DNA dizileri eklenerek PZR ile çoğaltılmış olan insert DNA ile *in vitro* ortamda DNA parçalarını birleştirmek için kullanılan DNA ligaz enzimi ile bir araya getirilir ve sonuç olarak iki DNA parçası *in vitro* ortamda birleştirilir.

Restriksiyon endonükleazları dışında günümüzde özellikle yaygın olarak kullanılan bir yöntem ise homolog rekombinasyondur. Homolog rekombinasyon, DNA molekülleri arasında genetik bilginin yer değişimini katalizleyen korunumlu bir yoldur ve çift zincir hasar onarımı (double strand break repair (DSBR)), çökmüş veya duraklamış replikasyon çatalının kurtarılması, yatay gen aktarımı ve mayoz bölünme gibi önemli hücresel

süreçlerde yer aldığı kanıtlanmıştır (45). Yatay gen transferi, bakteri türleri özelinde evrimsel olarak büyük bir rol oynamaktadır, birçok bakteri suşu bu sayede yeni özellikler kazanabilmekte ve adaptasyon sağlayabilmektedir. Bakteriler arasında ve bakteri – bakteriyofaj arasında gerçekleşen gen transferlerinde kullanılan homolog rekombinasyon mekanizmaları keşfedilip *in vitro* koşullarda tekrarlanmaya çalışılmaktadır. Başarılı olunan homolog rekombinasyon mekanizmaları, DNA parçalarının modifikasyonunda kullanılmakta ve verimli klonlama yöntemleri araştırılmaya devam edilmektedir.

Homolog rekombinasyon ile klonlama birçok farklı teknik ile uygulanabilmektedir. Bu tekniklere örnek olarak, Gateway klonlama, CRISPR-Cas9 klonlama ve SLiCE klonlama verilebilir.

Sekansa bağlı olmaksızın DNA parçalarının önceden tanımlanmış düzeni, oryantasyonu ve okuma çerçevesi sayesinde Gateway klonlama teknolojisi hatırı sayılır ölçüde gelişim sağlamıştır. *In vitro* ve *in vivo* sistemlerde ekspresyon ünitelerinin bir araya getirilmesinde büyük çoğunluk tarafından kabul görmüş bir yöntem olan Gateway klonlama teknolojisi ilk olarak Life Technologies firması tarafından geliştirilip Invitrogen™ tarafından pazarlanmıştır (44,46).

CRISPR Cas9 klonlamada Cas9, hedef DNA ile Watson-Crick baz çifti oluşumu sürecinde küçük RNA'lar tarafından yönlendirilen bir nükleazdır (47). Cas9, mevcut sistemlere kıyasla kolay bir tasarım sağlayan, yüksek hassasiyet sahip, verimli ve çok çeşitli hücre ve organizma tipi için çoklu ve yüksek çıktılı gen düzenlemesi sağlayan bir sistemi temsil eder. Hedef genom bölgesindeki bir çift zincir kırığını oluşturarak genom düzenlemesini teşvik eder (48). Cas9 ile kesilme gerçekleştirdikten sonra hedef lokus iki farklı DNA tamir yolağına girebilmektedir. Hataya açık non-homolog uç birleştirme (error prone NHEJ) veya daha hassas olan homolog yönlendirilmiş tamir (HDR pathway) yolağı tercih edilebilir. Bu yolaklar ile tamir kalıbına göre hedeflenen bölgeye ekleme ya da bölgeden delesyon gerçekleştirilebilmektedir. (49)

Bu çalışmada tüm klonlamalar Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) klonlama yöntemi kullanılarak yapılmıştır, 2.2.1. başlığında detaylı olarak açıklanmıştır.

Homolog rekombinasyon tekniği sayesinde DNA üzerindeki hedeflenen spesifik parçalar başka DNA parçaları ile değiştirilebilir ve çıkarılabilir. DNA üzerindeki spesifik bölgelerin belirlenebilmesinden dolayı, homolog rekombinasyon teknikleri ile restriksiyon endonükleaz enzimine göre daha geniş yelpazede moleküler klonlama yapılması sağlanabilmektedir.

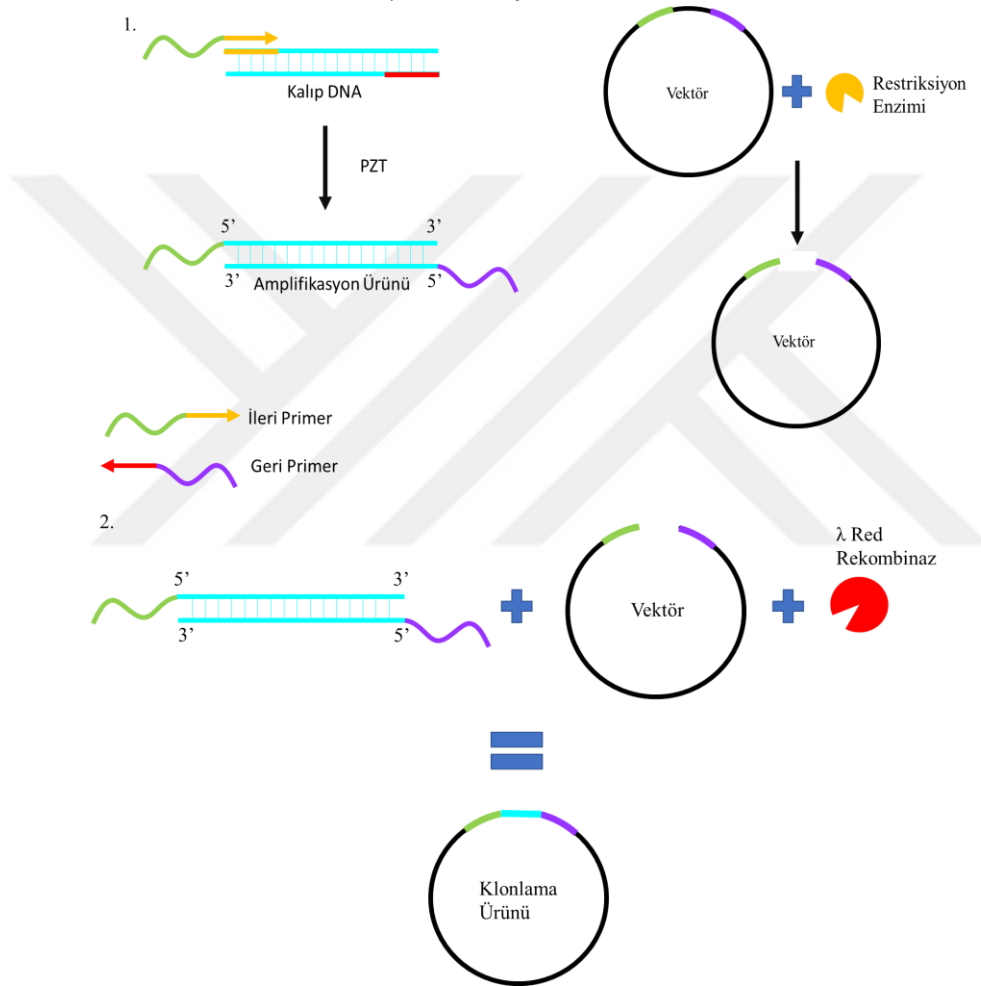
### **2.2.1. SLİCE KLONLAMA**

SLiCE (*Seamless Ligation Cloning Extract*) ile klonlama, kolay üretilen bakteri hücresi lizatlarını kullanarak tek bir *in vitro* rekombinasyon tepkimesinde birden fazla DNA parçasını birleştirerek rekombinant DNA molekülleri oluşturan özgün bir klonlama yöntemidir. Bu yöntem ile geleneksel klonlama metodlarındaki sekans kısıtlamalarının önüne geçilmektedir. SLiCE, 15-25 b'lik kısa homolog uçların rekombinasyonu ile kusursuz klonlanması ve bakteriyel sentetik kromozomlar veya başka kaynaklardan elde edilen DNA parçalarının yöne spesifik alt klonlanması için verimli bir strateji sağlamaktadır. (50,51)

SLiCE yöntemi, uçlarında, klonlanacak vektöre ya da DNA parçasına heterolog DNA dizileri içeren ya da içermeyen tek DNA parçaları, tek aşamada birden fazla DNA parçasını klonlama ya da büyük DNA parçalarının alt klonlanması gibi neredeyse her klonlama yaklaşımı yerine kullanılabilir. (51)

Temel olarak SLiCE klonlama oldukça basit ve etkili bir yöntemdir ve üç adımdan oluşmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla; lineer vektörün ve PZT ile oluşturulan uygun 3' ve 5' uzama dizilerine sahip primerleri olan homolog uçları içeren insert parçalarının hazırlanması, SLiCE *in vitro* tepkimesi ve son olarak rekombinasyon ürünlerinin uygun bakteriye standard transformasyon yöntemleri ile aktarılmasıdır (elektroporasyon veya kimyasal transformasyon) (50,51). (Şekil 2.3.)

Şekil 2.3. SLiCE klonlama temel basamakları. 1) PZT ile SLiCE primer uçlu insert DNA'nın hazırlanması ve vektör kesimi. 2) Kesilmiş vektör ve insert DNA'nın SLiCE lizatı ( $\lambda$  Red



Rekombinaz) ile klonlanması

SLiCE klonlamada, DH10B ve JM109 gibi RecA-mutantı olan *E. coli* suşlarında üretilmiş  $\lambda$ -profajı red rekombinaz sistemi kullanılmaktadır. Bunun için bu hücrelerden enzim lizatları hazırlanır ve bu lizatlar *in vitro* ortamda klonlama için kullanılır. Zhang ve arkadaşları *E. coli* homolog rekombinasyon sistemlerinden RecA'ya bağlı olmayan sisteminin SLiCE'ı katalizlediğini bulmuştur ve DH10B suşuna  $\lambda$ -profajı red rekombinaz sistemini aktararak



PPY suşunu elde etmiştir ve bu suştan elde edilen lizat ile SLiCE klonlamayı gerçekleştirmişlerdir. PPY suşundan elde edilmiş lizatlar ile en verimli SLiCE tepkimesi gerçekleştirilmiştir. (50)

### **2.3. DENEY TASARIMI**

Bu tez çalışmasındaki deney tasarımı; üretilen insert DNA parçaları (T7 RNA Polimeraz geni ve  $P_{T7}$  kontrolünde GFP geni), bu DNA parçalarının vektörlere klonlanması, oluşturulan vektörlerin *E. coli* DH5 $\alpha$  suşuna aktarılması, genetik devrenin indüksiyonu için gerekli olan ~400nm uzun dalga ultraviyole ışık sisteminin üretimi ve bu sistem ile genetik devrenin test edilmesi için yanıt yüzey yöntemi ile deney tasarımı ve deneylerin uygulanması olarak 6 ana başlığa ayrılmaktadır.

#### **2.3.1. T7 RNA POLİMERAZ GENİ**

*E. coli* RNA polimerazlarından daha hızlı çalışan T7 RNA polimeraz enzimi, 2.2.2 başlığında bahsedildiği gibi *E. coli* BL21 suşunun kromozomal DNA'sına entegre olup, pDawn plazmidine SLiCE klonlama ile aktarılması için, *E. coli* BL21 kromozomundaki T7 RNA polimeraz genini tanıyacak ve hedeflenen bölgenin homolog DNA dizileri eklenmiş, iki parçadan oluşan primer tasarımları ile PZT ile amplifiye edilmiştir. T7 RNA polimeraz geni, 2652 baz çiftlik bir gen olup, bu gen parçası 3' ve 5' uçlarında SLiCE klonlama için gerekli DNA parçaları ile amplifiye edilmiştir.

#### **2.3.2. YEŞİL FLORESAN PROTEİN (EGFP) GENİ**

Sistemdeki ikinci plazmidin oluşturulması için, pACYC184 plazmidine SLiCE klonlama ile  $P_{T7}$  kontrolünde GFP geni olarak aktarılması için, laboratuvarında daha önceden üretilmiş pET28A-GFP plazmidinden, GFP'geninin upstream'inde  $P_{T7}$  olacak şekilde üretilecek primerler ile PZT uygulanmıştır. Bu primerler aynı zamanda amplifiye edilen bölgenin 5' ve 3' uçlarında pACYC184 plazmidinde hedeflenen bölgeye bağlanacak homolog DNA dizisi kuyrukları ile  $P_{T7}$ -GFP amplifiye edilmesini sağlamaktadır. pET28a-GFP, plazmidinde kullanılan GFP doğal tip GFP olmayıp EGFP (enhanced GFP), yani yükseltilmiş GFP proteindir. EGFP geni ise 720 baz çiftinden oluşmaktadır. Fakat eklenen insert DNA tekrar pET28a-GFP plazmidinde bulunan lacI represör bölgesi ile amplifiye edilmiştir. Bu sayede

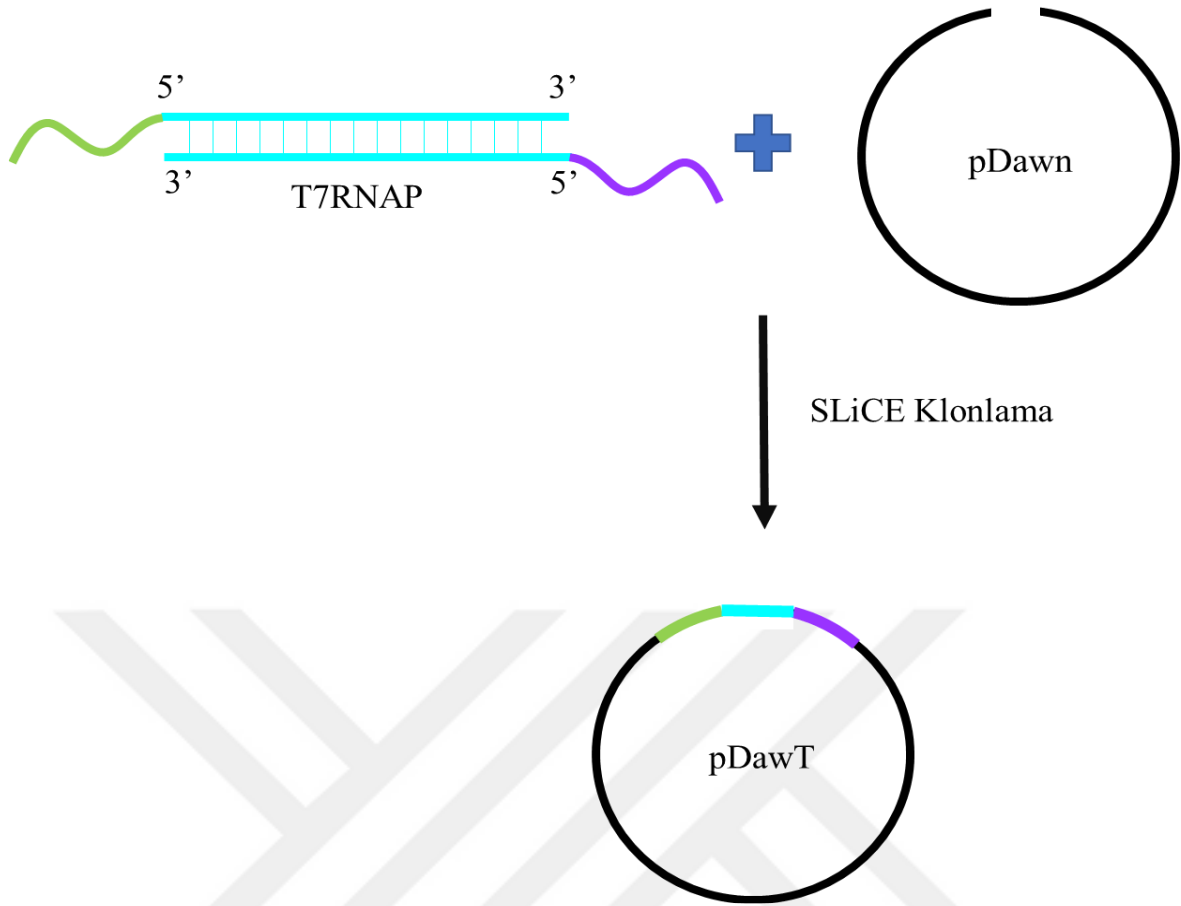
ileri çalışmalarda oluşturulan sistemin inhibisyonu da sağlanabilecektir. Sonuç olarak amplifiye edilen DNA bölgesi 2469 baz çiftinden oluşmaktadır.

### **2.3.3. ÜRETİLEN VEKTÖRLER**

İki plazmidli sistemde üretilen plazmidlere pDawT ve pATG isimleri verilmiştir. pDawT plazmidini pDawn plazmidini ile T7 RNA polimeraz enzimi üretileceği için, pATG plazmidini ise pACYC184 plazmidini P<sub>T7</sub> kontrolünde GFP üretecek ayrı bir plazmidde dönüştürüldüğü için pATG ismi verilmiştir.

#### **pDawT**

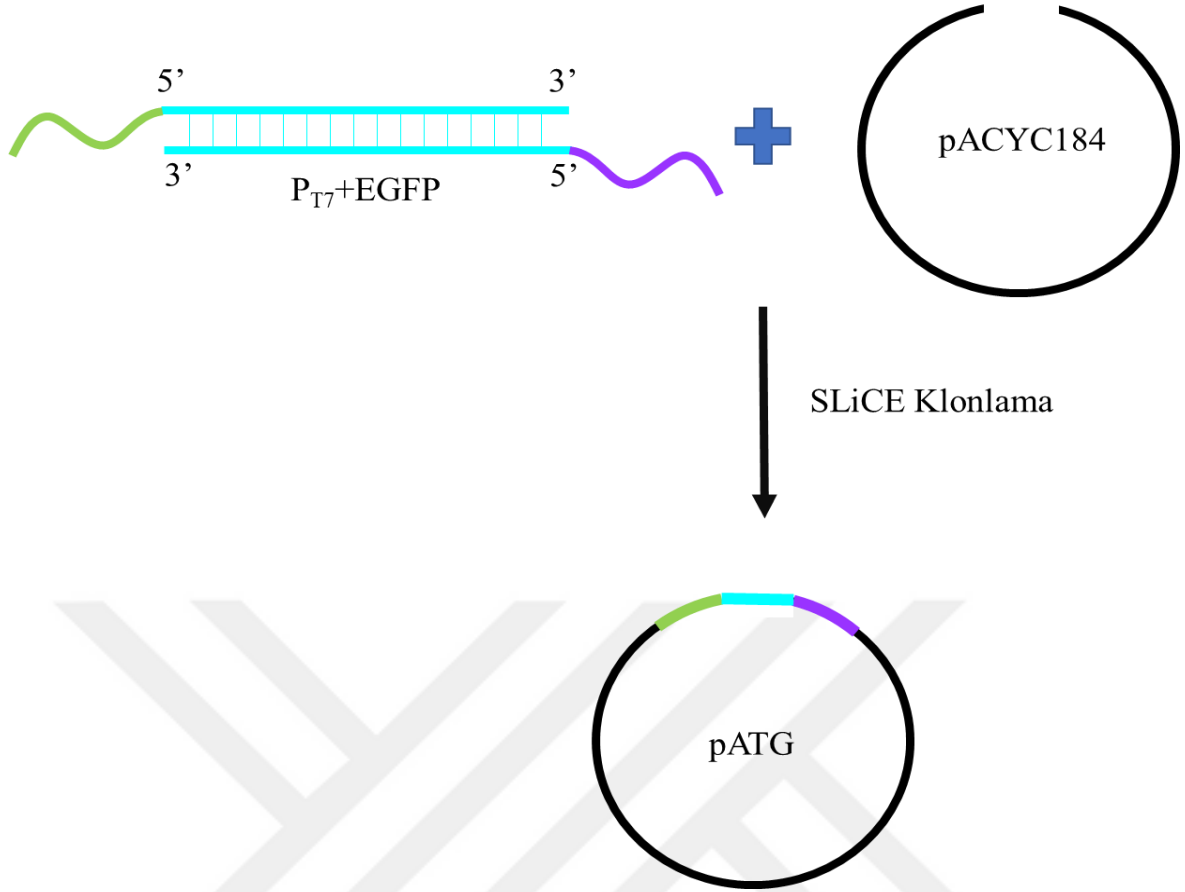
pDawT plazmidini, üretilen iki plazmidli sistemin ilk elemanı olarak çalışmaktadır. ~400nm uzun dalga ultraviyole ışık ile pDawT plazmidini kontrol edilmektedir. pDawT, pDawn plazmidinin pR promotorunun downstream'ine T7 RNA Polimeraz geni klonlanarak oluşturulmuştur (Şekil 2.4.). pDawn plazmidini omurgası değiştirilmemiş, kanamisin direnç kaseti, ~400nm uzun dalga ultraviyole ışık ile kontrol edilen genetik devre (YF1, FixJ, FixK2, cI, pR) ve plazmidin replikasyon orijini (pBR322) sabit kalmıştır.



Şekil 2.4. pDawT plazmidi ve üretimi

### pATG

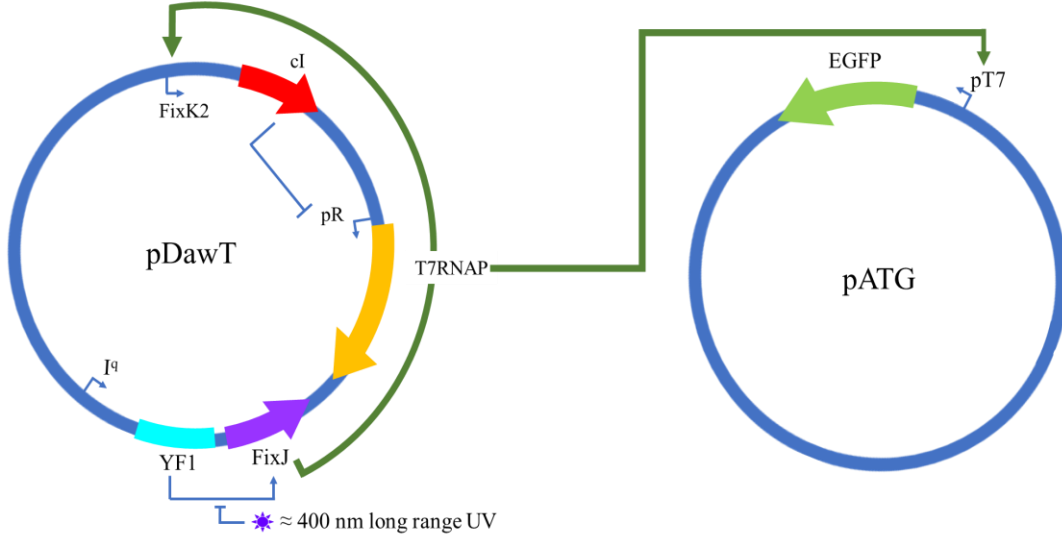
pATG plazmidi ikili plazmid sisteminin ikinci elemanı ve üretilmesi hedeflenen genin bulunduğu plazmidir. pACYC184 plazmidinin kloramfenikol antibiyotik direnç kaseti ve bu direnç kasetinin promotor bölgesi SLiCE klonlama ile,  $P_{T7}$ -EGFP bölgesi ile değiştirilmiştir (Şekil 2.5.). pACYC184 plazmidinin sadece kloramfenikol direnç kaseti ve promotor bölgesi değiştiği için tetrasiklin antibiyotik direnç kaseti ve p15A replikasyon orijini sabit kalmıştır.



Şekil 2.5. pATG plazmidi ve üretimi

#### **pDawT ve pATG Genetik Devresi**

pDawT ve pATG plazmidleri bir arada kullanıldığında, pATG plazmidinden EGFP üretimi, üretim için gerekli polimeraz olan T7 RNA polimeraz üretimi  $\sim 400\text{nm}$  uzun dalga boyu UV ile indüklenerek gerçekleştirilmektedir. pDawT plazmidinin  $\sim 400\text{nm}$  uzun dalga UV ile EGFP üretmesi, pDawn plazmidi ile hedef proteini üretmek ile aynı mekanizma ile sağlanmaktadır. Üretilen T7 RNA polimeraz ise pATG plazmidinde EGFP geninin akış yukarı yönündeki  $P_{T7}$ 'ye bağlanarak EGFP üretimini sağlamaktadır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. pDawT ve pATG plazmidlerinin bir aradaki çalışma prensibi

pDawT ve pATG plazmidleri sırasıyla farklı ailelerdeki pBR322 ve p15A replikasyon orijinlerine sahip olduğundan bir arada aynı hücrenin içinde üretilebilmektedir. Aynı zamanda pDawT plazmidini kanamisin pATG plazmidini de tetrasiklin antibiyotik direnç kasetlerine sahip olduğundan, kanamisinli ve tetrasiklinli besi yerinde bu plazmidlere sahip hücreler seçilebilmektedir.

#### 2.3.4. *ESCHERİCHIA COLI* DH5A TRANSFORMASYONLARI VE KOLONİ PCR İLE KONTROLLER

pDawT ve pATG plazmidlerinin *E. coli* DH5a suşuna aktarılması için, kimyasal transformasyon yöntemi kullanılmıştır. Transformasyon için kullanılan DH5a hücreleri kompetan hücreler değildir, transformasyon öncesi kompetan hücre olarak hazırlanmıştır. Bu aşamada TSS (transformation & storage solution) ile kimyasal transformasyon gerçekleştirilmiştir. TSS muamelesinden sonra hücrelere 42°C'de ışık şoku uygulanarak, hücre membranının geçirgenliği artırılır. Bu sayede ortama eklenen, transformasyonu gerçekleşmesi hedeflenen DNA molekülleri hücre içine geçebilmektedir.

Bu tez çalışmasında üç farklı transformasyon gerçekleştirilmiştir. Birincisi üretilen pDawT plazmidinin hücreler tarafından çoğaltılması ve kontrolü için, ikincisi pATG plazmidinin hücreler tarafından çoğaltılması ve kontrolü için uygulanmıştır. Üçüncü olarak ise iki klonlamanın gerçekleştirildiğinden koloni PCR ile emin olunduktan sonra hücrelerden

izole edilen pDawT ve pATG plazmidlerinin beraber hücrelere (ko-transformasyon) transformasyonu uygulanmıştır.

### **2.3.5. ~400NM UZUN DALGA ULTRAVİYOLE IŞIK İLE İNDÜKSİYON SİSTEMİNİN TASARIMI**

Bu tez için ~400nm uzun dalga ultraviyole ışığı altında hücrelerin üremesini sağlayan bir fermentör tasarlanıp üretilmiştir. Sistem temel olarak iki ayrı parçadan oluşmaktadır; ~400nm uzun dalga ultraviyole ışık sağlayan LED lamba ve kültürün oksijen ile etkileşimini arttırmak için manyetik karıştırıcı. LED lambanın gücü (W) ve manyetik karıştırıcının hızı bir adet Arduino UNO mikrokontrollör ile kontrol edilmektedir. ~400nm uzun dalga ultraviyole LED lambasının gücü ve motorun hızı “pulse width modulation (PWM, darbe genlik modülasyonu)” tekniği ile sağlanmaktadır. PWM ile gelen sinyalin bir anahtar mantığı ile ne kadar açık ve ne kadar kapalı olacağı ayarlanabilmektedir. Buna görev döngüsü denmektedir. Örneğin görev döngüsü %50 olarak ayarlanırsa, birim zamanın yarısı kadar sinyal gelecek yarısı kadarda sinyal gelmeyecektir. Bu sayede sinyalin gücü ayarlanabilmektedir (52). Arduino yazılımında PWM 0 ile 256 değerleri arasında ayarlanabilmektedir. Deney boyunca çalışılan UV yoğunlukları 20/256, 40/256, 80/256 ve 100/256 değerleridir. Bu değerlerden hücrelerin indüklendiği UV gücü hesaplanabilmektedir. 256/256 değeri, maksimum güçteki UV’yi belirtmektedir, bu da 10W gücündedir, dolayısıyla bu hesaplama “x” PWM ile ayarlanan değer olmak üzere;

$$W = \frac{x}{256} \times 10$$

formülü ile hesaplanabilmektedir.

### **2.3.6. ~400NM UZUN DALGA UV IŞIK İLE EGFP ÜRETİMİ VE KONTROLÜ**

#### **Üretim Deneyi Tasarımı**

GFP üretiminin hangi ışık yoğunluğunda ne kadar sürede nasıl olduğunun tespiti için bir deney tasarlanmıştır. Üretimin kontrolü için beş farklı ışık yoğunluğunda hücrelerin üremeleri, GFP protein üretimleri kontrol edilmiştir. Bunun için her ışık yoğunluğu için 2 saatte bir OD<sub>600</sub> ölçülmüş indüksiyon sonrası 6. saat 12. saat ve 24. saatlerde hücrelerden

örnek toplanıp protein izolasyonu için saklanmış ve aynı zamanda lam üzerine fikslenerek floresan mikroskopta incelenmiştir (Çizelge 2.2.).

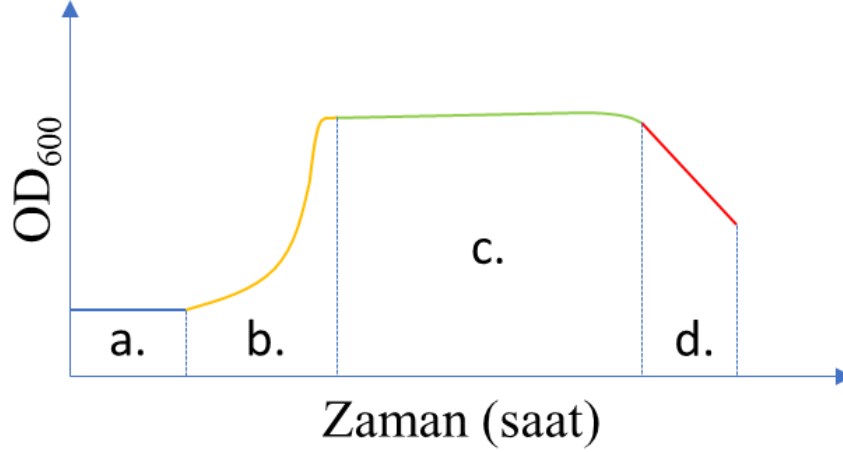
Çizelge 2.2. Deney grubu tasarımı, UV yoğunluğu ile zaman tablosu

| Time<br>UV(PWM) | 0h     | 2h     | 4h     | 6h    | 8h     | 10h    | 12h   | 24h   |
|-----------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
| 20/256          | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green | Green |
| 40/256          | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green | Green |
| 80/256          | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green | Green |
| 100/256         | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Yellow | Yellow | Green | Green |

|  |
|--|
| OD Ölçümü  |
| OD Ölçümü + Lam'a Fiksasyon + Protein İzolasyonu için Hücre Toplanması |

### Üreme Eğrisi ve Stres

Üreme eğrileri bir kültürün belirli zaman aralıkları ile 600nm'deki optik yoğunluğu ölçülerek hesaplanmaktadır. Mikroorganizmaların üremeleri lag fazı, logaritmik faz, durgun faz ve ölüm fazı olmak üzere dört fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.7.). Lag fazında üreme gerçekleşmez, var olan hücreler bölünmeye hazırlanmak için yeni ortama adaptasyon sağlar ve gerekli proteinlerin üretimi gerçekleşir, logaritmik fazda üreme hızı hücrelerin ölüm hızından daha çoktur, bu sebeple kültür içerisindeki hücre sayısı  $2^n$  formülü ile arttığından ( $n$  = bölünme sayısı) logaritmik olarak artmaktadır. Durgun fazda ise ölen hücre ile bölünen hücre sayısı birbirine eşittir, bu durumda kültürdeki hücre sayısı sabit kalmaktadır. Ölüm fazında ise ölüm sayısı bölünen hücre sayısından çoktur ve kültürdeki hücre sayısı azalır. Bakterilerin üreme eğrilerinde birçok etmen rol oynayabilmektedir.



Şekil 2.7. Bakteri üreme eğrisi ve üreme fazları. a. Lag fazı, b. Log fazı, c. Durgun faz, d. Ölüm fazı

Mikrobiyal hücre fabrikaları ele alındığında rekombinant protein üretimi ve üretilen polipeptidlerin katlanması hücreler üzerinde birçok dar boğaz yaratmaktadır (53). Doğadan toplayarak elde ettiğimiz *E. coli* gibi mikroorganizmalar, aslında ürettirmeye çalıştığımız proteinleri (insan proteinleri vs.) üretmek için verimli sistemlere sahip değildirlir. Her canlı gibi mikroorganizmaların metabolizmaları da kendi ihtiyaçlarını karşılayacak düzeydedir. Protein üretimi her canlı için en çok enerji gerektiren işlemlerden biridir. Mikrobiyal hücrelerin protein üretimi dışında en çok enerji gerektiren diğer işlemi ise üreme yani hücre bölünmesidir. Dengede çalışan bir sisteme dışarıdan başka yüksek enerji harcaması gerektiren işlemler uygulandığında, hücreler üzerinde farklı stres yanıtları ortaya çıkar. (54). Örneğin rekombinant protein üretimi hızı ile hücre üreme hızı arasında ters orantı görülmüştür, yani rekombinant protein üretimi hızlandırıldıkça hücrelerde üreme hızı düşmektedir (55). Weber ve Hoffman 2002’de yaptıkları çalışmalarda rekombinant protein üretimi hızı arttırılınca üreme hızındaki düşüşünü *E. coli*’nin rekombinant protein üretmek için enerji üretim yollarını hızlandırdığına ve bu sebeple bölünmeye ayıracağı enerjinin ve hücre içi proteinlerinin azaldığına bağlamaktadır. (55)

### Floresan Mikroskop ile Görüntüleme

Floresan proteinin floresan mikroskopta incelenmesi için çeşitli filtreler kullanılabilir. Bu filtreler örneklerden yayılan floresan ışıkları filtreleyerek sadece ışımaların görüntülenmesini sağlamaktadır. EGFP proteini ~509nm dalga boyunda ışımaya yapmaktadır (56). Kullanılan filtrenin geçireceği ışık aralığı bu dalga boyunu içermelidir.



Bu çalışmada kullanılan FITC filtresi yeşil ışınları geçirmek için kullanılan filtrelerden biridir. FITC filtresi dalga boyu aralığı 457-556nm olduğundan, EGFP proteinin ışınması bu filtre sayesinde ayırt edilerek incelenebilmektedir. Görüntülerin analizleri için görüntüleri oluşturan piksellerin sayımı kullanılabilir. Bu analizler RGB (kırmızı, yeşil ve mavi) ve HSV (hue, saturation ve value) değerlerini elde etmektedir. Bu değerler karşılaştırılarak ve istatistiksel yöntemlerle işlenerek anlamlı veriler oluşturulabilmekte ve görseller birbirleri ile karşılaştırılabilmektedir. Bu tez çalışmasında EGFP proteini bir raporcu protein olarak seçilmiş ve üretiminin kontrolü bu analizler ile gerçekleştirilmiştir.

## RGB ve HSV

RGB (Red, Green, Blue) renk uzayı, renkleri red (kırmızı), blue (mavi) ve green (yeşil) sinyallerin karışımı ile renklerinin üç boyutlu Kartezyen koordinat sisteminde ele almaktadır (57,58).

Fakat RGB modeli fiziksel gerçeklikte bulunan renklerin tamamını tam olarak nitelendiremez ve bilgisayarların renkleri daha detaylı algılayabilmesi sebebi ile HSV modeli de ortaya çıkartılmıştır. HSV (hue, saturation, value) uzayı ise, hue (renk), saturation (dolgunluk) ve value (parlaklık) sinyallerini ele alan silindirik ya da konik bir uzaydır. Foton fiziği dolayısıyla fiziksel gerçekliğe en yakın renk uzayı HSV'dir. Her rengin doğal parlaklığı, dolgunluğu da bulunmaktadır. Örneğin RGB ile bir sinyalin parlaklığı ölçülememektedir ve dolayısıyla HSV bize daha çok bilgi verebilmektedir. (57,58)

RGB değerlerinin HSV'ye dönüştürülmesi aşağıdaki formüller ile gerçekleştirilebilmektedir. Cmax, R, G, B değerlerinin en büyüğü, Δ ise Cmax ile Cmin farkıdır.

$$H = \begin{cases} 0^\circ, & \Delta = 0 \\ 60^\circ \times \left( \frac{G' - B'}{\Delta} \text{ mod } 6 \right), & C_{max} = R' \\ 60^\circ \times \left( \frac{B' - R'}{\Delta} + 2 \right), & C_{max} = G' \\ 60^\circ \times \left( \frac{R' - G'}{\Delta} + 4 \right), & C_{max} = B' \end{cases}$$

$$S = \begin{cases} 0, & C_{max} = 0 \\ \frac{\Delta}{C_{max}}, & C_{max} \neq 0 \end{cases}$$

$$V = C_{max}$$

RGB renk uzayı algoritmalar kullanılarak kolaylıkla diğer renk uzaylarına dönüştürülebilmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan algoritma Ek-4'te görülebilmektedir.



### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Mikrobiyal hücre fabrikaları rekombinant protein üretimi için yoğunlukla kullanılan ve üzerine çalışılan bir alandır. Bu alanda genetik mühendislik ve sentetik biyoloji araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Genetik devreler gibi araçlar genetik modifikasyonların gerçekleştirilmesi, protein üretim veriminin artması gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

Protein üretimleri için tasarlanmış olan vektörler bu genetik devrelere sahip olan sentetik biyoloji araçlarıdır. Geleneksel olarak protein üretiminde kullanılan vektörler aslında rekombinant protein üretimi için verimli sonuçlar elde etmektedir, fakat farklı durumlar için farklı genetik devreler üretilmiştir. Birçok vektör protein üretiminin başlatılması ve devamı için IPTG, arabinoz gibi çeşitli moleküller ile indüklenmeye ihtiyaç duymaktadır. Örneğin pET28a vektörü P<sub>T7</sub> kontrolünde gen ifadesi sağlamaktadır ve sadece *E. coli* BL21 gibi kromozomal DNA'sında T7 RNA Polimeraz genine sahip hücreler ile kullanılabilir. T7 RNA polimeraz enziminin *E. coli* RNA polimeraz enzimlerine kıyasla çok daha hızlı çalışması rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılmasına sebep olmuştur. BL21 bakteri suşunun T7 RNA Polimeraz geni, *lacUV5* kontrolünde üretilmekte ve IPTG ile indüklenmektedir. IPTG sisteme verildikten sonra T7 RNA polimeraz geni ifadesinin durdurulması için sistemdeki IPTG'nin uzaklaştırılması ya sisteme %1 glukoz eklenmesi gereklidir (59). IPTG metabolize edilemeyen bir molekül olduğu için ise hücreler bu molekülleri uzaklaştıramamaktadır. Aynı zamanda, IPTG ile indüklenen sistemlerde indüklenme gerçekleşmeden de gen ifadesinin ve protein üretiminin olabildiği bilinmektedir.

Üretilen genetik devreler ve vektörler ile, pDawT plazmidinde T7 RNA polimeraz gibi hızlı bir enzim *lac* operonu gibi sızıntı gerçekleştiren bir operon yerine ~400nm uzun dalga boyu UV ile indüklenen bir operon kontrolünde üretilerek başka bir plazmidde, pATG, PT7 kontrolünde hedef protein üretilmesi sağlanmıştır. İki plazmidli bu sistemde otamdaki ~400nm uzun dalga boyu ışık kesildiği zaman üretim durabilmektedir ve böylece anlık kontrol edilebilen bir sistem üretilmiştir. *lac* operonu yerine kullanılan operon ile sistemdeki sızıntının da önlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında üretilen vektörlerin mikrobiyal biyoteknoloji alanında yeni bir araç olarak kullanılması hedeflenmiştir.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

Kullanılan bütün laboratuvar cihazları Ek-1’de listelenmiştir.

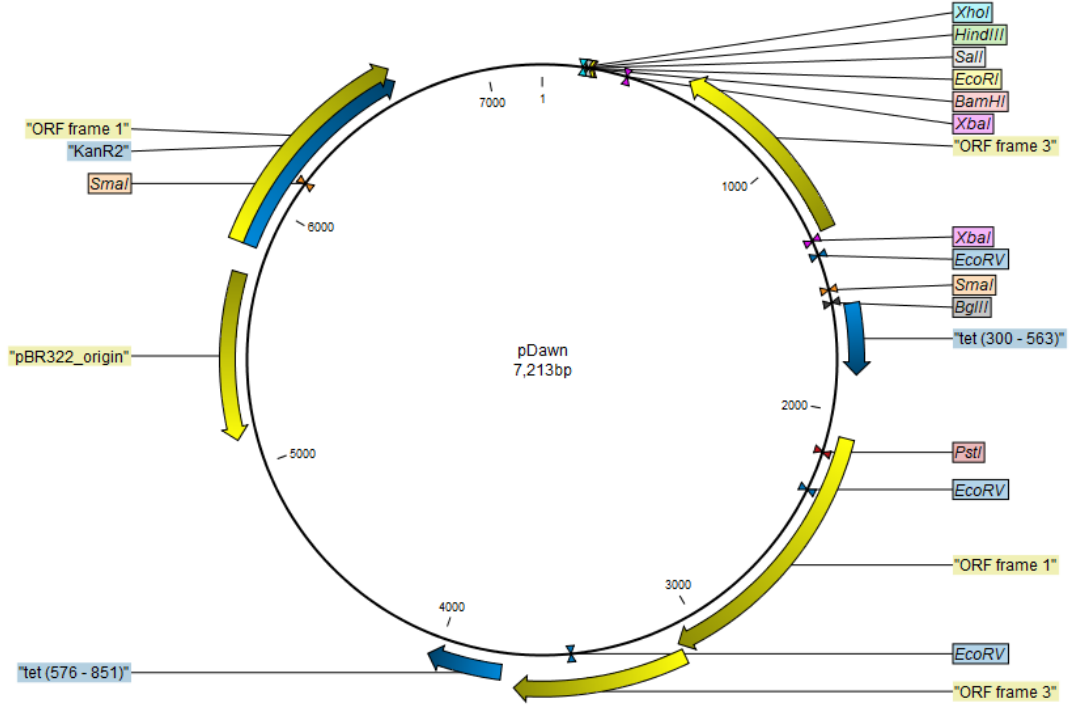
#### 4.1.1. KULLANILAN BAKTERİ SUŞLARI

Bu tez çalışmasında *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21 ve *E. coli* JM109 bakteri suşları kullanılmıştır. *E. coli* BL21 suşu kromozomal DNA’sından T7 RNA polimeraz geninin SLiCE klonlama kuyrukları ile amplifikasyonu için kullanılmıştır. Aynı zamanda pET28a-GFP plazmidi içeren *E. coli* BL21 ve pGLO plazmidi içeren *E. coli* BL21 suşu EGFP üretiminin floresan mikroskopta teyit edilmesi için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *E. coli* DH5 $\alpha$  bakteri suşu ise pDawT + pATG genetik devresini taşıyacak model organizma olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak ise herhangi bir plazmid içermeyen *E. coli* DH5 $\alpha$  suşu kullanılmıştır. pKD6 plazmidi içeren *E. coli* JM109 ise SLiCE lizatu elde edilmek için kullanılmıştır.

## 4.1.2. KULLANILAN VEKTÖRLER

### pDawn

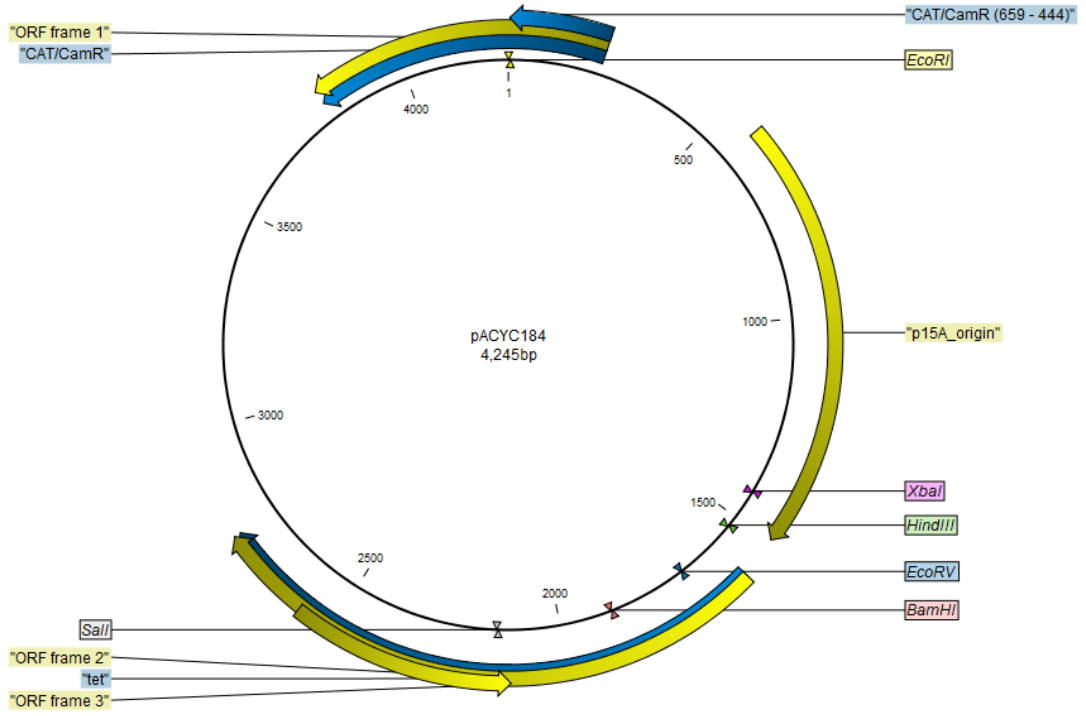
Bu tez çalışmasında pDawT plazmidinin üretimi için pDawn plazmidi vektör omurgası olarak kullanılmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. pDawn plazmidi genetik haritası

## pACYC184

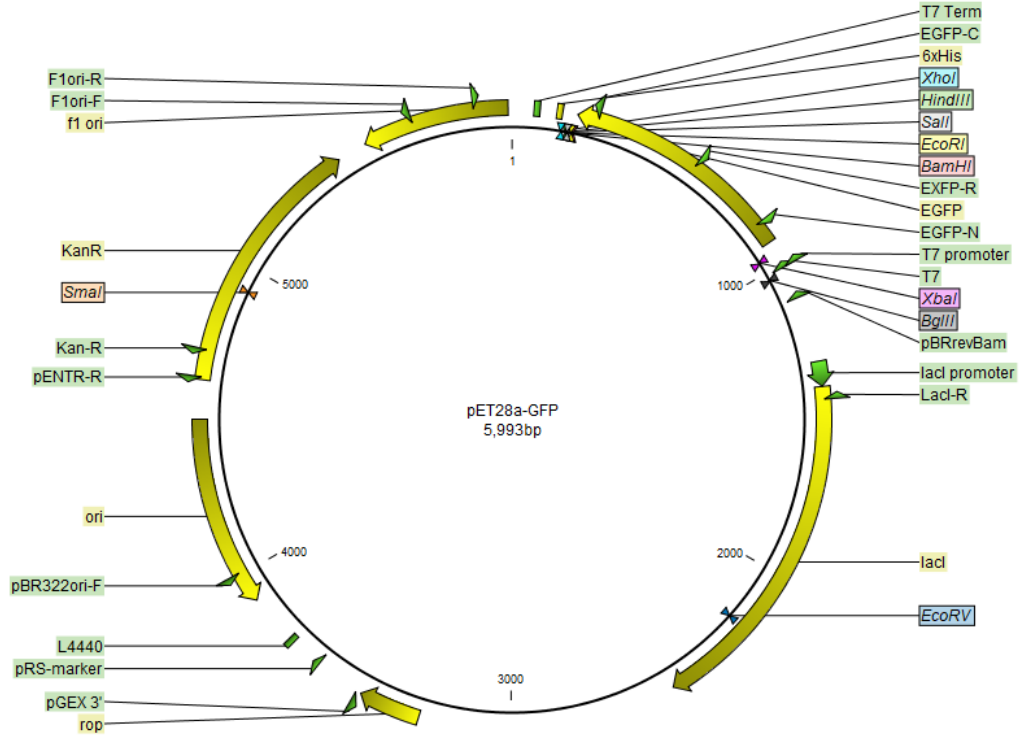
pATG plazmidinin üretimi için pACYC184 plazmidi vektör omurgası olarak kullanılmıştır. (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. pACYC184 plazmidi genetik haritası

## pET28a-EGFP

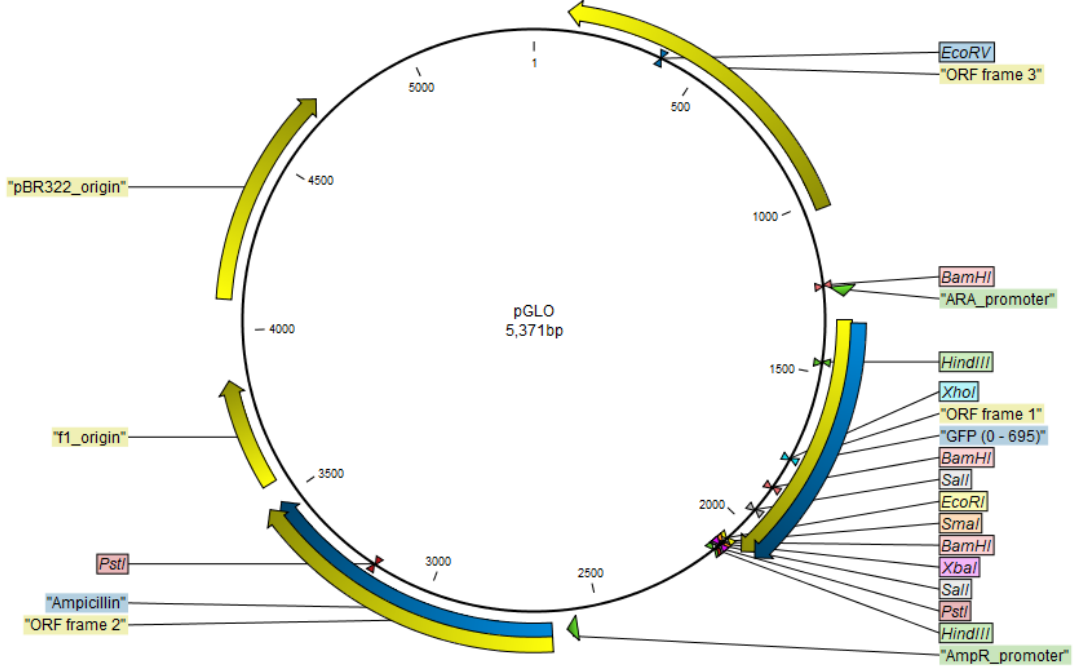
pET28aGFP vektörü, insert P<sub>T7</sub>-EGFP'nin amplifikasyonu için kalıp DNA olarak ve GFP üretimi için pozitif kontrol grubu olarak *E. coli* BL21 bakteri suşunda IPTG ile indüklenerek kullanılmıştır. Bu plazmid Clontech EGFP plazmidinden, EGFP plazmide klonlanarak oluşturulmuştur. (Şekil 4.3.)



Şekil 4.3. pET28aEGFP plazmidini genetik haritası

## pGLO

pGLO vektörü, GFP üretimi için pozitif kontrol grubu olarak *E. coli* BL21 bakterisi suşunda arabinoz ile indüklenerek kullanılmıştır. (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. pGLO plazmidi genetik haritası

### 4.1.3. BAKTERİ BESİYERLERİ

Elde edilen ve kullanılan bütün bakteriler, %50 gliserol içeren LB besiyeri ve gerekli antibiyotiklerle beraber -80°C'de stoklanmıştır. Transformasyon ve SLiCE lizatı hazırlama deneylerinde zengin sıvı besiyeri olarak 2xYT ve deneye göre gerekli antibiyotikler kullanılmıştır. Transformasyon deneylerinde antibiyotik seçilimi ve bakterilerin katı besiyerinde pasajları için gerekli antibiyotikleri içeren Columbia Base Agar (Oxoid™) ve Agar Agar (Tito™) kullanılmıştır. Kurulan genetik devre ile GFP üretimi deneylerinde ise zengin bir besiyeri olarak kanamisin ve tetrasiklin antibiyotiklerini bulunduran Terrific Broth kullanılmıştır Çizelge 4.1.



Çizelge 4.1. Besiyeri tarifleri

| Terrific Broth                  |      |         |              |
|---------------------------------|------|---------|--------------|
| Konsantrasyonlar                |      |         |              |
|                                 | Stok | Çalışan |              |
| Tripton                         | toz  | 12g/L   | otoklav      |
| Maya özütü                      | toz  | 24g/L   | otoklav      |
| Gliserol                        | 100% | 0.40%   | otoklav      |
| K-fosfat tamponu*               | 1M   | 0.1M    | ayrı otoklav |
| H <sub>2</sub> O                |      |         | otoklav      |
| *K-fosfat tamponu (pH 7.2)      |      |         |              |
| Konsantrasyonlar                |      |         |              |
|                                 | Stok | Çalışan |              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1M   | 0.283M  | otoklav      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 1M   | 0.717M  | otoklav      |

| 2x YT medium     |      |         |
|------------------|------|---------|
| Konsantrasyonlar |      |         |
|                  | Stok | Çalışan |
| Tripton          | toz  | 16g/L   |
| Maya özütü       | toz  | 10g/L   |
| NaCl             | 5M   | 86mM    |
| H <sub>2</sub> O |      |         |

Besi yerleri hazırlanırken kullanılan kanamisin, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotikleri duruma göre kullanılmıştır. Tetrasiklin ailesinden “oksitetrasiklin” bu tez çalışmasında kullanılmıştır. Kanamisin ve ampisilin suda çözünebilen antibiyotikler iken oksitetrasiklin suda çözünmemektedir, bu sebeple besi yerine eklenmeden önce DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek kullanılmıştır.

#### 4.1.4. BİYOKÜTLE TESPİTİ

Bütün biyokütle hesaplamalarında OD<sub>600</sub> (600nm’de optik yoğunluk) ölçümü için Biorad SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer cihazı kullanılmıştır.

#### 4.1.5. POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ

Genetik devrenin tasarımı için insert DNA oluşturulmasında ve klonlama kontrolünde PZT deneyleri yapılmıştır. Bütün PZT deneyleri için Dream Taq Polimeraz™, Dream Buffer

(New England Biolabs), dNTP set (ThermoFischer Scientific) kullanılmıştır. Sadece kullanılan primerler farklılık göstermektedir. Dream Buffer™ (New England Biolabs) tepkimede gerekli MgCl<sub>2</sub> içerdiğinden fazladan MgCl<sub>2</sub> bu deneylerde kullanılmamıştır.

Insert DNA ve klonlama kontrolü için yapılan koloni PZT deneylerinde aynı primer çiftleri kullanılmıştır. T7 RNA Polimeraz geninin ve P<sub>T7</sub>-EGFP dizisinin amplifikasyonunda kullanılan primer çiftleri Çizelge 4.2’de görülebilmektedir.

Çizelge 4.2. Kullanılan primer çiftleri. (a) T7 RNA Polimeraz geni üretimi ve pDawn plazmidine klonlanması için gerekli primer çifti. (b) P<sub>T7</sub>-EGFP amplifikasyonu ve pACYC184 plazmidine klonlanması için gerekli primer çifti. (c) T7 RNA Polimeraz geni ileri primerinin SLiCE klonlama için gerekli olan pDawn plazmidini pR promotorunun aşağı bölgesine homolog dizi. (d) T7 RNA polimeraz geni geri primerinin SLiCE klonlama için gerekli olan pDawn plazmidini çoklu klonlama bölgesi sonu C-terminus bölgesine homolog dizi. (e) P<sub>T7</sub>-EGFP dizisinin pACYC184 plazmidini kloramfenikol (CAT) kasetinin promotor bölgesinin başına homolog dizi. (f) P<sub>T7</sub>-EGFP dizisinin pACYC184 plazmidini kloramfenikol (CAT) kasetinin sonuna homolog dizi.

| Primerler              | pDawn Bağlanma Bölgesi (SLiCE)(c)    | T7 RNA Polimeraz Geni Bağlanma Bölgesi        |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| <b>T7 RNA Pol. (a)</b> |                                      |   |
| <b>İleri</b>           | 5' - [ctttaagaaggagatatacc>          | [ATGAACACGATTAACATCGC> - 3'                   |
| <b>Geri</b>            | 5' - [ttcgggctttgtagcagccg>          | [TTACGCGAACGCGAAGTCCG> - 3'                   |
|                        | pDawn Bağlanma Bölgesi (SLiCE)(d)    | T7 RNA Polimeraz Geni Bağlanma Bölgesi        |
|                        | pACYC184 Bağlanma Bölgesi (SLiCE)(E) | P <sub>T7</sub> -EGFP Dizisi Bağlanma Bölgesi |
| <b>pT7+GFP (b)</b>     |                                      |   |
| <b>İleri</b>           | 5' - [aaaatgagacgttgatcggc>          | [CATCGGTCGAGATCCCGGTGC> - 3'                  |
| <b>Geri</b>            | 5' - [agcacctgtgccttcgcta>           | [CGGATATAGTTCCTCCTTTCAG> - 3'                 |
|                        | pACYC184 Bağlanma Bölgesi            |   |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Bölgesi<br>(SLiCE)(f) | P <sub>T7</sub> -EGFP<br>Bağlanma<br>Bölgesi |
|-----------------------|--|

Tüm PZT deneyleri için, Biorad DNA Engine Peltier Thermal Cycler™ ve Biometra T1 Thermocycler™ cihazları kullanılmıştır.

#### 4.1.6. DNA VE PLAZMİD İZOLASYONU / SAFLAŞTIRMASI

Kromozomal DNA izolasyonu bu tez çalışmasında sadece *E. coli* BL21 suşu kromozomal DNA'sı izole edilirken yapılmıştır. Bu protokolde kimyasal olarak sadece Tris-EDTA kullanılmıştır.

Plazmid izolasyonları için standart alkalin lizis plazmid izolasyonu protokolü uygulanmıştır. Bu protokolde kullanılan alkalin lizis solüsyonları ve içerikleri Çizelge X'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Alkalin lizis I, II ve III çözeltileri için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.

| Alkalin Lizis I  |      | Alkalin Lizis II |     | Alkalin Lizis III    |       |
|------------------|------|------------------|-----|----------------------|-------|
| Glukoz           | 1M   | NaOH             | 10N | K-Asetat             | 5M    |
| Tris-HCl pH:8    | 1M   | SDS              | 20% | Glasiyel Asetik Asit | 17.4M |
| EDTA pH:8        | 0.5M | H <sub>2</sub> O |     | H <sub>2</sub> O     |       |
| H <sub>2</sub> O |      |                  |     |                      |       |

Alkalin lizis plazmid izolasyonu için aynı zamanda, fenol kloroform izoamil alkol (Amresco), 2-propanol (Merck) ve %99,6'lık ve %70'lik EtOH (J.T. Baker) kullanılmıştır. Plazmid izolasyonu sonucunda oluşan plazmid pelletini çözmek için ise RNaz A (Thermo Scientific) enzimi kullanılmıştır.

Plazmid izolasyonu sonrası plazmidler saflaştırılma hedefi ile PEG (polietilen glikol) kullanılmıştır.

PZT deneyleri sonuçlarının saflaştırılması için ise silika filtre (Promega™) ile standart PZT ürünü saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Bu protokolde kullanılan solüsyonlar Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Silika filtre ile DNA saflaştırması için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları

|                  |      |
|------------------|------|
| Guanidin HCl     | 8M   |
| NaCl             | 5M   |
| Bromtimol Mavisı | 50X  |
| Na-Asetat        | 3M   |
| 2-propanol       | 100% |
| 2-propanol       | 100% |
| H <sub>2</sub> O |      |

#### 4.1.7. İZOLE EDİLEN VE SAFLAŞTIRILAN VEKTÖRLERİN LİNEERİZASYONU

Kullanılan pDawn ve pACYC184 vektörlerinin lineerizasyonu için, 20U/μl *EcoRI* (New England Biolabs) ve NEBuffer™ Set'te (New England Biolabs) bulunan 10X NEBuffer II™ (New England Biolabs) ve 100x BSA kullanılmıştır.

#### 4.1.8. INSERT VE VEKTÖR DNA ANALİZİ

İzole edilen tüm DNA moleküllerinin (vektör, insert DNA), PEG ile saflaştırılan plazmidlerin varlığı ve PZT deneylerinin sonuçları agaroz jel elektroforez kullanılarak tespit edilmiştir. Agaroz jeller hazırlanırken Bioshop™ Agarose ve TAE Buffer (50X Stok konsantrasyonu kullanılmıştır (Çizelge 4.5.)). Elektroforez Thomas Scientific Owl™ horizontal elektroforez sisteminde, Biorad PowerPac Basic Power Supply™ kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5. Agaroz jel elektroforez deneyleri için gerekli olan elektroforez tamponu tarifi

|             |            |
|-------------|------------|
| TAE         | 50X        |
| Tris Baz    | 242g/L     |
| Asetik Asit | 71.375mL/l |
| EDTA        | 0.5M       |

Aynı zamanda Nanodrop ND-1000 spektrofotometre cihazı (Nanodrop) kullanılarak, izole edilen tüm DNA moleküllerinin ve saflaştırılan tüm DNA moleküllerinin miktarları tespit edilmiştir.

Ürünler agaroz jele yüklenirken 6X DNA Loading Dye kullanılmış, agaroz jel EtBr ile boyanmış ve Biorad VersaDoc Imaging System™ ve PDQuest 2-D™ yazılımı görüntülenmiştir.

#### **4.1.9. SLİCE LİZATI HAZIRLAMA**

SLiCE lizati hazırlamak için pKD46 plazmidi içeren *E. coli* JM109 hücreleri kullanılmıştır. pKD46 plazmidi içeren JM109 hücrelerinin üretimi ampisilin içeren 2xYT besi yerinde gerçekleştirilmiştir. JM109 hücrelerinin pKD46 plazmidinden  $\lambda$  Red rekombinaz proteinini üretmesi L-arabinose ile hücreler indüklenerek gerçekleştirilmiştir. JM109 hücrelerinin lizisinin gerçekleşmesi ve lizatın kullanıma hazır elde edilmesi Triton X-100 solüsyonu ve %100 gliserol kullanılmıştır.

#### **4.1.10. SLİCE KLONLAMA**

Insert ve vektör DNA'ların SLiCE ile klonlanması için, hazırlanan SLiCE lizati, 10mM ATP içeren 10X T4 Ligaz Tamponu (New England Biolabs™) kullanılmıştır. Klonlamanın gerçekleşeceği 37°C sıcaklıktaki inkübasyon için ise Biorad DNA Engine Peltier Thermal Cycler™ kullanılmıştır.

#### **4.1.11. ~400NM UZUN DALGA UV SİSTEMİ HAZIRLANIŞI VE GFP ÜRETİMİ**

Bu tez çalışmasında oluşturulan ~400nm Uzun Dalga UV fermentör sistemi oluşturulurken, transistörler, potansiyometreler, Arduino Uno™, ~400nm Long range UV LED, 3D basılmış

beher kapağı, işlemci fanı, bilgisayar fanı, neodyum mıknatıslar, devre tahtası, 400W gc kaynağı ve bir LCD ekran kullanılmıştır.

Devrenin alışması için gerekli olan yazılım Arduino IDE programında yazılmıştır.

#### 4.1.12. PDAWT VE PATG PLAZMİDLERİ İLE GFP ÜRETİMİNİN TESPİTİ

##### Total Protein İzolasyonu

Bu tez çalışmasında GFP üretiminin kontrolü için kullanılan bakterilerden total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total protein izolasyonu için kullanılan kimyasallar izelge 4.6'da verilmiştir. Ayrıca rotator, sonikatör ve santifüj cihazları izolasyon deneylerinde kullanılmıştır. Elde edilen örneğin saklanması için ise %100'lk gliserol kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. Bakteriden total protein izolasyonu için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.

|                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| Triton X-100            | 10%                 |
| Tween-20                | 10%                 |
| Tris HCl pH:8.0         | 1M                  |
| NaCl                    | 5M                  |
| Gliserol                | 50%                 |
| $\beta$ -Merkaptoetanol | 13.3M               |
| Lizozim                 | 10 $\mu$ g/ $\mu$ l |

##### Nikel Kolon Kromatografi ile Referans GFP Saflaştırılması

GFP üretiminin SDS page ile incelenebilmesi için jelde referans bant olarak kullanılacak GFP proteini saflaştırılmıştır. Daha önce *E. coli* BL21 hücresinde üretilmiş olan GFP proteini hücre lizatlarından total protein izolasyonu ile toplanmış, total proteinden ayırmak için üretim esnasında 6-histidin kuyruğu eklenen bu GFP proteini Nikel kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu saflaştırma deneyinde kolon içeriği için Ni-NTA Agaroz boncuklar (Qiagen) ve 0.1M NiSO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Kullanılan kolon ise PrepSep Extraction Columns (C18) kolonudur. Saflaştırma için kullanılan bağlama ve elüsyon tamponları izelge 4.7.'de tarifi ile verilmiştir.

Çizelge 4.7. Protein saflaştırma protokollerinde kullanılan bağlama ve elüsyon tamponları çözeltileri ve stok konsantrasyonları.

| Bağlama Tamponu  |  |    |  |  |  |
|------------------|--|----|--|--|--|
| TrisCl pH:8.0    |  | 1M |  |  |  |
| NaCl             |  | 5M |  |  |  |
| H <sub>2</sub> O |  |    |  |  |  |

| Elüsyon Tamponu 1 |    | Elüsyon Tamponu 2 |    | Elüsyon Tamponu 3 |    |
|-------------------|----|-------------------|----|-------------------|----|
| TrisCl pH: 8.0    | 1M | TrisCl pH: 8.0    | 1M | TrisCl pH: 8.0    | 1M |
| NaCl              | 5M | NaCl              | 5M | NaCl              | 5M |
| İmidazol          | 5M | İmidazol          | 5M | İmidazol          | 5M |
| H <sub>2</sub> O  |    | H <sub>2</sub> O  |    | H <sub>2</sub> O  |    |

### Bradford Testi ile Protein Miktarlarının Ölçümü

Bradford testi için gerekli olan standart eğrisi BSA (Serva) kullanılarak elde edilmiştir. Gerekli olan bradford ayırıcı ise coomassie mavisi G-250, fosforik asit, etanol ve ddH<sub>2</sub>O kullanılarak hazırlanmıştır (Çizelge 4.8.). Bradford testi 96 kuyucuklu plaka içerisinde gerçekleştirilmiş ve Victor 3V (Perkin Elmer) plaka okuyucusu ile analiz edilmiştir.

Çizelge 4.8. Bradford testi için kullanılan Bradford ayırıcı çözeltileri ve stok konsantrasyonları

| Bradford Ayırıcı               |        |
|--------------------------------|--------|
| Coommassie brilliant blue G250 | 1.00%  |
| Etanol                         | 99.90% |
| Fosforik asit                  | 85.00% |
| H <sub>2</sub> O               |        |

### SDS PAGE ve Coomassie Boyama ile Görüntüleme

SDS page jelleri hazırlanırken ayırıcı jel için, TrisCl pH:8.8, SDS, akrilamid bisakrilamid (30:0.8), TEMED ve APS, topayıcı jel için ise TrisCl pH:6.8, SDS, akrilamid bisakrilamid (30:0.8), TEMED ve APS kullanılmıştır (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.9. SDS PAGE deneylerinde hazırlanan jeller için gerekli olan çözeltiler ve stok konsantrasyonları.

| Ayrıcı Jel               |         | Toplayıcı Jel         |         |
|--------------------------|---------|-----------------------|---------|
| TrisCl pH:8.8            | 1M      | TrisCl pH:6.8         | 1M      |
| Akrilamid                |         | Akrilamid             |         |
| Bisakrilamid<br>(30:0.8) | 30.00%  | Bisakrilamid (30:0.8) | 30.00%  |
| SDS                      | 20.00%  | SDS                   | 20.00%  |
| TEMED                    | 100.00% | TEMED                 | 100.00% |
| APS                      | 10.00%  | APS                   | 10.00%  |
| H <sub>2</sub> O         |         | H <sub>2</sub> O      |         |

Örneklerin kuyulara yüklenmesi için ise Laemmlı örnek tamponu kullanılmıştır (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. Örnek yükleme tamponu (Laemmlı tamponu) tarifi (60).

| Örnek Yükleme Tamponu |                  |         |
|-----------------------|------------------|---------|
|                       | Konsantrasyonlar |         |
|                       | Stok             | Çalışan |
| TrisCl pH: 6.8        | 1M               | 0.25M   |
| Gliserol              | 100%             | 40%     |
| SDS                   | 20%              | 4%      |
| β-Merkaptoetanol      | 100%             | 10%     |
| Bromfenol Mavisi      | 1%               | 0.02%   |
| H <sub>2</sub> O      |                  |         |

SDS PAGE jelleri Biorad Mini Protean Tetra Cell Casting Stand'de hazırlanmış ve Biorad Mini Protean Tetra Cell dikey elektroforez tankında yürütülmüştür. Yürütme işlemi için 1X SDS PAGE elektroforez tamponu kullanılmıştır (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. SDS PAGE elektroforez tamponu tarifi.

| 5X SDS Page Elektroforez Tamponu |                  |         |
|----------------------------------|------------------|---------|
|                                  | Konsantrasyonlar |         |
|                                  | Stok             | Çalışan |
| Tris baz                         | 1M               | 0.125M  |
| Glisin                           | 2M               | 0.96M   |
| SDS                              | 20%              | 0.50%   |
| H <sub>2</sub> O                 |                  |         |



Jeller yürüdüktan sonra, fiksasyon çözeltisi ile fikse edilmiş, coomassie boyama ile boyanmış ve görüntülenmeden önce destaining çözeltisi ile fazla boyadan arındırılmıştır (Çizelge 4.12.).

Çizelge 4.12. SDS PAGE sonucunda elde edilen jellerin coomassie boyama ile boyanması için gerekli olan çözeltiler ve tarifleri.

| Fiksasyon Çözeltisi |      |         | Boyama Çözeltisi               |      |         | Destaining Çözeltisi |      |         |
|---------------------|------|---------|--------------------------------|------|---------|----------------------|------|---------|
|                     | Stok | Çalışan |                                | Stok | Çalışan |                      | Stok | Çalışan |
| İsopropanol         | 100% | 25%     | Asetik Asit                    | 100% | 10%     | Asetik Asit          | 100% | 10%     |
| Asetik Asit         | 100% | 10%     | Coomassie Brilliant Blue G-250 | 1%   | 0.01%   | H <sub>2</sub> O     |      |         |
| H <sub>2</sub> O    |      |         | H <sub>2</sub> O               |      |         |                      |      |         |

Jeller boyandıktan sonra Biorad VersaDoc görüntüleme sisteminde beyaz filtre kullanılarak görüntülenmiştir.

## Floresan Mikroskop ile Görüntüleme

Bütün floresan görüntülemeler için Carl Zeiss Axio Imager M1™ floresan mikroskobu ve FITC ve Rhodamin filtreleri ve Carl Zeiss AxioVision™ yazılımı kullanılmıştır. Görüntüleri alınan örnekler imageJ programı ve Python yazılım dilinde yazılan yazılım ile RGB ve HSV analizlerine tabi tutulmuştur.

## 4.2. YÖNTEM

Tüm deneyler için steril cam ve plastik malzemeler kullanılmıştır. Steril ve tek kullanımlık pipet uçları, 50mL ve 15mL falkon tüpler, 1.5mL & 2mL eppendorf tüpler, 0.2mL PZT tüpleri ve 2mL, 10mL, 50mL serolojik pipetler tercih edilmiştir. Bakterilerin üretimi için kullanılan cam malzemeler kullanım öncesi otoklavlanarak steril edilmiş, yayma ekim yönteminde kullanılan cam spreaderlar %96,6'lık etil alkol ve ateş ile, özeler ateş ile steril edilmiştir. Kullanılan cam malzemeler iste çamaşır suyu ve Alchonox® ile temizlenip distile su ile durulanmıştır. Otoklavlanacak cam malzemeler bu işlemden geçtikten sonra otoklavlanmış, steril olması gerek malzemeler ise kurutulularak tekrar kullanılmıştır. Tüm deneyler öncesi çalışma ortamı %70'lik etil alkol ve distile su ile temizlenmiştir.

## 4.2.1. MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLER

### Besiyeri Hazırlanması

Mikrobiyoloji temelli olmasından dolayı bu tez çalışmasının neredeyse her aşamasında besi yerleri devreye girmiştir. Bu besi yerleri, Columbia base agar, 2xYT, LB Gliserol stok ve Terrific Broth'dur (bu besi yerlerinin çeşitli türevleri deneyler boyunca kullanılmıştır).

Columbia base agar hazırlanırken 39g/L (1 litre için 39g) Columbia base agar, 5g/L agar agar tek distile suya eklendikten sonra otoklavlanmıştır.

2xYT besi yerini hazırlamak için 16g/L tripton, 10g/L maya özütü ve son hacimde 86mM NaCl bulunacak şekilde tek distile suya eklendikten sonra besi yeri otoklavlanmıştır.

LB gliserol stok besiyeri 10g/L tripton, 5g/L maya özütü, 0.5g/L NaCl, 0.001N NaOH ve %30 gliserol tek distile suya eklendikten sonra otoklavlanarak hazırlanmıştır.

Terrific broth besi yeri hazırlanışı iki farklı aşamadan oluşmaktadır, ilk aşamada tek distile su içerisinde 12g/L tripton, 24g/L maya özütü ve %0,4 gliserol bir cam şişede hazırlanmıştır. İkinci aşama olarak ise 0.283M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0.717M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 'dan oluşan 1M potasyum fosfat tamponu (pH: 7.2) ayrı bir cam şişede hazırlanır. Hazırlanan iki solüsyon da karıştırılmadan otoklavlanmıştır. Otoklav ile sterilizasyon gerçekleştikten sonra aseptik kondisyonda potasyum fosfat tamponu son hacimde 0.1M olacak şekilde besiyeri şişesine eklenmiştir.

Antibiyotikli besi yerlerinin üretiminde, katı besi yerleri için antibiyotikler otoklav sonrası besi yeri biraz soğutulup, sıvı besi yerlerinde ise kullanılmadan hemen önce eklenmiştir. Kanamisin antibiyotiği suda çözüldüğü için doğrudan besi yerine eklenmiştir fakat oksitetrasiklin antibiyotiği alkolde çözünür ve direkt besi yerine eklendiğinde çökelti oluşturur. Bu sebeple oksitetrasiklin besi yerine eklenmeden önce 1 Oksitetrasiklin : 10 DMSO oranında DMSO ile çözülerek besi yerine eklenmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılmış bütün antibiyotikli besi yerleri, oksitetrasiklin için 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , kanamisin için 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  antibiyotik içermektedir.

## **Bakterilerin Kültürlenmesi ve Saklanması**

Bu tez çalışmasında kullanılan bakteriler çeşitli amaçlar ile farklı yöntemler ile farklı katı ve sıvı besi yerlerine ekilmiştir. Sıvı kültürden katı besi yerine yayma ve çizgi ekim yöntemleri ile, sıvı kültürden sıvı besi yerine, katı kültürden sıvı besi yerine ve katı kültürden katı besi yerine bakteri ekimleri farklı amaçlar ile daima aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Bakteri kültürlerinin saklanması için, aseptik koşul altında steril öze yardımcı ile katı besi yerlerinden bakteri kolonileri toplanıp 2mL'lik eppendorf tüplerde %30 gliserol içeren LB besi yerine ekilmiş ve sonuçta oluşan kültür homojen olacak şekilde resüspanse edilmiştir. Kullanılan ve üretilen bütün bakteri kültürleri LB gliserol stok besi yerine ekilerek -80°C dolabında saklanmıştır.

### **4.2.2. GENETİK DEVRENİN OLUŞTURULMASI**

#### **Insert DNA'ların Üretilmesi**

T7 RNA Polimeraz geninin PZT ile amplifikasyonu için gerekli olan gen kaynağının elde edilmesi için *E. coli* BL21 suşundan kromozomal DNA izole edilmiştir. Bu izolasyon için öncelikle, gece boyu 37°C'de *E. coli* BL21 suşu üretilmiştir. Daha sonra üretilen kültürden 1mL hücre alınıp 2mL'lik eppendorf tüpe aktarılmış ve 13.000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti 200µL lizis tamponu (tek distile steril su içerisinde 10mM TrisCl pH:7,2, 1mM EDTA ve %0,1 SDS) ile sertçe resüspanse edilerek 10 dakika kaynar suda bekletilmiştir. Kaynatma sonrasında lizis tamponu ile muamele edilmiş hücreler tekrar 13.000g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant nükleaz free bir eppendorf tüpüne alınarak -20°C'de saklanmıştır.

Bu tez çalışmasında yapılan bütün polimeraz zincir tepkimeleri için primerlerin tamamı CLC Sequence viewer ve PerlPrimer yazılımları ile gerçekleştirilmiştir. Bütün PZT deneylerinde PCR grade pipet uçları, tüpler ve su kullanılmıştır.

T7RNAP geninin *E. coli* BL21 kromozomundan amplifikasyonu için bir ileri ve bir geri primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler, Tm değerleri ve GC içerikleri Çizelge 4.13.'te verilmiştir. Primerlerin Çizelge 4.13'te sarı ile işaretli parçaları, *E. coli* BL21

kromozomundaki T7RNAP geninin başlangıç kodunu ile bitiş kodunu arasını hedeflemektedir. Renksiz olan parçalar ise daha sonra amplifiye edilen DNA parçalarının 5' ve 3' uçlarında tek zincir olarak bulunmaktadır. Bu parçalar sayesinde amplifiye edilen insert DNA'lar hedef vektöre homolog olarak SLiCE klonlama ile aktarılmıştır. fDawnT7 primeri ileri primer, rDawnT7 primeri ise geri primer olarak tasarlanmıştır.

Çizelge 4.13. T7RNAP amplifikasyonu ve pDawn vektörüne klonlanma için tasarlanan primer çifti.

| İsim    | Primerler  | Tm (°C) | %GC |
|---------|--|---------|-----|
| fDawnT7 | 5'-<br>[ctttaagaaggagatatacc>[ATGAACACGATTAACATCGC>-<br>3' | 51.8    | 40% |
| rDawnT7 | 5'-<br>[ttcgggctttgtagcagccg>[TTACGCGAACGCGAAGTCCG>-<br>3' | 62.7    | 60% |

T7RNAP geninin amplifikasyonu için fDawnT7 ve rDawnT7 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZT deneylerinin protokolü Çizelge 4.14.'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. T7RNAP geni amplifikasyonu için gerekli olan PZT karışımı konsantrasyonları.

| Materyal            | Çalışan Konsantrasyonlar |
|---------------------|--------------------------|
| dNTP                | 0,200mM                  |
| fDawnT7             | 0,200µM                  |
| rDawnT7             | 0,200µM                  |
| BL21 DNA            | 100ng                    |
| Dream Buffer        | 1X                       |
| Dream Taq Polimeraz | 1,250U                   |
| H2O                 |                          |

T7RNAP geninin PZT ile amplifikasyonu için gerekli olan PZT döngüleri sıcaklık ve süreleri Çizelge 4.15.'te verilmiştir.

Çizelge 4.15. T7RNAP geninin amplifikasyonu için gerekli olan PZT sıcaklıkları ve döngüleri.

|   | Sıcaklık (°C) | Süre    | Döngü Sayısı |
|---|---------------|---------|--------------|
| 1 | 80 °C         | Bekleme |              |
| 2 | 95 °C         | 120sn   |              |
| 3 | 95 °C         | 30sn    | x35          |
| 4 | 50 °C         | 30sn    |              |
| 5 | 72 °C         | 120sn   |              |
| 6 | 72 °C         | 300sn   |              |
| 7 | 16 °C         | Bekleme |              |

P<sub>T7</sub>-EGFP bölgesi laboratuvarında bulunan pET28a-GFP plazmidi kalıp DNA olarak kullanılarak amplifiye edilmiştir. Bu promotor gen ikilisinin PZT ile amplifikasyonu için iki çift primer tasarlanmıştır. Bu primerlerim T<sub>m</sub> ve %GC değerleri Çizelge 4.16’da verilmiştir. Primerlerin sarı ile işaretli parçaları, pET28a-GFP plazmidindeki P<sub>T7</sub> öncesi lac repressör bölgesinin başını ve EGFP geninin sonundaki N-terminalini hedeflemektedir, bu sayede P<sub>T7</sub> kontrolünde EGFP geni elde edilmektedir. Renksiz olan parçalar ise daha sonra amplifiye edilen DNA parçalarının 5’ ve 3’ uçlarında tek zincir olarak bulunmaktadır. Bu parçalar sayesinde amplifiye edilen insert DNA’lar hedef vektöre homolog olarak SLiCE klonlama ile aktarılmıştır. fT7GFP primeri ileri primer, rT7GFP primeri ise geri primer olarak tasarlanmıştır.

Çizelge 4.16. P<sub>T7</sub>+EGFP amplifikasyonu için tasarlanan primer çifti.

| İsim   | Primerler   | T <sub>m</sub> (°C) | %GC |
|--------|---|---------------------|-----|
| fT7GFP | 5'-[aaaatgagacgttgatcggc>[CATCGGTCGAGATCCCGGTGC>-3'   | 65.3                | 67% |
| rT7GFP | 5'-[agcaccctgtcgccttgcgta>[CGGATATAGTTCCTCCTTTCAG>-3' | 53.5                | 45% |

P<sub>T7</sub>-EGFP bölgesinin amplifikasyonu için fT7GFP ve rT7GFP primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZT deneylerinin protokolü Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. P<sub>T7</sub>+EGFP bölgesi amplifikasyonu için gerekli PZT karışımı konsantrasyonları

| Materyal            | Çalışan Konsantrasyonlar |
|---------------------|--------------------------|
| dNTP                | 0,200mM                  |
| fT7GFP              | 0,200µM                  |
| rT7GFP              | 0,200µM                  |
| pET28a-GFP          | 100ng                    |
| Dream Buffer        | 1X                       |
| Dream Taq Polimeraz | 1,250U                   |
| H <sub>2</sub> O    |                          |

P<sub>T7</sub>+EGFP bölgesinin PZT ile amplifikasyonu için gerekli olan PZT döngüleri sıcaklık ve süreleri Çizelge 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.18. P<sub>T7</sub>+EGFP bölgesi amplifikasyonu için gerekli olan PZT sıcaklıkları ve döngüleri.

|   | Sıcaklık (°C) | Süre    | Döngü Sayısı |
|---|---------------|---------|--------------|
| 1 | 80 °C         | Bekleme |              |
| 2 | 95 °C         | 120sn   |              |
| 3 | 95 °C         | 30sn    | x35          |
| 4 | 51 °C         | 30sn    |              |
| 5 | 72 °C         | 90sn    |              |
| 6 | 72 °C         | 300sn   |              |
| 7 | 16 °C         | Bekleme |              |

T7RNAP ve P<sub>T7</sub>+EGFP amplifikasyonları için Dream Taq DNA polimeraz (New England Biolabs) tercih edilmiştir. Tampon olarak Dream Taq polimerazın kendine özgü tamponu olan Dream Buffer (New England Biolabs) tamponu kullanılmıştır. Bu tamponun içerisinde PZT için gerekli olan MgCl<sub>2</sub> bulunduğundan PZT karışımlarına fazladan MgCl<sub>2</sub> eklenmemiştir. PZT’nin gerçekleşmesi için karışımlara 0,200mM dNTP eklenmiştir.

Bütün PZT ürünleri silika spin kolonlar (Promega™) ile saflaştırılmıştır. Spin kolonlarda bulunan silika filtrelere DNA’nın bağlanması için bağlanma tamponu olarak Guanidin-HCl tabanlı bir bağlanma tamponu hazırlanmıştır. Bu tampon, 4,5M Guanidin-HCl, 50mM NaCl, 1X Bromtimol mavisi ve 21,5mM Na-Asetat (pH: 5,2)’tan oluşmaktadır. 150µl PZT ürünü DNA ile 224.69µl bağlanma tamponu pipetleme ile karıştırılarak silika filtre içeren spin

kolona yüklenmiştir. DNA yüklenen spin kolon daha sonra 3,000g ivmede 30sn santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpünde toplanan sıvı bir kez daha yüklenerek bu santrifüj aşaması tekrarlanmıştır. Daha sonra toplama tüpünde toplanan sıvı atılır ve spin kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Silika filtre bu aşamaların ardından bir kere 500µl %100 isopropanol ile 6.000g ivmede 30 sn santrifüj edilmiştir. Bu yıkamanın ardından alkol kontaminasyonunu engellemek adına tekrar toplama tüpü değiştirilmiş ve spin kolon 500µl %70 isopropanol ile 6.000g ivmede 30sn santrifüj edilerek yıkanmıştır. Bu aşama toplama tüpü değiştirilerek bir kez daha tekrarlanmıştır. Daha sonra tekrar toplama tüpü değiştirilerek silika filtre 13.000g ivmede 5 dakika santrifüj edilerek kurutulmuştur. Silika filtreyi içinde kalmış olabilecek olan alkolden tamamen uzaklaştırmak için silika kolonlar 37°C etüvün tabanında yan olarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra silika kolonlara DNA'yı toplamak için 40µl nükleaz free su eklenmiş ve önce 6.000g ivmede 30sn daha sonra 10.000g ivmede 1 dakika santrifüj edilerek DNA saf bir halde.

Silika filtreler kullanılmadan önce ve kullanıldıktan sonra 800µl su ile en az iki kere yıkanarak temizlenmiştir.

Saflaştırılan PZT ürünlerinin daha sonra Nanodrop cihazında miktarları ve saflık düzeyleri ( $A_{260/280}$ ,  $A_{260/230}$ ) tayin edilmiştir.

### **Vektörlerin Çoğaltılması ve Klonlama için Kesilmesi**

pDawn ve pACYC184 vektörleri laboratuvarında bu çalışma öncesi, az miktarda ya bir membrana emdirilmiş ya da -20°C dolabında düşük hacimde saklanmıştır. Bu vektörlerin çoğaltılması için, iki vektör de *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edilmiş ve -80°C dolabında stoklanmıştır. Transformasyon deneylerinde tüm işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

*E. coli* DH5α hücreleri transformasyonu için TSS ile kimyasal transformasyon yöntemi tercih edilmiştir. TSS (transformation & storage solution), son hacimde %10' PEG 6k, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> olacak şekilde hazırlanır ve +4°C dolabında saklanır. Gece boyu üretilen DH5α hücreleri 25mL 2xYT besiyeri içerisinde 0.1 OD'den başlatılarak 0.4-0.86 OD'ye kadar üretilmiştir. Daha sonra 0.4-0.6 OD'de kültürden 2mL alınarak 2mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve tüpler 10.000g ivmede 60-90sn santrifüj edilmiştir.

950µl TSS stoğuna 50µl DMSO eklenerek kullanılacak TSS+DMSO çözeltisi hazırlanmıştır. Ucu kor haline gelmiş bisturi ile kesilen 200µl'lik pipet ucu ile transformasyon başına 100µl TSS+DMSO çözeltisi hücre pelletine eklenmiş ve pellet resüspanse edilmiştir. Bu işlemin hemen ardından hücre-TSS+DMSO süspansiyonuna 1ng-5ng arası vektör (pDawn ya da pACYC184) eklenmiş ve hücreler 45 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. 45 dakikanın ardından hücreler 42°C'de 30 saniye ısı şokuna uğratılmıştır. Daha sonra hücreler 15mL'lik falkon tüplere alınıp tüplere 2mL 2xYT besiyeri eklenmiştir. 2xYT eklendikten sonra hücreler 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tekrar 2mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak 10.000g ivmede 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletlere 200µl 2xYT eklenerek hücre peletleri resüspanse edilmiştir. Son olarak resüspanse edilen hücreler vektörlerin içerdiği antibiyotik direnç kasetlerine uyumlu olacak şekilde antibiyotikli katı besiyerlerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. pDawn plazmidi transforme edilen hücreler ColK50 (Columbia Agar Kanamycin 50µg/mL besi yerlerine, pACYC184 plazmidi transforme edilen hücreler ise ColT20 (Columbia Agar Tetracycline 20µg/mL) besi yerlerine ekilmiştir. Ekim gerçekleştikten sonra plaklar 37°C'de bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün üremeler kontrol edilmiştir.

Vektörlerin çoğaltılması için plaklarda üreyen kolonilerden seçilerek içerdiği vektöre göre antibiyotik içeren 10-25mL sıvı besi yerine bu koloniler ekilmiş ve bakteriler bir gece 37°C etüvde üremeye bırakılmıştır.

Bir gece üremenin ardından alkalen lizis plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Alkalen lizis plazmid izolasyonu için öncelikle önceki gece üreyen bakteri kültürü 50mL'lik falkona alınmış ve 2.000g ivmede 20dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti 200µL alkalen lizis 1 (50mM Glukoz, 25mM pH:8 Tris-HCl, 10mM pH:8 EDTA) çözeltisinin içinde resüspanse edilmiştir. Daha sonra sırasıyla süspansiyona taze hazırlanmış 400µL alkalen lizis 2 (0.2N NaOH, %1 SDS) çözeltisi ve 300µl alkalen lizis 3 (3M K-Asetat, 2M Asetik Asit) çözeltisi eklenmiş ve her çözelti eklendiğinde nazikçe karıştırılmıştır. Çözeltiler eklendikten sonra hücre süspansiyonu buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra 2mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne süspansiyon aktarılmış ve tüpler +4°C'de 17.000g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 600µL alınmış ve nükleaz free bir mikrosantrifüj tüpüne nükleaz free uçla eklenmiştir. Bu aşamadan



sonra kullanılan tüpler ve pipet uçları daima nükleaz free olarak tercih edilmiştir. 600µL süpernatanta eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol eklenmiş ve iyice karışana kadar sertçe vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler +4°C’de 17.000g ivmede 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj basamağından sonra tüpte oluşan fazlardan üst faz, diğer fazlar alınmadan temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Temiz bir tüpe aktarılan üst sıvıya 600µL soğuk izopropanol eklenmiş ve tüp vortekslenmiştir. Daha sonra tüpler +4°C’de 17.000g ivmede 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpten süpernatant uzaklaştırılır ve pellet önce %99,6’lık EtOH ve daha sonra %70’lik EtOH ile santrifüj edilerek yıkanmıştır. Son olarak %70’lik EtOH uzaklaştırılır ve pellet herhangi bir alkol kontaminasyonunun önüne geçmek amacıyla tüpün kapağı açık bir şekilde 37°C etüv tabanında 30 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak alkol tamamen uçurulduktan sonra (pellet rengi şeffaflaştığında), 30µL 20µg/mL DNase free RNase ile pellet çözülmüştür. İzole edilen plazmid miktarı ve saflık düzeyi (A<sub>260/280</sub>, A<sub>260/230</sub>) Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür.

Plazmidler izole edildikten sonra, enzim kesimi için PEG ile çöktürülerek saflaştırılmıştır. PEG çöktürme için 15µL izole edilen plazmid, 185µL nükleaz free su ile karıştırılarak DNA çözeltisi oluşturulmuştur. 200µL DNA çözeltisine, 77,78µL çöktürme çözeltisi eklenmiştir. Çöktürme çözeltisi 5mM pH: 8,2 TrisCl, 0,5mM EDTA, %13 PEG 6000 ve 10mM MgCl<sub>2</sub> içermektedir ve bu tarife taze olarak hazırlanmıştır. DNA çözeltisine çöktürme çözeltisi eklendikten sonra pipetleme yöntemi ile çözeltiler 2mL’lik geniş tabanlı mikrosantrifüj tüpünde karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüpler oda sıcaklığında 20 dakika 16.000g ivmede santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 500µL %70’lik EtOH ile yıkanmıştır. Yıkama aşaması iki kez tekrar edilmiştir. Son olarak pellet herhangi bir alkol kontaminasyonunun önüne geçmek amacıyla tüpün kapağı açık bir şekilde 37°C etüv tabanında 30 dakika inkübe edilmiştir. Alkolün uçtuğundan emin olunduktan sonra pellet 20µL nükleaz free su ile çözülmüştür. Son olarak Nanodrop cihazında saflaştırılan plazmidin konsantrasyonu ve saflık düzeyi (A<sub>260/280</sub>, A<sub>260/230</sub>) ölçülmüştür.

İzole edilen ve saflaştırılan bütün DNA örnekleri -20°C dolabında saklanmıştır.

SLiCE klonlama için kullanılan vektörler kullanım öncesinde halkasal yapıdan lineer yapıya dönüştürülmelidir. Bu amaçla kullanılan iki vektör pDawn ve pACYC184 tek restriksiyon

endonükleaz ile kesilmiştir. Lineerizasyon için kullanılacak olan restriksiyon endonükleaz enzimi olarak *EcoRI* (New England Biolabs) tercih edilmiştir. *EcoRI*'ın enzim olarak seçilmesinin sebebi, pDawn ve pACYC184 vektörlerini tek noktadan kesmesidir. Bu sayede seçilen vektörlerden bölge kaybı olmadan lineerizasyon gerçekleşmektedir. Aynı zamanda iki plazmiddeki *EcoRI* kesim bölgeleri de SLiCE klonlama ile hedeflenecek homolog bölgelerin arasında bulunmaktadır. Bu da SLiCE klonlama için tercih edilen verim arttıracak önemli bir kriterdir. Aynı zamanda insertlerin (T7RNAP ve P<sub>T7</sub>+EGFP) dizilerinde seçilen restriksiyon enzimi *EcoRI*'ın kesim bölgesi bulunmamaktadır, bu da klonlama esnasında *in vitro* ortamda bu *EcoRI* enziminin klonlanacak insertleri kesmeyeceğini ve deney sonucuna etki etmeyeceğini garantilemektedir. *EcoRI* enzimi bu kriterlerin hepsi göz önünde bulundurularak tercih edilmiştir.

Tek enzim kesimi 0.2mL'lik PZT tüplerinde ve *EcoRI* enziminin optimum çalışma sıcaklığı 37°C olduğundan kesim inkübasyonu 37°C'lik etüvde gerçekleştirilmiştir. Bütün kesim deneyleri inkübasyon süreleri hariç buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

pDawn plazmidinin kesimi için total hacim 25µL olarak tercih edilmiştir ve bu hacimde kesilebilecek maksimum plazmid miktarı 25µg olarak (elimizdeki saflaştırılan pDawn konsantrasyonuna göre) hesaplanmıştır. 25µg plazmid için tüp içerisinde 1x NEBufferII tamponu, 2x BSA, 20U *EcoRI* karıştırılmış ve beklemeden 37°C etüvde 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

pACYC184 plazmidinin kesimi için total hacim 25µL olarak tercih edilmiştir ve bu hacimde kesilebilecek maksimum plazmid miktarı 7,64µg olarak (elimizdeki saflaştırılan pACYC184 konsantrasyonuna göre) hesaplanmıştır. 7,64µg plazmid için tüp içerisinde 1x NEBufferII tamponu, 2x BSA, 20U *EcoRI* karıştırılmış ve beklemeden 37°C etüvde 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

### **SLiCE Lizatının Hazırlanması ve SLiCE Klonlama ile Genetik Devrenin Tamamlanması**

SLiCE klonlama için gerekli olan enzimleri elde etmek amacıyla SLiCE lizatu, pKD46 plazmidi içeren *E. coli* JM109 kültüründen elde edilmiştir. pKD46 plazmidi içeren *E. coli* JM109 kültürü gece boyu 37°C'ye ayarlanmış çalkalamalı etüvde üretilmiştir. Ertesi gün

gece boyu üreyen kültür seyreltilerek 0.03 OD'den tekrar ampisilin antibiyotiği içeren 50mL 2xYT besiyerinde 37°C'de üremeye bırakılmıştır. Kültür 5-5,5 OD'ye ulaştığında %0,2 L-(+)-arabinoz ile indüklenmiştir. İndüksiyon sonrası kültür çalkalanarak 2 saat daha 37°C'de  $\lambda$  prophage protein red üretimi için üremeye bırakılmıştır. Üretimin 2 saati tamamlandığında bütün kültür iki farklı 50mL'lik falkona alınıp +4°C'de 5.000g ivmede 20 dakika santrifüj edilmiştir ve sonuç olarak süpernatantlar tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra daima buz üzerinde çalışılmıştır. Pelletler 50mL çift distile su ile resüspanse edilmiş ve daha sonra süspansiyonlar tekrar +4°C'de 5.000g ivmede 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar tekrar tamamen uzaklaştırılmış ve pelletlerin ağırlığı falkonun darası alınarak ölçülmüştür. Toplanan 0,25g pellet başına taze hazırlanmış 600 $\mu$ L %3 Triton X-100 ve 50mM TrisCl (pH: 8) içeren lizis tamponu eklenmiş, pelletler yavaşça resüspanse edilmiş ve kültürler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra süspansiyon 1.5mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve hücre birikintilerini çöktürmek amacıyla +4°C'de 17.000g ivmede 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar pellete dokunmadan temiz 1.5mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve süpernatantlara eşit hacimde %100'lük gliserol eklenmiş ve karıştırılmıştır. Son olarak elde edilen lizatlar 40-60 $\mu$ L'lik alikotlar halinde 0.5 $\mu$ L'lik PZT tüplerinde kısa süreli olmak üzere -20°C, uzun süreli olmak üzere -80°C dolabında saklanmıştır. Sonuç olarak 10x SLiCE lizatları elde edilmiştir (50,61).

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen bütün SLiCE yöntemleri verimi yüksek tutmak amacıyla transformasyon deneyleri ile aynı gün transformasyon deneyinin hemen öncesinde gerçekleştirilmiştir. Bütün SLiCE klonlama deneyleri 37°C'de inkübasyon hariç buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Klonlama deneylerinde transforme edilecek hücre olarak *E. coli* DH5 $\alpha$  hücreleri ve bu hücrelerin transformasyonu için TSS (bkz. ile kimyasal transformasyon yöntemi tercih edilmiştir.

pDawT plazmidinin üretimi için *Eco*RI enzimi ile kesilmiş pDawn plazmidi ve SLiCE için gerekli olan pDawn plazmidine homolog kuyruklara sahip T7RNAP geni birleştirilmiştir. Klonlama deneyleri için öncelikle pDawn ve pATG plazmit konsantrasyonları ve T7RNAP ve P<sub>T7</sub>+EGFP insert konsantrasyonları ng/ $\mu$ l biriminden pmol/ $\mu$ l birimine formül kullanılarak çevrilmiştir.

$$pmol\ DNA = \frac{\mu g\ DNA \times pmol}{660\ pg} \times \frac{10^6\ pg}{1\ \mu g} \times \frac{1}{DNA\ uzunlu\u{g}u}$$

Klonlama *E. coli* DH5 $\alpha$  hücresi 0.4-0.5 OD'ye ulaştığında başka bir tüpte gerçekleştirilir. Bu sayede SLiCE reaksiyonu gerçekleştiği zaman beklemeden üretilen plazmidlerin hücrelere transformasyonu gerçekleştirilmiştir.

pDawT plazmidinin üretimi için 0,2mL'lik nükleaz free PZT tüpünde pDawT plazmidini üretimi için toplam hacim 8,55 $\mu$ L olacak şekilde, 1:2 vektör:insert oranında olması için 0,08pmol *Eco*RI ile kesilmiş pDawn, 0.016pmol T7RNAP karıştırılmış, 1x SLiCE lizati, 1X T4 DNA ligaz tamponu alikotu ile karıştırılmıştır. T4 DNA ligaz tamponu eklenmeden önce tüp dibinde biriken çökeltilerin karışması için iyice vortekslenmiştir.

pATG plazmidini üretimi için ise toplam hacim 10,10 $\mu$ L olacak şekilde, 1:2 vektör:insert oranında olması için 0,135pmol *Eco*RI ile kesilmiş pACYC184, 0,27pmol P<sub>T7</sub>+EGFP karıştırılmış, 1x SLiCE lizati, 1X T4 DNA ligaz tamponu alikotu ile karıştırılmıştır. T4 DNA ligaz tamponu eklenmeden önce tüp dibinde biriken çökeltilerin karışması için iyice vortekslenmiştir.

Daha sonra tüpler 15 dakika boyunca 37°C etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 5. dakikasında transforme edilmek üzere üretilen hücrelerden (0.4-0.6 OD arasında) 2mL alınarak 2mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve tüpler 10.000g ivmede 60-90sn santrifüj edilmiştir. 950 $\mu$ L TSS stoğuna 50 $\mu$ L DMSO eklenerek kullanılacak TSS+DMSO çözeltisi hazırlanmıştır. Ucu kor haline gelmiş bisturi ile kesilen 200 $\mu$ L pipet ucu ile transformasyon başına 100 $\mu$ L TSS+DMSO çözeltisi hücre pelletine eklenmiş ve pellet resüspanse edilmiştir. Bu işlemin hemen ardından hücre-TSS+DMSO süspansiyonuna 5ng SLiCE klonlanan vektör (pDawT ya da pATG) eklenmiş ve hücreler 45 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. 45 dakikanın ardından hücreler 42°C'de 30 saniye ısı şokuna uğratılmıştır. Daha sonra hücreler 15mL'lik falkon tüplere alınıp tüplere 2mL 2xYT besiyeri eklenmiştir. 2xYT eklendikten sonra hücreler 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler tekrar 2mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak 10.000g ivmede 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletlere 200 $\mu$ L 2xYT eklenerek hücre pelletleri resüspanse edilmiştir. Son olarak resüspanse edilen hücreler vektörlerin içerdiği

antibiyotik direnç kasetlerine uyumlu olacak şekilde antibiyotikli katı besiyerlerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. pDawT plazmidi transforme edilen hücreler ColK50 (Columbia Agar Kanamycin 50µg/mL besi yerlerine, pATG plazmidi transforme edilen hücreler ise ColT20 (Columbia Agar Tetracycline 20µg/mL) besi yerlerine ekilmiştir. Ekim gerçekleştikten sonra plaklar 37°C’de bir gece inkübe edilmiş ve ertesi gün üremeler kontrol edilmiştir.

Klonlama ve transformasyon deneyleri sonucunda ekilen plaklarda kolonilerin bir gece inkübasyon sonrası ürediği görülmüş ve transformasyonun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bunun üzerine üreyen koloniler DNA kaynağı olarak kullanılarak klonlamanın kontrolü için pDawT için DreamTaq polimeraz kullanılarak pATG için ise Phusion polimeraz kullanılarak koloni PZT yöntemi uygulanmıştır. Koloni PZT deneyleri için insert DNA amplifikasyonunda kullanılan primer setleri insert ettiğimiz bölgeyi amplifiye edebildiğimizi kontrol etmek için aynen kullanılmıştır. Konvansiyonel PZT deneylerinden farklı olarak PZT tüplerine ilk olarak 5µL PZT düzeyi nükleaz free su eklenmiş ve her tüpe farklı koloni olmak üzere pipet ucu ucu ile koloniler alınmış ve tüplerde resüspanse edilmiş ve pipet uçları atılmadan plazmid antibiyotik direnç kasetine göre ColK50 ya da ColT20 besi yerlerine pipet uçları ile önceden işaretli bölgelere imprinting gerçekleştirilmiştir. Bu sayede PZT sonucunda hangi kolonide klonlama gerçekleştiği takip edilmiştir. Daha sonra tüplere her tüpteki son hacim 15µL olacak şekilde PZT karışımları eklenmiştir (Çizelge 4.19.).

Çizelge 4.19. Klonlama kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZT’nin karışımları ve çözeltilerin konsantrasyonları.

| pDawT               |                          | pATG               |                          |
|---------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| Materyal            | Çalışan Konsantrasyonlar | Materyal           | Çalışan Konsantrasyonlar |
| dNTP                | 0,300mM                  | dNTP               | 0,200mM                  |
| fDawnT7             | 0,300µM                  | fT7GFP             | 0,200µM                  |
| rDawnT7             | 0,300µM                  | rT7GFP             | 0,200µM                  |
| pDawT Kolonisi      | 5µL Hücre Süspansiyonu   | pATG Kolonisi      | 5µL Hücre Süspansiyonu   |
| Dream Buffer        | 1X                       | Phusion HF Buffer  | 1X                       |
| Dream Taq Polimeraz | 0,400U                   | Phusion Polymerase | 0,300U                   |
| H2O                 |                          | H2O                |                          |

pATG plazmidi için koloni PCR deneylerinde ilk olarak Dream Taq polimeraz kullanılmış fakat nonspesifik bantlar alınmıştır ve bu sorunun önüne bağlanma sıcaklığı arttırılarak

geçilebileceği düşünülmüştür. Bu sebeple bağlanma sıcaklığı çok yüksek sıcaklıklarda çalışan Phusion polimeraz enzimi kullanılarak koloni PZT deneyi pATG plazmidi için tekrarlanmıştır. pDawT ve pATG plazmidlerinin kontrolü için gerekli olan koloni PZT basamak sıcaklıkları ve döngüleri Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. Klonlama kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZT’nin sıcaklıkları ve döngüleri.

| pDawT |               |         |              | pATG |               |         |              |
|-------|---------------|---------|--------------|------|---------------|---------|--------------|
|       | Sıcaklık (°C) | Süre    | Döngü Sayısı |      | Sıcaklık (°C) | Süre    | Döngü Sayısı |
| 1     | 80 °C         | Bekleme |              | 1    | 80 °C         | Bekleme |              |
| 2     | 95 °C         | 120sn   |              | 2    | 98 °C         | 120sn   |              |
| 3     | 95 °C         | 30sn    | x35          | 3    | 98 °C         | 10sn    | x35          |
| 4     | 50 °C         | 30sn    |              | 4    | 62 °C         | 30sn    |              |
| 5     | 72 °C         | 120sn   |              | 5    | 72 °C         | 90sn    |              |
| 6     | 72 °C         | 300sn   |              | 6    | 72 °C         | 300sn   |              |
| 7     | 16 °C         | Bekleme |              | 7    | 16 °C         | Bekleme |              |

#### **PZT Deneylerinin, DNA İzolasyonlarının, Saflaştırmalarının ve Kesimlerinin Kontrolü: Agaroz Jel Elektrofrez**

Bu tez çalışmasında yapılan bütün PZT deneylerinin, plazmid izolasyonlarının, DNA/plazmid saflaştırmalarının ve plazmid kesimlerinin kontrolü agaroz jel elektrofrez tekniği ile sağlanmıştır. Bu tez çalışmasında analiz edilen en kısa DNA molekülü 2535 baz çifti uzunluğuyla P<sub>T7</sub>+EGFP bölgesi olup en uzun DNA molekülü ise 7929 baz çifti uzunluğuyla pDawT plazmididir ve iki DNA molekülü için de kullanılabilir optimum agaroz jel agaroz konsantrasyonu %1 w/v (g/mL, agaroz/1xTAE) olarak tercih edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada %1’lik agaroz jeller kullanılmıştır. Koloni PZT deneyleri hariç tüm DNA molekülleri jel kuyularına 4:1 (DNA:6xLoadingDye) oranında toplam hacim 5µL olacak şekilde yüklenmiştir. Koloni PZT deneylerinde ise PZT sonucunda tüplerde olan 15µL ürüne 5µL 6x Loading Dye eklenerek kuyulara 20µL yükleme gerçekleştirilmiştir.

Kullanılmamış agaroz jeller +4°C dolabında kısa süreliğine 1xTAE tamponu içerisinde daha sonra kullanmak amacıyla saklanmıştır. Bütün agaroz jeller 1xTAE tamponu içerisinde 80-100V arasında yürütülmüştür ve yürütme süresi de voltaja bağlı olarak değişkenlik göstermiştir.

### **pDawT ve pATG Plazmidlerinin *E. coli* DH5 $\alpha$ Hücrelerine Aktarılması**

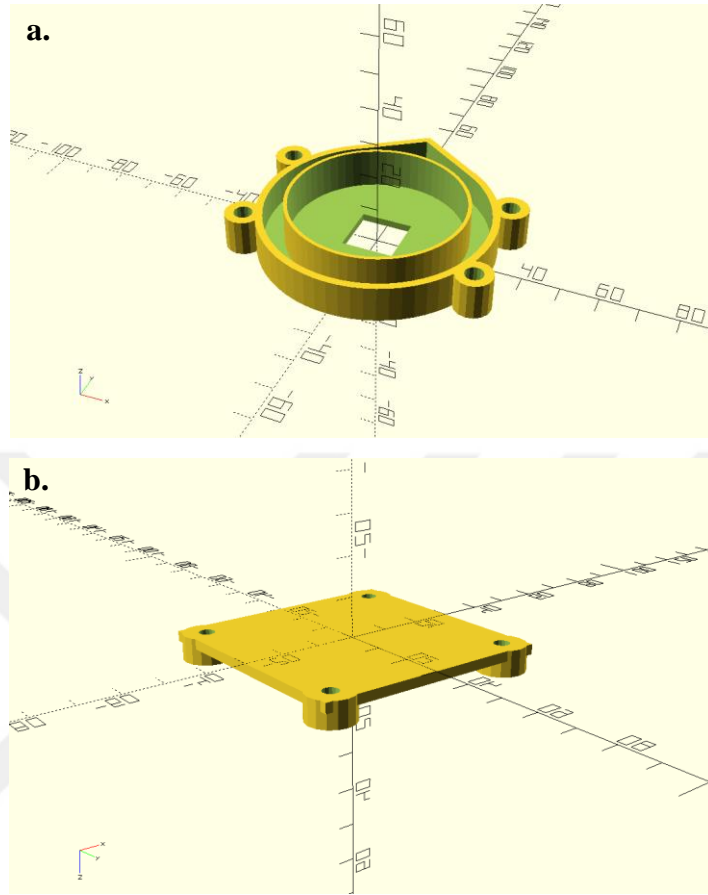
Koloni PZT deneylerinden pozitif sonuç alındıktan sonra pozitif koloniler gerekli antibiyotiği içeren 2xYT sıvı besi yerinde gece boyu üremeye bırakılmış ve ertesi gün bu kültürlerden alkalen lizis plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

pDawT ve pATG plazmidlerinin izolasyonları gerçekleştirildikten sonra, bir *E. coli* DH5 $\alpha$  kültürü gece boyu bu plazmidlerin ko-transformasyonu için üremeye bırakılmıştır. Ko-transformasyon deneyi ertesi gün TSS ile kimyasal transformasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ko-transformasyonun bu tez çalışmasındaki diğer transformasyon yöntemlerinden tek farkı, hücreler TSS+DMSO ile muamele edildikten hemen sonra pDawT ve pATG plazmidleri aynı hücrelere, her plazmid 1-5ng olacak şekilde eklenmiştir ve dolayısıyla transformasyonun en son basamağı olan katı besiyerine hücre ekimi sırasında hücreler iki plazmidin de antibiyotik direncine uygun ColTK (20 $\mu$ g/ml Tetrasiklin, 50 $\mu$ g/ml Kanamisin içeren Columbia Base Agar) katı besiyerine ekilmiştir. Daha sonra hücreler LB gliserol stok besiyerinde -80°C dolabında saklanmıştır.

### **4.2.3. ~400NM UZUN DALGA UV FERMENTÖR SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI**

Fermentör sistemi, hücreler 50mL'lik beherlerde olacak şekilde tasarlanmıştır. Öncelikle 3D yazıcıdan beherin manyetik karıştırıcının üzerinde duracağı plaka ve beherin ağzında led lambayı ve led lambanın soğutucusunu bulunduran bir kapak basılmıştır (Şekil 4.5). Basılacak tasarımlar OpenSCAD programında Ek 2'de verilen kodlar ile tasarlanmıştır. Basılan parçalar daha sonra sistemde gerekli yerlere vidalanmıştır. Manyetik karıştırıcı olarak basit bir fan'ın merkezinde bulunan parçaya iki farklı kutuplar olacak şekilde

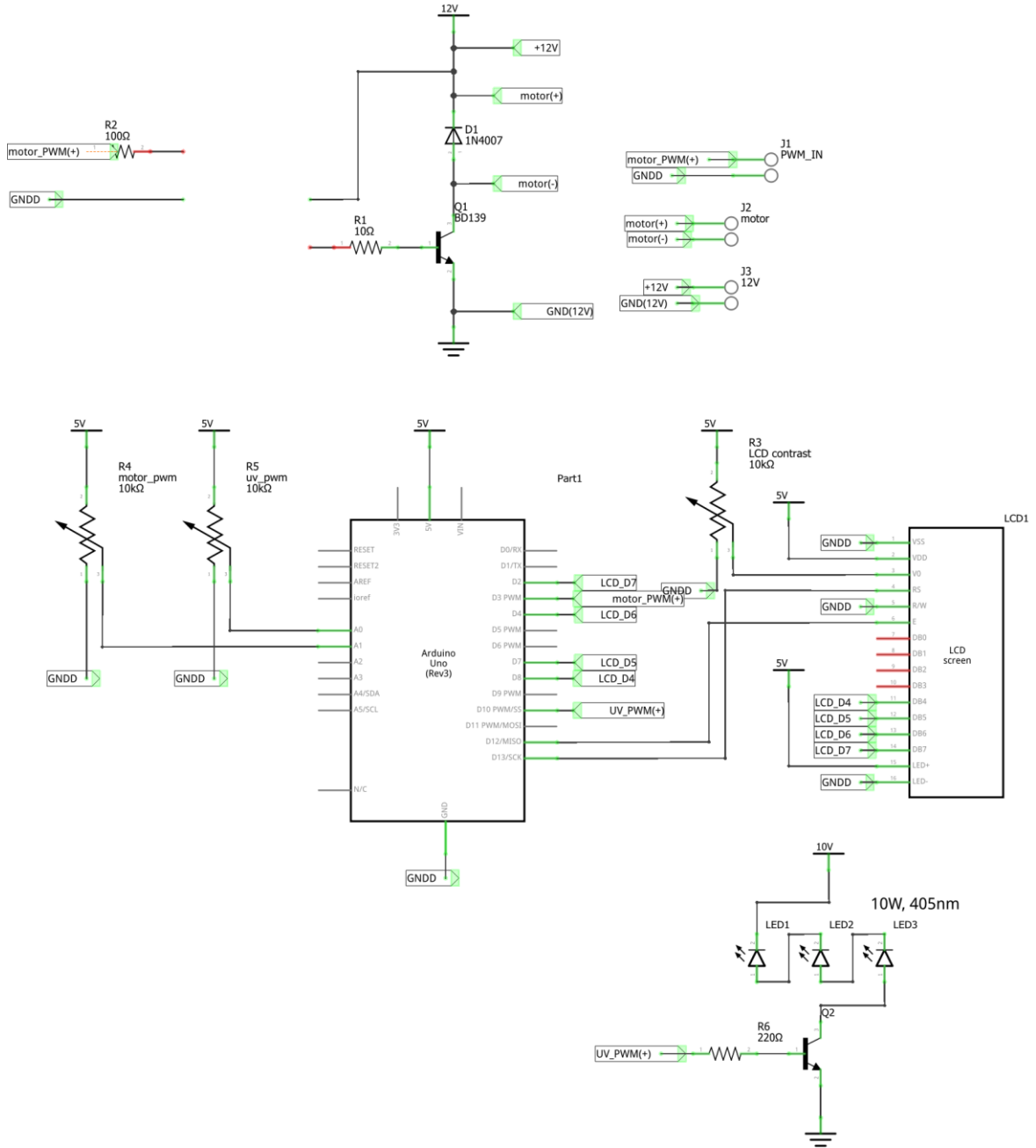
neodyum mıknatıslar takılmıştır. Bu sayede bakteri kültürleri, steril manyetik balık kullanılarak daima karıştırılabilmektedir.



Şekil 4.5. 3D basılan (a) beher kapağı.ve (b) manyetik karıştırıcı tepsisi

Daha sonra sistem bir devre tahtası üzerinde şematiği göre devre tasarlanmış ve bir araya getirilmiştir. Şekil 4.6'deki Fritzing programında çizilmiş, UV fermentör sistemi bir araya getirilirken kurulan devre tasarımını verilmiştir.



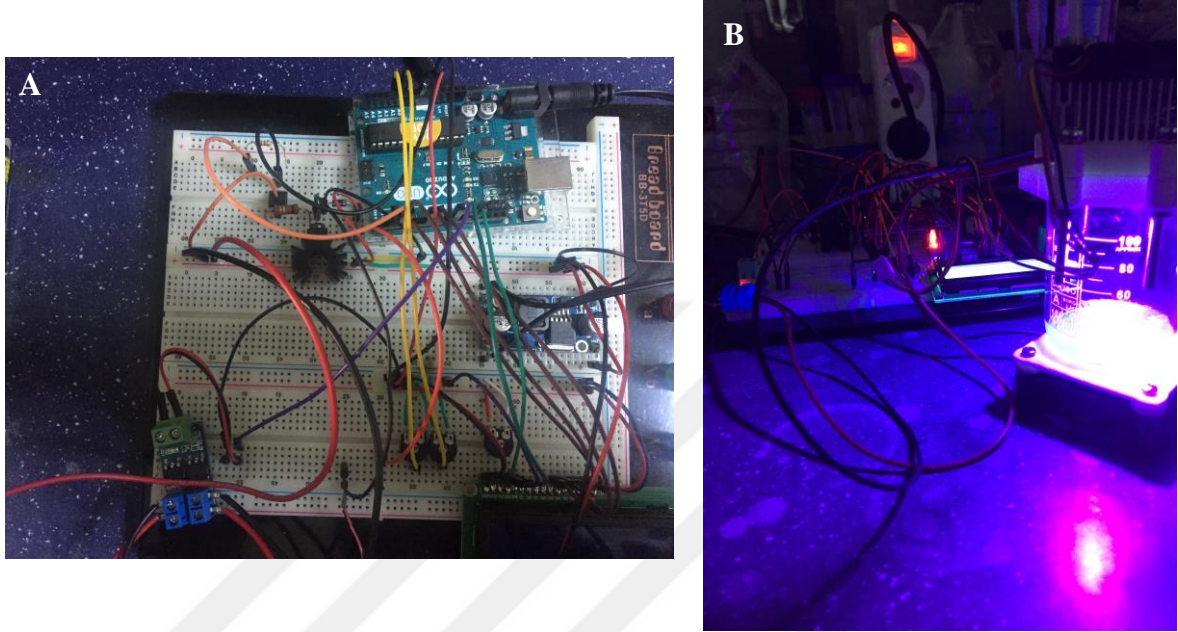


fritzing

Şekil 4.6. UV fermentör sisteminin Fritzing programında çizilen devre tasarımı

Daha sonra Arduino UNO mikrokontrollörüne, “pulse width modulation” tekniği ile UV yoğunluğu ve manyetik karıştırıcının gücünü ayarlayabilmemizi sağlayacak kod yüklenmiştir. Yazılan Arduino kodu, LED ekranda; LED lambadan kültüre verilen UV'nin yoğunluğunun ve manyetik karıştırıcının dönme hızının geri bildirimini de sağlamaktadır. Arduino IDE’de devrenin çalışması için yazılan kod Ek 3’de verilmiştir.

Şekil 4.7’de de devrenin son hali ve çalışırken çekilmiş fotoğrafları bulunmaktadır. Devrede bulunan potansiyometreler ile UV’nin yoğunluğu ve motorun hızı ayarlanabilmektedir. Işğın kültüre temasında cam ya da plastik herhangi bir engel olmaması için ışık 3D basılan kapaktan kültüre sağlanmıştır. Işık kaynağı LED lambanın ısınmaması için, bilgisayar işlemcisi soğutucusu LED’in bulunduğu kapağı monte edilmiştir.



Şekil 4.7. UV fermentör sistemi (A) elektrik devresi (B) çalışırken

#### 4.2.4. ~400NM UZUN DALGA UV İLE EGFP ÜRETİMİ VE GENETİK DEVRENİN KONTROLÜ

EGFP üretim deneyleri 2.3.6. başlığında açıklanan deney tasarımına uyarak gerçekleştirilmiştir. ~400nm uzun dalga UV ile indüklenmek için *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücreleri bir gün önceden gece boyu üreme için 20 $\mu$ g/ml Tetrasiklin, 50 $\mu$ g/ml Kanamisin içeren 5mL 2XYT besi yerinde falkonlar herhangi bir ışık indüksiyonunu engellemek amacıyla alüminyum folyo ile sarılarak 37°C’deki çalkalamalı etüvde çalkalanmıştır. Bir gece üreme sonunda hücreler 20 $\mu$ g/ml Tetrasiklin, 50 $\mu$ g/ml Kanamisin içeren 20mL Terrific Broth besi yerinde 0.1 OD yoğunluğa ayarlanıp herhangi bir ışık indüksiyonunu engellemek amacıyla üremenin gerçekleştiği cam balonlar alüminyum folyo ile sarılarak tekrar 37°C’deki çalkalamalı etüvde üretime başlatılmış ve hücreler 0,8 OD’ye geldiklerinde cam balondan 50mL’lik steril behere alınmıştır. Daha sonra beherdeki hücreler, ~400nm uzun dalga UV ışık sistemine konularak indüklenmiştir. Hücreler 20/255

UV, 40/255, 80/255, 100/255 UV yoğunluklarında olmak üzere 4 farklı deney grubu tasarlanmıştır. İndüklenme sonrası 12 saate kadar her 2 saatte bir OD ölçümü gerçekleştirilmiş, 0. saat, 6. saat, 12. saat ve 24. saatlerde de hücrelerden OD ölçümünün yanı sıra 2mL alınıp 10.000g ivmede 2 dakika santrifüj edilmiştir ve elde edilen pelletler -20°C dolabında protein izolasyonu için saklanmış ve tekrar aynı saatlerde üremeye devam eden hücrelerden steril su ile 1:10 ve 1:100 dilüsyonlar yapılarak iki bölgeye ayrılmış lamlara 1µL damlatılmıştır. Hücre dilüsyonlarının bulunduğu damlalar kuruduktan sonra, %99,8 MeOH ile hücrelerin lama fiksasyonu gerçekleştirilmiş ve lam saklama kutusuna kaldırılmıştır. 0. saatte hücrelere aynı yöntemlerin uygulanmasının sebebi ise indüklenme öncesi bakterilerdeki EGFP üretiminin kontrolüdür.

Pozitif kontrol olarak pET28aGFP ve pGLO plazmidleri kullanılmıştır. Bu plazmidler farklı IPTG ve arabinoz konsantrasyonları ile indüklenmiştir. pET28aGFP plazmidini içeren *E. coli* BL21 hücreleri 0.1 OD'de sırasıyla, 0.05mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM ve 1mM konsantrasyonlarında IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenmiş ve floresan mikroskop altında görüntülenmek için lamlara fikse edilmiştir. pGLO plazmidini içeren *E. coli* BL21 hücreleri ise 0.1OD'de 0.67mM, 1.33mM, 3.33mM, 6.66mM ve 13.3mM konsantrasyonlarında arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenmiş ve floresan mikroskop altında görüntülenmek için lamlara fikse edilmiştir.

### **Hücrelerin Görüntülenmesi**

Bütün UV yoğunluklarındaki üretim deneyleri tamamlandıktan sonra, hücre fikse edilmiş lamlar aynı gün içerisinde Zeiss Axio Imager M1 floresan mikroskopunda FITC filtresinde 10x, 20x ve 40x büyütmelemlerde görüntülenmiş ve görüntüler daha sonra analiz için kaydedilmiştir.

### **Toplam Protein İzolasyonu ve EGFP Saflaştırması**

Protein izolasyon deneyleri inkübasyon süreleri hariç daima buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Üretim deneyleri sürecinde elde edilen hücre pelletlerinden ve SDS page deneylerinde referans bant görebilmek adına EGFP saflaştırması için -20°C dolabında bulunan EGFP üretilmiş hücre pelletlerinden total protein izolasyonu için %0,5 Triton X-100, %0,5 Tween-20, 50mM pH:8 TrisCl, 250mM NaCl, %10 Gliserol ve 10mM β-

merkaptotanol'den oluşan bir deterjan karışımı hazırlanmıştır. Hücre pelletleri öncelikle 700µL su içerisinde pipetleme yöntemi ile resüspanse edilmiş ve daha sonra 5mL'lik serolojik pipet yardımı ile toplam hacim ölçülmüştür. Toplam hacim resüspansiyon sonucunda pellet dağıldığı için artarak ~800µL'ye ulaşmıştır. 800µL başına hücre süspansiyonu başına 534,34µL deterjan karışımı eklenmiştir. Daha sonra ise bu karışıma 0,2µg/µl konsantrasyonunda olacak şekilde 26,67µl taze hazırlanmış 10µg/µl lizozim stokundan eklenmiştir. Deterjan karışımı ile hücre süspansiyonu 2mL tüpte hazırlandıktan sonra, 20 dakika boyunca tüpler mikrosantrifüj tüp döndürücüsünde ters yüz edilmiştir. 20 dakikalık ters yüz etme işleminden sonra hücrelerin lizisi sonucu ortaya çıkan DNA moleküllerinden kurtulmak amacıyla her süspansiyon 1 saniyelik uyarımlarla sonikatör cihazının 2 genişlik ayarında 35-40 kez sonike edilmiştir. Daha sonra, tüpler +4°C'de 13,000g ivmesinde 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış ve eşit hacimde 100% gliserol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. İzole edilen proteinler saklanmak için -20°C dolabına kaldırılmıştır.

EGFP proteinin izolasyonu ve saflaştırılması için pET28a-GFP plazmidinden EGFP üretmiş *E. coli* BL21 hücre pelletleri kullanılmıştır. Saflaştırma deneylerinde proteinler kapaklı cam tüplerde toplanmıştır.

Hücre pelletlerinden total protein izolasyonu yapıldıktan sonra EGFP proteinleri Nikel kolon için hazırlanmış kolon hacmi 2-2,5mL olan PrepSep Extraction Columns kolonundan geçirilerek saflaştırılmıştır. Bu yöntem için öncelikle 50mM pH:8,0 TrisCl ve 250mM NaCl içeren bağlanma tamponu ve üç farklı elüsyon tamponu hazırlanmıştır. Birinci elüsyon tamponu 50mM pH:8,0 TrisCl, 250mM NaCl ve 25mM imidazol içermektedir. Birinci elüsyon tamponundan farklı olarak ikinci elüsyon tamponu 250mM imidazol, üçüncü elüsyon tamponu ise 400mM imidazol içermektedir. Tamponlar hazırlandıktan sonra kolondan öncelikle 3-5 kolon hacmi kadar bağlanma tamponu geçirilmiştir. Daha sonra kolona EGFP üretmiş *E. coli* BL21 hücrelerinin total protein izolasyonu çözeltisi eklenmiştir ve kolondan akan çözelti toplanmıştır. Bu çözelti EGFP hariç bütün hücresel proteinleri içermektedir. Ardından ~10 kolon hacmi kadar bağlanma tamponu ile kolon yıkanmış ve bağlanma tamponu tamamen geçtikten sonra kolon akışı durdurulmuştur. Toplama tüpü değiştirilerek öncelikle 4mL birinci elüsyon tamponu kolonu imidazol ile şartlandırmak için kolondan geçirilmiş ve bir tüpte toplanmıştır. Daha sonra 6mL ikinci elüsyon tamponu

kolondan geçirilmiş ve bir tüpte toplanmıştır. İkinci elüsyon tamponu saflaştırılmış EGFP proteinini içermektedir. Daha sonra 6mL üçüncü elüsyon tamponu kolondan geçirilmiş ve toplanmıştır. nc elüsyon tamponu ise kolona bağlı kalan proteinleri ayırmak için kullanılmıştır, bu sebeple yüksek konsantrasyonda imidazol içermektedir. Kolonu tamamen temizlemek için kolondan birkaç kolon hacmi kadar çift distile su geçirilmiştir. Son olarak kolonun akışı durdurulmuş, %20 EtOH ile doldurulmuş ve +4°C’de saklanmıştır. Elüsyon tamponları ile toplanan EGFP rnekleri daha sonra SDS page’de kullanılmak üzere -20°C dolabında saklanmıştır.

### **Bradford Testi**

Bu tez çalışmasında Bradford testi, izole edilen ve saflaştırılan proteinlerin miktarlarını SDS-PAGE’e yüklemeden önce tespit etmek için uygulanmıştır. İzole edilen ve saflaştırılan proteinlerin miktarını Bradford testi ile ölçmek için bir standart eğri oluşturulması gerekmektedir. Bu standart eğri de BSA proteini ile oluşturulmuştur.

Bradford testi 96-kuyucuklu plakalarda gerçekleştirilmiş ve test sonucu renk değişimleri Victor 3V (Perkin Elmer) plaka okuyucuda llmştır.

Test için öncelikle %0,05 Coomassie Brilliant Blue G-250, %25 EtOH, %42,5 Fosforik asit içeren 50mL 5X Bradford zeltisi ve 1µg/µL BSA zeltisi hazırlanmıştır. Standart eğri için BSA proteini 10µg, 9µg, 8µg, 7µg, 6µg, 5µg, 4µg, 3µg, 2µg, 1µg olmak üzere 10 farklı miktarda kullanılmıştır. Daha sonra kuyulara toplam hacim 100µL olacak şekilde su ve örnek eklenmiştir. BSA kuyularındaki örnek miktarları izelge 4.21.’de verilmiştir. Üretim deneyi örneklerinden 2µL, saflaştırılmış EGFP örneklerinden ise 10µl, 2µL ve 1µL kullanılmıştır. Testte saflaştırılmış EGFP rnekleri 2 tekrarlı, diğer bütün örnekler ise 3 tekrarlı çalışılmıştır (izelge 4.21.).

Çizelge 4.21. Bradford testinde kullanılan 96 kuyucuklu plakaya örnek yükleme düzeni ve örnek miktarları. A, B, C sıralarında BSA, D sırasında 20/256UV, E sırasında 40/256UV, F sırasında 80/256UV, G sırasında 100/256UV yoğunluğunda çalışılan deney grupları, H1, H2, H3 kuyularında indüklenmemiş, H7-H12 kuyuları arasında ise referans olarak saflaştırılan EGFP örnekleri bulunmaktadır. H4, H5 ve H6 kuyularında ise blank hesaplaması için örnek eklenmemiştir.

|   | 1     | 2      | 3      | 4     | 5      | 6      | 7            | 8           | 9           | 10           | 11          | 12          |
|---|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|
| A | 10µg  | 9µg    | 8µg    | 7µg   | 6µg    | 5µg    | 4µg          | 3µg         | 2µg         | 1µg          |             |             |
| B | 10µg  | 9µg    | 8µg    | 7µg   | 6µg    | 5µg    | 4µg          | 3µg         | 2µg         | 1µg          |             |             |
| C | 10µg  | 9µg    | 8µg    | 7µg   | 6µg    | 5µg    | 4µg          | 3µg         | 2µg         | 1µg          |             |             |
| D | 20.6  | 20.12  | 20.24  | 20.6  | 20.12  | 20.24  | 20.6         | 20.12       | 20.24       |              |             |             |
| E | 40.6  | 40.12  | 40.24  | 40.6  | 40.12  | 40.24  | 40.6         | 40.12       | 40.24       |              |             |             |
| F | 80.6  | 80.12  | 80.24  | 80.6  | 80.12  | 80.24  | 80.6         | 80.12       | 80.24       |              |             |             |
| G | 100.6 | 100.12 | 100.24 | 100.6 | 100.12 | 100.24 | 100.6        | 100.12      | 100.24      |              |             |             |
| H | 0.0   | 0.0    | 0.0    | Blank | Blank  | Blank  | EGFP<br>10ul | EGFP<br>2ul | EGFP<br>1ul | EGFP<br>10ul | EGFP<br>2ul | EGFP<br>1ul |

Hazırlanan kuyuların her birine hızlıca toplam hacimde 1X Bradford çözeltisi olacak şekilde Bradford çözeltisi eklenmiştir ve karıştırılmıştır. Bu aşama her kuyu için pipet ucu değiştirilerek yapılmıştır. Daha sonra plakanın kapağı kapatılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda Victor 3V (Perkin Elmer) cihazında 595nm dalga boyunda kuyulardaki renk değişimi ölçülmüştür.

## SDS PAGE

Bradford testi ile miktarı ölçülen proteinler bant karşılaştırması için SDS PAGE yöntemi ile yürütülmüş ve jeller coomassie boyama ile boyanarak gözlemlenmiştir. Bu tez çalışması için hazırlanan yığma ve ayırma jelleri, EGFP proteini 32,7 kDa olduğu için, sırasıyla %6'lık ve %15'lik akrilamid bisakrilamid konsantrasyonu içerecek şekilde hazırlanmıştır. SDS page için jeller hazırlanırken öncelikle MiniProtean Casting sistemi (Biorad) hazırlanmış ve sistemin jeli polimerize olurken akıtmaması için tabanına vazelin sürülmüştür. Camlar hazırlandıktan sonra ilk olarak 0,375M pH:8,8 TrisCl, %15 akrilamid-bisakrilamid, %0,1 SDS, %0,05 APS ve %0,05 TEMED içeren ayırma jeli hazırlanmıştır. Bu jel döküldükten sonra üstü bütanol ile kaplanarak jelin oksijen teması engellenmiş ve polimerizasyon yaklaşık 20 dakikada gerçekleşmiştir. Daha sonra bütanol uzaklaştırılıp 0,125M pH:6,8 TrisCl, %6 akrilamid-bisakrilamid, %0,1 SDS, %0,05 APS ve %0,05 TEMED içeren yığma jeli hazırlanmıştır. Bu jel de döküldükten sonra tarak takılmıştır. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra jeller kısa süreliğine 1x SDS glisin yürütme tamponu içerisinde +4°C'de saklanmıştır.

SDS PAGE jelleri hazırlandıktan sonra MiniProtean (Biorad) elektroforez sistemine yerleştirilmiş ve kuyular yüklenmeden 1x SDS Glisin yürütme tamponu elektroforez tankına eklenmiştir. Daha sonra protein örnekleri 20µg, EGFP örnekleri 10µg olacak şekilde endorphin tüplerine eklenmiş ve örnekler son hacimde 1X konsantrasyonunda olacak şekilde Laemmli örnek tamponu eklenmiş ve karıştırılmıştır. Örnekler Laemmli tamponuyla beraber 85-90°C sıcaklıkta 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra SDS page kuyularına ilk ve son kuyulara 4µL Unstained Protein Ladder yüklenmiş ve diğer kuyulara da örnekler yüklenerek toplamda iki jel yüklenmiş ve yürütülmüştür. Bantlar yığılma jelini geçene kadar elektroforez 80V'da, ayırma jeline girdikten sonra da 100V'da elektroforez gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez tamamlandıktan sonra yığılma jelleri uzaklaştırılmış ve ayırma jelleri coomassie boyama için %25 izopropanol, %10 asetik asit içeren fiksasyon çözeltisinde 30 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Fiksasyon gerçekleştirildikten sonra jellere %10 asetik asit ve %0,01 Coomassie Brilliant Blue G-250 Coomassie boyama çözeltisi eklenmiş ve bir gece çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün jeller fazla boyadan arındırılmak için %10 Asetik asitte 4 kez 30 dakikada bir çözelti tazelenerek çalkalanarak inkübe edilmiştir. Jeller fazla boyadan arındırıldıktan sonra Molecular Imager VersaDoc® (Biorad) cihazında beyaz filtre altında 0,3 sn ışıklandırma görüntülenmiştir.

#### **4.2.5. GÖRÜNTÜ ANALİZİ**

Floresan mikroskop altındaki görüntülerin incelenmesi için ImageJ programı ve Computer Vision 2 yazılım geliştirme kütüphanesi ile Python dilinde "Jupyter Lab" kullanılarak analiz programı geliştirilmiştir. ImageJ programı ile görüntülerin RGB analizleri gerçekleştirilmiş, Computer Vision 2 yazılım geliştirme kütüphanesi ile Python dilinde yazılan yazılım ile de RGB değerleri HSV değerlerine dönüştürülerek, HSV analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde RGB ve HSV değerleri elde edildikten sonra piksel dağılımı ve yoğunluklarını incelemek amacıyla saturation-hue, saturation-value ve hue-value 2D histogram grafikleri oluşturulmuştur. RGB ve HSV analizlerinde görüntülerdeki arkaplan gürültüsünden kurtulmak için imageJ programında "background subtraction" (arkaplan çıkartma) yapılmıştır. Yazılan yazılım Ek-4'te verilmiştir.

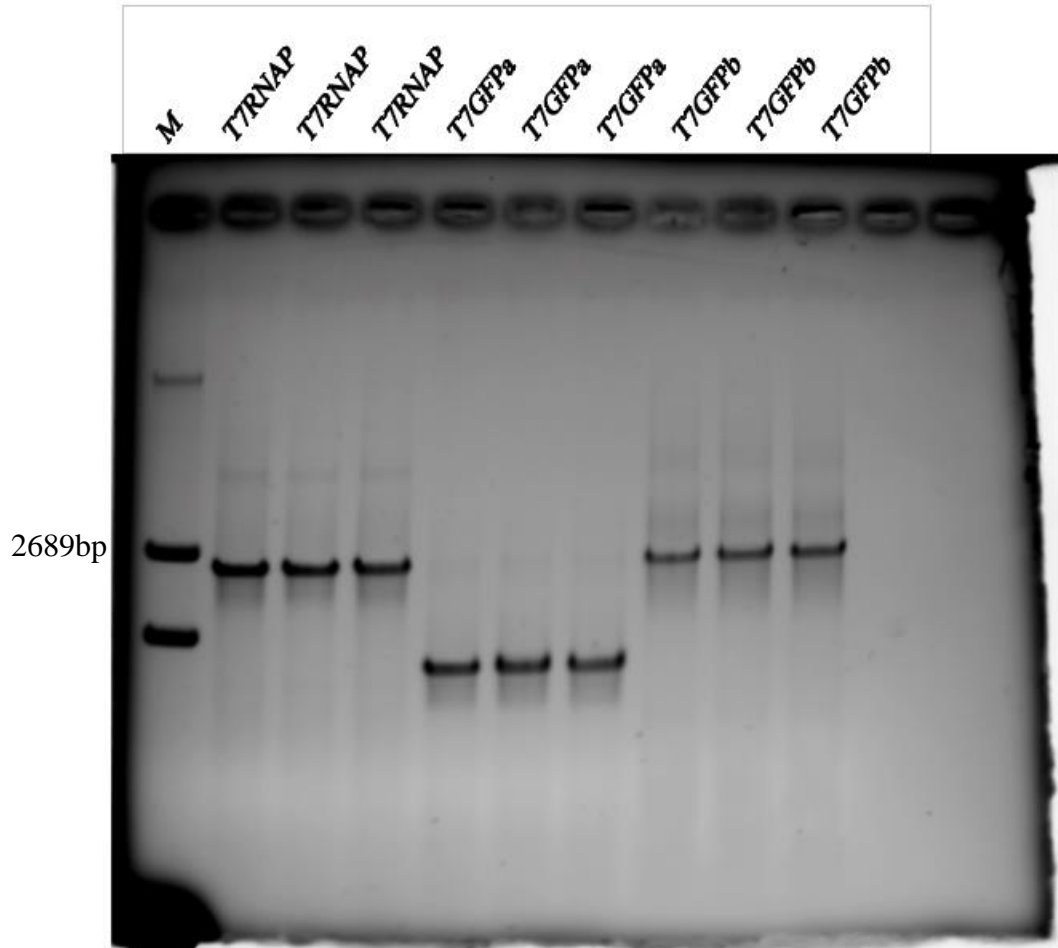
## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. GENETİK DEVRENİN OLUŞTURULMASI

#### 5.1.1. INSERT DNA'LARIN ÜRETİMİ VE HAZIRLANMASI

##### Insert DNA'ların PZT ile Amplifikasyonu

Bu tez çalışmasında genetik devrenin ilk hazırlanan elemanları insert DNA'lar olan T7RNAP geni ve P<sub>T7</sub>+EGFP bölgeleridir. *E. coli* BL21 kromozomal DNA'sından T7RNAP geni ve pET28aGFP plazmidinden P<sub>T7</sub>+EGFP gen bölgesi PZT ile 3' ve 5' uçlarında SLiCE kuyukları olacak şekilde amplifiye edilmiş ve %1'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütülmüştür (Şekil 5.1.). Bu agaroz jel'de DNA ladder olarak 2689 baz çiftinden oluşan pUC19 plazmidi kullanılmıştır.



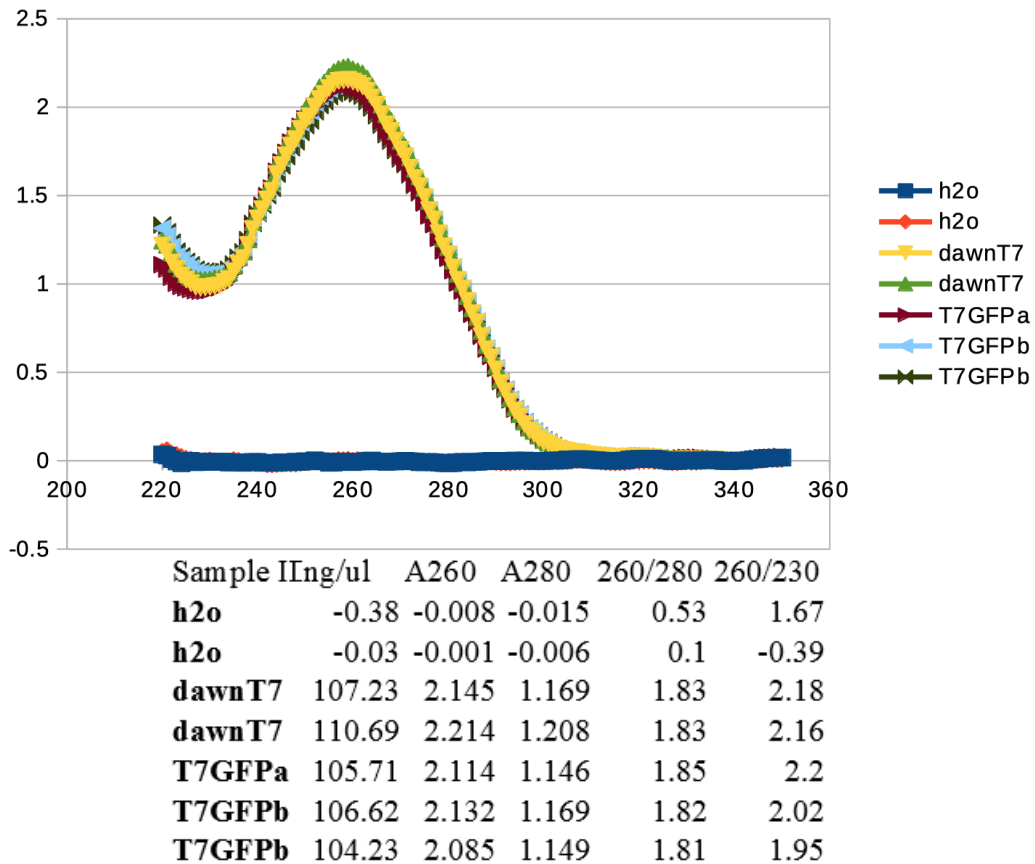
Şekil 5.1. T7RNAP ve P<sub>T7</sub>+EGFP insert DNA parçalarının PZT ile üretim sonuçları, %1 agaroz jel elektroforez görüntüsü



T7GFPa bantları pET28aGFP plazmidinin P<sub>T7</sub>+EGFP bölgesini içermekte fakat lac represörünü içermemektedir. İlk olarak hedefimiz lac operonu represör bölgesini de genetik devreye katmak olduğu için bu bölgeyi içeren T7GFPb bantları ve bu PZT ürünleri ile genetik devre tasarımına devam edilmiştir.

### PZT Ürünlerinin Saflaştırılması

PZT ürünleri Promega silika kolonlarla guanidin-HCl kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırmanın Nanodrop cihazı ile spektrofotometrik sonuçları elde edilmiştir. Şekil 5.2.'de görüldüğü gibi T7RNAP geni (dawnT7) ve P<sub>T7</sub>+EGFP DNA bölgesinin (T7GFPb) saflık düzeylerini belirten A<sub>260/280</sub> değerleri 1.8-2.0 arasında ve A<sub>260/230</sub> değerleri 2'ye yakın çıkmıştır. T7RNAP geni 108.96 ng/μL, P<sub>T7</sub>+EGFP DNA bölgesi ise 105.425 ng/μL konsantrasyonlarında saflaştırılmıştır (tekrarların ortalamaları alınmıştır). Bütün bu değerler saflaştırmanın başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.



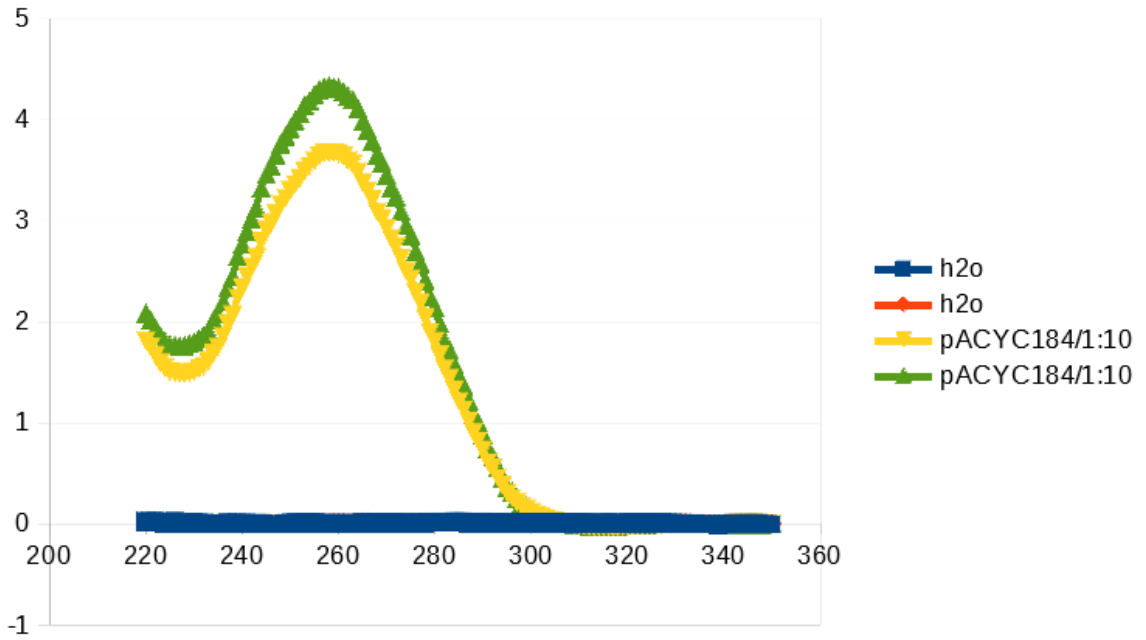
Şekil 5.2. Insert DNA PZT ürün saflaştırmalarının spektrofotometrik sonuçları

## 5.1.2. VEKTÖRLERİN HAZIRLANMASI

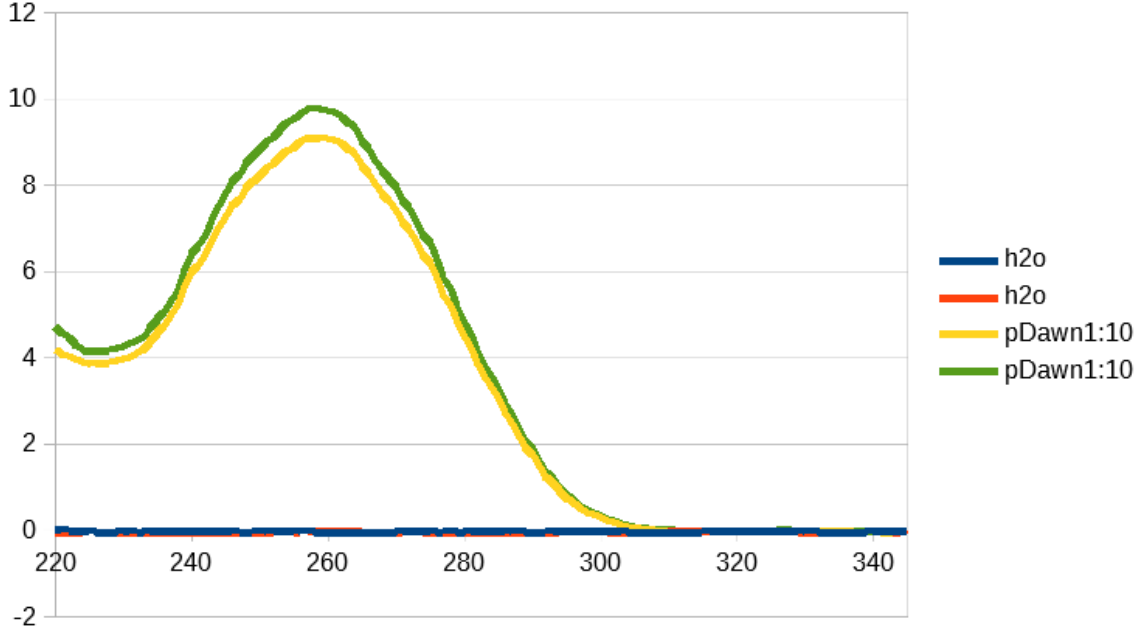
### İzolasyon ve Saflaştırma Sonuçları

pDawn ve pACYC184 plazmidleri *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerinde çoğaltıldıktan sonra izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. İzolasyon ve saflaştırma spektrofotometrik sonuçları Nanodrop cihazı ile elde edilmiştir.

pACYC184 plazmidi alkalen lizis plazmid izolasyonu ile izole edildiğinde  $\sim 2.000\text{ng}/\mu\text{L}$  konsantrasyonunda elde edilmiş, izolasyon ile saflaştırılmadığı için saflık değerleri olan  $A_{260/280}$  değeri  $\sim 2$  ve  $A_{260/230}$  değeri  $\sim 2,4$  olarak ölçülmüştür. pDawn plazmidi ise alkalen lizis plazmid izolasyonu ile izole edildiğinde  $\sim 4.705\text{ng}/\mu\text{L}$  konsantrasyonunda elde edilmiş, izolasyon ile saflaştırılmadığı için saflık değerleri olan  $A_{260/280}$  değeri 2,03 ve  $A_{260/230}$  değeri 1,89 olarak ölçülmüştür. Plazmid saflaştırma ve izolasyon sonuçları Şekil 5.3.'te verilmiştir.



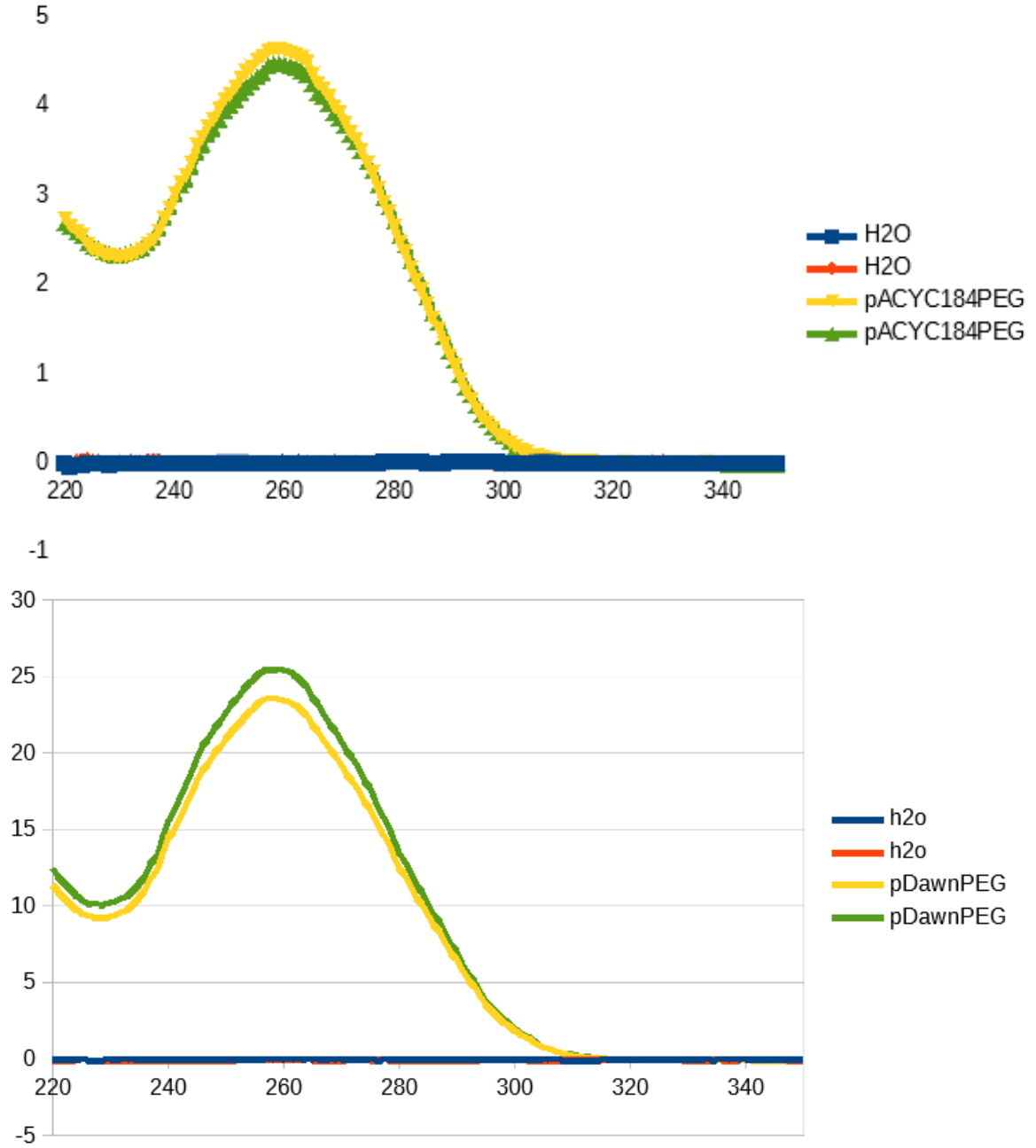
Şekil 5.3. pDawn ve pACYC184 plazmid izolasyonlarının spektrofotometrik analizi



| Sample ID            | ng/ul  | A260   | A280   | 260/280 | 260/230 |
|----------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
| <b>h2o</b>           | 0.28   | 0.006  | 0.018  | 0.31    | 0.57    |
| <b>h2o</b>           | 0.79   | 0.016  | 0.02   | 0.8     | 8.2     |
| <b>pACYC184/1:10</b> | 183.3  | 3.666  | 1.805  | 2.03    | 2.43    |
| <b>pACYC184/1:10</b> | 215.91 | 4.318  | 2.142  | 2.02    | 2.4     |
| Sample ID            | ng/ul  | A260   | A280   | 260/280 | 260/230 |
| <b>h2o</b>           | -0.15  | -0.003 | -0.001 | 2.49    | -3.73   |
| <b>h2o</b>           | 0.03   | 0.001  | -0.009 | -0.08   | -0.09   |
| <b>pDawn1:10</b>     | 454.38 | 9.088  | 4.47   | 2.03    | 2.29    |
| <b>pDawn1:10</b>     | 486.61 | 9.732  | 4.791  | 2.03    | 2.29    |

Şekil 5.3. (devam) pDawn ve pACYC184 plazmid izolasyonlarının spektrofotometrik analizi

İzole edilen plazmidlerin saflaştırılması için PEG ile plazmid çöktürme gerçekleştirilmiş ve spektrofotometrik sonuçlar Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. PEG ile saflaştırma sonucunda pACYC184 plazmidi 227,32ng/μL, pDawn plazmidi ise 1.221,5ng/μL konsantrasyonlarında elde edilmiştir. pDawn plazmidinin saflık düzeyleri değerleri olan A260/280 değeri 1,88 A260/230 değeri ise 2,5 olarak elde edilmiştir. pACYC184 saflık düzeyi ise A260/280 değeri 1,69 A260/230 değeri ise 1,98 olarak elde edilmiştir. PEG çöktürme sonucu spektrofotometre sonuçları Şekil 5.4.'te görülebilmektedir.



Şekil 5.4. PEG çöktürülerek saflaştırılan plazmidlerin spektrofotometrik analizi

| Sample ID   | ng/ul  | A260  | A280  | 260/280 | 260/230 |
|-------------|--------|-------|-------|---------|---------|
| H2O         | 0.53   | 0.011 | 0.021 | 0.51    | 2.48    |
| H2O         | 0.3    | 0.006 | 0.005 | 1.21    | 0.46    |
| pACYC184PEG | 231.14 | 4.623 | 2.65  | 1.74    | 2       |
| pACYC184PEG | 223.5  | 4.47  | 2.719 | 1.64    | 1.91    |

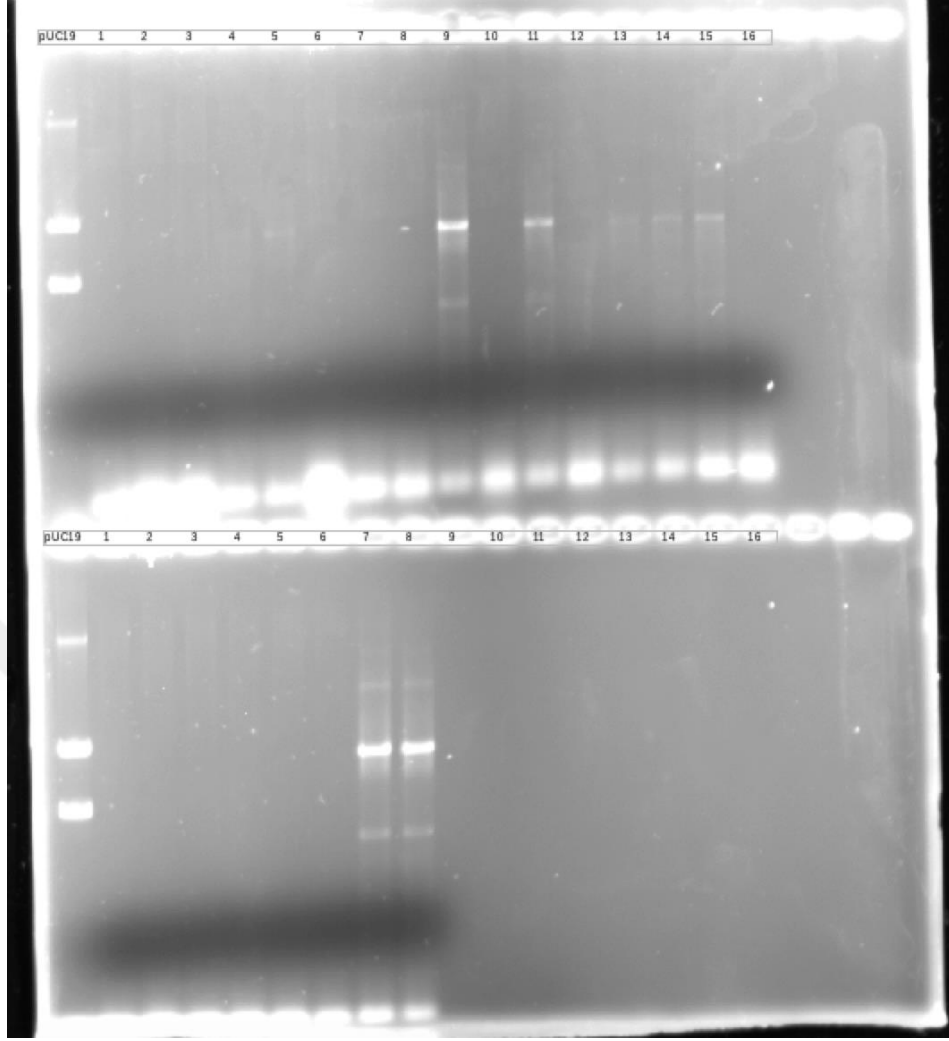
| Sample ID | ng/ul   | A260   | A280   | 260/280 | 260/230 |
|-----------|---------|--------|--------|---------|---------|
| h2o       | -0.15   | -0.003 | -0.001 | 2.49    | -3.73   |
| h2o       | 0.03    | 0.001  | -0.009 | -0.08   | -0.09   |
| pDawnPEG  | 1172.56 | 23.451 | 12.498 | 1.88    | 2.51    |
| pDawnPEG  | 1270.33 | 25.407 | 13.474 | 1.89    | 2.5     |

Şekil 5.4. (devam) PEG çöktürülerek saflaştırılan plazmidlerin spektrofotometrik analizi

### 5.1.3. SLİCE İLE GENETİK DEVRENİN TAMAMLANMASI

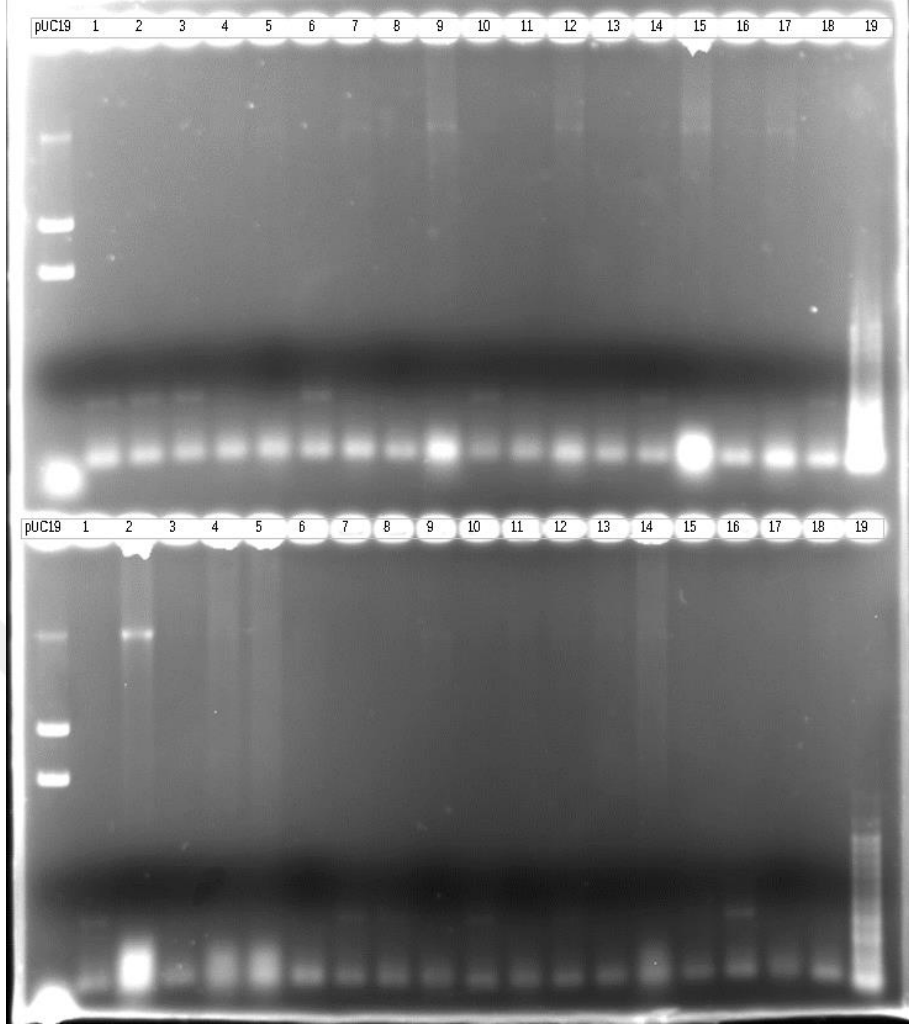
#### Koloni PZT

SLiCE klonlama ile insert DNA ve vektörün birleştirilip birleştirilmediği SLiCE klonlama sonrası yapılan koloni PZT deneyi ile kontrol edilmiştir. Bu sebeple yapılan koloni PZT ürünleri %1'lik agaroz jel ile DNA ladder olarak pUC19 plazmidi kullanılarak elektroforez tankında yürütülmüştür. Şekil 5.5.'te pDawT plazmidi için yapılan SLiCE klonlama sonuçları verilmiştir. pDawT klonları için koloni PZT deney sonuçlarında PZT uygulanan kolonilerden 13, 14 ve 15. koloniler pozitif sonuç vermiştir ve bu hücrelerden 15. koloni tek bant sonuç verdiği için plazmid izole etmek için seçilmiştir.



Şekil 5.5. pDawn SLiCE klonlama kontrolü, %1 agaroz jel elektroforezinde koloni PZT sonuçları

Şekil 5.6'da ise pATG plazmidi için yapılan SLiCE klonlama sonuçları verilmiştir. pATG klonları için koloni PZT deney sonuçlarında ise PZT uygulanan kolonilerden, 9,12, 15, 17 ve 21. koloniler pozitif sonuç vermiş 9 ve 21. koloniler tek bant sonuç verdiği için plazmid izole etmek için seçilmiştir.



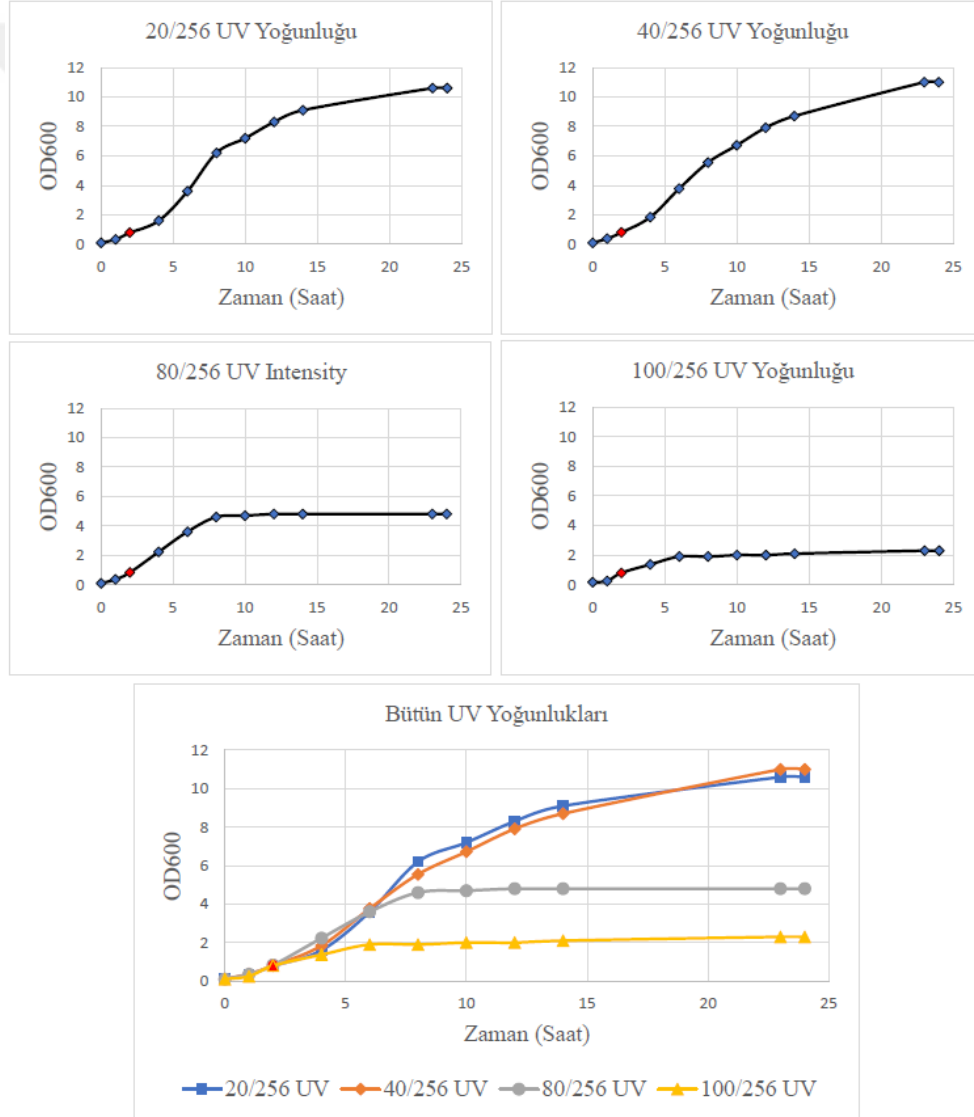
Şekil 5.6. pATG SLiCE klonlama kontrolü, %1 agaroz jel elektroforezinde koloni PZT sonuçları

Plazmid izolasyonları sonucu ko-transformasyon deneyi ile iki plazmid de aynı hücreye aktarılmıştır, bu noktada bir rekombinant klonlama gerçekleşmediği için koloni PZT yapılmamıştır.

## 5.2. EGFP ÜRETİMİ VE ANALİZİ

### 5.2.1. ÜREME EĞRİLERİ

EGFP üretimi deneyleri esnasında hücre kültürleri 0.1 OD'den başlatılmış ve 0.8 OD'de ~400nm uzun dalga UV ile indüklenmiştir. İndüklenme öncesi hücreler 0.8 OD'ye gelene kadar saat başı OD ölçümü alınmış, indüksiyon sonrası ise 12. saate kadar 2 saatte bir ve 23 ve 24. saatlerde olmak üzere her indüksiyon seviyesi için toplamda 8 kez OD ölçülmüştür. Sonuç olarak elde edilen değerlerden 20/256, 40/256, 80/256, 100/256 UV yoğunluklarındaki üretim sistemlerinin hücre büyüme eğrileri oluşturulmuştur, bu eğriler Şekil 5.7.'de verilmiştir.





### Şekil 5.7. pDawT + pATG sistemi ile EGFP üreten hücrelerin üreme eğrileri

~400nm uzun dalga UV ile deney grubu dışında üreme kontrolü olarak genetik devreyi içermeyen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pACYC184 hücresi de 80/256 ve 100/256 UV altında 24 saat üretilmiş ve son ulaştığı OD<sub>600</sub> değeri ölçülmüştür. Bu değerler 80/256 için 10,58 OD 100/256 için ise 10,42 OD olarak ölçülmüştür.

Negatif kontrol olarak genetik devreyi içermeyen *E. coli* DH5 $\alpha$  – pACYC184 içeren hücre hattı 80/256 ve 100/256 UV yoğunluklarında üretilmiş ve 24 saatin sonunda bu hücreler yaklaşık 11 OD'ye kadar üremiştir.

### 5.2.2. BRADFORD ANALİZİ

Bradford analizi için standart eğri BSA kullanılarak oluşturulmuştur. Saflaştırılan EGFP protein ürünleri hariç her örnek üç kopya yüklenmiş ve bu örneklerin ortalaması alınarak blank ortalaması örnek ortalamasından çıkartılmış ve gerçek değerler elde edilmiştir. Çizelge5.1.'de işlenmemiş veriler görülebilmektedir.

Çizelge 5.1. Bradford analizi için hazırlanan 96-kuyulu plaka düzeni ve 595nm'de alınmış sonuçlar

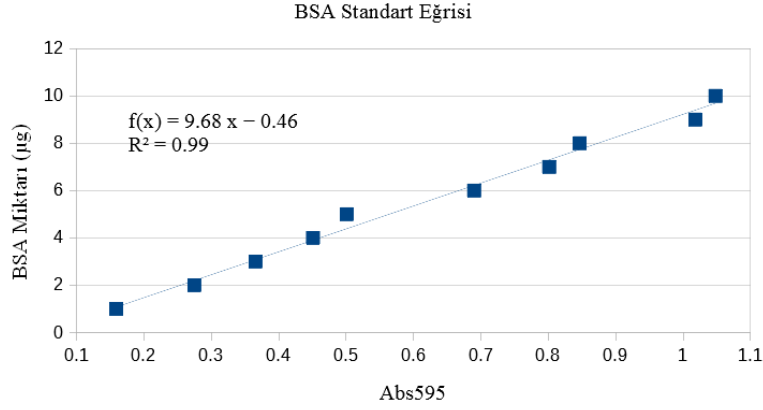
|   | 1          | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7              | 8             | 9             | 10             | 11            | 12            |
|---|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| A | 10 $\mu$ g | 9 $\mu$ g | 8 $\mu$ g | 7 $\mu$ g | 6 $\mu$ g | 5 $\mu$ g | 4 $\mu$ g      | 3 $\mu$ g     | 2 $\mu$ g     | 1 $\mu$ g      |               |               |
| B | 10 $\mu$ g | 9 $\mu$ g | 8 $\mu$ g | 7 $\mu$ g | 6 $\mu$ g | 5 $\mu$ g | 4 $\mu$ g      | 3 $\mu$ g     | 2 $\mu$ g     | 1 $\mu$ g      |               |               |
| C | 10 $\mu$ g | 9 $\mu$ g | 8 $\mu$ g | 7 $\mu$ g | 6 $\mu$ g | 5 $\mu$ g | 4 $\mu$ g      | 3 $\mu$ g     | 2 $\mu$ g     | 1 $\mu$ g      |               |               |
| D | 20.6       | 20.12     | 20.24     | 20.6      | 20.12     | 20.24     | 20.6           | 20.12         | 20.24         |                |               |               |
| E | 40.6       | 40.12     | 40.24     | 40.6      | 40.12     | 40.24     | 40.6           | 40.12         | 40.24         |                |               |               |
| F | 80.6       | 80.12     | 80.24     | 80.6      | 80.12     | 80.24     | 80.6           | 80.12         | 80.24         |                |               |               |
| G | 100.6      | 100.12    | 100.24    | 100.6     | 100.12    | 100.24    | 100.6          | 100.12        | 100.24        |                |               |               |
| H | 0.0        | 0.0       | 0.0       | Blank     | Blank     | Blank     | GFP 10 $\mu$ l | GFP 2 $\mu$ L | GFP 1 $\mu$ L | GFP 10 $\mu$ L | GFP 2 $\mu$ L | GFP 1 $\mu$ L |

|       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1.531 | 1.551 | 1.376 | 1.323 | 1.121 | 1.035 | 0.696 | 0.840 | 0.813 | 0.637 |       |       |
| 1.589 | 1.475 | 1.283 | 1.326 | 1.251 | 0.986 | 1.064 | 0.879 | 0.780 | 0.702 |       |       |
| 1.521 | 1.526 | 1.378 | 1.253 | 1.195 | 0.979 | 1.090 | 0.875 | 0.728 | 0.635 |       |       |
| 0.766 | 0.795 | 0.727 | 0.782 | 0.779 | 0.749 | 0.742 | 0.754 | 0.811 |       |       |       |
| 0.746 | 0.762 | 0.965 | 0.711 | 0.814 | 0.858 | 0.765 | 0.763 | 0.846 |       |       |       |
| 0.703 | 0.740 | 0.696 | 0.686 | 0.732 | 0.705 | 0.699 | 0.802 | 0.695 |       |       |       |
| 0.642 | 0.646 | 0.618 | 0.659 | 0.643 | 0.608 | 0.675 | 0.651 | 0.582 |       |       |       |
| 0.701 | 0.720 | 0.708 | 0.490 | 0.500 | 0.507 | 0.475 | 0.751 | 0.566 | 0.454 | 0.723 | 0.577 |

Veriler işlendikten sonra ise BSA standart eğrisi oluşturulmuş, bu eğrinin R<sup>2</sup> değeri hesaplanmış ve formülü oluşturulmuştur (Şekil 5.8.). BSA standardı için oluşturulan eğrinin R<sup>2</sup> değeri 0,99 olarak hesaplanmış ve eğrinin formülü;

$$y = 9.68x - 0.46$$

olarak elde edilmiştir.



Şekil 5.8. BSA standart eğrisi

BSA standart eğrisi kullanılarak örnekler için elde edilen 595nm'deki absorbans değerleri  $y = 9,68x - 0,46$  formülünde "x" değeri yerine yazılarak örnek miktarları hesaplanmıştır. Bu formülden çıkan sonuçlar kuyulara 2µL örnek yüklendiği için 2µL hacimdeki miktarı bize göstermektedir. Dolayısıyla çıkan değerler 2'ye bölünüp gerçek konsantrasyonlar µg/µL biriminden hesaplanmıştır. Bu analize göre, indüklenmemiş (0UV0h) hücrelerinden izole edilen protein konsantrasyonu 0,789µg/µL'dir. 20/256 yoğunluğunda UV ile indüklenen hücrelerin 6. saatte izole edilen protein konsantrasyonu 1,049µg/µL, 12. saatte izole edilen protein konsantrasyonu 1,109µg/µL ve 24. saatte izole edilen protein konsantrasyonu 1,043µg/µL olarak ölçülmüştür. 40/256 yoğunluğunda UV ile indüklenen hücrelerin 6. saatte izole edilen protein konsantrasyonu 0,939µg/µL, 12. saatte izole edilen protein konsantrasyonu 1,126µg/µL ve 24. saatte izole edilen protein konsantrasyonu ise 1,661µg/µL'dir. 80/256 UV yoğunluğunda indüklenen hücrelerden izole edilen protein konsantrasyonları, 6. saatte 0,723µg/µL, 12. saatte 1,126µg/µL ve 24. saatte 0,736µg/µL'dir. 100/256 UV yoğunluğunda indüklenen hücrelerden izole edilen protein konsantrasyonları ile 6., 12. ve 24. saatlerde sırasıyla; 0,542µg/µL, 0,484µg/µL ve 0,272µg/µL olarak ölçülmüştür. Saflaştırılan EGFP proteini konsantrasyonu ise 0,922µg/µL'dir. İşlenmemiş veri ve konsantrasyon değerleri Çizelge 5.2.'de görülebilmektedir.

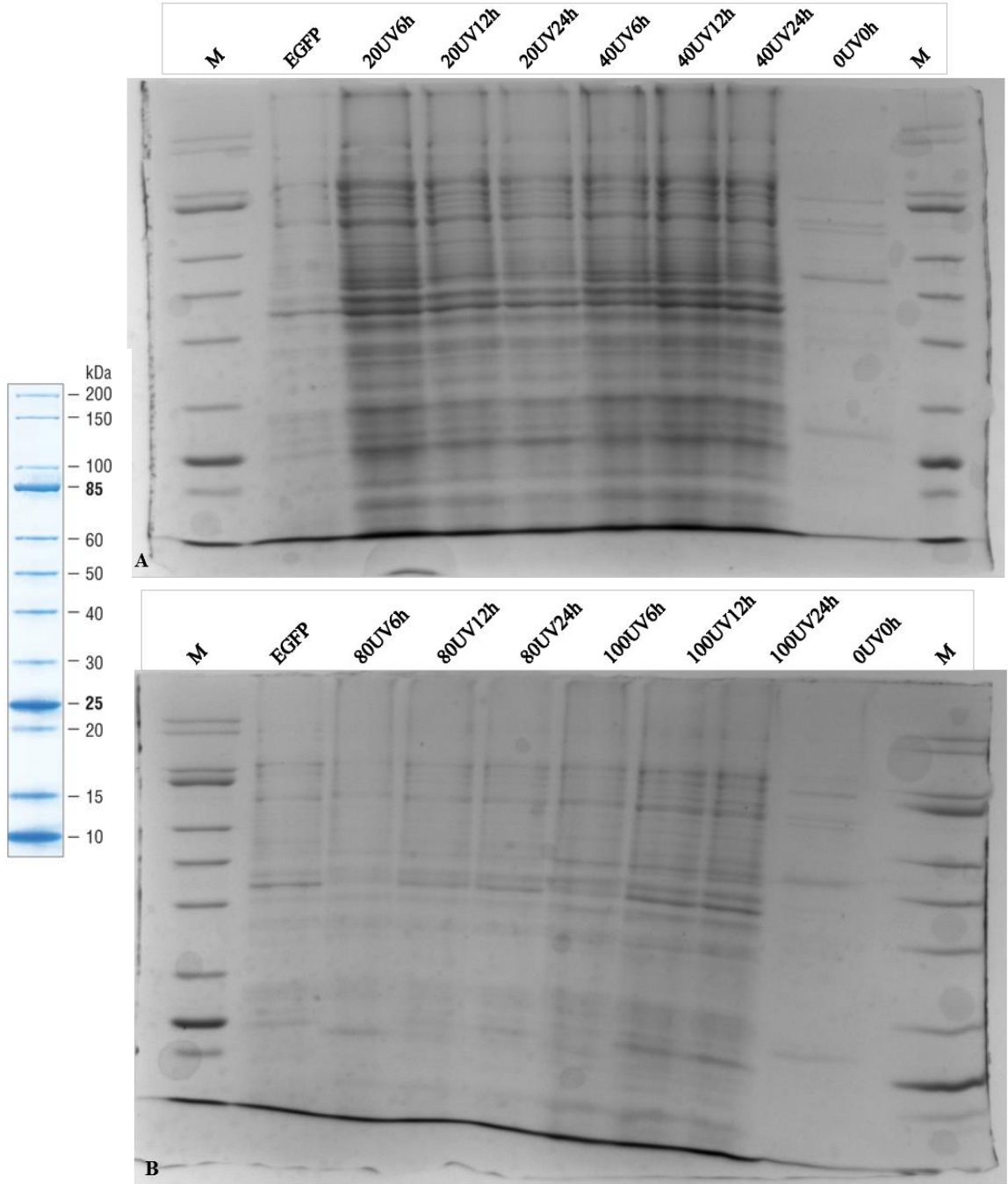
Çizelge 5.2. İşlenmemiş Bradford testi sonuçları, örneklerin miktarları ve konsantrasyon değerleri

|          | #1     | #2     | #3                | Ortalama OD 595   | Miktar ( µg)           | Konsantrasyon ( µg/µL) |
|----------|--------|--------|-------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 0UV0h    | 0.2019 | 0.2209 | 0.208895          | 0.2105618542845   | 1.578                  | 0.789                  |
|          | #1     | #2     | #3                | Ortalama OD595    | Miktar ( µg)           | Konsantrasyon ( µg/µL) |
| 20UV6h   | 0.2664 | 0.2831 | 0.2429            | 0.264157944112244 | 2.098                  | 1.049                  |
| 20UV12h  | 0.2956 | 0.2795 | 0.255             | 0.276702932917523 | 2.219                  | 1.109                  |
| 20UV24h  | 0.2278 | 0.2496 | 0.3118            | 0.263071502710084 | 2.087                  | 1.043                  |
|          | #1     | #2     | #3                | Ortalama OD595    | Miktar ( µg)           | Konsantrasyon ( µg/µL) |
| 40UV6h   | 0.2466 | 0.2123 | 0.2657            | 0.241554483628617 | 1.879                  | 0.939                  |
| 40UV12h  | 0.2626 | 0.3144 | 0.2635            | 0.28016830058067  | 2.253                  | 1.126                  |
| 40UV24h  | 0.4663 | 0.3589 | 0.3469            | 0.390693159518611 | 3.323                  | 1.661                  |
|          | #1     | #2     | #3                | Ortalama OD595    | Miktar ( µg)           | Konsantrasyon ( µg/µL) |
| 80UV6h   | 0.2036 | 0.1872 | 0.2               | 0.196951536267756 | 1.447                  | 0.723                  |
| 80UV12h  | 0.2405 | 0.2325 | 0.3031            | 0.258723788857248 | 2.045                  | 1.022                  |
| 80UV24h  | 0.1969 | 0.2056 | 0.1961            | 0.199565695752614 | 1.472                  | 0.736                  |
|          | #1     | #2     | #3                | Ortalama OD 595   | Miktar ( µg)           | Konsantrasyon ( µg/µL) |
| 100UV6h  | 0.1426 | 0.1597 | 0.1761            | 0.159472111689408 | 1.084                  | 0.542                  |
| 100UV12h | 0.1471 | 0.1435 | 0.1519            | 0.147483356908343 | 0.968                  | 0.484                  |
| 100UV24h | 0.1187 | 0.1092 | 0.0832            | 0.10367763997318  | 0.543                  | 0.272                  |
|          | #1     | #2     | Ortalama OD595    | Miktar ( µg)      | Konsantrasyon ( µg/µL) |                        |
| GFP 1/50 | 0.2519 | 0.2239 | 0.237895187617806 | 1.843             | 0.922                  |                        |

### 5.2.3. SDS PAGE

Bradford testi ile protein miktarları hesaplandıktan sonra, SDS-PAGE’de bu proteinler yürütülmüştür. İki adet SDS PAGE jeli yürütülmüş ve her bir jelde on adet kuyu bulunmaktadır. İki jelde de ilk ve son kuyulara Unstained Protein marker yüklenmiş ikinci ve dokuzuncu kuyulara da sırasıyla saflaştırılmış EGFP ve indüklenmemiş hücrelerden protein izolasyonları yüklenmiştir. İlk jele Unstained protein marker ve EGFP’den sonra sırasıyla, 20/256 UV, 40/256 UV de üretimi sağlanmış 6, 12 ve 24. saatlerde protein izolasyonu yapılmış örnekler yüklenmiştir. İkinci jele ise Unstained protein marker ve EGFP’den sonra sırasıyla, 80/256 UV, 100/256 UV de üretimi sağlanmış 6, 12 ve 24. saatlerde protein izolasyonu yapılmış örnekler yüklenmiştir. Jellere EGFP ve örneklerden yaklaşık 20µg protein yüklenmiştir. SDS-PAGE jel görüntüleri Şekil 5.9.’da görülmektedir. Bu görüntülerde bant kalınlıkları 20/256 UV ile indüklenenlerde büyük bir fark göstermese de 80 UV ve 100 UV ile indüklenen hücrelerde az da olsa belirgindir. İndüklenmeyen

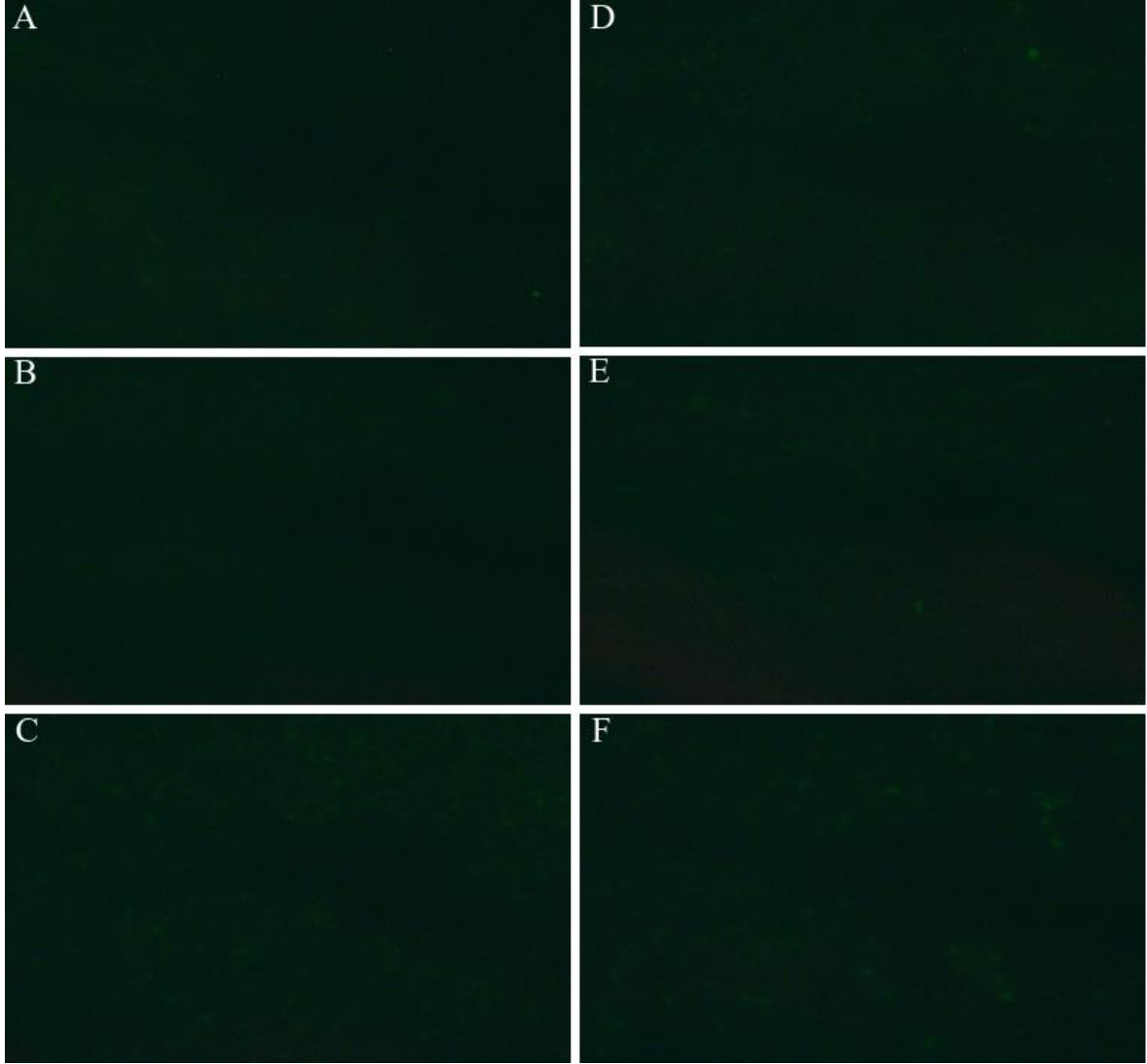
hücrelerde EGFP bantları gözükmemiştir. Beklenen EGFP bantları ~32.7kDa olmalıdır ve protein ladderda 30-40 arasında bu bantlar gözükabilmektedir.



Şekil 5.9. Farklı kondisyonlarda üretilen EGFP örneklerinin SDS PAGE Coomassie boyama görüntüleri. Protein ladder; Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200kDa) (New England Biolabs)

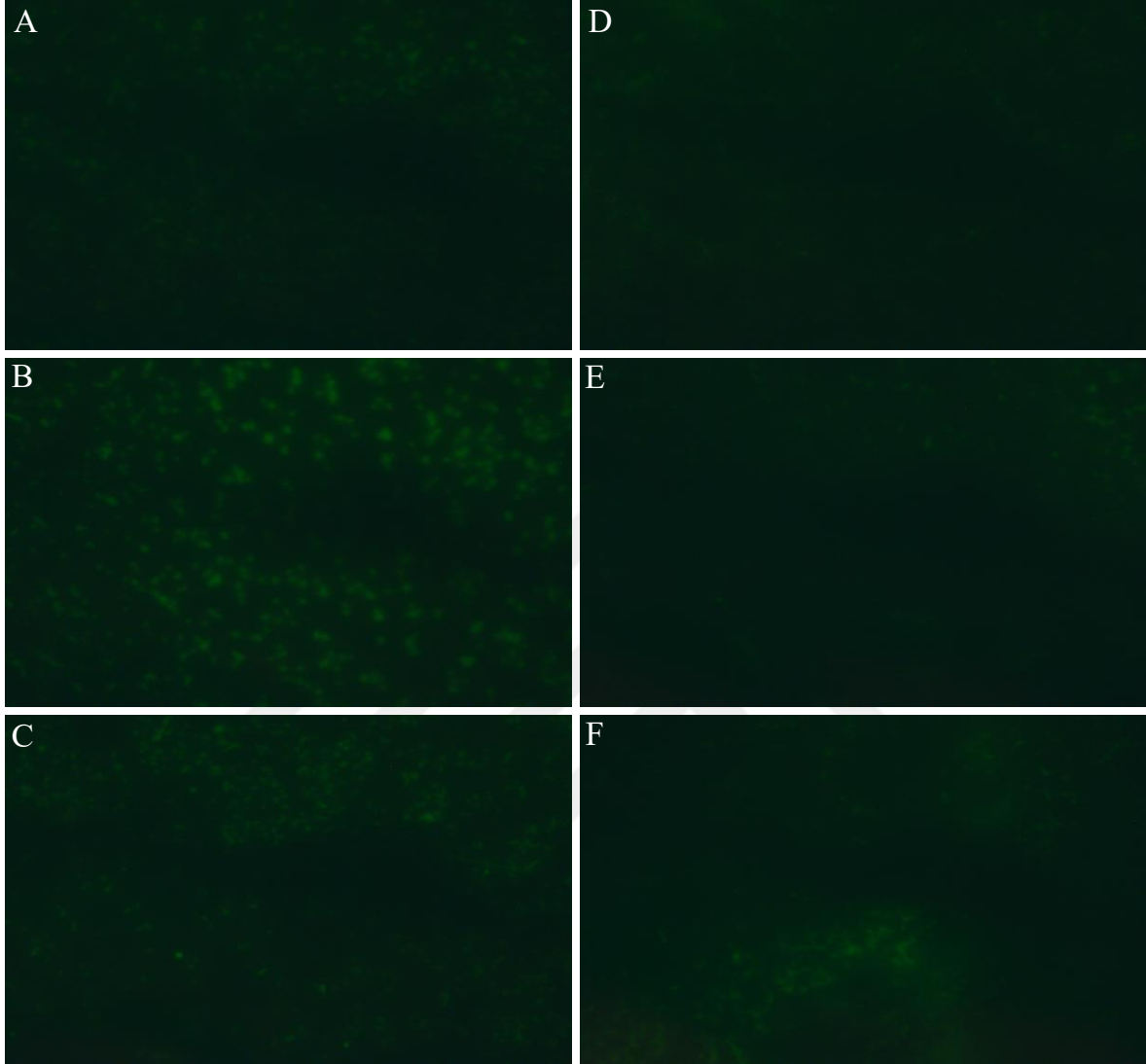
#### 5.2.4. HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ VE ANALİZİ

Hücreler lamlara fikse edildikten sonra 10x, 20x ve 40x büyütmede Axio Imager M1 (Carl Zeiss) floresan mikroskopunda FITC filtresinde aynı oturumda görüntülenmiş ve 40x büyütmedeki görüntüler analiz için kaydedilmiştir. Şekil 5.10.'da 40x'te 20/256 ve 40/256 UV yoğunluklarında üretilmiş *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT + pATG hücrelerinin 1:100 dilüsyonlarının 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.



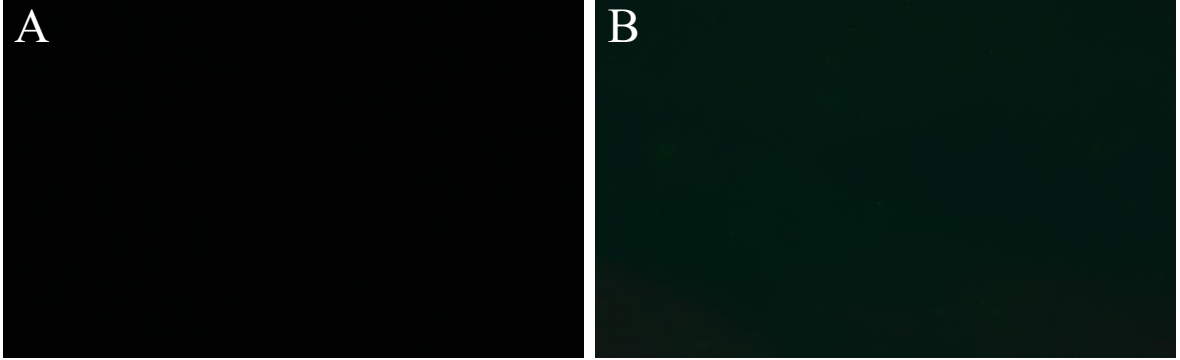
Şekil 5.10. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 20/256 UV ve 40/256 UV ışık yoğunluğunda indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT + pATG hücreleri. A. 20/256 UV'de 6 saat, B. 20/256 UV'de 12 saat C. 20/256 UV'de 24 saat, D. 40/256 UV'de 6 saat, E 40/256 UV'de 12 saat, F. 40/256 UV'de 24 saat indüklenmiş hücreler

Şekil 5.11.'de ise 80/256 ve 100/256 UV yoğunluklarında üretilmiş hücrelerin 1:100 dilüsyonları 40x büyütmedeki görüntüleri görülebilmektedir.



Şekil 5.11. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 80/256 UV ve 100/256 UV ışık yoğunluğund *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT + pATG hücreleri. A. 80/256 UV'de 6 saat, B. 80/256 UV'de 12 saat C. 80/256 UV'de 24 saat, D. 100/256 UV'de 6 saat, E 100/256 UV'de 12 saat, F. 100/256 UV'de 24 saat indüklenmiş hücreler

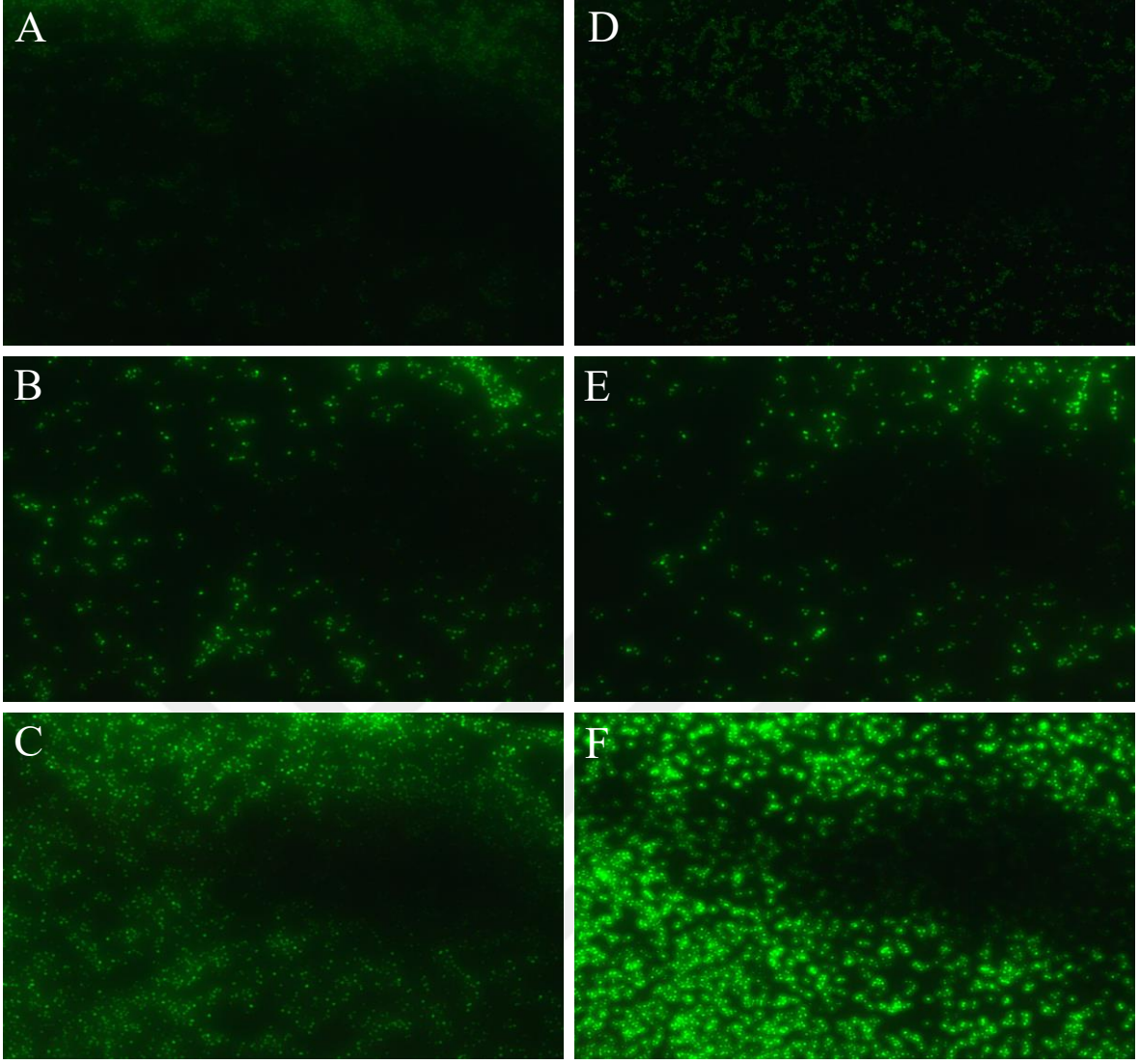
Şekil 5.12.'de ise indüklenmemiş *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT + pATG hücrelerinin 1:100 dilüsyonlarının FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri, negatif kontrol olarak kullanılmış *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerinin 1:100 dilüsyonlarının FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.12. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen A. *E. coli* DH5α (negatif kontrol)  
B. İndüklenmemiş *E. coli* pDawT + pATG hücreleri

Bu tez çalışmasında iki pozitif kontrol grubu bulunmaktadır, bunlardan biri farklı IPTG konsantrasyonları ile indüklenen pET28aGFP içeren *E. coli* BL21 hücreleri ve farklı arabinoz konsantrasyonları ile indüklenen pGLO içeren *E. coli* DH5α hücreleridir.

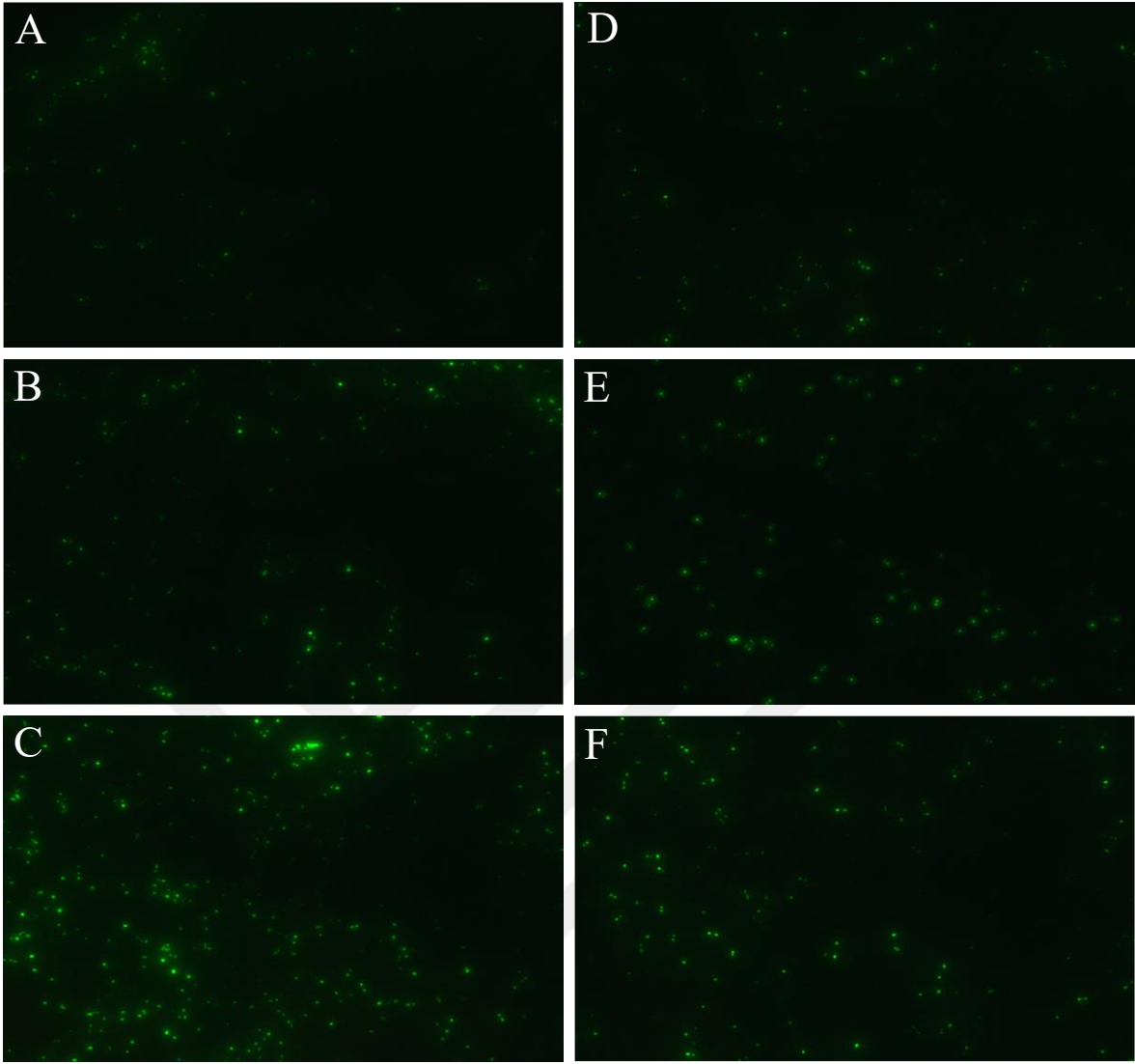
Şekil 5.13.'te sırasıyla 0.05mM ve 0.1mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.13. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 0.05mM ve 0.1mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücreleri. A. 0.05mM IPTG ile 6 saat, B. 0.05mM IPTG ile 12 saat C. 0.05mM IPTG ile 24 saat, D. 0.1mM IPTG ile 6 saat, 0.1mM IPTG ile 12 saat, F. 0.1mM IPTG ile 24 saat indüklenmiş hücreler

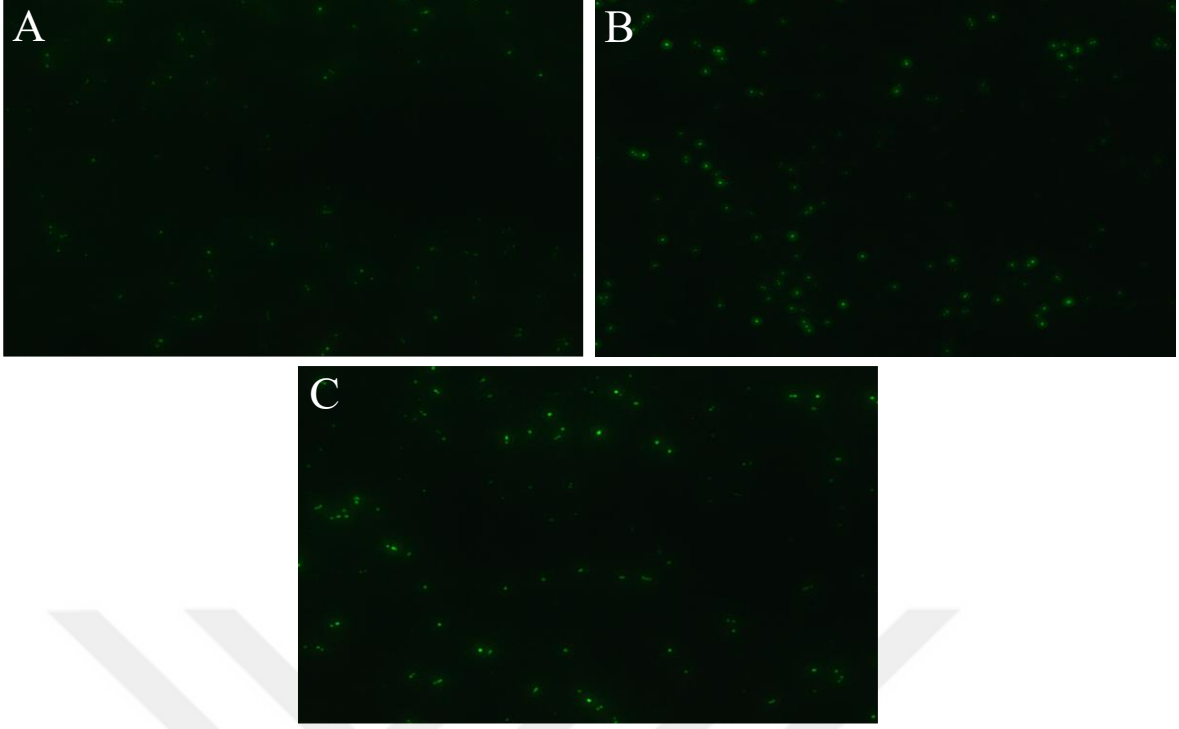
Şekil 5.14.'te ise sırasıyla 0.2mM ve 0.5mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.





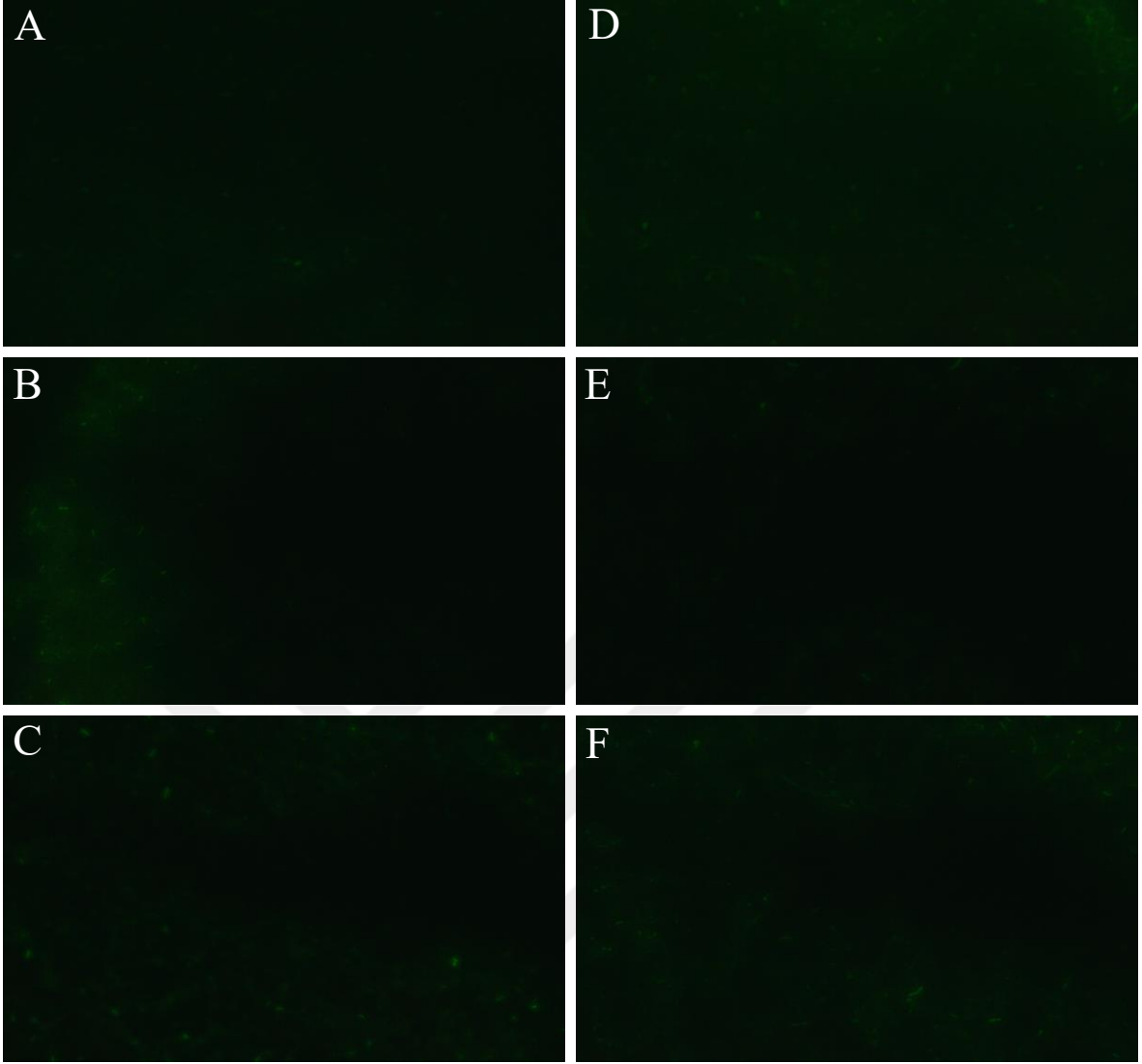
Şekil 5.14. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 0.2mM ve 0.5mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücreleri. A. 0.2mM IPTG ile 6 saat, B. 0.2mM IPTG ile 12 saat C. 0.2mM IPTG ile 24 saat, D. 0.5mM IPTG ile 6 saat, E. 0.5mM IPTG ile 12 saat, F. 0.5mM IPTG ile 24 saat indüklenmiş hücreler

Şekil 5.15.'te sırasıyla 1.0mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.



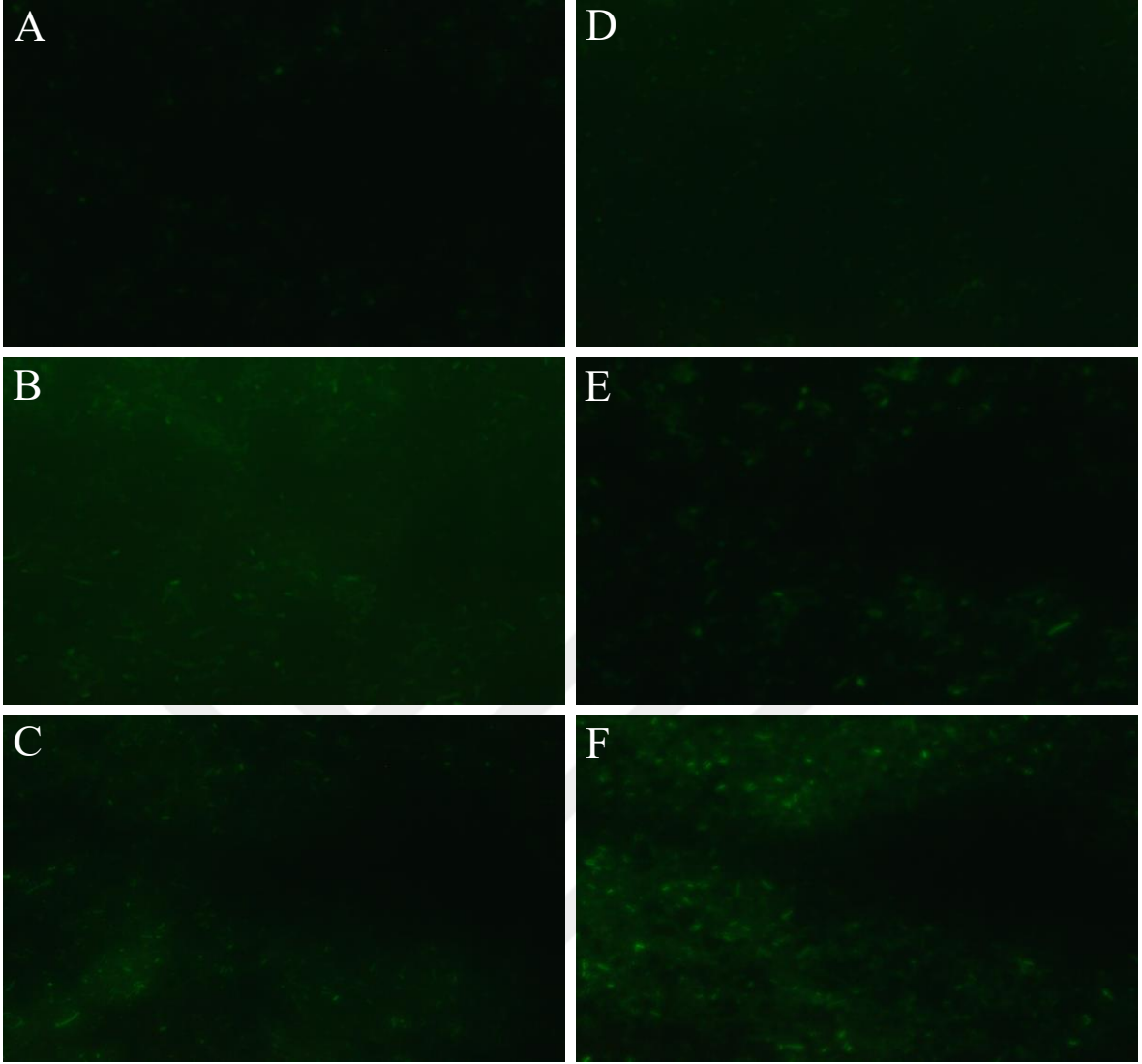
Şekil 5.15. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 1.0mM IPTG ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücreleri. A. 1.0mM IPTG ile 6 saat, B. 1.0mM IPTG ile 12 saat C. 1.0mM IPTG ile 24 saat, indüklenen hücreler

IPTG ile indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin yanı sıra *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri de pozitif kontrol olarak 6, 12 ve 24 saat 0.67mM, 1.33mM, 3.33mM, 6.66mM ve 13.3mM arabinoz konsantrasyonları ile indüklenmiş ve FITC filtresi ile 40x büyütmede görüntülenmiştir. Şekil 5.16.'da sırasıyla 0.67mM ve 1.33mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.



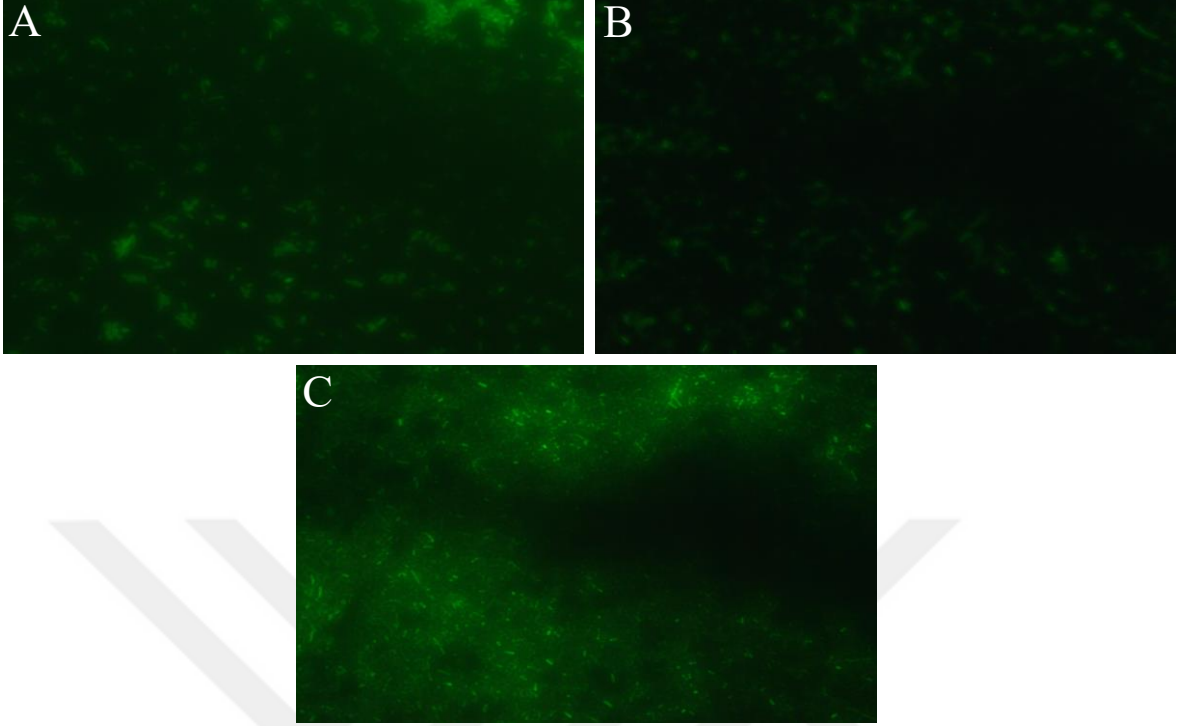
Şekil 5.16. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 0.67mM ve 1.33mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri. A. 0.67mM arabinoz ile 6 saat, B. 0.67mM arabinoz ile 12 saat C. 0.67mM arabinoz ile 24 saat, D. 1.33mM arabinoz ile 6 saat, 1.33mM arabinoz ile 12 saat, F. 1.33mM arabinoz ile 24 saat indüklenmiş hücreler indüklenen hücreler

Şekil 5.17.'de ise sırasıyla 3.33mM ve 6.66mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 5.17. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 3.33mM ve 6.66mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri. A. 3.33mM arabinoz ile 6 saat, B. 3.33mM arabinoz ile 12 saat C. 3.33mM arabinoz ile 24 saat, D. 6.66mM arabinoz ile 6 saat, 6.66mM arabinoz ile 12 saat, F. 6.66mM arabinoz ile 24 saat indüklenmiş hücreler indüklenen hücreler

Şekil 5.18.'de 13.3mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin FITC filtresinde 40x büyütmedeki görüntüleri verilmiştir.

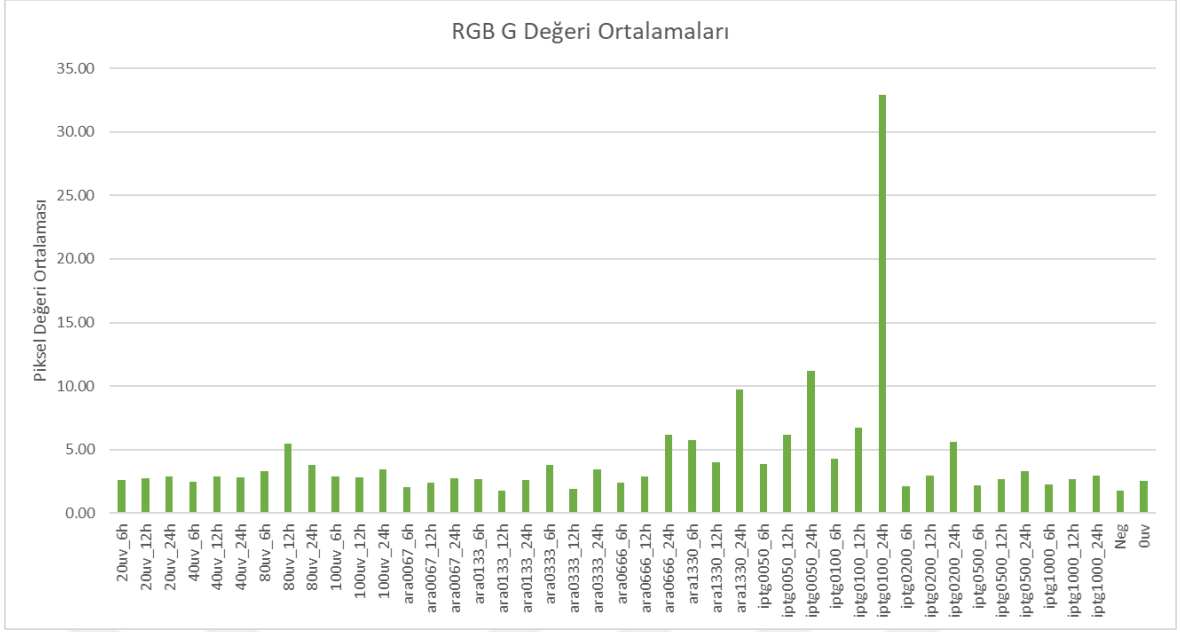


Şekil 5.18. 40x büyütmede FITC filtresi ile görüntülenen 13.3mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri. A. 13.3mM arabinoz ile 6 saat, B. 13.3mM arabinoz ile 12 saat C. 13.3mM arabinoz ile 24 saat, indüklenen hücreler

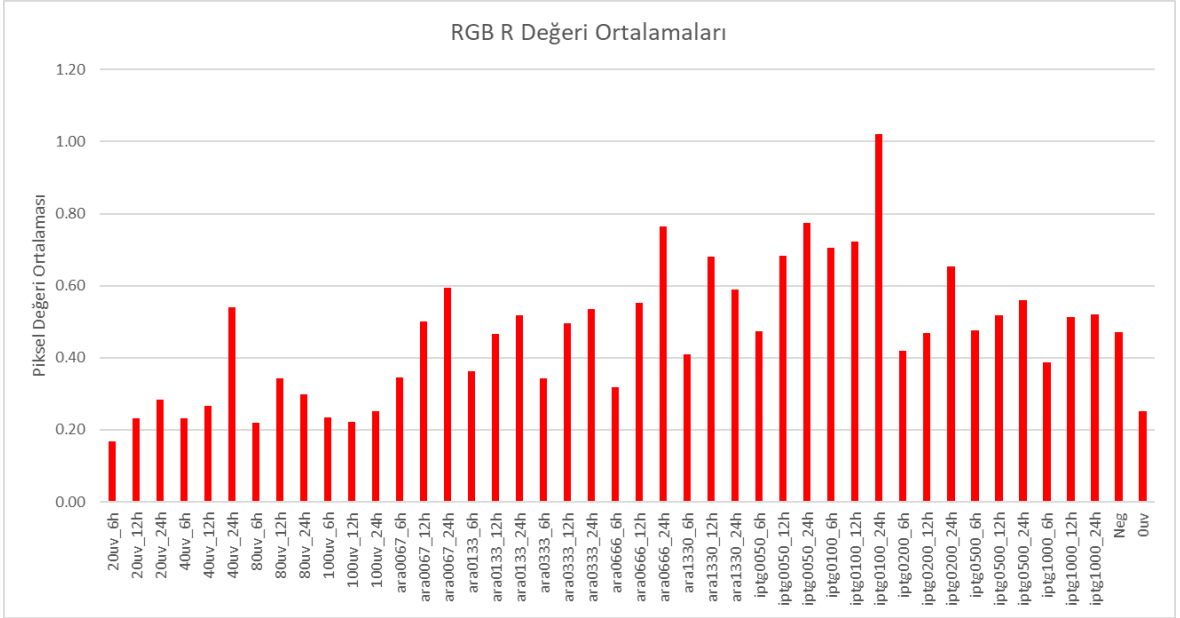
### **RGB (Red Green Blue) Analizi**

FITC filtresinde 40x büyütmede görüntüleri alınan örnekler öncelikle imageJ programında gürültü sinyallerinden kurtulmak için 200 piksellik ayarda “background subtraction (arkaplan çıkartma)” işlemine tabi tutulmuştur. Gürültü sinyalleri çıkartıldıktan sonra her örneğin görüntüsü için RGB histogram analizi uygulanmış ve ortalama red (R), green (G) ve blue (B) değerleri kaydedilmiştir.

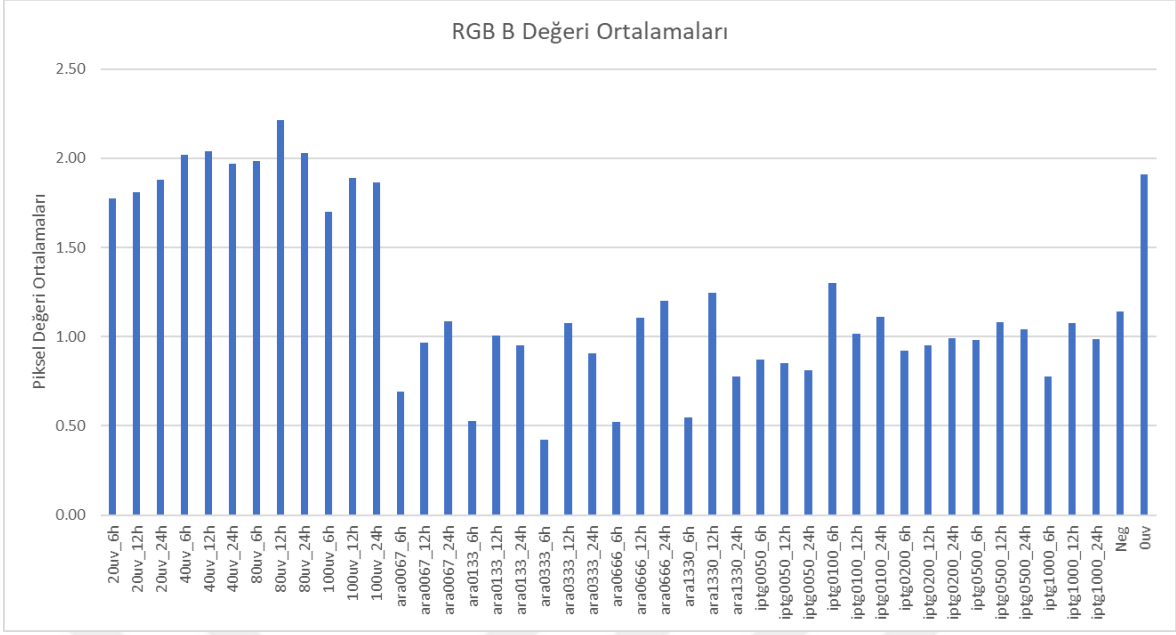
Şekil 5.19.’da her görüntülerdeki bütün piksellerin green değerleri ortalaması verilmiştir. Bu verilere göre UV kullanılan sistemlerden yüksek üretim yapan pozitif kontrollere en yakın örnek, 80/256 UV’de 12 saat indüklenmiş olarak hücrelerdir.



Şekil 5.19. Bütün örnek görüntülerinin tüm piksellerindeki G (yeşil) değerleri ortalamaları  
 Şekil 5.20. ve Şekil 5.21.'de ise, sırasıyla bütün örneklerin görüntülerinin red ve blue analizlerinin ortalama değerleri için grafikler verilmiştir. Piksellerin R ve B değerlerinin deney, negatif kontrol ve pozitif kontrol grupları arasında anlamlı bir farka sahip olmadığı görülmüştür.



Şekil 5.20. Bütün örnek görüntülerinin tüm piksellerindeki R (kırmızı) değerleri ortalamaları



Şekil 5.21. Bütün örnek görüntülerinin tüm piksellerindeki B (mavi) değerleri ortalamaları RGB analizinden daha derin bir karşılaştırma yapmak için görüntülerin HSV analizi gerçekleştirilmiş ve bu analizler birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

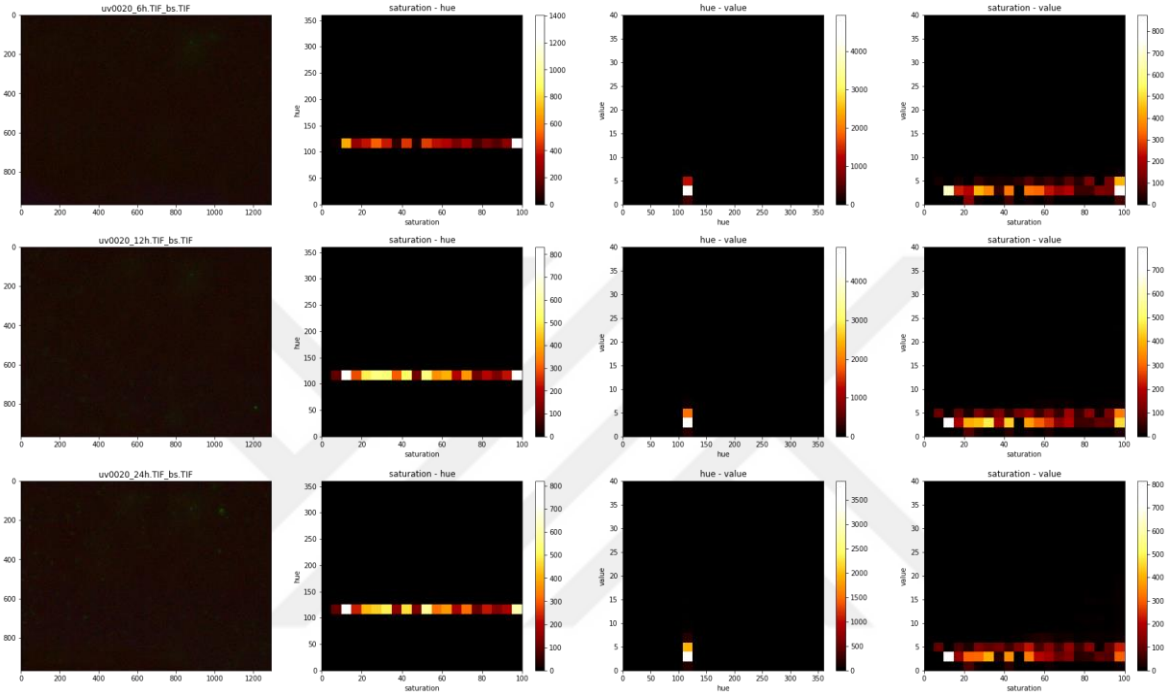
### HSV (Hue Saturation Value) Analizi

Python programlama dilinde yazılan kod ile mikroskop görüntülerinin HSV piksel analizleri gerçekleştirilmiş ve hue, saturation ve value değerleri için histogramlar oluşturulmuştur. Hue değeri Value değerleri piksellerin parlaklığını

EGFP ışınım dalga boyu 509nm hue değeri 123 olduğundan toplam HSV analizinde hue değerleri  $123 \pm 10$  aralığında filtrelenmiş ve saturation – value, hue-value ve saturation-hue 2D histogramları oluşturulmuştur. Filtrelenen aralığın tam ortası EGFP'nin beklenen değeridir, 113 değeri ise Oluşturulan 2D histogramları daha sonra her örnek için, Earth Mover's Distance yöntemi ile karşılaştırılmış ve her örnek sonucunun birbirine uzaklığı incelenmiştir. 2D histogramlardaki renk açıldıkça görüntülerin değerlerinde bulunan piksel sayısı artmaktadır.

Şekil 5.22.'te 20/256 UV ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-PATG hücrelerinin  $123 \pm 10$  hue değerleri aralığında filtrelenmiş saturation-hue, hue-value ve saturation-value değerleri için 2D histogramları verilmiştir. Bu grafiklerde 20/256 UV'de 6 saat indüklenen ve  $123 \pm 10$  hue değerleri aralığında ışınım gerçekleştirmiş olan hücrelerin

value aralığı 5-10 arasında, saturation değerleri ise 40 ila 100 değerleri arasındadır. 12 saat boyunca 20/256 UV ile indüklenen hücreler ise 5-20 value aralığında değerlere ve 40-100 aralığında saturation değerlerine sahiptir. 12 saat indüklenen hücrelerdeki 60-90 aralığı saturation değerlerindeki piksel sayısının arttığı görülmektedir. Aynı UV yoğunluğuyla 24 saat indüklenen hücrelerde ise 5-15 value değerleri arasındaki piksel sayısı ve 60-80 saturation değerleri arasındaki piksel sayısı artmıştır

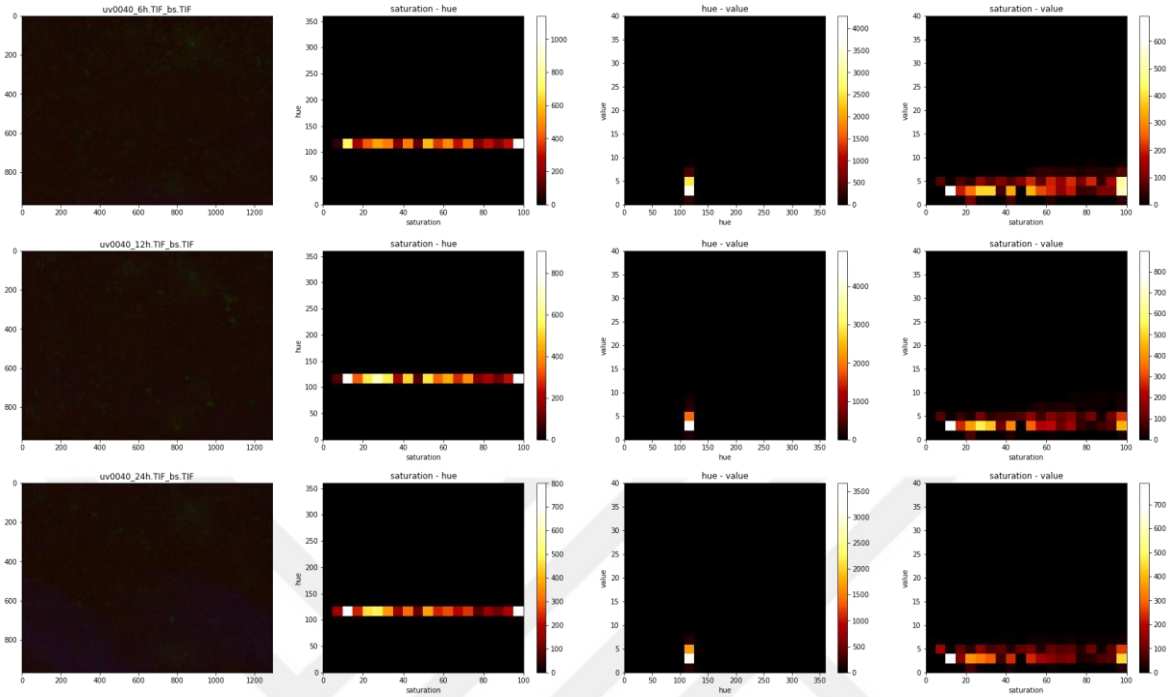


Şekil 5.22. 20/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

Şekil 5.23.'te 40/256 UV yoğunluğunda 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin  $123 \pm 10$  hue değerleri aralığında filtrelenmiş saturation-hue, hue-value ve saturation-value değerleri için 2D histogramları verilmiştir. 6 saat indüklenmiş ve  $123 \pm 10$  hue değerleri aralığında ışığa gerçekleştirmiş olan hücrelerin value aralığı 5-20 arasında, saturation değerleri ise 40-100 aralığında ve 70-90 aralığında piksel sayısı yoğunluk göstermektedir. 12 saat indükleme sonucunda value değeri 5-15 arasında olan piksellerde 6 saate göre artış görülmüş, saturation değerlerinde ise 70-80 aralığındaki piksel

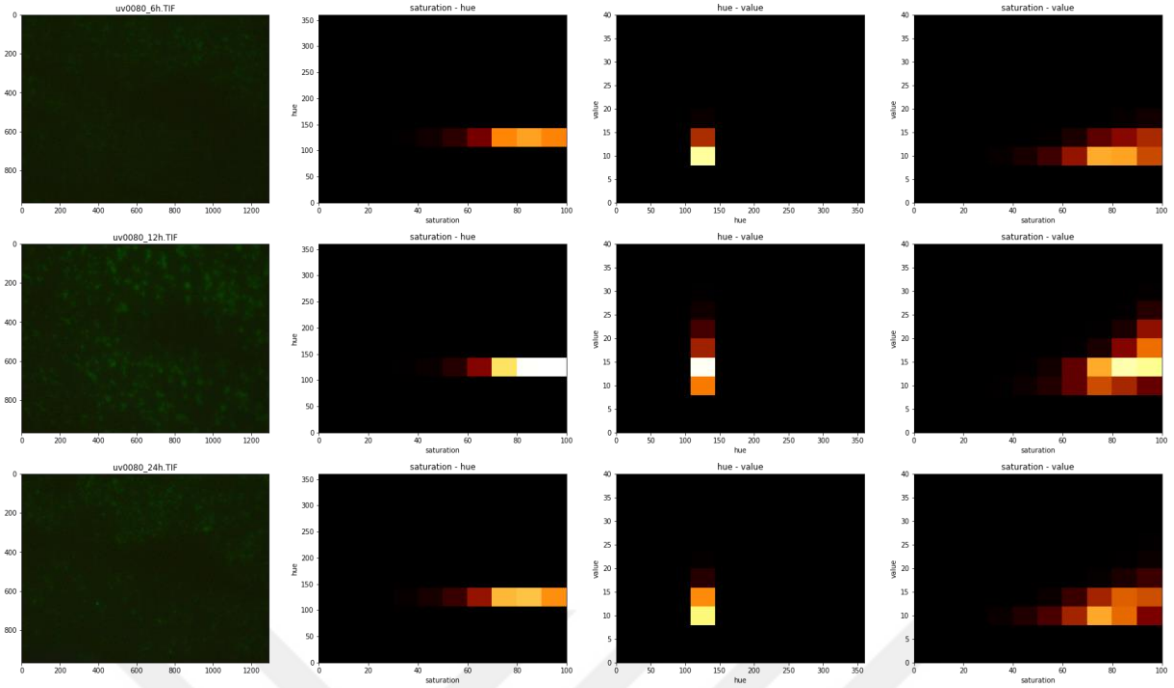


sayısında artış görülmüştür. 24 saat sonunda value değerlerindeki piksel oranı sabit kalmışken, saturation aralığı 10-100 değerleri aralığında görülmüştür.



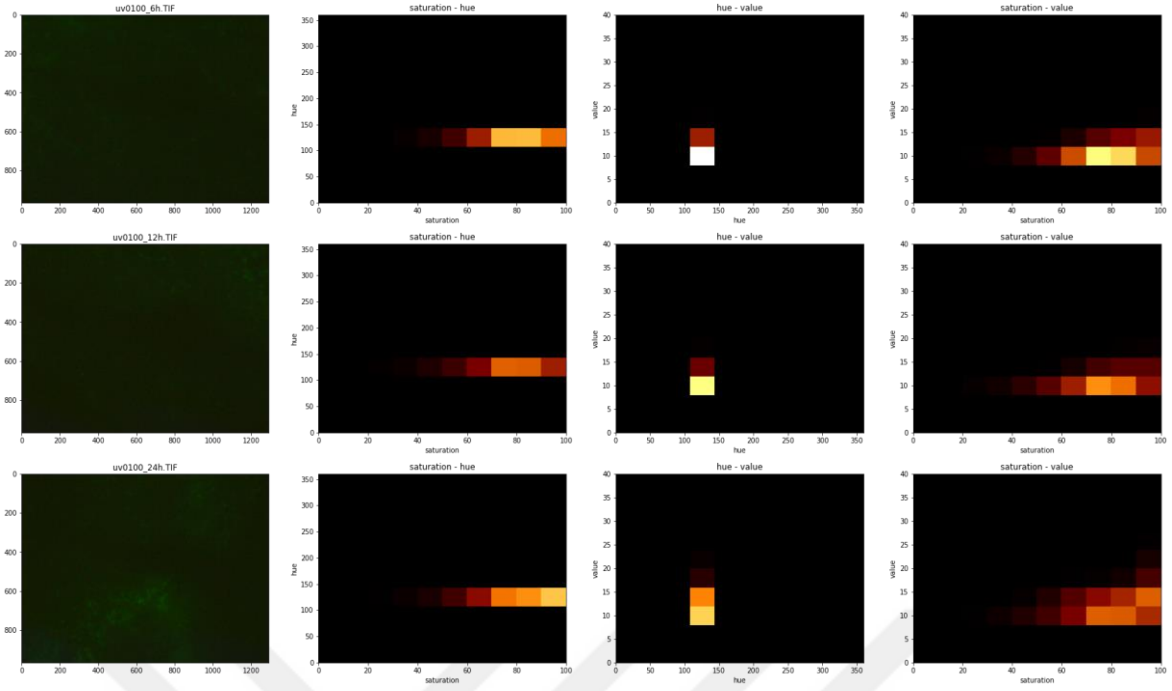
Şekil 5.23. 40/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

Şekil 5.24.'te 80/256 UV yoğunluğunda 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin  $123 \pm 10$  hue değerleri aralığında filtrelenmiş saturation-hue, hue-value ve saturation-value değerleri için 2D histogramları verilmiştir. 6 saat indüklenen hücrelerde saturation değerleri 40-100 aralığında piksel, value değerleri ise 5-20 aralığında yoğun olarak piksel bulundurmaktadır. 12 saat indüklenen hücrelerde saturation değerleri 50-100 arasında olan pikseller görülmüş ve 80-100 değerlerindeki pikseller çok yoğun görülmüştür. 5-30 aralığındaki value değerlerinde pikseller görülmüş ve 10-15 aralığında piksel yoğunluğu çok yoğun görülmüştür. 24 saat indüklenme sonucunda yüksek saturation değerlerindeki piksel sayısı düşmüş ve tekrar 6 saatteki gibi 40-100 arası değerlere sahip pikseller görülmüştür. 24 saat için ise 5-20 value değerleri aralığında pikseller elde edilmiş ve piksel yoğunluğu azalmıştır.



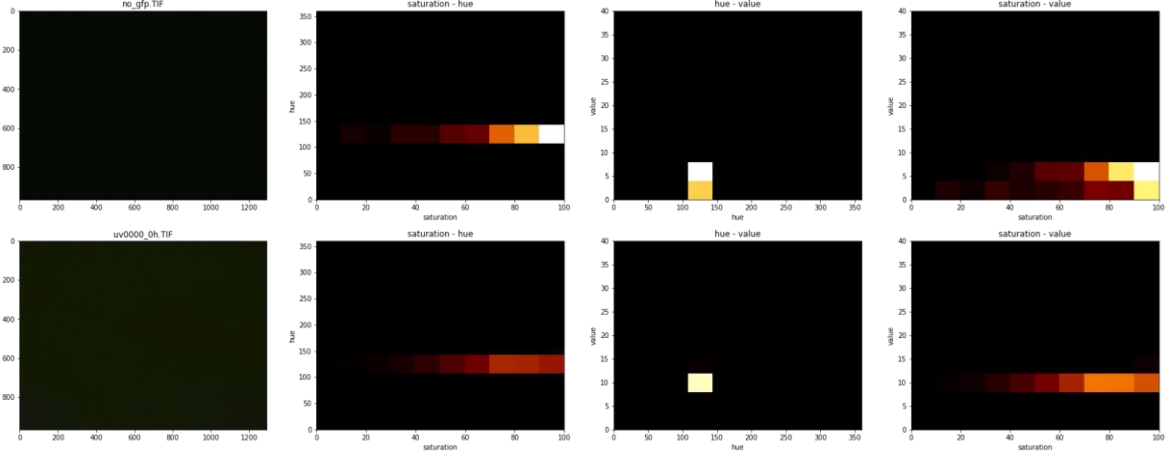
Şekil 5.24. 80/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

Şekil 5.25.'te ise 100/256 UV yoğunluğunda 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin  $123 \pm 10$  hue değerleri aralığında filtrelenmiş saturation-hue, hue-value ve saturation-value değerleri için 2D histogramları verilmiştir. 100/256 UV yoğunluğunda 6 saat indüklenen hücrelerde saturation değerleri 40-100 aralığında olan ve value değerleri 5-20 değerleri arasında olan pikseller görülmüştür. 12 saat indükleme sonucunda saturation değerleri 30-100 arasında olan pikseller elde edilmiştir fakat, 60-100 saturation değer aralığındaki piksel yoğunluğu azalmıştır. 12 saat indükleme sonucu piksellerin bulunduğu value değer aralığında bir değişim gerçekleşmemiş olup, piksel yoğunluğu az da olsa azalmıştır. 24 saat indükleme sonucunda saturation değerleri 30-100 arasında olan pikseller elde edilmiş fakat, 90-100 aralığındaki değerlere sahip piksel yoğunluğu artmıştır. Piksel yoğunluğu 24 saat indükleme sonucunda 5-20 value değerleri aralığında görülmüştür.



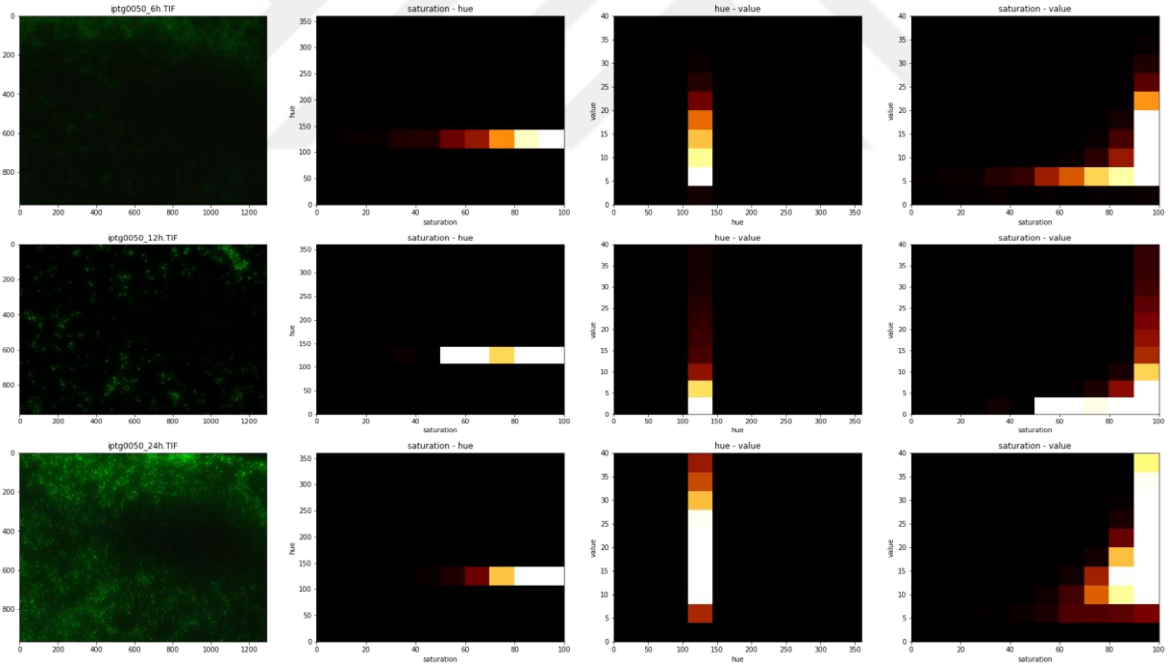
Şekil 5.25. 100/256 UV ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$  pDawT-pATG hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

2D histogramların birbirleri dışında karşılaştırılması için negatif kontrol olarak indüklenmemiş hücreler, EGFP genini içermeyen DH5 $\alpha$  hücresi ve pozitif kontrol olarak farklı IPTG ve arabinoz konsantrasyonları ile indüklenmiş BL21-pET28aGFP ve DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri kullanılmıştır. Negatif kontrol grupları için oluşturulan 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları Şekil 5.26.'de verilmiştir.

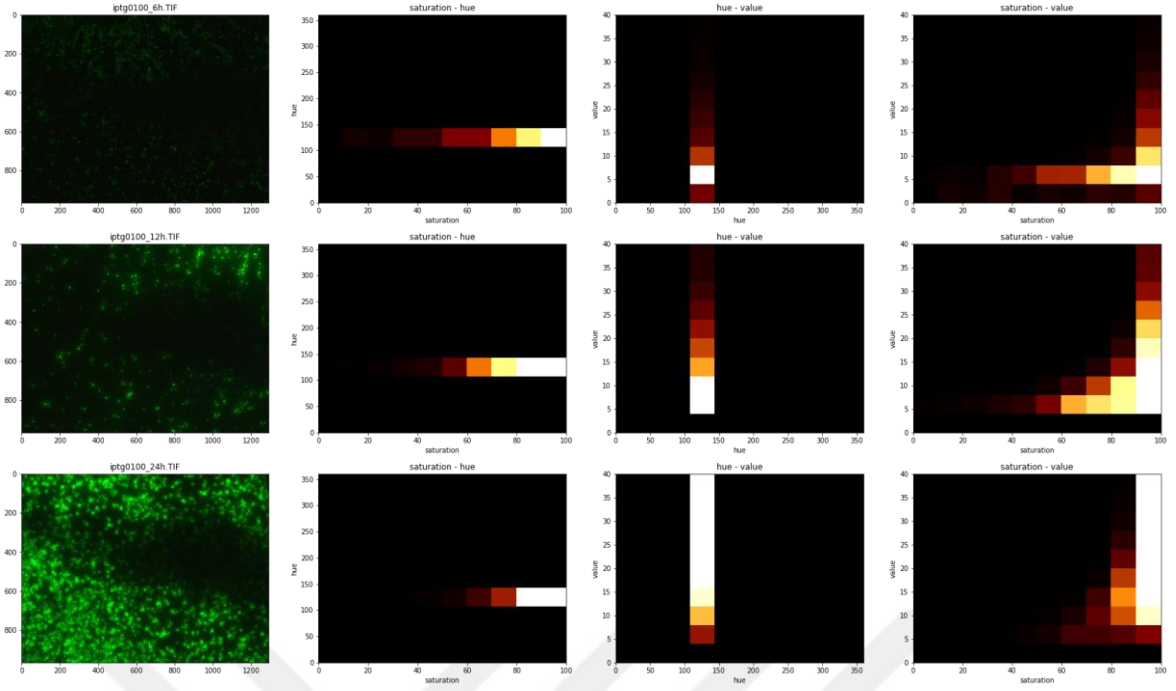


Şekil 5.26. Sırasıyla EGFP geni ya da devreyi içermeyen boş DH5 $\alpha$  hücreleri ve pDawT-pATG genetik devresini içeren fakat UV ile indüklenmemiş BL21 hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

Şekil 5.27. ve Şekil 5.28.'de sırasıyla pozitif kontrol gruplarından 0.05mM ve 0.1mM IPTG ile indüklenmiş BL21-pET28aGFP hücrelerinin 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları verilmiştir.

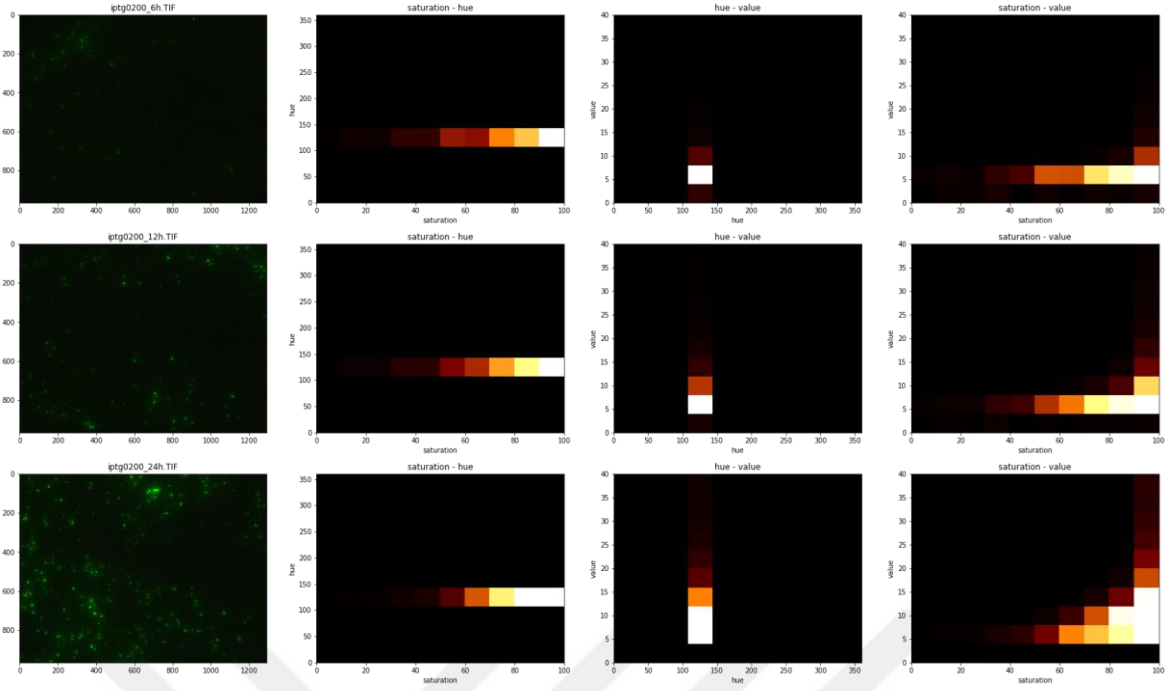


Şekil 5.27. 0.05mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

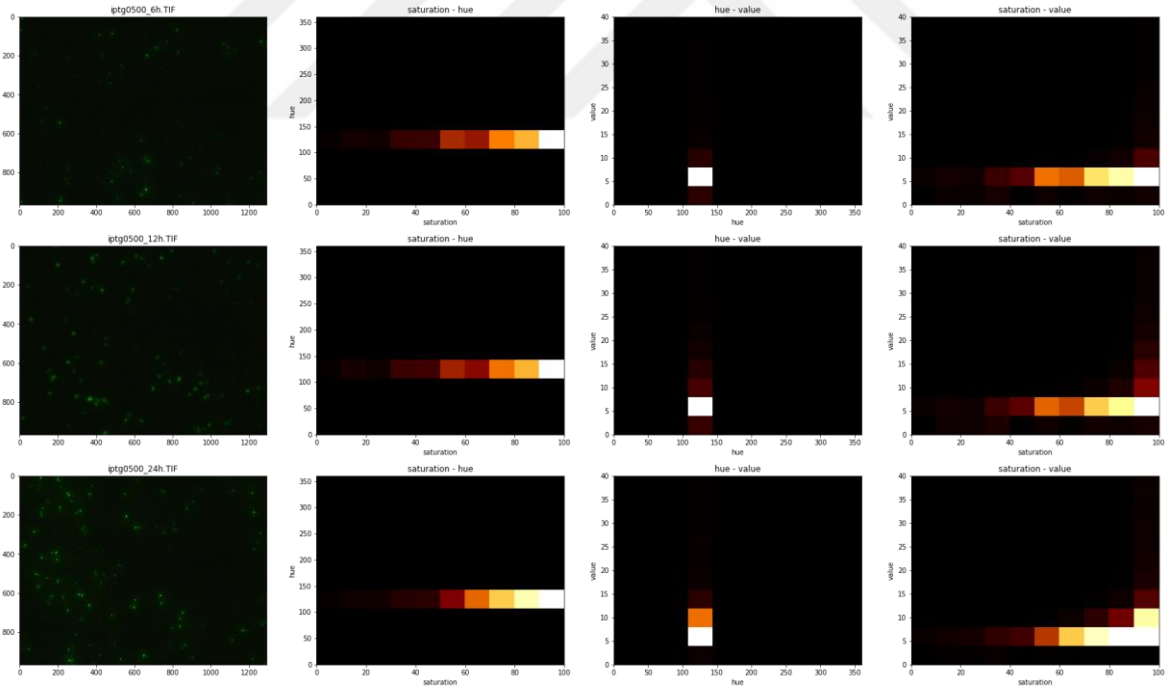


Şekil 5.28. 0.1mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

0.2mM ve 0.5mM IPTG ile indüklenmiş *E. coli* BL21-pET28aGFP hücreleri pozitif kontrol gruplarının 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları sırasıyla Şekil 5.29. ve Şekil 5.30.'da verilmiştir.

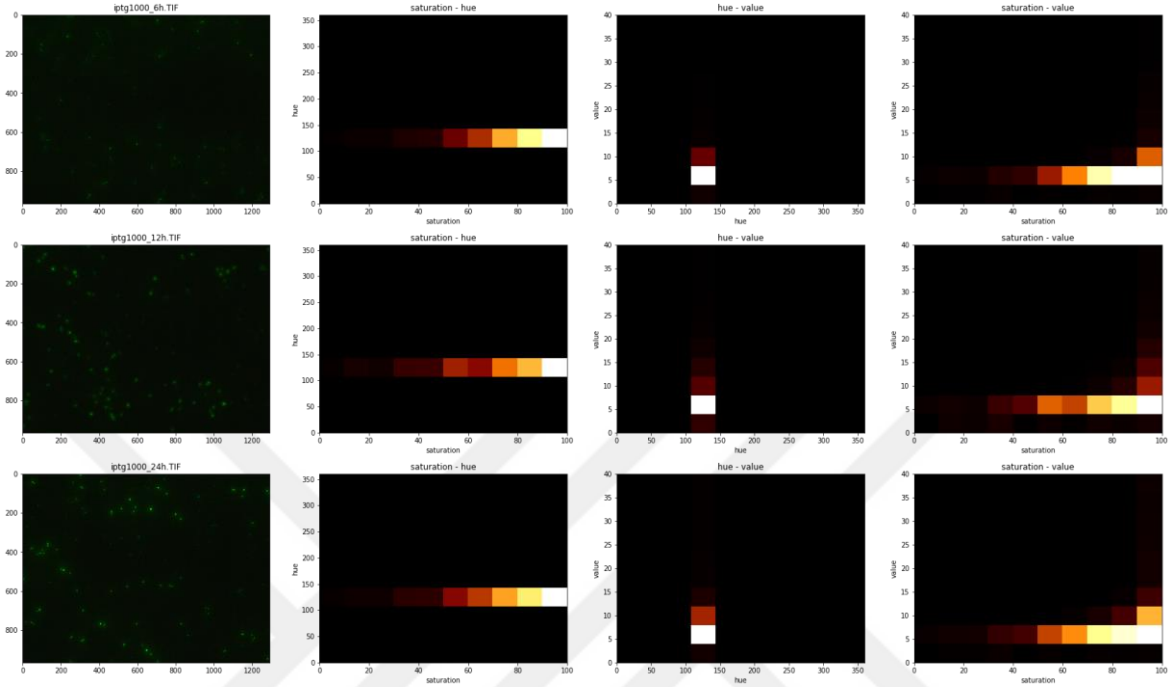


Şekil 5.29. 0.2mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar



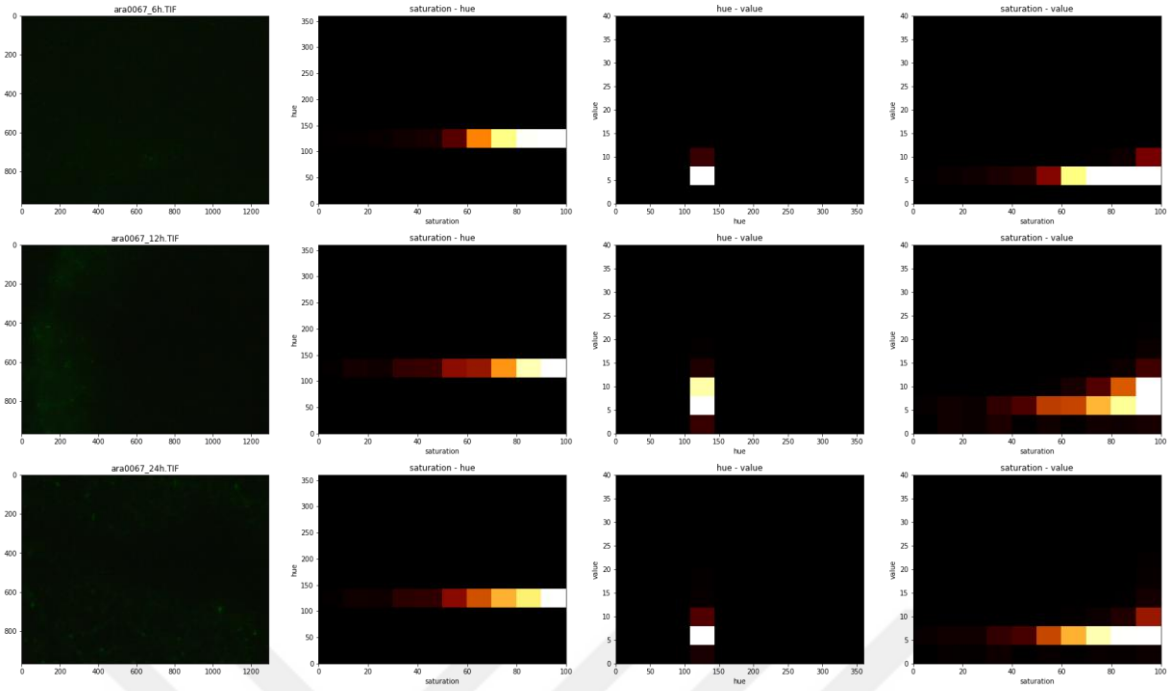
Şekil 5.30. 0.5mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

Şekil 5.31.'te ise pozitif kontrol gruplarından 1.0mM IPTG ile indüklenmiş BL21-pET28aGFP hücrelerinin 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları verilmiştir.

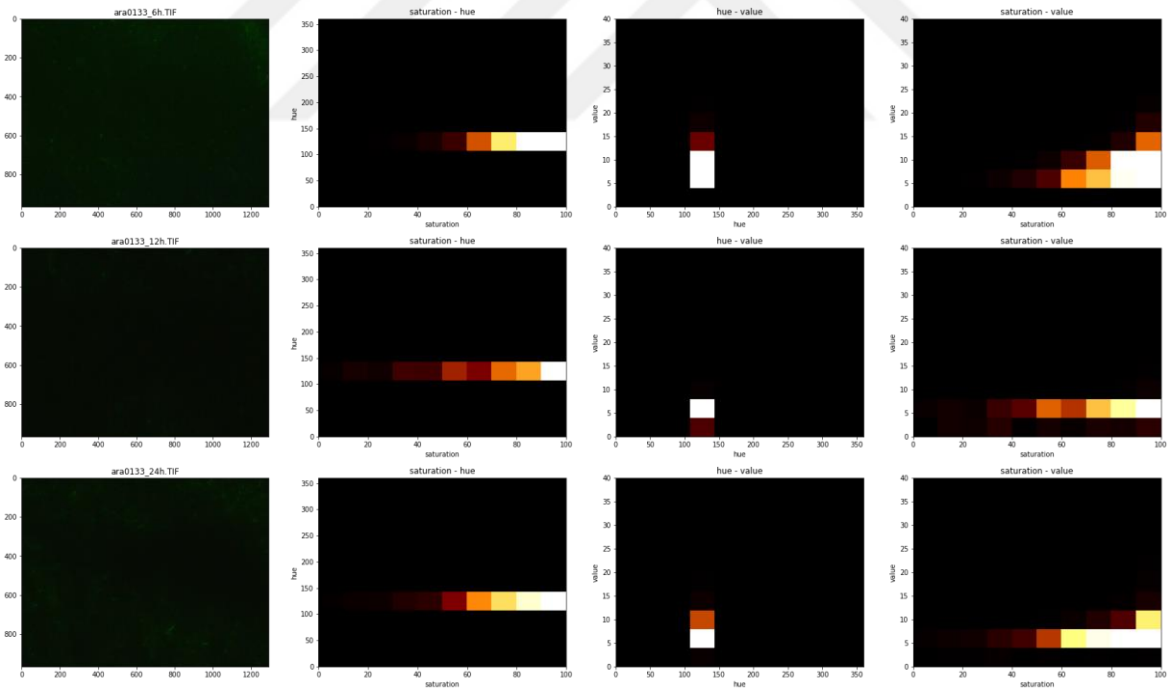


Şekil 5.31. 1.0mM IPTG ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* BL21-pET28aGFP hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerini gösteren 2D histogramlar

İkinci pozitif kontrol grubu olarak ise 6, 12 ve 24 saat boyunca, 0.67mm, 1.33mm, 3.33mm, 6.66mm ve 13.3mm arabinoz ile indüklenmiş *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücreleri kullanılmıştır. Şekil 5.32. ve Şekil 5.33.'te sırasıyla 0.67mM ve 1.33mM ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş hücrelerin 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları verilmiştir.



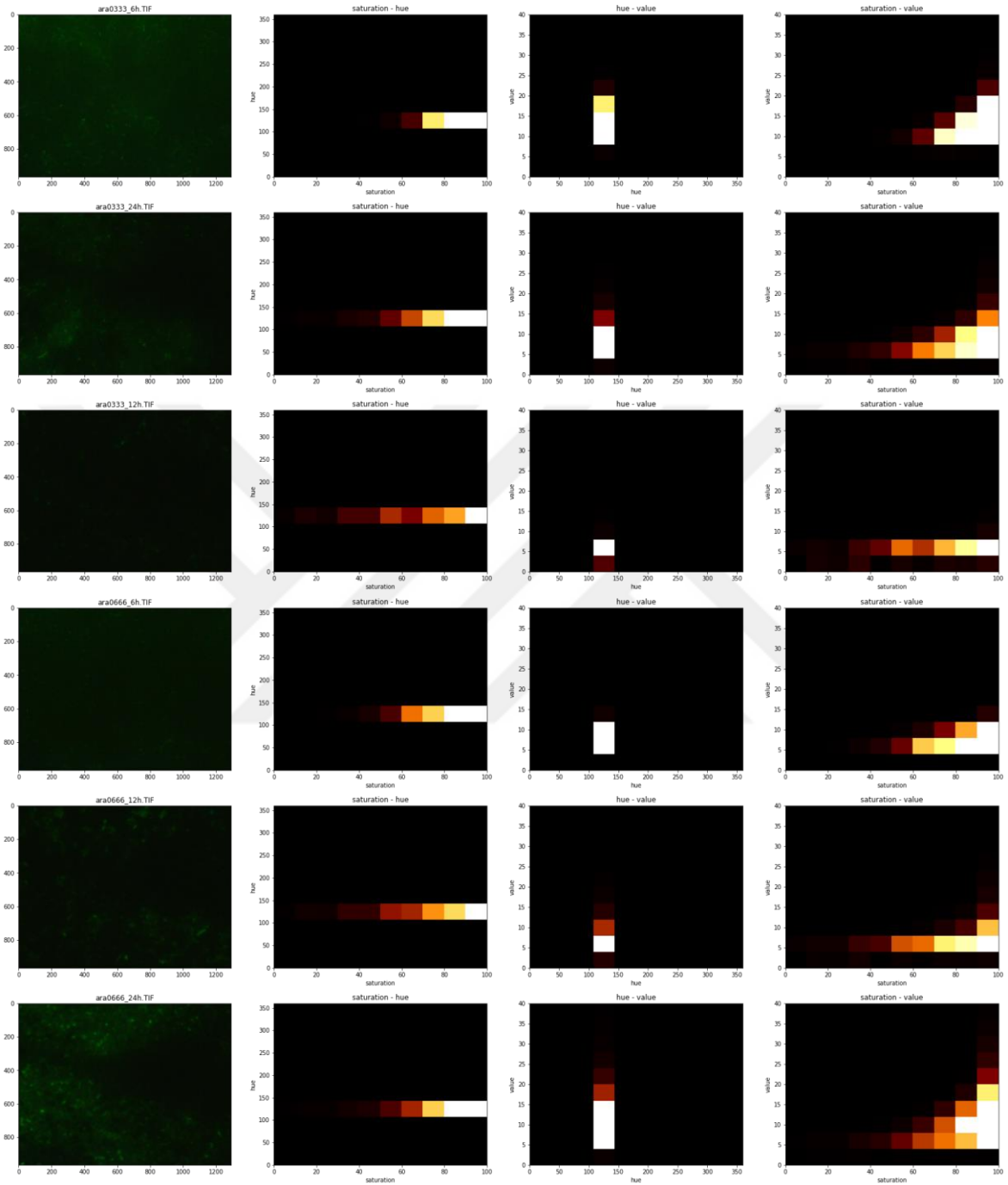
Şekil 5.32. 0.67mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar



Şekil 5.33. 1.33mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar

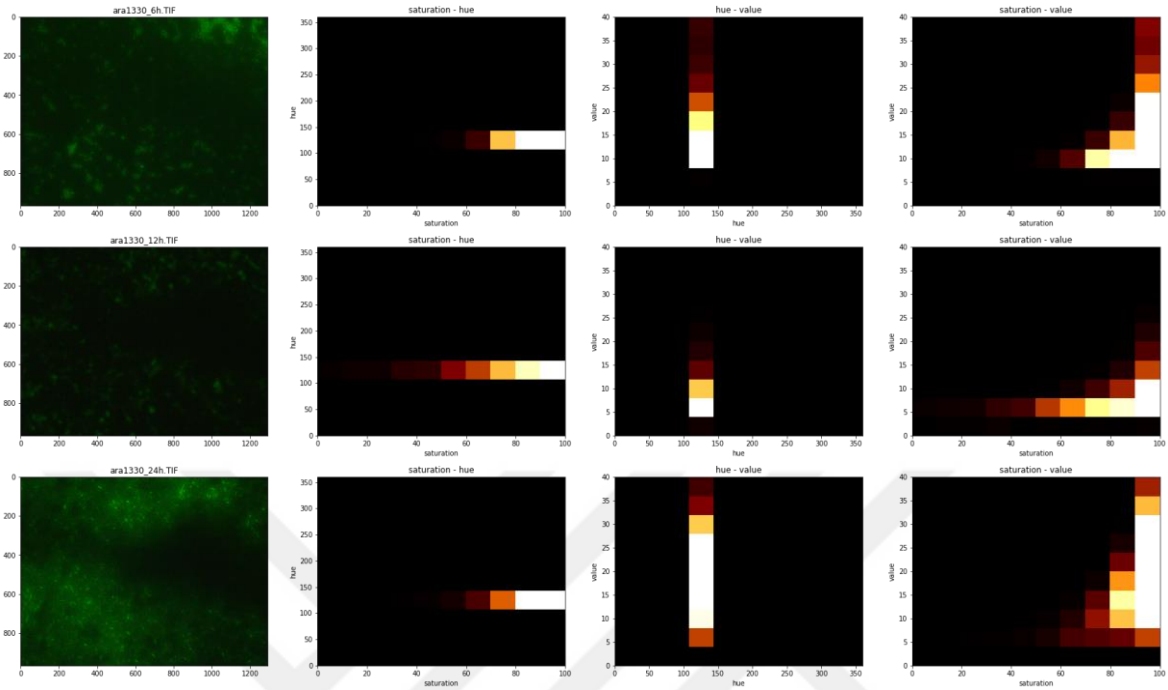


Şekil 5.34.'te 3.33mM ve 6.66mM ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş hücrelerin 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları verilmiştir.



Şekil 5.34. 3.33mM ve 6.66mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar

Şekil 5.35.'te ise 13.3mM arabinoz ile 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenmiş hücrelerin 2D saturation-hue, hue-value ve saturation-value histogramları verilmiştir.

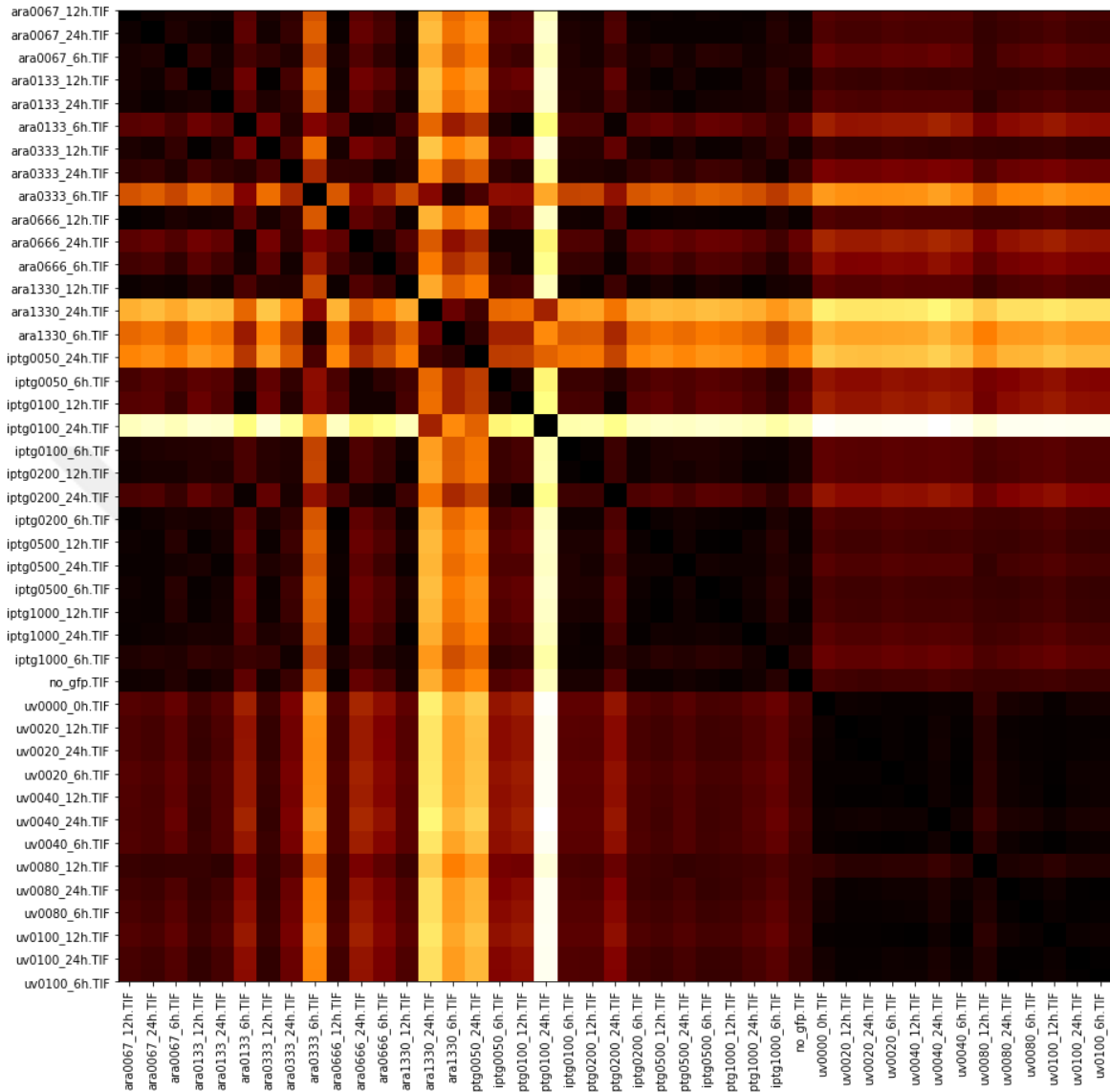


Şekil 5.35. 13.3mM arabinoz ile sırasıyla 6, 12 ve 24 saat boyunca indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGLO hücrelerinin saturation hue, hue value ve saturation-value değerlerinin gösteren 2D histogramlar

Deney, pozitif kontrol ve negatif kontrol gruplarının HSV değerlerine göre piksel dağılımlarının 2D histogramları elde edildikten sonra, Earth Mover's Distance yöntemi ile saturation-hue, hue-value ve saturation-value 2D histogramları arasındaki mesafeler hesaplanmış ve sonuç olarak her 2D histogram çeşidi için bütün örnekler arası ısı haritaları oluşturulmuştur. Bu ısı haritalarında bölgedeki renk ne kadar açıksa, o bölgeyi tanımlayan örneklerin 2D histogramları arasındaki uzaklık o kadar fazladır (beyaz en fazla fark, siyah fark yok). Bu ısı haritalarında sol üst köşeden sağ alt köşeye giden diyagonalin iki tarafı da birbiri ile aynıdır. Earth Mover's Distance yöntemi sonucu ile aynı zamanda 2D histogramların arasındaki uzaklıklar hesaplanmış ve sonuç olarak saturation-hue, hue-value ve saturation-value 2D histogramları kullanılarak örnekler arasındaki yakınlığı belirten dendogramlar da oluşturulmuştur.

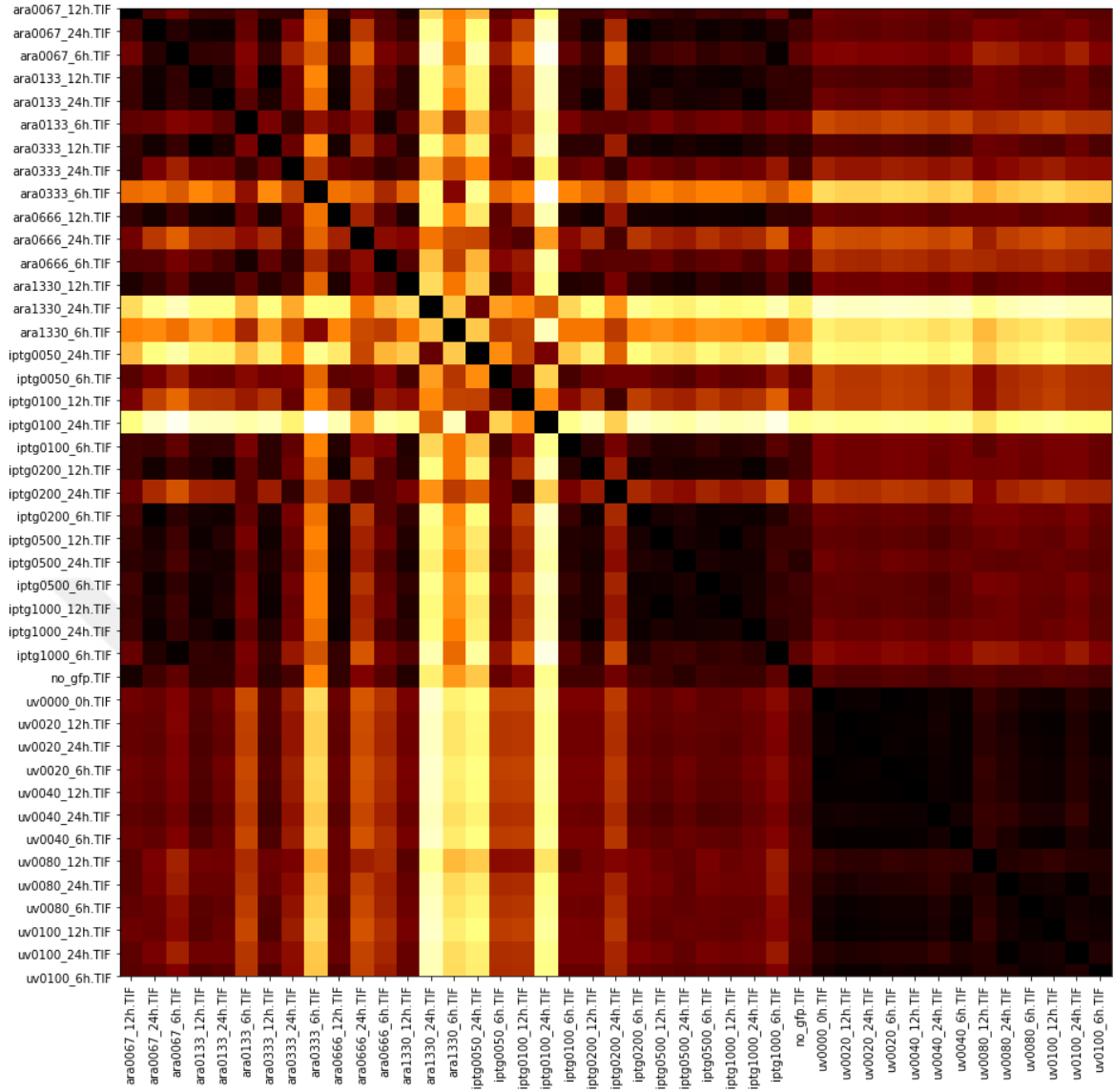
Şekil 5.36.'da saturation-hue 2D histogramlarındaki dağılımların birbirlerine olan uzaklıklarını gösteren ısı haritası verilmiştir. Isı haritasına göre UV ile indüklenen sistemde

saturation-hue dağılımları pozitif kontroller ile en yakın olan örnek 80/256 UV yoğunluğunda 12 saat indüklenen örnekler olduğu görülmektedir.



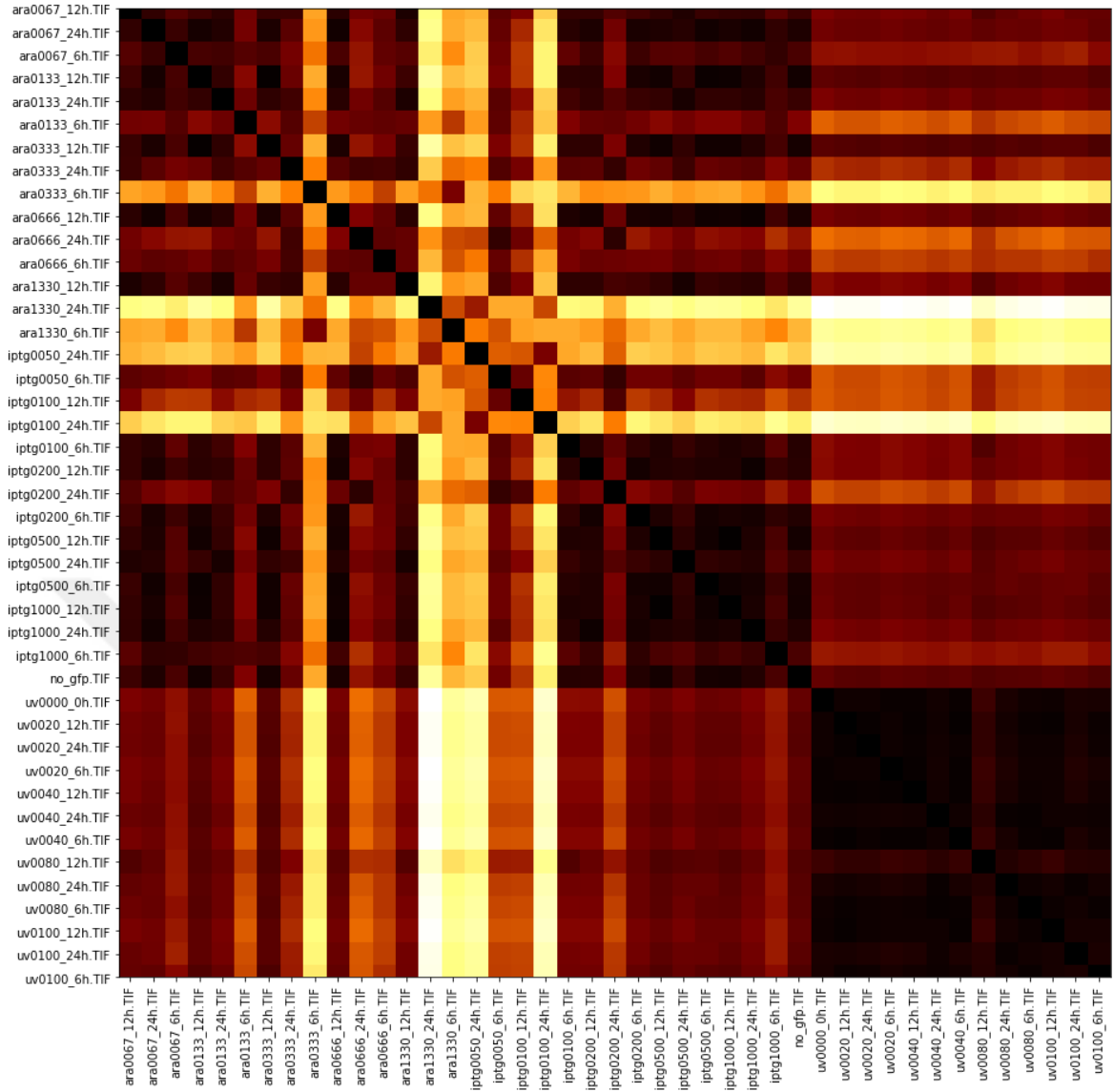
Şekil 5.36. Saturation-hue değerlerine göre piksel dağılımlarını gösteren 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası

Şekil 5.37.'de hue-value 2D histogramlarındaki dağılımların birbirlerine olan uzaklıklarını gösteren ısı haritası verilmiştir. Isı haritasına göre UV ile indüklenen sistemde hue-value dağılımları 80/256 UV yoğunluğunda 12 saat indüklenmiş örnekler 13.3mM arabinoz ile 12 saat indüklenmiş ve 0.1mM IPTG ile 6 saat indüklenmiş örneklerle yakinken, 40/256 UV yoğunluğunda 24 saat indüklenmiş örnekler ise 3.3mM ve 1.33mM arabinoz ile 12 saat indüklenmiş örnekler ile yakındır.



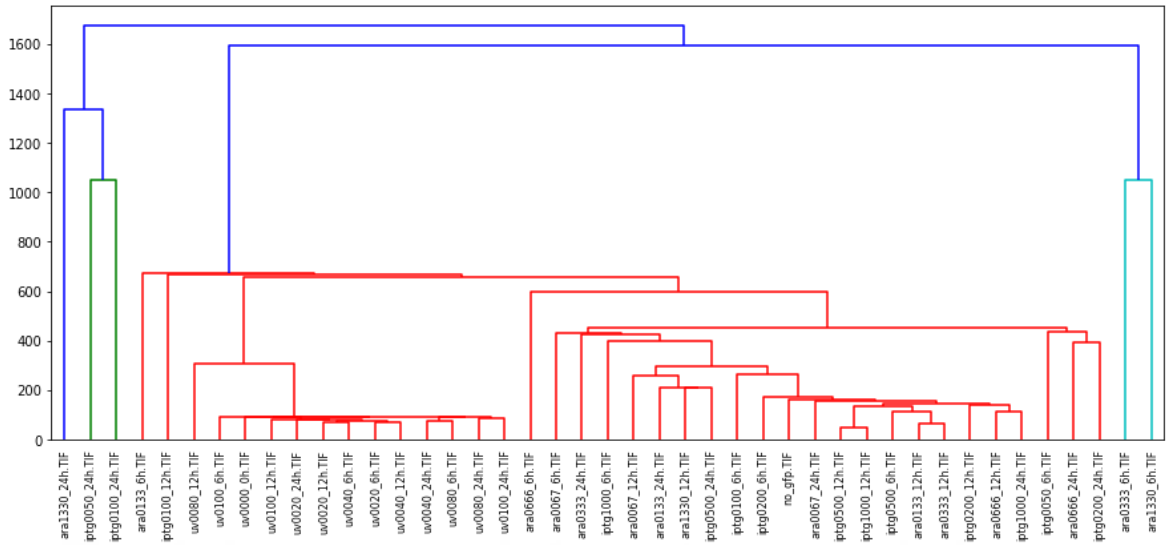
Şekil 5.37. Hue-value değerlerine göre piksel dağılımlarını gösteren 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası

Şekil 5.38’de ise saturation-value 2D histogramlarındaki dağılımların birbirlerine olan uzaklıklarını gösteren ısı haritası verilmiştir. Bu ısı haritasında 80/256 UV yoğunluğunda 12 saat indüklenen örneklerin, diğer UV yoğunluklarında ve indüksiyon sürelerinde indüklenen örneklerden pozitif kontrollere daha yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 5.38. Saturation-value değerlerine göre piksel dağılımlarını gösteren 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası

Şekil 5.39.'da ise Saturation-value 2D histogramlarındaki dağılımların karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan uzaklıkların dendrogram grafiğinde karşılaştırılması verilmiştir. Bu dendrogramdan, 80/256 UV yoğunluğunda 12 saat indüklenen hücrelerin saturation-value dağılımlarının pozitif kontrol gruplarına, diğer deney gruplarına kıyasla çok daha yakın olduğu görülmektedir. Bu deney grubu özellikle arabinoz ile indüklenen pozitif kontrol grubuna genel olarak daha yakındır ve IPTG ile indüklenen pozitif kontrol grubundan ise 1mM IPTG ile 6 saat, 0.05mM IPTG ile 24 saat ve 0.2mM IPTG ile 24 saat indüklenen pozitif kontrol gruplarına diğer deney gruplarına kıyasla çok daha yakındır.



Şekil 5.39. Saturation-value 2D histogramlarındaki dağılımlarının karşılaştırılması ve birbirlerine yakınlıklarını ortaya çıkartan dendrogram

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

Mikrobiyal hücre fabrikaları ile rekombinant protein üretimi günümüzde biyoteknolojinin ilgilendiği önemli alanlardan biri olma yolunda ilerlemektedir. Bu hedefle dünyada plazmidler kullanılarak birçok genetik devre oluşturulmuştur. Rekombinant protein üretim genetik devreleri olarak iki ya da daha çok plazmidli sistemler de geleneksel olarak kullanılan tek plazmidli sistemler gibi yoğun olarak çalışılmıştır (62–65). Üretim için kullanılan genetik devrelere birçok promotor bölgesi entegre edilmiş ve yaygınca kullanılmıştır.  $P_{T7}$ ,  $P_{ara}$  ve  $P_{lac}$ ,  $P_{tac}$ ,  $P_{lacUV5}$  gibi promotorlar geleneksel olarak verimli kullanılan genetik devre promotorlarına örnek verilebilir (66,67). Bunlara ek olarak doğada hali hazırda bulunan  $P_{luxl}$  gibi promotor sistemleri de genetik devrelerde son zamanlarda kullanılmaya başlanmıştır (67). Promotora ve operonlara bağlı olarak bu genetik devreler çeşitli yöntemlerle indüklenebilmektedirler. Örneğin *lac* operonu laktoz ya da laktoz analog molekülü olarak IPTG ile indüklenebilmekte iken, bu çalışmada kullanılan pDawn plazmidi omurgasının içerdiği operon 400-470nm dalga boyundaki UV ve mavi ışık ile indüklenerek protein üretimini sağlamaktadır (2,68).  $P_{T7}$ , T7 RNA Polimeraz enziminin transkripsiyonu başlatmak için ihtiyacı olan DNA bölgesi olduğundan genellikle bu promotora içeren sistemler kromozomal DNA’ında T7 RNA polimeraz genini içerip bu enzimi üretebilen *E. coli* BL21 gibi hücrelerde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında T7 RNA polimeraz genini kromozomal DNA’ında bulundurmayan bir bakteri suşu olan *E. coli* DH5 $\alpha$ ’da bir plazmidten ~400nm uzun dalga UV ile T7 RNA polimeraz üretilmiş, diğer plazmidten ise bu enzimin varlığında  $P_{T7}$  kontrolünde EGFP üretimi sağlanmıştır. T7 RNA polimeraz genini içermeyen hücrelerde de bu sistem sayesinde rekombinant protein üretimi gerçekleştirilebilecektir.

Üretilen genetik devre pDawn ve pACYC184 plazmid omurgalarını içermekte ve iki plazmidten oluşmaktadır.  $P_{T7}$  ve T7 RNA polimeraz sistemi verimli ve hızlı protein üretiminde yaygınca kullanılan bir sistem olduğundan genetik devrede EGFP üretimini amplifiye edeceği düşünülerek seçilmiştir.

pDawn plazmidi hali hazırda ışık ile protein üretiminin indüklenmesini YF1 histidin kinaz enzimi ile sağladığı için bu plazmidten T7 RNA polimeraz enzimini ışık kontrolünde üretmesi için seçilmiştir. pACYC184 plazmidinden ise P<sub>T7</sub> kontrolünde EGFP üretimi sağlanmıştır. Bu plazmidin genetik devrenin ikinci elemanı olarak seçilmesinin sebebi ise pDawn plazmidinin replikasyon orijini olan pBR322 ailesinden olmayan p15A replikasyon orijinine sahip olması. Aynı aileden olmayan iki replikasyon orijini sayesinde iki plazmid de aynı anda aynı hücrede, segregasyona uğramayıp üretilebilmiştir. pDawn plazmidi kanamisin, pACYC184 plazmidi ise tetrasiklin direnç kaseti taşıdığından transforme edilen bakteriler kanamisin ve tetrasiklinli besi yerlerinde seçilebilmiştir.

pDawn ile pACYC184 plazmidleri izole edildikten sonra *EcoRI* enzimi ile kesilmek için saflaştırılmıştır. İzole edilen plazmidler PEG ile çöktürüldüğünde kesim için yeterli miktarda ve gereken saflıkta elde edilebilmiştir. Kesim sonrası *in vitro* ortamda lineerize edilmiş plazmidleri *EcoRI* enziminden uzaklaştırmak için de saflaştırma deneyleri uygulanmış fakat verimli bir şekilde plazmidler elde edilememiştir. Genetik devrelere eklenen T7RNAP geni ve P<sub>T7</sub>+EGFP bölgeleri *EcoRI* kesim bölgeleri içermemektedir. Bu sebeple klonlama deneyleri öncesinde hücreler saflaştırılmamıştır.

SLiCE klonlama deneylerinde insert DNA'ların 3' ve 5' uçlarında pDawn ve pACYC184 plazmidlerinde hedeflenen bölgelere homolog 20 baz çiftlik bölgeler kullanılarak rekombinasyon gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde rekombinasyon *in vitro* ortamda gerçekleştirilmiştir.  $\lambda$  prophage-red proteinin optimum çalışma sıcaklığı olduğundan rekombinasyon 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Rekombinasyon için gerekli olan inkübasyon süresi 15-60 dakika arasındır, fakat 15 dakika ile 60 dakika arasında klonlama verimi neredeyse aynıdır, bu sebeple 15 dakika inkübasyon tercih edilmiştir (51).

SLiCE klonlamada 15 dakikalık inkübasyon sona erdiğinde klonlama sonucundaki plazmidler *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine aktarılmıştır. Aktarımdan hemen önce kültürlerin 0.4-0.6 OD olduğuna dikkat edilmiş ve TSS-DMSO ile hücreleri parçalamamak adına, hücre pelletleri kesilmiş bir pipet ucu ile yavaşça resüspanse edilmiştir. SLiCE ürünleri hücre süspansiyonuna eklendiğinde tüpler el yardımı ile nazikçe çalkalanmıştır.

SLiCE ürünlerinin *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine transformasyonu sonucunda üreyen kolonilere koloni PZT gerçekleştirilmiştir ve bu aşamada pipet ucu ile koloni alınırken kolonilerin



oluşturduğu polisakkaritli yapıdan yüklü miktarda almamaya özen gösterilmiştir. Burada kolonilerden gelebilecek olan DNA harici materyaller PZT deneylerinde kullanılan Taq DNA Polimeraz enzimini inhibe edebilmektedir (69). Koloni PZT sonuçlarında pDawT plazmidi için Dream Taq Polimeraz ve Dream Tamponu kullanılmışken, pATG plazmidi için Phusion Polimeraz ve Phusion HF Tamponu kullanılmıştır. pATG plazmidi koloni PZT deneyleri için Dream Taq polimeraz kullandığında non-spesifik PZT bantları alınmıştır, bu sebeple için bağlanma sıcaklığı çok daha yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyan Phusion Polimeraz ve Phusion HF tamponu ile PZT yapılarak istenilen bant elde edilmiş ve klonlamanın kontrolü sağlanmıştır.

İki genetik devrenin de sorunsuzca oluşturulduğu koloni PZT ile onaylandıktan sonra, üretilen pDawT ve pATG plazmidleri *E. coli* DH5 $\alpha$  bakterisine ko-transforme edilmiş ve EGFP üretimi için deneyler başlatılmıştır.

Üretim için hazırlanan devrede Arduino Uno mikrokontrollörü kullanılmış, bu mikrokontrollöre yüklenen yazılım ile devreye eklenen potansiyometreler ve LED ekrandan geri bildirim sayesinde ~400nm uzun dalga UV veren LED lambanın ve fermentör sisteminde hücrelerin oksijenasyonunu sağlayan manyetik karıştırıcının gücü ayarlanabilmektedir. LED lambaya verilen maksimum güç 10W'tır fakat hücrelere 10W gücünün tamamının verilmemesi deney tasarlanırken tercih edilmiştir. 10W gibi güçlü bir ışık hücrelere verilirse hücrelerin fazla ısınabileceği dolayısıyla zarar göreceği düşünülerek yazılım içerisinde "pulse width modulation" tekniği ile bu güç ayarlanmıştır. Pulse width modulation tekniğinde maksimum değer 256 minimum değer ise 0'dır. Bu çalışmada hücreler 20/256 UV, 40/256 UV, 80/256 UV ve 100/256 UV yoğunluklarında ~400nm uzun dalga UV ile indüklenmiştir. Bu yoğunluklar sırasıyla, 0,78W, 1,56W, 3,13W ve 3,91W güçlerine denk gelmektedir. Manyetik karıştırıcının gücü ise her örnek için daima 80/256 gücüne ayarlanmıştır.

SDS page ile farklı ışık yoğunluklarında farklı zamanlarda izole edilen proteinler yürütüldüğü zaman jel üzerinde gözle görülen fark sadece 3,13W yoğunlukta 6 saat indüklenen hücreler ile 12 ve 24 saat indüklenen hücreler arasında ve 3,91W yoğunlukta 6 saat indüklenen hücreler ile 12 ve 24 saat indüklenen hücreler arasındadır. 0,78W ve 1,56W ışık yoğunluklarında indüklenen hücrelerin EGFP üretimi SDS page ile görülebilmekteyken,

EGFP bantları arasında gözle görülür bir fark gözükmemektedir. Bu sebeple hücrelerin FITC filtresi altında mikroskop görüntüleri incelenmiştir.

~400nm uzun dalga UV ile indüklenen hücreler FITC filtresi altında 40x büyütmede görüntülendiğinde, 0,78W gücündeki ışıkla indüklenen hücrelerdeki EGFP üretiminin, 1,56W, 3,13W ve 3,91W gücünde indüklenen hücrelere kıyasla daha az olduğu görülmüştür. Üretimin kontrolü için konvansiyonel protein ekspresyon plazmidleri olan EGFP üreten pET28a ve pGLO plazmidleri pozitif kontrol olarak kullanılmış, negatif kontrol olarak ise indüklenmemiş hücreler ve EGFP proteini üretecek herhangi bir genetik devre içermeyen boş DH5a hücresi kullanılmıştır.

Görüntüler üzerinde RGB analizleri gerçekleştirildiğinde, beklendiği gibi R (kırmızı) ve B (mavi) değerleri tüm örnekler için çok düşük düzeyde çıkmış, çalışılan örnekler arasında anlamlı bir fark ortaya çıkartmamıştır. Fakat G (yeşil) değerleri bu noktada önemlidir, çünkü görüntüde yeşil olan bölgelerin yoğunluğunu hesaplamamızı sağlamıştır. Bu sonuca göre fazla üretim yapan pozitif kontrollere en yakın olan deney grubu 3,13W UV yoğunluğunda 12 saat indüklenen (80/256 UV yoğunluğunda) hücreler olmuştur. Bu değerlere göre 3,13W ile 12 saat indüklenen hücrelerin en yakın olduğu pozitif kontrol grubu 0.2mM IPTG ile 24 saat ve 13.3mM arabinoz ile 6 saat indüklenmiş hücrelerdir. 3,13W ile 12 saat indüklenen hücrelerin yeşil piksel değeri ortalaması 5.44 iken 0.2mM IPTG ile 24 saat indüklenen hücrelerin yeşil piksel ortalaması 5.68, 13.3mM arabinoz ile 6 saat indüklenen hücrelerin yeşil piksel ortalaması 5.73 çıkmıştır. Daha detaylı analiz için RGB analizlerinin üzerine RGB değerleri HSV değerlerine çevrilmiş ve HSV analizi gerçekleştirilmiştir.

HSV analizinde, hue (H) değerleri piksellerin rengini, saturation (S) değerleri piksellerin ne kadar soluk ya da dolgun olduğunu, value (V) değerleri ise piksellerin parlaklığını belirtmektedir. HSV analizi için EGFP ışımalarının rengi ~129 hue değerinde gerçekleştiği için  $129 \pm 10$  aralığına hue değerleri filtrelenmiş ve bu aralıktaki hue-value, saturation-value ve saturation-hue değerleri arasında 2 boyutlu histogramlar çıkartılarak piksellerin bu değerlerinin dağılımları incelenmiştir. Daha sonra piksel dağılımları karşılaştırılmak için Earth Mover's Distance yöntemi ile dağılımlar arasındaki uzaklıklar karşılaştırılarak üç 2D histogram için de ısı haritaları oluşturulmuştur. Hue-value ve saturation-hue ısı haritaları hue değerleri filtrelendiği için aslında sadece sırasıyla value ve saturation değerlerini

karşılaştırmaktadır. Belirlenen hue aralığındaki value-saturation ısı haritası bu durumda en açıklayıcı veriyi göstermektedir. Value-saturation ısı haritasında pozitif kontrol grupları ile en az farka sahip olan yani en yakın olan deney grubu 3,13W ile 12 saat indüklenen hücreler olarak ortaya çıkmıştır. Bu da RGB analizini doğrular bir sonuç ortaya çıkartmıştır. Value-saturation 2D histogramlarının birbirlerine olan uzaklıkları hesaplanarak Y ekseninde uzaklığı belirten bir dendogram oluşturulmuştur. Bu dendograma göre örneklerin uzaklıkları incelendiğinde 3,13W UV ile 12 saat indüklenen hücrelerin (uv0080\_12h) saturation-value değerleri diğer deney gruplarına kıyasla pozitif kontroller ile daha yakın çıkmıştır. Bu yakınlık da deney grupları arasında en verimli protein üretimi sağlayan pDawT-pATG sisteminin 3,13W UV ile 12 saat indüklenmesi ile elde edildiğini belirtmektedir.

Filtrelenen hue değerleri aralığındaki değişen value değerleri, hücrelerin ürettiği EGFP'nin parlaklığını belirtmektedir. Value değeri arttıkça parlaklık artmaktadır. Parlaklık pozitif gruplara yakın olan 3,13W UV ile 12 saat indüklenen deney grubunda, IPTG ile indüklenen pET28aGFP ve arabinoz ile indüklenen pGLO sistemlerinde göre daha az görülmüştür. Fazla parlak EGFP görüntüleri üretilen EGFP'lerin inklüzyon cisimleri oluşturduğunu göstermektedir. Inklüzyon cisimleri bir protein çok fazla üretildiği zaman, bu proteinlerin bir araya gelerek birikmesi ile oluşur ve çözünmemektedirler. Üretilen proteinlerin çok olup çözünebilir protein olmamaları bazı durumlarda dezavantaj olabilmektedir çünkü örneğin Triton X-100 ile protein izolasyonu gibi yöntemlerle verimli bir şekilde izole edilememektedirler. Bütün bunlar 3,13W UV ile 12 saat indüklenen pDawT-pATG sisteminin inklüzyon cisimleri oluşturmadan protein üretimi sağladığını göstermektedir.

Üreme eğrilerine bakıldığında ise ilk olarak 80/256 ve 100/256 UV'de ki bakteri üremelerinin 20/256 ve 40/256 UV yoğunluklarında üremelere göre ciddi bir düşüş gördüğü göz önünde bulundurulduğunda UV yoğunluğunun bu hücrelerin üremesine engel olduğu (hücrelerin çok ısınması gibi) düşünülebilir, fakat negatif kontrol olarak genetik devreyi içermeyen ve aynı UV yoğunluklarında üretilen *E. coli* DH5 $\alpha$  – pACYC184 hücrelerinin aynı UV yoğunluklarında 24 saat sonunda yaklaşık 11 OD'ye ulaşması bu hücrelerin 80/256 ve 100/256 UV yoğunluklarında üretime yetişemediği düşünülmüştür. Protein üretim stresi bakteriler üzerinde yaygınca görülmektedir ve bu noktada hücrelerin kullandığı enerjinin protein üretimi için kullanılırken toplam enerjisini hücre bölünmesine harcamadığı düşünülmüştür. (54,70,71)

## 6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında üretilen iki plazmidli (pDawT ve pATG) genetik devre ile EGFP proteininin  $P_{T7}$  kontrolünde kromozomal DNA'sında T7 RNA polimeraz genine sahip olmayan ve hücre fabrikası olarak konvansiyonel olarak kullanılmayan bir hücre olan *E. coli* DH5 $\alpha$  hücresinde üretimi sağlanmıştır. Çalışmamızda kullanılan UV yoğunluğu ve zaman aralıklarda FITC filtresindeki floresan mikroskop görüntülerinin analizlerine göre en verimli EGFP üretimi 0,8 OD'den itibaren 3,13W UV (80/256 UV) ile 12 saat indüklenen *E. coli* DH5 $\alpha$  hücrelerinde gerçekleşmiştir. Ayrıca bu çalışmada Ohlendorf ve arkadaşlarının ürettiği pDawn plazmidinin sadece 470nm mavi ışıkta değil, ~400nm uzun dalga UV ışığında da indüklenbildiği gösterilmiştir (2).

Günümüzde rekombinant protein üretimi için geleneksel olarak kullanılan  $P_{T7}$  promotörü kontrolünde gen ifadesi gerçekleşen pET plazmidleri kadar fazla protein üretimi bu tez çalışmasındaki deneyler ile gerçekleştirilememiş fakat, pDawT + pATG sisteminin çalıştığı ve bu sistem ile üretilen protein miktarının inklüzyon cisimleri üretmediği ve dolayısıyla çözünür protein üretimi olduğu gösterilmiştir. Bu sistem sayesinde geleneksel olarak  $P_{T7}$  kontrolünde üretim sağlanan *E. coli* BL21 hücre hattı yerine, daha kompleks ve konvansiyonel olarak kullanılmayan mikrobiyal hücre fabrikalarında protein üretimi gerçekleştirilebilir.

Ayrıca IPTG ve arabinoz ile indüklenen sistemlerde, indüklenme sonrası protein üretimi durdurulması zor bir işlemdir. IPTG *E. coli* hücreleri tarafından metabolize edilemeyen bir molekül olduğundan besiyerindeki besin ve oksijen yetmeyene kadar hücreler proteinleri üretmeye devam etmektedir. IPTG indüksiyonunun durdurulması için %1 oranında glukoz eklenmesi gerekmektedir, fakat bu da %100 oranda protein üretimini durdurmamaktadır eklenen glukoz *lac* represörünü kullanarak indüksiyonu durdurmaktadır (72,73). Arabinoz ise metabolize olan bir moleküldür ve hücre içerisindeki arabinoz tükenene kadar protein üretimi devam eder (74,75). Işık ile indüklenen sistemlerde ise üretim ışık verildiğinde başlar ve ortamda indüksiyon elemanı olan ışık kesildiğinde üretim durur. Bu da protein üretimi için gerçek bir devre anahtarı mekanizması demektir. Bu sistemde ise ~400nm uzun dalga UV ışık ile T7 RNA polimeraz enzimi üretimi kontrol edilerek, hedef protein üretimi  $P_{T7}$

kontrolünde gerçekleştirilmiştir. Böylece rekombinant proteinlerin üretiminin kontrolü istenildiği zaman durdurularak ve istenildiği zaman devam ettirilerek sağlanabilecektir.

*E. coli* dışında birçok başka *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas putida* gibi bakteri ya da maya suşu mikrobiyal hücre fabrikası olarak kullanılmak için denenmekte ve kullanılmaktadır (76–78). İki plazmidli pDawT-pATG genetik devresi sayesinde P<sub>T7</sub> kontrolünde rekombinant protein üretimi için *E. coli* BL21 gibi kromozomal DNA'sında T7 RNA polimeraz geni taşıyan hücreler dışında birçok mikrobiyal hücre fabrikasında bu protein üretim aracının kullanılmasının önü açılabilir. pDawT ve pATG vektörleri, ucuz ve kolay klonlama deneyleri ile daha karmaşık rekombinant proteinlerin üretimi için farklı mikrobiyal hücre fabrikalarında *E. coli* DH5 $\alpha$  bakterisinden daha verimli üretim sağlayabilecektir. Bu tez çalışması ile hali hazırda var olan mikrobiyal hücre fabrikaları rekombinant protein üretim araçlarına bir yenisi eklenmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, et al. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci.* 1979 Jan 1;76(1):106–10.
2. Ohlendorf R, Vidavski RR, Eldar A, Moffat K, Möglich A. From Dusk till Dawn: One-Plasmid Systems for Light-Regulated Gene Expression. *J Mol Biol.* 2012 Mar;416(4):534–42.
3. Clark DP, Pazdernik NJ. Recombinant Proteins. In: *Biotechnology* [Internet]. Elsevier; 2016 [cited 2019 Apr 4]. p. 335–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123850157000107>
4. Park M, Tsai S-L, Chen W. Microbial Biosensors: Engineered Microorganisms as the Sensing Machinery. *Sensors.* 2013 May 6;13(5):5777–95.
5. Jackson DA, Symons RH, Berg P. 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*. *Proc Natl Acad Sci.* 1972 Oct 1;69(10):2904–9.
6. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 1973 Nov 1;70(11):3240–4.
7. Johnson I. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science.* 1983 Feb 11;219(4585):632–7.
8. Hwang H-G, Kim K-J, Lee S-H, Kim C-K, Min C-K, Yun J-M, et al. Recombinant Glargine Insulin Production Process Using *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol.* 2016 Oct 28;26(10):1781–9.
9. Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangués R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Factories* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Apr 6];15(1). Available from: <http://www.microbialcellfactories.com/content/15/1/33>

10. Ferrer-Miralles N, Villaverde A. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Factories*. 2013;12(1):113.
11. Glazer AN, Nikaido H. *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*. Second Edition. Cambridge University Press; 2007.
12. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Mar;8(3):207–17.
13. Berg R. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol*. 1996 Nov;4(11):430–5.
14. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983 Jun;166(4):557–80.
15. Little JW. Autodigestion of *lexA* and phage X repressors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;5.
16. Little JW, Mount DW. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*. 1982 May;29(1):11–22.
17. Schweizer H, Boos W. Transfer of the A(*argF-lac*)U169 Mutation Between *Escherichia coli* Strains by Selection for a Closely Linked *Tn10* Insertion. *Mol Genet Genomics*. 1983;2.
18. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci*. 1990 Jun 1;87(12):4645–9.
19. Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi S-H, et al. Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J Mol Biol*. 2009 Dec;394(4):644–52.
20. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 1986 May;189(1):113–30.

21. William Studier F, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. [6] Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 1990 [cited 2019 Apr 4]. p. 60–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/007668799085008C>
22. Katzke N, Arvani S, Bergmann R, Circolone F, Markert A, Svensson V, et al. A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif*. 2010 Feb;69(2):137–46.
23. Kwon S-K, Kim SK, Lee D-H, Kim JF. Comparative genomics and experimental evolution of *Escherichia coli* BL21(DE3) strains reveal the landscape of toxicity escape from membrane protein overproduction. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Dec [cited 2019 Apr 4];5(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/srep16076>
24. Xin F, Dong W, Dai Z, Jiang Y, Yan W, Lv Z, et al. Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2019 Jul 15]. p. 207–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640857000095>
25. Alper H, Fischer C, Nevoigt E, Stephanopoulos G. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc Natl Acad Sci*. 2005 Sep 6;102(36):12678–83.
26. Dietrich JA, Shis DL, Alikhani A, Keasling JD. Transcription Factor-Based Screens and Synthetic Selections for Microbial Small-Molecule Biosynthesis. *ACS Synth Biol*. 2013 Jan 18;2(1):47–58.
27. Ptashne M. *A genetic switch: phage lambda revisited*. 3. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004. 154 p.
28. Hoynes-O'Connor A, Moon TS. Programmable genetic circuits for pathway engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2015 Dec;36:115–21.
29. Moon TS, Lou C, Tamsir A, Stanton BC, Voigt CA. Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. *Nature*. 2012 Nov;491(7423):249–53.



30. Daniel R, Rubens JR, Sarpeshkar R, Lu TK. Synthetic analog computation in living cells. *Nature*. 2013 May;497(7451):619–23.
31. Bonnet J, Yin P, Ortiz ME, Subsoontorn P, Endy D. Amplifying Genetic Logic Gates. *Science*. 2013 May 3;340(6132):599–603.
32. Temme K, Hill R, Segall-Shapiro TH, Moser F, Voigt CA. Modular control of multiple pathways using engineered orthogonal T7 polymerases. *Nucleic Acids Res*. 2012 Sep;40(17):8773–81.
33. Brophy JAN, Voigt CA. Principles of genetic circuit design. *Nat Methods*. 2014 May;11(5):508–20.
34. Liao C, Blanchard AE, Lu T. An integrative circuit–host modelling framework for predicting synthetic gene network behaviours. *Nat Microbiol*. 2017 Dec;2(12):1658–66.
35. Gardner TS, Cantor CR, Collins JJ. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*. 2000 Jan;403(6767):339–42.
36. Sathiamoorthy S, Shin JA. Boundaries of the Origin of Replication: Creation of a pET-28a-Derived Vector with p15A Copy Control Allowing Compatible Coexistence with pET Vectors. Chatterji D, editor. *PLoS ONE*. 2012 Oct 22;7(10):e47259.
37. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci*. 1979 Apr 1;76(4):1648–52.
38. Englesberg E, Squires C, Meronk FJ. THE L-ARABINOSE OPERON IN *ESCHERICHIA COLI* B/r: A GENETIC DEMONSTRATION OF TWO FUNCTIONAL STATES OF THE PRODUCT OF A REGULATOR GENE\*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1969.
39. Casadaban MJ. Regulation of the regulatory gene for the arabinose pathway, *araC*. *J Mol Biol*. 1976 Jul;104(3):557–66.

40. Schleif R. Regulation of the L-arabinose operon of Escherichia coli. *Trends Genet.* 2000;16(12):559–565.
41. Möglich A, Ayers RA, Moffat K. Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases. *J Mol Biol.* 2009 Feb;385(5):1433–44.
42. Monson EK, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc Natl Acad Sci.* 1992 May 15;89(10):4280–4.
43. Chang ACY, Cohen SN. Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid. *J BACTERIOL.* 1978;16.
44. Ashwini M, Murugan SB, Balamurugan S, Sathishkumar R. Advances in molecular cloning. *Mol Biol.* 2016 Jan;50(1):1–6.
45. Kaniecki K, De Tullio L, Greene EC. A change of view: homologous recombination at single-molecule resolution. *Nat Rev Genet.* 2017 Dec 11;19(4):191–207.
46. Hartley JL. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Res.* 2000 Nov 1;10(11):1788–95.
47. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Sep 25;109(39):E2579–86.
48. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010 Sep;11(9):636–46.
49. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2281–308.
50. Zhang Y, Werling U, Edlmann W. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res.* 2012 Apr 1;40(8):e55–e55.

51. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) Cloning Method. In: Valla S, Lale R, editors. DNA Cloning and Assembly Methods [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2014 [cited 2019 May 2]. p. 235–44. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-764-8\\_16](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-764-8_16)
52. Holmes DG, Lipo TA. Pulse width modulation for power converters: principles and practice. Hoboken, NJ: John Wiley; 2003. 724 p.
53. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microb Cell Factories*. 2008;7(1):11.
54. Hoffmann F, Rinas U. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. In: Physiological Stress Responses in Bioprocesses [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004 [cited 2019 Jul 7]. p. 73–92. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/b93994>
55. Hoffmann F, Weber J, Rinas U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol Bioeng*. 2002 Nov 5;80(3):313–9.
56. Jakobs S, Subramaniam V, Schönle A, Jovin TM, Hell SW. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett*. 2000 Aug 18;479(3):131–5.
57. Georgieva L, Dimitrova T, Angelov N. RGB and HSV colour models in colour identification of digital traumas images. 2005;6.
58. Ganesan P, Rajini V. Assessment of satellite image segmentation in RGB and HSV color space using image quality measures. In: 2014 International Conference on Advances in Electrical Engineering (ICAEE) [Internet]. Vellore, India: IEEE; 2014 [cited 2019 Jul 22]. p. 1–5. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/6838441/>
59. Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 1998 Mar;209(1–2):95–103.

60. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680–5.
61. Okegawa Y, Motohashi K. A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochem Biophys Rep*. 2015 Dec;4:148–51.
62. Tabor S. Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current Protocols in Molecular Biology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2001 [cited 2019 Apr 4]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471142727.mb1602s11>
63. Harth G. A two-plasmid system for stable, selective-pressure-independent expression of multiple extracellular proteins in mycobacteria. *Microbiology*. 2004 Jul 1;150(7):2143–51.
64. Equbal MdJ, Srivastava P, Agarwal GP, Deb JK. Novel expression system for *Corynebacterium acetoacidophilum* and *Escherichia coli* based on the T7 RNA polymerase-dependent promoter. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013 Sep;97(17):7755–66.
65. Brzoska AJ, Firth N. Two-Plasmid Vector System for Independently Controlled Expression of Green and Red Fluorescent Fusion Proteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*. 2013 May 1;79(9):3133–6.
66. Choi YJ, Morel L, Le Francois T, Bourque D, Bourget L, Groleau D, et al. Novel, Versatile, and Tightly Regulated Expression System for *Escherichia coli* Strains. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Aug 1;76(15):5058–66.
67. Nocadello S, Swennen E. The new pLAI (lux regulon based auto-inducible) expression system for recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories*. 2012;11(1):3.
68. Neubauer P, Hofmann K, Holst O, Mattiasson B, Kruschke P. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time

using lactose as inducer. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 1992 Mar [cited 2019 Jul 4];36(6). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00172185>

69. Xu Y. Robust Colony PCR from Multiple *E. coli* Strains using OneTaq® Quick-Load® Master Mixes. :3.

70. Dong H, Nilsson L, Kurland CG. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol.* 1995 Mar;177(6):1497–504.

71. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2005;16.

72. Novy R, Morris B. Use of glucose to control basal expression in the pET System. :3.

73. Briand L, Marcion G, Kriznik A, Heydel JM, Artur Y, Garrido C, et al. A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2016 Dec;6(1):33037.

74. Leblanc DJ, Mortlock RP. Metabolism of D-Arabinose: a New Pathway in *Escherichia coli*. *J BACTERIOL.* 1971;106:7.

75. Fritz G, Megerle JA, Westermayer SA, Brick D, Heermann R, Jung K, et al. Single Cell Kinetics of Phenotypic Switching in the Arabinose Utilization System of *E. coli*. Herman C, editor. *PLoS ONE.* 2014 Feb 26;9(2):e89532.

76. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 2000;16:30.

77. Kirmair L, Skerra A. Biochemical Analysis of Recombinant AlkJ from *Pseudomonas putida* Reveals a Membrane-Associated, Flavin Adenine Dinucleotide-Dependent Dehydrogenase Suitable for the Biosynthetic Production of Aliphatic Aldehydes. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(8):10.

78. Meyers A, Furtmann C, Gesing K, Tozakidis IEP, Jose J. Cell density-dependent auto-inducible promoters for expression of recombinant proteins in *Pseudomonas putida*:

Cell-density promoters for *Pseudomonas putida*. Microb Biotechnol [Internet]. 2019 Jun 25 [cited 2019 Jul 22]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.13455>



## EKLER

### EK-1 KULLANILAN MAKİNE TEÇHİZAT LİSTESİ

|                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| Thermo IEC MicroCL 17R          | Santrifüj                |
| Beckman Coulter Microfuge 18    | Santrifüj                |
| Beckman Coulter X-15R           | Santrifüj                |
| Shel Lab                        | Çalkalamalı inkübatör    |
| Nanodrop ND-1000                | Spektrofotometre         |
| Biorad Smartspec™ 3000          | Spektrofotometre         |
| Biorad Versadoc Model 1000      | Görüntüleme sistemi      |
| Biorad DNA Engine Peltier       | Thermocycler             |
| Biometra T1                     | Thermocycler             |
| Labnet VX100                    | Vortex                   |
| Biorad PowerPac Basic           | Güç kaynağı              |
| Thomas Scientific Owl           | Yatay elektroforez tankı |
| Perkin Elmer Victor 3V          | Plaka Okuyucu            |
| FinePCR SH30                    | Orbital Shaker           |
| Biorad MiniProtean Tetra System | Dikey Elektroforez tankı |
| Carl Zeiss Axio Imager M1       | Floresan Mikroskop       |

### EK-2 OPENS CAD İLE 3D BASILAN PARÇALARIN KODLARI

#### Centred Primitives Modülü

```
module ccube(size,center=[0,0,0]) {
    translate([-size[0]/2*center[0],-size[1]/2*center[1],-
size[2]/2*center[2]])
        cube(size);
}

module ccylinder(h, d, center=[0,0,0]) {
    translate([d/2-d/2*center[0],d/2-d/2*center[1],-h/2*center[2]])
        cylinder(h=h, d=d, center=false);
}

ccylinder(d=10, h=25, center=[1,0,0], $fn=64);
//ccube([10,10,10], center=[1,1,0]);
//ccube([10,10,20]);
```

## Beher Kapağı

```
use <centeredPrimitives.scad>
```

```
cXY = [1,1,0];
```

```
cX = [1,0,0];
```

```
module tip(base, h, height) {  
    linear_extrude(height=height, center=true, convexity=1, twist=0)  
    polygon(points=[[-base/2,0],  
                    [base/2,0],  
                    [0,h]],  
            paths=[[0,1,2]],  
            convexity=1);  
}
```

```
module lidwtip(d, height, tipbase) {  
    ccylinder($fn=64, d=d, h=height, center=cXY);  
    mca = asin(tipbase / d);  
    echo(mca);  
    mc = cos(mca) * d / 2;  
    echo(mc);  
    translate([0,mc,height/2]) tip(tipbase, 11, height);  
}
```

```
module hollowlid(innerD, height, tipbase, wallt) {  
    difference() {  
        lidwtip(innerD+(wallt*2), height, tipbase);  
        translate([0,0,2]) lidwtip(innerD, height, tipbase);  
    }  
}
```

```
module innerrim(outerD, height, wallt) {  
    difference() {  
        ccylinder($fn=64, d=outerD, h=height, center=cXY);  
        translate([0,0,2]) ccylinder($fn=64, d=outerD-wallt, h=height,  
center=cXY);  
    }  
}
```

```
module screwPosts(d) {  
    for (a = [25, -25, 180-25, 180+25])  
        difference() {  
            translate([d/2*cos(a), d/2*sin(a), 0])  
                ccylinder($fn=16, d=10, h=10, center=cXY);  
            translate([d/2*cos(a), d/2*sin(a), -1])  
                ccylinder($fn=16, d=5, h=12, center=cXY);  
        }  
}
```



```

    }
}

module coolerHolder(d) {
    difference() {
        ccylinder($fn=64, d=d, h=10, center=cXY);
        translate([0,4,2]) ccube([52,56,10], center=cXY);
        translate([0,0,-1]) ccube([14,14,4], center=cXY);
    }
    translate([0,16,2]) ccube([32,4,3], center=cXY);
    translate([0,-16,2]) ccube([32,4,3], center=cXY);
    screwPosts(70);
}

```

```

module lid() {
    difference() {
        union(){
            hollowlid(60, 10, 32, 2);
            innerrim(49, 13, 2);
            screwPosts(70);
        }
        translate([0,0,-1]) ccube([14,14,4], center=cXY);
    }
}

```

```

//coolerHolder(64);
lid();

```

## Manyetik Karıştırıcı Tepsisi

```
use <centeredPrimitives.scad>
```

```

cXY = [1,1,0];
cX = [1,0,0];

```

```

fan60 = 60;
fan60holes = 50;
plateThickness = 2.5;
screwD = 4;

```

```

module screwHoles(x, y, z, screwD) {
    translate([x/2, y/2, -1]) ccylinder($fn=16, h=z+2, d=screwD,
center=cXY);
    translate([-x/2, y/2, -1]) ccylinder($fn=16, h=z+2, d=screwD,
center=cXY);
}

```

```

    translate([x/2, -y/2, -1]) ccylinder($fn=16, h=z+2, d=screwD,
center=cXY);
    translate([-x/2, -y/2, -1]) ccylinder($fn=16, h=z+2, d=screwD,
center=cXY);
}

module screwPosts(x, y, z, screwD) {
    translate([x/2, y/2, 0]) ccylinder($fn=16, h=z+plateThickness,
d=screwD+8, center=cXY);
    translate([-x/2, y/2, 0]) ccylinder($fn=16, h=z+plateThickness,
d=screwD+8, center=cXY);
    translate([x/2, -y/2, 0]) ccylinder($fn=16, h=z+plateThickness,
d=screwD+8, center=cXY);
    translate([-x/2, -y/2, 0]) ccylinder($fn=16, h=z+plateThickness,
d=screwD+8, center=cXY);
}

module base(fanSize, fanHoleDist) {
    difference(){
        union() {
            ccube([fanSize,fanSize,plateThickness], center=cXY);
            screwPosts(fanHoleDist, fanHoleDist, 4, 4);
        }
        screwHoles(fanHoleDist, fanHoleDist, plateThickness+6, 4);
    }
}

base(fan60, fan60holes);

```

### EK-3 ARDUİNO IDE'DE YAZILAN ~400NM UZUN DALGA UV FERMENTÖR SİSTEMİNİN ÇALIŞMASI İÇİN GEREKLİ KOD

```

include <LiquidCrystal.h>

const int rs=13, rw=11, e=12, d4=8, d5=7, d6=4, d7=2;
LiquidCrystal lcd(rs, e, d4, d5, d6, d7);
const int uvOut=10, moOut=3;
const int uvIn=A0, moIn=A1;

int volatile uvPwm = 0;
int volatile moPwm = 0;

void setup() {
    // put your setup code here, to run once:
    lcd.begin(16, 2);
}

```

```

lcd.clear();
pinMode(uvOut, OUTPUT);
pinMode(moOut, OUTPUT);

lcd.setCursor(0, 0);
lcd.print("UV:");
lcd.setCursor(0, 1);
lcd.print("MO:");
}

void loop() {
  // put your main code here, to run repeatedly:
  int uvRead = (int)(analogRead(uvIn) / 4);
  int moRead = (int)(analogRead(moIn) / 4);
  if(uvRead != uvPwm) {
    uvPwm = uvRead;
    analogWrite(uvOut, uvPwm);
    lcd.setCursor(4, 0);
    lcd.print(uvPwm);
    lcd.print(" ");
  }
  if(moRead != moPwm){
    moPwm = moRead;
    analogWrite(moOut, moPwm);
    lcd.setCursor(4, 1);
    lcd.print(moPwm);
    lcd.print(" ");
  }
  delay(100);
}

```

#### **EK-4 COMPUTER VİSİON 2 KÜTÜPHANESİ İLE PYTHON DİLİNDE JUPYTERLAB'DA YAZILAN HSV ANALİZ YAZILIMI**

```

%matplotlib inline
import cv2
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import glob
import os

def rgb2hsv(img, hMin, hMax):
  hsv = cv2.cvtColor(img, cv2.COLOR_RGB2HSV)
  hUnfiltered = hsv[:, :, 0].reshape(-1)
  sUnfiltered = hsv[:, :, 1].reshape(-1)
  vUnfiltered = hsv[:, :, 2].reshape(-1)

```

```

h = []
s = []
v = []
for j in range(len(hUnfiltered)):
    if hUnfiltered[j] >= hMin/2 and hUnfiltered[j] <= hMax/2:
        h.append(int(hUnfiltered[j]*2)) # convert to 0 - 360 hue scale
        s.append(int(sUnfiltered[j]/2.55))
        v.append(int(vUnfiltered[j]/2.55))
return h, s, v

def imgs2histogram(imgList:list, hMin, hMax):
    f, axs = plt.subplots(nrows=len(imageList), ncols=4, sharex=False,
sharey=False)
    f.set_size_inches(w=30, h=5*len(imageList))
    for i in range(len(imageList)):
        print(imageList[i])
        img = cv2.imread(imageList[i])
        axs[i][0].imshow(img)
        axs[i][0].set_title(imageList[i])
        h, s, v = rgb2hsv(img, hMin, hMax)

        hhist, binEdges = np.histogram(h, bins=range(360))
        axs[i][1].bar(binEdges[:-1], hhist, width=1)
        axs[i][1].set_title('hue')
        #axs[i][1].set_ylim(0,60000)
        #axs[i][1].set_yscale('log')

        shist, binEdges = np.histogram(s, bins=range(100))
        axs[i][2].bar(binEdges[:-1], shist, width=1)
        axs[i][2].set_title('saturation')
        #axs[i][2].set_ylim(0,40000)
        #axs[i][2].set_yscale('log')

        vhist, binEdges = np.histogram(v, bins=range(100))
        axs[i][3].bar(binEdges[:-1], vhist, width=1)
        axs[i][3].set_title('value')
        #axs[i][3].set_ylim(0,200000)
        #axs[i][3].set_yscale('log')

    plt.show()

def imgs2cluster(imgList:list, hMin, hMax):
    f, axs = plt.subplots(nrows=len(imageList), ncols=2, sharex=False,
sharey=False)
    f.set_size_inches(w=30, h=15*len(imageList))
    for i in range(len(imageList)):
        print(imageList[i])

```

```

img = cv2.imread(imageList[i])
axs[i][0].imshow(img)
axs[i][0].set_title(imageList[i])
h, s, v = rgb2hsv(img, hMin, hMax)
axs[i][1].scatter(s, v, marker=',')
axs[i][1].set_title('s - v')
axs[i][1].set_ylim(0,50)
axs[i][1].set_xlim(0,100)
plt.show()

def imgs2hist2D2(imgList:list):
    histograms = []

    for i in range(len(imageList)):
        fig = plt.figure()
        # f, axs = plt.subplots(nrows=1, ncols=4, sharex=False,
sharey=False)
        fig.set_size_inches(w=30, h=5)
        img = cv2.imread('./img/{0}'.format(imageList[i]))
        h, s, v = rgb2hsv(img, 113, 123)
        print('{0}-> H:{1}-{2}\tS:{3}-{4}\tV:{5}-{6}'.format(imageList[i],
min(h), max(h), min(s), max(s), min(v), max(v)))
        axs = fig.add_subplot(141)
        axs.imshow(img)
        axs.set_title(imageList[i])

        pairwise = {}

        # hue - saturation
        axs = fig.add_subplot(142)
        hist, xedges, yedges, image = axs.hist2d(s, h, bins=20, range=((0,
100), (0, 360)), vmin=0, cmap='afmhot')
        # print('h-s max: {0}'.format(np.amax(hist)))
        axs.set_title('saturation - hue')
        axs.set_xlabel('saturation')
        axs.set_ylabel('hue')
        plt.colorbar(image, ax=axs)
        pairwise['sh'] = hist

        # hue - value
        axs = fig.add_subplot(143)
        hist, xedges, yedges, image = axs.hist2d(h, v, bins=20, range=((0,
360), (0, 40)), vmin=0, cmap='afmhot')
        # print('h-v max: {0}'.format(np.amax(hist)))
        axs.set_title('hue - value')
        axs.set_xlabel('hue')
        axs.set_ylabel('value')

```

```

plt.colorbar(image, ax=axis)
pairwise['hv'] = hist

# saturation - value
axis = fig.add_subplot(144)
hist, xedges, yedges, image = axis.hist2d(s, v, bins=20, range=((0,
100), (0, 40)), vmin=0, cmap='afmhot')
# print('s-v max: {}'.format(np.amax(hist)))
axis.set_title('saturation - value')
axis.set_xlabel('saturation')
axis.set_ylabel('value')
plt.colorbar(image, ax=axis)
pairwise['sv'] = hist

histograms.append(pairwise)
outFigFn = imageList[i].replace('.TIF', '')
outFigFn = outFigFn + '.png'
fig.savefig(outFigFn)

plt.show()
return histograms

from scipy.stats import wasserstein_distance

def otCalc(histograms:list, components:list):
    condDistMat = {}
    for comp in components:
        condDistMat[comp] = []
        for i in range(len(histograms)):
            for j in range(i+1, len(histograms)):
                wd = wasserstein_distance(histograms[i][comp].flatten(),
histograms[j][comp].flatten())
                condDistMat[comp].append(wd)
    return condDistMat

def otCalc1D(histograms:list, components:list):
    condDistMatrix = {}

imageList = []
for fn in os.listdir("./img/"):
    if '_bs.TIF' in fn:
        imageList.append(fn)
imageList.sort()
print(imageList)

# hue -> lambda conversion:
# https://www.colorhexa.com/

```

```
# lambda_gfp = 509 nm
# hue_gfp = 123
# imgs2histogram(imageList, 123-10, 123+10)
# imgs2cluster(imageList, 123-10, 123+10)
hist = imgs2hist2D2(imageList)
emdList = otCalc(hist, ['sh', 'hv', 'sv'])
```



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı:** Ege SOYDEMİR

**Doğum Yeri:** Ankara

**Doğum Tarihi:** 07.11.1992

**Medeni Hali:** Bekar

**Yabancı Dili:** İngilizce (TOEFL iBT: 102/120)

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** ODTÜ Geliştirme Vakfı Özel Lisesi

**Lisans:** Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bilkent Üniversitesi

**Yüksek Lisans:** Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi

### **Yayınlar ve Bildiriler**

### **İş Tecrübesi**

**Kurumu:** Başkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

**Görevi:** Araştırma Görevlisi

**Yılları:** 2019 -

**Kurumu:** Kıbrıs Sağlık ve Sosyal Bilimler Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi

**Görevi:** Yarı Zamanlı Öğretim Üyesi

**Yılları:** 2018-2019



## TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Engin D, Soydemir E, Ertuzun G. PS-286- DIY Biohacker mid-voltage electroporator device. In: Uluslararası XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi Konuşma Özetleri ve Bildiri Kitabı. Antalya, Türkiye: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti; 2018. p. 431.





Uluslararası TB, Moleküler ve  
Sistem Mikrobiyoloji Kongresi  
Ankara Mikrobiyoloji Derneği

# Uluslararası International XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Turkish Microbiology Congress

Starlight Hotel & Convention Center, Antalya

4-8 Kasım  
November 2018

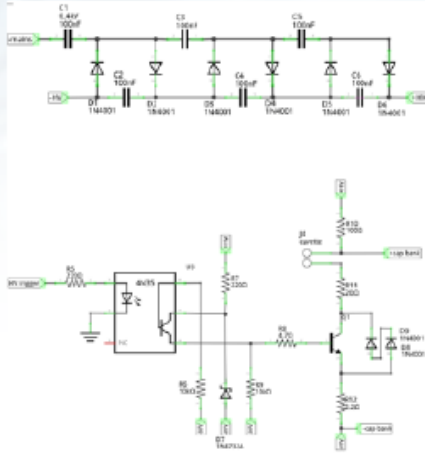
POSTER BİLDİRİLER



International Symposium on  
Migration, Travel & Infection  
Turkish Society of Microbiology  
Turkish Society for Parasitology



## High voltage source



Voltage multiplier and high voltage discharge circuits

## PS-287

### BACTERIOLOGICAL STUDY OF NEONATAL CONJUNCTIVITIS IN NAJAF CITY, IRAQ

Maitham Ghaly Yousif

Biology Department College of Science University of Al-Qadisiyah, Iraq

**Objective:** Bacterial conjunctivitis is one of the most common eye problems encountered in world. Most cases are severe, self-limiting. Neonatal conjunctivitis is a red eye in a newborn caused by infection, irritation, or a blocked tear duct. When caused by an infection, neonatal conjunctivitis can be very serious. The cause factors for Conjunctivitis are many.

**Methods:** Our study included 124 swabs were taken from neonate conjunctiva, their ages from one day to 30 days, 70 girls and 54 boys from Al-Zahraa teaching hospital in Najaf governorate, Iraq. All swabs were culture directly on appropriate media to diagnosis of bacterial causative agents.

**Results:** The results shows that 25 % Chlamydia trachomatis, 20% Staphylococcus aureus, 16% Streptococcus haemolyticus, 14% Haemophilus influenza 13% Streptococcus pneumoniae, 10% Pseudomonas aeruginosa and 3% Neisseria gonorrhoeae.

**Conclusion:** Conjunctivitis, when caused by an infection, is most commonly caused by a viral infection. Bacterial infections, allergies, other irritants, and dryness are also common causes. Bacterial infections are contagious and passed from person to person, but can also spread through contaminated objects or water.

**Keywords:** Neonatal, conjunctivitis, Bacteriological study

## PS-288

### BRUSELLOZUN TANISINDA KULLANILABİLECEK GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYON VE VALIDASYON ÇALIŞMALARI

Hasan Zeybek, Ziya Cibali Açıköz, **Tuba Dal**, Rıza Durmaz

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana  
Bilim Dalı, Ankara

İnsan brusellozunun heterojen ve non-spesifik klinik semptomları hastalığın hızlı ve kesin teşhisini zorlaştırmaktadır. Rutin tanıya yaşanan zorluklar nedeniyle günümüzde etkenin tür düzeyinde tespitine olanak sağlayan pratik, hassas ve spesifik moleküler tanı yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır.

**Amaç:** Bu çalışmada; brusellozun erken tanısında kullanılabilen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon (Gz-PZR) yönteminin optimizasyonu ve validasyonu amaçlandı.

**Yöntem:** Çalışmada Gz-PZR yönteminin en düşük saptama limiti (EDSL), 10<sup>8</sup>-10<sup>1</sup> cfu/ml konsantrasyonda hazırlanan ve Brucella melitensis ATCC 23456 standart suşu içeren simüle serum ve tam kan örneklerinde araştırıldı. Yöntemin EDSL'si, Thermo DNA izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanarak ekstrakte edilen simüle örneklerde Maxima SYBR green (Thermo Fisher Scientific, USA), QuantiTect (Qiagen, Hilden, Germany) ve Ampliqon Tempase (Ampliqon, Copenhagen, Denmark) PZR master mikseri ile belirlendi. Optimize edilen metodun validasyonu Thermo DNA izolasyon kit-Ampliqon master mikser kombinasyonu yapıldı. Validasyon çalışmalarında yöntemin doğruluk, tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve özgüllük parametrelerine bakıldı.

**Bulgular:** Yöntemin EDSL'si; Maxima SYBR green master mikser ile kurulan monopleks Gz-PZR çalışmalarında 10<sup>4</sup> cfu/ml bulundu. Duyarlılığın artırılması ve daha düşük konsantrasyonlardaki DNA'nın amplifikasyonunu saptamaya yönelik prob bazlı QuantiTect ve Ampliqon Tempase master mikseri ile kurulan multipleks reaksiyonlarda 10<sup>4</sup> cfu/ml ve 10<sup>1</sup> cfu/ml konsantrasyonda hazırlanmış örneklerin tamamında amplifikasyon sağlandı. Yoğunluğu 10<sup>2</sup> cfu/ml olan örneklerde optimize edilen yöntem ile %80 başarı elde edildi. Validasyon çalışmalarında yöntemin doğruluk, tekrarlanabilirlik, özgüllük ve duyarlılık değerlerinin oldukça yüksek olduğu belirlendi.

**Sonuç:** Optimize edilen prob bazlı Gz-PZR yöntemi ile reaksiyon tüpünde 2 kopya DNA bulunması durumunda bile pozitif sonuç alınabilmektedir. Validasyon çalışmaları bu yöntemin klinik örneklerde rutin tanı amacıyla kullanılabilceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bruselloz, optimizasyon, validasyon, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu