

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REKOMBİNANT İNSAN İNSULİN PEPTİDİNİN BAKTERİYAL EKSPRESYON
SİSTEMİ KULLANARAK ÜRETİMİ

Ceren CAN

Haziran

2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

Temel Biyoteknoloji
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REKOMBİNANT İNSAN İNSULİN PEPTİDİNİN BAKTERİYAL
EKSPRESYON SİSTEMİ KULLANARAK ÜRETİMİ

Ceren CAN

Danışman Öğretim Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

Haziran

2015

ETİK BEYAN

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

Yüksek Lisans Öğrencisinin Adı Soyadı

Ceren CAN

İmzası

ONAY

Yrd. Doç. Dr. E. Doruk ENGİN danışmanlığında Ceren Can tarafından hazırlanan bu çalışma 26/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Can AKÇALI

İmza:

Üye:Yrd. Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU

İmza:

Üye:Yrd. Doç. Dr. E. Doruk ENGİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REKOMBİNANT İNSAN İNSULİN PEPTİDİNİN BAKTERİYAL EKSPRESYON SİSTEMİ KULLANARAK ÜRETİMİ

Ceren CAN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

İnsülin pankreasta yer alan beta hücreleri tarafından üretilen, polipeptid yapıda olup 5400 dalton moleküler ağırlığına sahip, 51 aminoasite sahip, A ve B zincirleri olarak bu zincirlerin birbirine disülfid bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan bir hormondur. Bu hormon insan vücudunda kan şekerinin ayarlanmasında rol oynamaktadır. İnsan vücudunda kan şekeri dengesinin bozulması halinde diyabet hastalığı ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık dünya birçok insan da Tip 1 diyabet, Tip 2 diyabet, Gebelikte diyabet ve Spesifik nedenlere bağlı diyabet olarak görülmektedir.

Bu tez çalışmasında rekombinant DNA teknolojisi, terapötik kullanım için insan insülinin üretimi bakteri üretici sistemleri kullanılarak üretilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle insülin geninin tüm sekansını kodlayan vektorler oluşturulmuştur. Oluşturulan bu vektörler bakteri üretici sistemde kullanılmak üzere *Escherichia coli* K12-JM109 ve BL21 (DE3) hücrelerine aktarılıp ilgili proteinin üretilmesi sağlanmıştır. Ardından yapılan detaylı çalışmalarla protein üretimi ve saflaştırma optimize edilmiştir.

2015, 140 sayfa

Anahtar kelimeler: insülin, rekombinant protein üretimi, bakteri ekspresyon sistemleri,

ABSTRACT

EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN INSULIN IN BACTERIAL EXPRESSION SYSTEMS EXPRESSION SYSTEMS

Ceren CAN

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk Engin

Insulin which is produced by pancreas with situated beta cells, has polypeptide structure. Insulin has 5400 daltons with a molecular weight and fifty one amino acids. Moreover the insulin hormone is the result of connected to each other by disulfide bonds of the A chains and B chains. This hormone plays a role in the regulation of blood sugar in human body. When the deterioration of the balance of blood glucose arises in the human body, it causes diabetes. This disease is seen among many people in the world, which is named such as Type 1 diabetes, Type 2 diabetes, gestational diabetes, and diabetes by specific causes.

In this thesis the main goal is produced using bacterial production of human insulin producers systems for therapeutic, use recombinant DNA technology. Therefore, they are vectors encoding the entire sequence of the insulin gene have been created. The generated vectors used for the production bacteria system, transferred to the Escherichia coli, K12-JM109 and BL21 (DE3) cells and they are used for protein production. After that the protein production and purification have been optimized with the detailed study.

2015, 140 pages

Keywords: Insulin, recombinant protein production, bacterial expression systems

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecinde araştırma ve geliştirme faaliyetlerime sürekli destek veren ve katkı sağlayan, çalışmalarımda yol gösteren ve bu tezin hazırlanmasında her aşamasında değerli fikirlerini paylaşan, üzerimde büyük emeği olan çok değerli hocam Yrd. Doç. Evren Doruk ENGİN'e, çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan ve katkı sağlayan, günün büyük bir bölümünü keyifle ve mutlu bir şekilde beraber geçirdiğim sevgili dostum Pelin KOLÇAK'a, akademik çalışmalarımın sponsoru olmak ile birlikte sabırla mezuniyetimi bekleyen ve teşvikleri ile bizleri yalnız bırakmayan dostum Burak AVCI'ya

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans eğitimimde sağladığı maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu – Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı'na (TUBİTAK -BİDEB)

Çalışmalarımı yazı dökerken benden kıymetli vakitlerini esirgemeyen Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Doç. Dr. Yeşim DOĞAN' a, bana her zaman destek olan enstitü sekreteri Emine EROĞLU'na, öğrenci işleri sorumlusu Asuman ERZİNCAN'a ve lab kordinatörümüz Devrim AYDIN'a

Kızı olmaktan onur duyduğum, mutlu bir hayat geçirmemi sağlayan, eğitimim sürecinde kendisinden ödün vererek okutan, emeklerini asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Zerrin ELDEMİR'e eşim ile birlikte hayatıma giren, değerli aileme, bana ve başaracağıma inanan, zor zamanlarımda destek veren, beni anlayan saygıdeğer babam Mehmet Emin CAN'a ve sevgili annem Ayşe CAN'a

Hayatımın her saniyesi yanımda olan ve sevgisi ile hayatıma ışık tutan :)) Bitanecek eşim Burak CAN'a teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması sevgili eşim Burak CAN' a adanmıştır.

• İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xviii
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER	4
2.1.İnsülin Hakkında Temel Bilgiler	4
2.1.1.İnsülin Tarihçesi.....	4
2.1.2.İnsülin Yapısı.....	5
2.1.3.İnsülin Biyosentezi.....	5
2.2.Diyabet ve Epidemiyolojisi	6
2.3.Rekombinant Protein Üretimi	7
2.3.1.E.colide rekombinant protein üretim.....	7
2.4.Klonlama ve Vektör Seçimi	9
2.5.Protein Saflaştırma Yöntemleri	13
2.5.1.Metal şelasyon afinite kromotografi.....	13
2.5.2.Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC).....	15
2.6.Deney Tasarımı	15
2.6.1.Plackett-Burmen Tasarımı.....	16
2.6.2.Box-Behnken.....	16
3.GEREKÇE VE AMAÇ	18
4.MATERYAL VE YÖNTEM	19

4.1.Bakteriyel ekspresyon sisteminde rekombinant insan insülini üretim sürecinin tasarımı.....	19
4.2.Materyal.....	21
4.2.1.İnsülin A ve B füzyon peptidlerini kodlayan vektör yapılarının tasarımı.....	21
4.2.2.Gen kaynağı memeli hücre hattı.....	25
4.2.3.Moleküler klonlama çalışmaları ve protein ekspresyonu için bakteri suşu ve vektör seçimi.....	25
4.2.4.İnsülin A ve B zincirleri gen kaynağı.....	27
4.2.5.Tampon ve çözeltiler.....	28
4.2.5.1.Mikrobiyolojik besiyerlerinin hazırlanması.....	28
4.2.6.Bakteriyolojik kültürlerin üretilmesi ve stoklanması.....	31
4.2.7.Memeli hücre kültürü deneyleri.....	31
4.2.7.1.Memeli Hücrelerinden nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması.....	32
4.2.7.2.“Midi-prep” alkalen lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu.....	33
4.3.Polietilen glikol ve etanol ile DNA presipitasyonu.....	35
4.4.Silika matriks ile nükleik asit saflaştırması.....	35
4.4.1.Saflaştırılan DNA örneklerinin spektrofotometrik yöntem ile miktar ve kalite tayini	36
4.4.2.Agaroz jel elektroforezi.....	37
4.4.3.DNA Poliakrilamid jel elektroforezi.....	39
4.5.İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin polimeraz zincirleme tepkimesi ile çoğaltılması.....	40
4.5.1.İnsülin A ve B PZT ürünleri ile pET28a plazmid vektörünün restriksiyon endonükleazlar ile sindirilmesi.....	41
4.5.2.XhoI – NdeI çift enzim kesimi yapılmış insülin geni A ve B zinciri DNA'larının pET28a plazmid vektörüne ligasyonu ile pInsA ve pInsB ekspresyon vektörlerinin oluşturulması.....	43
4.5.3.Escherichia coli K12 JM109 hücrelerinin insülin A ve B zinciri ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB ile transformasyonu.....	44
4.5.4.Transformant kolonilerin polimeraz zincirleme tepkimesi ile taranması.....	45
4.6.İnsülin ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin DNA dizi analizi.....	48

4.7.İnsülin ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin ekspresyon konağı Escherichia coli BL21 fabrika hücrelerine aktarılması.....	50
4.8.Escherichia coli BL21 fabrika hücrelerde insülin A ve B zincirleri ekspresyon deneyleri.....	51
4.9.İndüklenmiş E. coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB bakteri hücresi pelletlerinden protein izolasyonu.....	52
4.10.Bakteri hücresi lizatlarından immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile 6 x histidin etiketli proteinlerin saflaştırılması.....	53
4.11.Bakteri hücre pelletlerinden izole edilmiş proteinlerin, denatüre edici gradyent poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi.....	55
4.12.Bakteri hücre pelletlerinden izole edilmiş ve kromatografik olarak saflaştırılmış proteinlerin, denatüre edici tris - trisin poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi.....	59
4.13.İndüklenmiş hücre pelletlerinde rekombinant insülin A ve B füzyon peptidlerinin western blotlama ve anti-His-tag antikoları ile işaretleme ile gösterilmesi.....	62
4.13.1.1.Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler.....	65
4.14.Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB fabrika hücre bankalarında rekombinant insan insülini A ve B peptidi üretiminin fraksiyonel faktöryel deneysel tasarım ve yanıt yüzeyi modellemesi yöntemleri ile optimizasyonu.....	67
4.15. Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	71
4.16.İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin konsantrasyonlarının Bradford yöntemi ile ölçülmesi.....	73
4.17.İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin siyanojen bromür kullanılarak sindirilmesi.....	75
4.18.Siyanojen bromür ile proteolitik sindirme uygulanan insülin A ve B zinciri füzyon proteinlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi ve saflaştırılması.....	75
4.19.Ters faz kromatografisi ile saflaştırılan siyanojen bromür sindirme ürünlerinin indirgenme ve yükseltgenme ile dimerizasyonu.....	76
5.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	80
5.1.IM-9 insan B lenfoblastik hücre pelletlerinden DNA eldesi.....	80
5.2.İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin PZT ile çoğaltılması.....	81
5.3.İnsülin geni A ve B segmentlerinin pET28a omurgasına klonlanarak pInsA ve	

pInsB ekspresyon vektörü plazmidlerinin elde edilmesi.....	82
5.4.Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB fabrika bankalarında rekombinant insan insülini A ve B zinciri füzyon peptidi üretiminin fraksiyonel faktryel deneysel tasarım ve yanıt yüzeyi modellemesi yöntemleri ile optimizasyonu.....	90
5.5.İndüklenmiş hücre pelletlerinden izole edilmiş proteinlerin kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılması.....	114
5.6.Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin siyanojen bromür ile sindirilerek N-terminal füzyon peptidinin uzaklaştırılması.....	117
5.7.Rekombinant insülin A ve B peptidlerinin indirgenme ve yükseltgenme tepkimesi ile dimerizasyonu.....	120
<u>6.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	124
6.1.Sonuç.....	128
<u>KAYNAKLAR.....</u>	129
EK 1 - Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler.....	137
EK 2 - Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler.....	140
EK 3 - Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri.....	140
EK 4 - Tez Deneylerinde Kullanılan R-Kodları.....	142
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	147

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1. İnsülin sinyal peptidi, B, C ve A zincirleri ile insülin B ve C segmentlerinin çoğaltılması için kullanılan iBF – iBR ve iAF – iAR oligonükleotid primerlerinin mRNA (NM_000207) ve genomik DNA (NG_007114) üzerindeki yerleşimleri.....42
- Şekil 4.2. pET28a ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesi ile ribozomal bağlanma sekası, trombin kesim bölgesi, N- ve C-terminal 6 x histidin etiketleri. İnsülin A ve B gen segmentlerinin klonlanması için kullanılan NdeI ve XhoI kesim bölgeleri işaretlenmiştir.....44
- Şekil 4.3. Rekombinant insülin A ve B füzyon peptidleri, 6 x histidin saflaştırma etiketi ve bu etiketin son üründen uzaklaştırılmasını sağlayan siyanojen bromid proteolitik sindirme bölgeleri ile klonlama ileri primerlerinin yerleşimi.....45
- Şekil 4.4. Tez çalışmasında kullanılan ekspresyon vektörü pET28a'nın haritası.....46
- Şekil 4.5. Redüksiyon ve oksidasyon tepkimeleri ile oluşan rekombinant insülin dimerlerinin ters faz C18 proteomik kolon kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için mobil faz akım protokolu. Not: A pompası: saf su, B pompası: saf asetonitril, C pompası: %20 asetonitril, %80 su karışımı.....95
- Şekil 4.6. Redüksiyon ve oksidasyon tepkimeleri ile oluşan rekombinant insülin dimerlerinin ters faz C18 proteomik kolon kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için mobil faz bileşimi.....96
- Şekil 5.1. DNA1. IM-9 hücre pelletinden saflaştırılmış DNA örneğinin 220 – 350 nm dalgalı boyları arası spektral spektrofotometrik ölçümü.....97
- Şekil 5.2. İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primerler ile elde edilmiş 84 ve 111 bç uzunluğundaki çoğaltma ürünlerinin DNA PAGE ile analizi.....99
- Şekil 5.3. Süpersarmal çembersel (kulvar 1), NdeI (kulvar 2) ve XhoI (kulvar 3) enzimleri ile sindirilmiş pET28a'nın agaroz jel elektroforezi ile görüntüsü.....99
- Şekil 5.4. İnsülin A ve B polimeraz zincirleme tepkimesi ürünleri ile pET28a plazmid vektör DNA'sının NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile sindirilmesi sonrası spektrofotometrik analizi.....100
- Şekil 5.5. İnsülin geni A ve B zinciri DNA'sı ekli plazmidleri alan transformantların polimeraz zincirleme tepkimesi ardından restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi analizi ile saptanması.....101
- Şekil 5.6. Ekspresyon plazmidini pInsA'nın Sanger yöntemi ile elde edilmiş DNA dizisi analiz kromatogramı.....102
- Şekil 5.7. İndüklenmiş Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinden

izole edilmiş proteinlerin polietilen glikol – sodyum klorür fraksiyonel presipitasyonu sonrası denatüre edici tris trisin gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi. (B: belirteç – süt tozu protenleri; H: Humulin R; B1 – 4: E. coli BL21(DE3)/pInsB kolonileri; A1 – 3: E. coli BL21(DE3)/pInsA kolonileri).....	103
Şekil 5.8. İndüklenmiş Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinden izole edilmiş proteinlerin anti-His-tag antikoları ile western blot analizi. (G: rekombinant yeşil floresan protein; B: E.coli BL21(DE3)/pInsB kültürü; A: E. coli BL21(DE3)/pInsA kültürleri).....	104
Şekil 5.9. İndüklenmiş hücre pelletleri total proteinlerinin tris glisin, rekombinant insülin fraksiyonlarının ise, tris trisin jellerinde yürütülmesi ile elde edilen kulvar bant profilleri. TG: denatüre edici tris glisin gradiyent poliakrilamid jeli; TT: denatüre edici tris trisin gradiyent poliakrilamid jeli; MB: moleküler belirteç (sığır sütü proteinleri); İA: İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılmış insülin A zinciri füzyon peptidi.....	106
Şekil 5.10. Rekombinant insan insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile taranan faktörlerin ikili etkileşim grafikleri..	110
Şekil 5.11. Rekombinant insan insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile taranan faktörlerin ikili etkileşim grafikleri..	112
Şekil 5.12. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.	118
Şekil 5.13. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.....	119
Şekil 5.14. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği....	120
Şekil 5.15. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.	121
Şekil 5.16. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.	122
Şekil 5.17. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.....	123
Şekil 5.18. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.	124
Şekil 5.19. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi	

grafığı.....	125
Şekil 5.20. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafığı....	126
Şekil 5.21. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafığı.	126
Şekil 5.22. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafığı.	127
Şekil 5.23. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafığı.....	128
Şekil 5.24. İndüklenmiş Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA pelletlerinden saflaştırılan rekombinant insülin A zinciri füzyon peptidinin kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatogramı. Absobans 215 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Toplanan fraksiyon, pembe kutu ile işaretlenmiştir.....	129
Şekil 5.25. İndüklenmiş Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA pelletlerinden saflaştırılan rekombinant insülin B zinciri füzyon peptidinin kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatogramı. Absobans 215 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Toplanan fraksiyon pembe kutu ile işaretlenmiştir.....	129
Şekil 5.26. Kromatografik saflaştırma ürünlerinin kantitasyonu için gerçekleştirilen Bradford deneyi standart eğrisi.....	130
Şekil 5.27. Rekombinant insan insülin A(A) ve B(C) zinciri füzyon peptidleri ile bunların siyanojen bromür kesim ürünlerinin (B, D) ters faz C18 kromatografisi ile analizi.....	132
Şekil 5.28. İzomolar oranda karıştırılarak oksitlenen indirgenmiş rekombinant insülin A ve B zincirlerinin dimerizasyon ürünlerinin ters faz C18 kromatografisi ile analizi. A: Monomer ve dimerlerin retansiyon zamanı limitleri; B: nativ formda Humulin R; C: indirgenmiş Humulin R; D: siyanojen bromür kesim ürünü insülin A ve B peptidlerinin oksitlenme tepkimesi ürünleri; E: Mobil faz akımına A pompasının katkısı.....	134
Şekil 5.29. İndirgenmiş rekombinant insülin A ya da B peptidlerinin oksidasyon ürünlerinin ters faz C18 kromatografisi ile analizi. A: Monomer ve dimerlerin retansiyon zamanı limitleri; B: indirgenmiş Humulin R; C: insülin A peptidlerinin oksitlenme tepkimesi ürünleri; D: insülin B peptidlerinin oksitlenme tepkimesi ürünleri; E: Mobil faz akımına A pompasının katkısı.....	135

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. İnsülin A ve B zincirlerini kodlayan gen segmentlerinin pET28a plazmid vektörüne klonlanmasında kullanılan oligonükleotid primerlerin dizisi, kesim enzimi ve bağlanma sıcaklıkları.....	44
Çizelge 4.2. Luria Bertani besiyeri içeriği.....	49
Çizelge 4.3. LB-kanamisinli katı besiyeri içeriği.....	50
Çizelge 4.4. SOC besiyeri içeriği.....	51
Çizelge 4.5. Bakteri ekspresyon besiyeri içeriği.....	51
Çizelge 4.6 Memeli hücresi lizis tamponu.....	53
Çizelge 4.7. Alkalen lizis I çözeltisinin içeriği.....	54
Çizelge 4.8. Alkalen lizis II çözeltisi içeriği.....	55
Çizelge 4.9. Alkalen lizis III çözeltisi içeriği.....	55
Çizelge 4.10. Polietilen glikol ve etanol ile DNA presipitasyon çözeltisi.....	56
Çizelge 4.11. Guanidinli nükleik asit silika bağlanma tamponu.....	57
Çizelge 4.12. Spektrofotometrik yöntem ile DNA örneklerinin kalite tayini.....	58
Çizelge 4.13. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon stok çözeltileri.....	59
Çizelge 4.14. DNA Yürütme jeli.....	60
Çizelge 4.15. Saflaştırılmış IM-9 DNA'sından iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primer çiftleri ile insülin geni A ve B zinciri bölgelerinin çoğaltılması için PZT karışımı.....	61
Çizelge 4.16. İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin PZT ile çoğaltılması için sıcaklık döngü programı.....	62
Çizelge 4.17. İnsülin A ve B PZT ürünleri ile pET28a plazmid vektörünün NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleazları ile sindirilmesi.....	63
Çizelge 4.18. İnsülin geni A ve B zinciri DNA'larının pET28a ekspresyon vektörüne klonlanması için ligasyon çözeltisi.....	64
Çizelge 4.19. Escherichia coli hücrelerini kompetan hale getirmek için kullanılan transformasyon çözeltisi bileşimi.....	65
Çizelge 4.20. Ekspresyon vektörü pET28a'nın çoklu klonlama bölgesi çoğaltma ve sekanslama primerleri.....	66

Çizelge 4.21. Transformantların “insert” alma durumunun saptanması için T7-5' – T7-3' tarama polimeraz zincirleme tepkimesi.....	66
Çizelge 4.22. T7-5' – T7-3' polimeraz zincirleme tepkimesi için sıcaklık döngüsü....	67
Çizelge 4.23. Sanger sekanslama tepkimesi çözeltisi.....	69
Çizelge 4.24. Ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin “insert” DNA dizi analizi için döngü sekanslama sıcaklık protokolü.....	69
Çizelge 4.25. Sanger sekanslama tepkimesi ürünlerinin presipitasyonu için sodyum asetat – etanol çözeltisinin bileşimi.....	70
Çizelge 4.26. Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinde protein ekspresyonu için induksiyon besiyeri bileşimi.....	71
Çizelge 4.27. Bakteri hücre pelleti lizis çözeltisi bileşimi.....	72
Çizelge 4.28. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi bağlanma tamponu bileşimi.....	74
Çizelge 4.29. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi elüsyon tamponu bileşimi.....	74
Çizelge 4.30. Yükek yoğunluklu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel çözeltisi bileşimi.....	75
Çizelge 4.31. Düşük yoğunluklu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel çözeltisi bileşimi.....	76
Çizelge 4.32. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid yığılma jeli çözeltisi bileşimi.....	76
Çizelge 4.33. Denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi için örnek yükleme tamponu.....	77
Çizelge 4.34. Denatüre edici gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi için monofazik tampon çözeltisi bileşimi.....	78
Çizelge 4.35. Protein poliakrilamid jelleri için hızlı fiksasyon çözeltisi bileşimi.....	78
Çizelge 4.36. Protein poliakrilamid jelleri için Coomassie mavisi boyama çözeltisi bileşimi.....	78
Çizelge 4.37. Denatüre edici tris trisin gradiyent jeller için 3x konsantrasyonunda jel hazırlama tamponu bileşimi.....	79
Çizelge 4.38. Denatüre edici tris trisin gradiyent ayırıcı jel çözeltisi bileşimi.....	79
Çizelge 4.39. Denatüre edici tris trisin gradiyent örnek yükleme jel çözeltisi bileşimi.....	81

Çizelge 4.40. Denatüre edici tris trisin gradiyent jel elektroforezi için 10x konsantrasyonda anod tampon çözeltisi bileşimi.....	81
Çizelge 4.41. Denatüre edici tris trisin gradiyent jel elektroforezi için 10x konsantrasyonda katod tampon çözeltisi bileşimi.....	81
Çizelge 4.42. Islak transfer için 1x western blot tampon çözeltisi bileşimi.....	82
Çizelge 4.43. Tris ile tamponlanmış salin – Tween-20 (TBST) çözeltisi bileşimi.....	83
Çizelge 4.44. Western blot membran bloklama çözeltisi bileşimi.....	83
Çizelge 4.45. Rekombinat kimerik insülin A zinciri için CNBr ile sindirme protokolü.....	83
Çizelge 4.46. Rekombinat kimerik insülin B zinciri için CNBr ile sindirme protokolü.....	84
Çizelge 4.47. Saf bakteriyel protein çözme çözeltisi.....	84
Çizelge 4.48. Bradford 1X tampon.....	85
Çizelge 4.49. Standartlar.....	85
Çizelge 4.50. DNA izolasyon tamponu.....	86
Çizelge 4.51. Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin üretimi sürecinde etkili olan faktörlerin taranması amacı ile oluşturulmuş Plackett – Burman deney tasarımı matriksi.....	87
Çizelge 4.52. Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin üretiminde etkili olduğu saptanan faktörlerin yanıt yüzey modellemesi için gerçekleştirilen Box – Behnken deney matriksi.....	89
Çizelge 4.53. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi bağlanma tamponu bileşimi.....	91
Çizelge 4.54. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi elüsyon tamponu bileşimi.....	91
Çizelge 4.55. Protein kantitasyonu deneylerinde kullanılan Bradford çözeltisi bileşimi.....	92
Çizelge 4.56. Redüksiyon ve oksidasyon tepkimeleri ile oluşan rekombinant insülin dimerlerinin ters faz C18 proteomik kolon kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için mobil faz akım protokolü.....	95
Çizelge 5.1. IM-9 hücre pelletlerinden saflaştırılan DNA örneğinin 230, 260 ve 280 nm dalgaboylarındaki absorban değerleri ile oranları.....	99
Çizelge 5.2. İnsülin A ve B polimeraz zincirleme tepkimesi ürünleri ile pET28a	

plazmid vektör DNA'sının NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile sindirilmesi sonrası spektrofotometrik yöntem ile miktar ve kalite tayini.....	101
Çizelge 5.3. Plackett-Burman tasarımına göre gerçekleştirilmiş deneylerde elde edilmiş rekombinant insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Yinsülin A / Ytotal protein).....	108
Çizelge 5.4. Plackett-Burman tasarımına göre gerçekleştirilmiş deneylerde elde edilmiş rekombinant insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Yinsülin B / Ytotal protein).....	109
Çizelge 5.5. Rekombinant insan insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile ana etkilerin tahmini ve istatistiksel önem testi.	110
Çizelge 5.6. Rekombinant insan insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile ana etkilerin tahmini ve istatistiksel önem testi.	111
Çizelge 5.7. Box – Behnken tasarımına göre gerçekleştirilmiş deney serisinde elde edilmiş rekombinant insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Yinsülin B / Ytotal protein).....	115
Çizelge 5.8. Box – Behnken tasarımına göre gerçekleştirilmiş deney serisinde elde edilmiş rekombinant insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Yinsülin B / Ytotal protein).....	116
Çizelge 5.9. Box – Behnken deney tasarımı ile çalkalama hızı, indüksiyon süresi ve başlangıç OD'sinin, rekombinant insülin A füzyon peptidi ekspresyon verimi yanıt yüzeyi modeli polinomial denkleminin katsayıları.....	117
Çizelge 5.10. Box – Behnken deney tasarımı ile çalkalama hızı, indüksiyon süresi ve başlangıç OD'sinin, rekombinant insülin B füzyon peptidi ekspresyon verimi yanıt yüzeyi modeli polinomial denkleminin katsayıları.....	118
Çizelge 5.11. Saflaştırılan rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptid fraksiyonlarının konsantrasyonları.....	132

SİMGELER DİZİNİ

-f	İleri primer
-r	Geri primer
A	Adenin
ADP	Adenozin difosfat
APS	Amonyum persülfat
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	ATP parçalayıcı enzim
bç	Baz çifti
BP	Boş plazmit (pET28a)
C	Sitozin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cDNA	Komplementer DNA
dak	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	DNA parçalayıcı enzim
dNTP	Deoksiribonükleotit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGFP	Enhanced yeşil (green) floresan protein
G	Guanin
g	Gram
GFP	Yeşil floresan protein
GP	GFP içerikli plazmit (pET28a)
H2O	Su

Hsp(s)	Isı şok protein(ler)i
IPTG	İzopropil β -D-1-thiogalaktopiranozit
KCl	Potasyum klorür
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
l	Litre
LB	Luria Bertani besiyeri (Luria's Broth)
M	Molarite
mA	Miliamper
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MM	Moleküler markör
mRNA	Mesajcı RNA
N	Normalite
Na ₂ HPO ₄	Sodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum hidroksit
°C	Santigrad derece
OD	Optik yoğunluk (density)
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfat tamponlayıcı tuz (buffered saline)
PCR / PZT	Polimeraz zincirleme (chain) tepkimesi (reaction)

PEG	Polietilenglikol
pH	Hidrojenin gücü-asitlik (Power of hydrogen)
pmol	Pikomol
PMSF	Fenil metil sülfonil florür
RNA	Ribonükleik asit
RNAP	RNA polimeraz
RNaz	RNA parçalayıcı enzim
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOB	Super optimal broth
SOC	Katabolit baskılayıcı SOB
T	Timin
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin
tRNA	Taşıyıcı RNA
TT	Ters transkripsiyon
TSS	Transformasyon çözeltisi
U/u	Ünite
UV	Ultraviyole
V	Volt
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

xG	Göreceli santrifüj gücü / ivmesi
[x]	X konsantrasyonu

1. GİRİŞ

İlk olarak 1917 yılında Macar mühendis olan Karl Ereky tarafından ‘‘Canlıların yardımı ile yapılan tüm üretim işleri’’ şeklinde tanımlanmış olan biyoteknoloji terimi, günümüze kadar gelişen modern tekniklerin bu alana uygulanması ile önemli ölçüde değişikliklere uğramıştır. Biyoteknoloji ile yapılan çalışmalar ilk olarak moleküler düzeyde başlamıştır. İlerleyen zaman içinde genişleyerek birçok açıdan çalışmaların kapsamı ile farklı tanımlanan modern biyoteknoloji kavramı ortaya çıkmıştır. 21. Yüzyılın başlarında biyoteknoloji, genom bilimi, rekombinant DNA teknolojisi gibi uygulamalarla daha da hızlı gelişim göstermiştir (1).

Değişen uygulama ve ihtiyaçlar neticesinde biyoteknolojinin tanımı da güncellemeye uğrayarak; bilgi birikimi, ürün ve hizmet üretimi amacıyla canlı ya da cansız organizmaların değiştirilmesi için bilim ve teknolojinin canlıorganizma, parça, ürün ve modellere uygulanması olarak tanımlanmıştır. Bu tanım kapsamındaki çalışmalar rekombinant DNA/RNA/protein teknolojileri, hücre/doku kültürü mühendisliği, gelişmiş üretim teknikleri ve biyoenformatik uygulamalarını içermekte olup değişen ihtiyaç, veri, kaynak ve yöntemlerle gelişmeye devam etmektedir. Dünya nüfusu ile doğru oranda artan hastalıklar ve bu hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlara duyulan talebin de artmasıyla biyoteknolojinin bu tanımı kapsamında rekombinant protein teknolojileri ile üretilen ilaçlar da hızla önem kazanmaktadır. Sağlık alanında biyoteknolojinin önemli bir katkısı olan rekombinant DNA teknolojisi canlı tarafından sentezlenemeyen ya da yeterli düzeyde üretilmeyen protein ve enzimlerin üretilmesine olanak sağlaması ile pek çok hastalık için önemli bir alternatif tedavi alanı oluşturmuştur (1)

Bir organizmaya ait bir proteinin, o proteini kodlayan geni bir vektör sistemi aracılığı ile farklı bir sisteme aktarılıp üretilmesi mantığına dayalı olan rekombinant protein ekspresyon teknolojileri, istenen proteinlerin saf fonksiyonel olarak hızlı, ucuz ve verimli bir şekilde üretilmelerine olanak sağlamaktadır. Bu sisteme dayalı olarak üretilen ilk

heterolog rekombinant proteinlerden birisi, insan insülin hormonudur ve 1978 yılında enterik bir bakteri olan *E.coli* aracılığı ile sentezlenmiştir (2).

İnsülin, yaklaşık 5,4 kd büyüklüğünde, A (21 aminoasit) ve B (30 aminoasit) olmak üzere birbirlerine disülfür köprüleri ile bağlı iki zincirden oluşan, pankreastaki beta hücreleri tarafından salgılanan ve vücudun şekeri kullanmasına yardımcı olarak kandaki şeker seviyesini normal sınırlarda tutan bir hormondur. Bu hormon, kan şekerinin kandan ayrılarak hücre içine girmesini sağlar, böylece kandaki şeker düzeyini ayarlar (3).

Tip 1, tip 2 ve diğer diyabet hastalıklarında kullanılan insülin, dünyada en çok satılan teröpatik proteinler arasındadır (4). Bu amaçla insan insülin proteininin terapötik kullanımı ve rekombinant olarak üretimi biyoteknoloji tarihinde yeni bir dönem başlatmıştır. Bu kapsamda *E. coli*'yi konakçı organizma olarak kullanarak rekombinant insan insülini üretmek için iki farklı yaklaşım izlenmektedir. Birinci yaklaşım A ve B zincirlerini kodlayan gen dizileri ayrı ayrı olmak üzere ekspresyona uygun *E. coli* suşuna aktarımı gerçekleştirilir. Bu hücrelerin büyük ölçekli kablarda ayrı ayrı kültürü yapılır. Oluşan insülin zincirleri kromotografik olarak saflaştırılır. A ve B zincirleri uygun oksidasyon şartlarında inkübe edilerek zincirlerarası disülfür bağlarının oluşumu sağlanır ve insan insulini crb (chain recombinant DNA bacteria) olarak adlandırılan rekombinant insülin elde edilmiş olur. Bu yöntemle protein ürünün hücre içi bozulması engellenmiş olur İkinci yaklaşım ise rekombinant *E. coli*'ye insan proinsulini için gerekli nükleotid kodonu yerleştirilir. Oluşan proinsülin saflaştırılır ve daha sonra C peptid proteolitik enzimlerle koparılır. Elde edilen bu insülinler proinsülin yolu üzerinden elde edildikleri için insan insulini prb (proinsülin recombinant DNA bacteria) olarak isimlendirilir (5).

Diyabet hastalığı son yüzyıl içerisinde insanoğlunu tehdit eden en ciddi hastalıklardan birisidir. Hastalığın dünya nüfusundaki oranı her geçen gün artmaktadır. Özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde diyabetten kaynaklı sağlık sorunları için harcanan bütçenin genel sağlık harcamaları içerisinde payı ciddi bir şekilde artmış ve hasta bireylerin tedavi maliyetleri yükselmiştir. Diyabet hastalığının ilaç sanayisindeki

öneminin artması sonucunda hastalığın tedavisinde kullanılan insülin üzerindeki biyoteknolojik çalışmalar da artmıştır. Yüksek maliyet ve düşük verimlilik ile doğal kaynaklardan elde edilen insülinin enfeksiyon riskine sahip olması insülin üretimi çalışmalarında rekombinant protein üretimi yönteminin tercih edilmesini sağlamıştır.

Özellikle biyoteknolojinin ilerlemesi ile rekombinant protein üretimi tekniklerinin gelişmesi sonucunda düşük maliyet, yüksek verimlilik ve hızlı sonuç alınması gibi avantajlı yanları sayesinde rekombinant protein üretimi ile insülin saflaştırılması ve üretilmesi çalışmaları devam etmektedir. Bu doğrultuda tez çalışmasında rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılarak hem yüksek verimde hem de düşük maliyetle insülin proteinin üretiminin gerçekleştirilmesi için en uygun koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İnsülin Hakkında Temel Bilgiler

2.1.1. İnsülin Tarihçesi

İnsülin ile ilgili çalışmalar endokrinin pankreastaki rolünün keşfi olan 1869 yılına kadar uzanmaktadır (6). Paul Langerhans pankreastaki hücrelerin birleşimi ile oluşan adacıkları bulmuştur. İlerleyen zamanda Langerhans adacıkları olarak da anılan bu hücre kümesinin salgı görevi üstlendiği düşünülmüştür. 1901 yılında Eugene Opie Langerhans adacıklarının insülin ürettiklerini ve bu hücrelerin yok olması ile birlikte diyabetin oluştuğunu gözlemlemiştir. İlerleyen yıllarda Tip 1 Diyabet olarak adlandırılacak olan bu patalojinin tedavisi ilk kez 1921 yılında Tip 1 diyabet hastası olan 14 yaşındaki Leonard Thompson'a medikal amaçlı olarak insülin verilmesiyle gerçekleşmiştir. 1922 yılında elde edilen bu başarılar sonucunda insülin ticari amaçlı olarak ilk defa Eli Lilly ilaç firması tarafından sığır yada domuz pankreasından özütleme ile üretilmiştir. İnsülini, insan üzerinde kullanan ilk bilim adamı olan Frederick Grant Banting ve James Rickard Macleod yapmış olduğu bu çalışmalar neticesinde 1923 yılında nobel ödülü almıştır (7).

1955 yılında Frederick Sanger sığır insülininin iki polipeptit zincirini meydana getiren aminoasitlerin dizilimlerini belirlemiştir. Yaptığı bu çalışmalar neticesinde Sanger 1958 yılında kimya alanında Nobel ödülünü almıştır (8).

Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre en çok görülen 5. hastalık olan diyabet ve hastalığın etkeni insülin sahasında yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda Nobel ile ödüllendirilmiştir(9) Bu araştırmalardan birisi de vücuttaki insülin seviyesinin ölçülmesi amacıyla diyabetli hastalar üzerinde radyoaktif izotopların kullanarak deneyler yapan ve hormon seviyesinin ölçülmesi amacıyla Radioimmunoassay(RIA) tekniğini geliştiren Rosalyn Sussman Yalow 1977 yılında fizyoloji ve tıp alanında Nobel ödülü almıştır (10).

1920'lerden 1970'lerin sonuna dek sığırlardan özütlenerek ilaç haline getirilen insülin, 1970'lerin başlarından itibaren gelişmeye başlayan rekombinant DNA teknolojisi ile 1978 yılında bakterileri kullanarak ilk defa Genentech firması bulmuştur (4)

2.1.2. İnsülin Yapısı

İnsülin insanda 11. kromozom üzerinde 2,159,779.-2,161,341.'uncu bazlar arasında bulunur. Yaklaşık 5,4 kd büyüklüğündedir. Pankreasta bulunan beta hücreleri tarafından sentezlenir. A(21 aminoasit), B(30 aminoasit) ve C (33 aminoasit) peptidlerinden oluşur. A peptidindeki 7. aminoasit ile B peptidindeki 7. aminoasit ve yine A peptidindeki 20.aminoasit ile B peptidindeki 19.aminoasit arasında kurulan disülfür köprülerinin oluşumu ile C peptid ayrılarak 2 polipeptitten oluşan insülin hormonu meydana gelir. Bu hormon yardımı ile pankreasın yeterli insulin üretememesi veya vücudun ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması sonucu oluşan diyabet hastalığı tedavi edilmektedir (11).

2.1.3. İnsülin Biyosentezi

İnsülin biyosentezi sürecinde; nükleusta insülin kodlayan genlerde mRNA transkripsiyonu gerçekleştirilir. Bu süreç ile birlikte mRNA sitoplazmaya ilerler ve polizom üzerinde translasyona uğrar. N-Terminal sinyal polipeptit oluşumu ile endoplazmik retikulum içerisinde A, B ve C polipeptit sentezi başlar. Polipeptit sentezi ile birlikte endoplazmik retikulum içerisinde uzayan bir zincir oluşur. Bu zincirin sonucunda, polipeptit zinciri meydana gelir. Sinyal peptidin zincirden ayrılması ile birlikte proinsülin oluşur. Endoplazmik retikulundan golgiye taşınan proinsülin proteaz etkisi ile c-peptit segmentini kaybederek insüline dönüşür (11).

2.2. Diyabet ve Epidemiyolojisi

Diyabet küresel olarak önemli bir kamu sağlık problemidir. Diyabet hastalığının mevcut durum itibariyle insan sağlığı açısından ciddi bir tehdit olması ve hızlı bir şekilde artış göstermesi hastalığın ve tedavi yöntemlerinin ne denli ciddi olduğunun

göstergesi niteliğindedir. Uluslararası Diyabet Federasyonunun açıkladığı Diyabet Atlasına göre dünyada 2013 yılı itibariyle diyabet hastası sayısı 382 Milyon kişidir. Yirmi yıl içerisinde bu sayının yaklaşık 592 milyon kişiye ulaşacağı düşünülmektedir (13).

2013 yılında yetişkinler arasında diyabet nedeniyle ölüm sayısının beş milyonu aştığı belirtilmektedir. Geçmiş yıllara göre ölüm oranları ve risk artmaktadır. Bu kapsamda diyabetin erken teşhisi, korunması ve önlenmesi için sağlık yatırımları her geçen gün artmaktadır. Hasta bireyler için ciddi bir tedavi masrafı getiren diyabet için yıllık 548 milyar dolar seviyelerinde harcama yapılmaktadır. Gelir seviyesi yüksek olan diyabet hastası bireyler yıllık ortalama 5621 dolar harcama yaparken, düşük ve orta gelire sahip bireyler 356 dolar harcama yapabilmektedir (14,15)

Diyabetli kişilerin yarısına yakını bu hastalığın olduğunu farketmeden yaşamına devam etmektedir. Büyük risk altında olan bu bireylerde erken teşhis ile birlikte tedavi uygulanması ile diyabetin etkisi ve zararı en aza inecektir. Günümüzde; Tip 1, Tip 2 ve Gebelik Diyabet çeşitleri dışında bazı durumlarda da diyabet hastalığı gözlemlenmektedir. Söz konusu bu diyabet tipine neden olan bazı durumlar; Rabson-Mendenhall sendromu, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, infeksiyonlar gibi genetik sendromlardır (16–18)

Tip 1 diyabet olarak adlandırılan türü, beta hücrelerinin otoimmün hasarından kaynaklı olarak salgıladığı insülin eksikliği veya yokluğu sonucu ortaya çıkmaktadır (18). Bir diğer diyabet hastalığı olan Tip 2 genel olarak erişkinlerde görülmektedir. Genetik yatkınlığı bulunan insanlarda çevresel faktörlerinde etkisi ile birlikte insülin direncinin artması ve insülin üretiminin azalması sonucunda oluşmaktadır (20). Tip 2 diyabetli hastalarda insülin üretimi olmasına rağmen hedef dokular bu üretilen insülini etkili ve verimli bir şekilde kullanamaz (21).

Gebelik sırasında glukoz dengesinin bozulması ve insülin hormonunun yetersiz üretilmesi sonucunda ortaya çıkan diyabet hastalığına gestasyonel diyabet olarak

adlandırılır (18).Gebelikler içerisinde düşük bir orana sahip olmasına rağmen plasenta hormonlarının, salgılanan insülinin etkisinin azalması veya engellenmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Gestasyonel gebelik olarak da adlandırılan bu diyabet hastalığı tipi, gebe kadınlarda %3'ünde rastlanmaktadır (21).

2.3. Rekombinant Protein Üretimi

2.3.1. E.colide rekombinant protein üretim

Proteinler birçok alanda sıklıkla kullanıldıkları için büyük bir öneme sahiptirler. Bu sebepten proteinlerin kısa zamanda ve düşük maliyetli olarak rekombinant olarak elde edilmesi modern biyoteknolojinin önemli çalışmaları arasında yer almaktadır. Proteinler doğal kaynaklarından üretilebileceği gibi rekombinant olarak yüksek miktarlarda da üretilebilmektedir (21). Doğal kaynaklar kullanarak üretimi gerçekleştirilen proteinlerin verimi çok düşük olduğundan ve saflaştırma süreçlerinde başarılı sonuçlar elde etme zorlukları sebebiyle heterolog rekombinant protein üretim teknolojisi, üretimi arzu edilen proteine daha hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde erişilebilmeye olanak sağlamaktadır (23).

Rekombinant protein üretimi teknolojisi, ilgili proteinin geni, vektör sistemleri yardımı ile üretimin gerçekleşeceği farklı taşıyıcı sistemlere aktarılması sonucunda üretimin gerçekleştirilmesidir. Bu yöntem ile saf proteinler, hızlı, ekonomik, verimli bir şekilde elde edilmektedir (24). Rekombinant protein üretimi yöntemi ile üretilen ilk proteinlerden birisi insülin hormonudur. Bu insülin enterik bir bakteri türü olan *E.coli*'nin taşıyıcı prokaryotik hücre olarak kullanılması ile elde edilmiştir (25).

Prokaryotik taşıyıcı hücrelerin hızlı çoğalması, kolay kültür tekniklerine sahip olması, daha ekonomik bir protein ekspresyonu sağlaması, izolasyon ve saflaştırma kolaylığı avantaj sağlarken, buna karşılık post-translasyonel modifikasyonlardan yoksun olması sebebiyle enzimatik sistemlerde kullanılacak ve üçüncül yapısında meydana gelecek modifikasyon eksiklikleri sebebi ile fonksiyon kaybı meydana gelecek proteinler için bu sistem elverişli olmamakta ve üretim koşullarını

zorlaştırmaktadır. Bu dezavantajı dışında, bakteri üretici sistemlerde güçlü promotorlar kullanıldığında yetersiz şaperon üretimi sebebiyle aşırı miktarda üretilen proteinlerde yetersiz katlanma meydana gelmektedir. Yetersiz katlanma sebebiyle proteinler çözünmez bir form olan inklüzyon cisimciklerinin içerisine depolanmaktadır (26).

E.coli ekspresyon sistemi için günümüzde birçok ticari ve ticari olmayan ayrıca çeşitli uygulamalar için özel tasarlanmış promotör bölgeler içeren vektörler bulunmaktadır. Bunlardan rekombinant protein üretiminde sık kullanılan T7 promotörlü pET ekspresyon sistemidir (23)

Escherichia coli'de proteinler 3 formda üretilmektedir;

- Üretimi arzu edilen proteinin C-terminal ve/veya N-terminal ucundan his-tag gibi bir floresans proteinle birlikte füzyon protein olarak üretilmesidir. Bu his-tag kuyrukları üretilen rekombinant proteinin immünopresipitasyon gibi çalışmalarda, saflaştırılmasında, görüntülenmesinde ve hücre-dışı proteazlara karşı korunmasında yarar sağlamaktadır.
- Üretilen proteinler periplazmaya veya besiyerine salınabilirler. Besiyerine salınan proteinlerin hücre-içi proteazlar tarafından degradasyon olasılığı azaltmakta ve doğru konformasyondaki proteinlerin besiyerine salınımıyla saflaştırmayı kolaylaştırmaktadır.
- Fazla miktarda rekombinant protein üretiminde proteinler inklüzyon cisimcikleri içerisinde çözünmez formda bulunmaktadırlar. Bu durum protein taşıyıcı hücrenin proteazlarından korunsu bile daha sonraki süreçlerde fonksiyonel protein eldesinde zorluklara ve miktar azlıklarına sebebiyet vermektedir

Günümüzde rekombinant protein üretim tekniklerinin kolaylaştırılması, kısa zamanda,

az maliyetli ve verimli şekilde protein elde etmek amacıyla üretim ve saflaştırma teknikleri ile ilgili çalışmalar gelişerek devam etmektedir (26).

2.4. Klonlama ve Vektör Seçimi

Rekombinant protein üretim süreci, uygun konakçı hücrede ekspresyon vektörleri üzerindeki güçlü promotorlar yardımıyla hedef proteini kodlayan DNA moleküllerinin verimli şekilde ilgili gen ürününün ifadenmesi ve nihai protein üretiminin yapılması çalışmalarını kapsamaktadır (27). Hedeflenen genlerin ifadenmesi ve sonucunda protein ürüne dönüşmesi için öncelikle güçlü bir promotor ardında olmak üzere ekspresyon vektörüne klonlanır. Taşıyıcı vektörler üzerinde; ribozom bağlanma bölgeleri, kontrol elementleri, antibiyotik direnç kaseti, replikasyon orijinleri, klonlamaya olanak sağlayan restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri ve verimli şekilde üretimi sağlayacak güçlü promotörler bulunmaktadır (28). Yaklaşık 500 bp uzunluğundaki promotör bölgeler, vektörün çoğalmasını sağladığı gibi polimeraz enzimlerinin bağlanması ile klonlanan ilgili protein DNA'sının replikasyonunda görev alır. Hedef sekansın ifadenmesini sağlayacak şekilde promotor bölgenin ardına klonlanmasıyla oluşturulan rekombinant vektör uygun taşıyıcı hücreye aktarılır ve hedef protein üretimi gerçekleştirilir. Ancak bu süreçleri etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Ayrıca rekombinant protein üretiminde kullanılan ekspresyon vektörlerinin kopya sayısı, antibiyotik direnç kaseti, çoklu klonlama bölgesi, transkripsiyon promotor seçimi, pET ekspresyon sistemleri gibi bazı ana özellikler üretimi etkilemektedir

- Kopya Sayısı

Ekstrakromozomal bir DNA parçası olan plazmitler, konakçı hücreden bağımsız bir şekilde sadece hücre içerisinde belirli kopya sayısında çoğalabilmektedir. Plazmitlerde replikon adı verilen bölgeler replikasyon başlangıcı (ori) ve kontrol eden elementlerden oluşan ve kopya sayısı ile yakından ilişkili olan genetik birimdir. Plazmitte yer alan ve replikasyon orijini olarak adlandırılan diziler sayesinde kopyalama gerçekleştirilebilir. Plazmitlerde 30'dan fazla replikon tanımlanmasına

rağmen moleküler klonlamada sıklıkla; kopya sayısı 15-20 olan ve bakterilerin birbirleri ile rekabet etmelerini sağlayan kolisin adlı bakteriyosinden adını alan colE1 replikonu ve bir diğeri pMB1 replikonu kullanılmaktadır (29).

- Antibiyotik Direnç Kasedi

Çoğu plazmid içinde buldukları bakteriye selektif avantaj sağlayan, bakteriyi tetrasiklin, kloramfenikol, blastisidin, ampisilin, zeosin gibi bir antibiyotiğe dirençli hale getirmek gibi özellikler kazandıran genler veya gen grupları taşırlar. Bu gen grupları özellikle rekombinant protein üretiminde aktarımı gerçekleştirilen ve ilgili geni içeren rekombinant vektörün, taşıyıcı hücreye seçici bir avantaj kazandırması sebebiyle ilgili hücre tarafından vektörün kopyalanması gerçekleştirilir. Aynı zamanda transformasyon gibi işlemlerde ilgili geni taşıyan hücre gruplarının uygun antibiyotikli besiyerleri yardımıyla ayırt edilmesini ve seçilmesini kolaylaştırır (31).

- Çoklu Klonlama Bölgesi

Çoklu klonlama bölgesi 20'den fazla farklı restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerinin bir arada bulunduğu polylinker adı da verilen bölgelerdir. Bu bölgede yer alan restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri ile açık okuma çerçevesini bozmayacak şekilde ikili enzim kesimlerine maruz kalmış hedef DNA dizisinin yerleşmesine olanak sağlanır ve kolay bir şekilde hedef DNA dizisinin klonlamasının sağlanır (32).

Hedef DNA dizisinin klonlanmasında sıklıkla kullanılan restriksiyon enzimleri, hedef sekans ile vektörün iki ucundan yapışkan uçlar meydana getirecek şekilde kesilmesini ve ligasyon yardımıyla vektör ile hedef gen dizisinin birleştirilmesine olanak sağlarlar. Genellikle çoklu klonlama bölgeleri direnç kaseti ya da haberci (reporter) genin başında yer almaktadır. Böylece hedef DNA parçasını alan başarılı bir rekombinant plazmit içeren transformatların fenotipik olarak teşhisi gerçekleştirilir (31,32).

- Promotorlar

Rekombinant protein eldesinde üretim koşullarını etkileyen ve kullanılan plazmitlerin üzerinde bulunan transkripsiyonel promotorlar mevcuttur. Bu promotorlar protein üretiminin indüksiyon aşamasında kritik rol oynamaktadır.

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla kuvvetli promotorlardan olan T4 yada T7 bakteriyofajlarından türetilmiş olan promotor sistemleri kullanılmaktadır. Bu promotorlar protein üretimi sırasında aktif hale getirecek olan laktoz ve laktoz analogu olan galaktopiranozidler tarafından indüklenmektedir. Bakteriyel ekspresyon sistemi olarak bu tez çalışmasında kullanılacak laktoz analogu izopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) lac operonu indükleyicisidir. Genellikle çoklu klonlama bölgesine bitişik olan bu promotor sistemi T7 viral promotoru olduğundan oldukça güçlüdür. Ancak bu promotor sadece viral T7 polimeraz varlığında çalışmaktadır. Bakterinin kendi polimerazları bu promotoru tanımamaktadır. Bu amaçla çoğu bakteri suşu T7 RNAP üretmediğinden kromozomal DNA' sında bu enzimi üretmesini sağlayan gen dizileri bulunan özel B serisi suşları (BL21 (DE3) gibi) kullanılır. Bu seri dışındaki kullanımlarda ya enzim bakteriye enjekte edilmeli yada dışarıdan verilmelidir (34).

Güçlü bir promotor olan T7 promotorunun operonunda bazı özel diziler bulunmaktadır. Bunlar represör, promotor, operatör, terminatör ve hedef gen dizisidir. Laktoz operonunun asıl hedefleri olan lacZ, lacY ve lacA ortamda laktoz varlığında ifadelenen genlerdir. Bu hedef genlerden lacY, laktozun hücre içerisine alınması için gerekli olan permeaz enzimini; lacZ, laktozu glikoza ve galaktoza parçalayan β -galaktozidaz enzimi ve lacA ise laktoz metabolizmasında oluşan artık ürünlerin hücreden uzaklaştırılması sırasında galaktosit şekerlerinin asetillenmesini sağlayan transasetilaz enzimini kodlar. Normal şartlarda ortamda laktoz bulunmadığında gereksiz yere hücre kaynaklarının tüketilmemesi için bu promotor çalıştırılmaz. Bu promotorun baskılanmasını sağlayan gen ise lacI genidir. Bu genin ürünü promotordaki operatör dizilere bağlanarak RNAP'ın promotora bağlanmasını engeller.

Ancak ortamda IPTG gibi bir şekerin varlığında lacI geninin fonksiyonu engellenir. Böylece RNAP sigma faktörünün bağlanmasıyla aktif hale gelir ve hedef geni de içeren transkripsiyon bölgesinin ifadelenmesini sağlar. RNAP promotora bağlanmasının ardından sigma faktör ayrılır ve kısa mRNA transkriptini sonlandırıcı bölge olan terminatör dizisine kadar devam ettirir. Yapılan çalışmalarda ortama indükleyici olarak laktozun yerine IPTG koyulması, sistemde tükenmeden tutulacak ve operonun çalışmasının devamlılığını sağlayacaktır (34).

- Pet ekspresyon sistemleri

Rekombinant protein üretiminde ticari olarak kullanılan farklı promotor içeriklerine sahip sistemler bulunmaktadır. Tac promotörü içeren pGEX, aeaBAD (arabinoz) promotörü içeren pBAD ve Trc promotörlü pTrc örnek verilebilir. Bu tez çalışmasında bakteriyel sistemde rekombinant protein üretmek amacıyla kullanılacak ve ticari olarak çok sık tercih edilen sistem T7 promotörlü ve lac operatör sistem bazlı pET sistemleridir. Bu tezde kullanılacak olan Şekil 4.4'de gösterilen pET-28a plazmit vektörü, klonlamada ve rekombinant protein üretiminde kullanılacak olan vektördür. Vektör üzerinde lac represör proteinini kodlayan lacI geni, T7 promotörü, lac operatör bölgesi, çoklu klonlama bölgesi, kanamisin direnç kaseti, flve colE1 replikasyon orijinleri bulunmaktadır. Klonlanmak istenen hedef gen T7 promotörü ve lac operatör bölgesinin 5' ucuna klonlanır. BL21 (DE3) suşunda lacUV5 promotör kontrolündeki operonun önünde T7 RNAP bulunduğundan IPTG ile indüklenen lac promotörü ile enzimi oluşturacak gen ifadelenir. Böylece ortamda T7 RNAP bulunduğu ve lac operonu engellenmediğinde pET vektöründe bulunan hedef gen mRNA'ya transkripsiyonu olur ve sonrasında istenen proteinin translasyonu gerçekleşir. Pet sistemlerinde bulunan altı histidinin yanyana gelmesiyle oluşan 6xHis işaretiyle veya amino terminaline eklenen 6xHis işaretleri protein saflaştırma süreçlerinde kolaylık sağlar (35).

2.5. Protein Saflaştırma Yöntemleri

2.5.1. Metal şelasyon afinite kromatografi

Tez çalışmasında hücre lizatı şeklinde elde edilen protein karışımından ilgili proteinin spesifik olarak ayrılması amacıyla kullanılan bu düşük basınçlı kromatografi sistemi; temel olarak koenzim, substrat, antikor, nükleik asit, hormon gibi biyolojik ligandlar ile saflaştırılması hedeflenen molekül arasında tersinir bağ kuran afinite kromatografisidir. Uzun yıllardır protein saflaştırmak üzere kullanılan afinite kromatografisi verimli ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle genel olarak tercih edilmektedir (36).

Oldukça hassas seçiciliğe sahip olan afinite kromatografisi genel olarak antijen-antikor, enzim-substrat, ilaç-reseptör gibi hassas etkileşimlere dayanır. Afinite kromatografisinde ayrımı arzu edilen protein yada protein grupları ile spesifik ligandları arasındaki tersinir etkileşime dayanan bir metottur. Hedef protein uygun koşullarda sabit fazda bulunan spesifik ligandına tersinir olarak bağlanmaktadır. Bağlanamayan proteinler hareketli fazla birlikte akıp giderler. Tutunan hedef proteinlerin salınımı ise spesifik olarak liganda yarışmalı olarak bağlanma sağlayacak moleküllerin verilmesi ile veya spesifik olmadan yalnızca pH gibi ortam koşullarının değiştirilmesi ile olmaktadır. Böylece hedef protein saf şekilde elde edilmiş olur (38).

Afinite kromatografisi; immünoafinite, hidrofobik etkileşim kromatografisi, kovalent afinite ve immobilize metal şelat afinite gibi birçok teknik bünyesinde barındırmaktadır. Bu tez kapsamında immobilize metal şelat afinite kromatografisi tercih edilmiştir. Bu yöntem özellikle teropötik proteinlerin, peptitlerin, nükleik asitlerin, hormonların ve enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Hedef proteinler metal iyonlarına karşı olan afiniteleri kullanılarak saflaştırılır. Bu ayırım tekniğinde, lewis asiti olarak adlandırılan çift elektron alıcısı olan metal iyonları ile proteinlerin yüzeyinde bulunan elektron verici atomlar (N, S ve O) arasındaki etkileşim ile olmaktadır. Bu etkileşim özellikle proteinlerde bulunan histidin amino asitinin imidazol grubu, triptofan amino asitinde bulunan indol ve sistein amino asitindeki thiol grupları ile olmaktadır. Her proteinin metal şelat olarak kullanılacak

divalent veya trivalent katyonlara ilgisi farklıdır. Sıklıkla kullanılan divalent katyonlar Fe^2 , Co^2 , Ni^2 , Cu^2 , ve Zn^2 ,dir. Bunlar dışında trivalent katyon olarak Fe^3 ve Al^{3+} de kullanılmaktadır (37–39)

2.5.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

Tez çalışmasında üretimi gerçekleştirilen rekombinant A ve B insülin proteinin, imidazolden arındırılması ve A ve B zincirlerinin analiz edilmesi sonucunda birleştirilerek kimerik insülin protein eldesi amacıyla kullanılan HPLC, günümüzde biyoteknoloji alanındaki teknolojilerin ve altyapıların gelişmesi doğrultusunda peptid ve proteinlerin karakterizasyonunda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Birbirine çok yakın analitlerin yer aldığı çözeltileri ayırmak amacıyla kullanılan bu yöntem temel olarak, yüksek basınçta sıvı ve katı olan fazlar arasında sıvıda çözülmüş bileşenlerin biraraya gelip etkileşimi sonucunda içerisinde bulunduğu kolondaki farklı zaman ve hızlarda hareketi ile birlikte çözeltide yer alan bileşenlerin kolonu terk ederek ayrılmasına dayanan bir yöntemidir. HPLC yönteminin en büyük avantajlarından birisi nitel ve nicel analiz yapılabilmesidir. Bu yöntem ayırımı arzu edilen bileşenlerin karışımdan çıkış zamanının farklı olması sağlarken, rahat, verimli ve hızlı şekilde analiz yapılabilmesini sağladığı için sıklıkla tercih edilmektedir. Özellikle son elli yıldır organik maddeler üzerinde yapılan deneylerde kullanılan bu yöntem ile ayırma, saflaştırma ve analiz etme imkanı sağlanmıştır (40,41).

2.6. Deney Tasarımı

Deney tasarım yöntemleri, rekombinant protein üretimi gibi birçok faktörün üretimde oldukça etkili olduğu süreçlerde istatistiksel olarak anlamlı ve tekrarlanabilir optimal üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılır. Özellikle rekombinant protein üretimi gibi zaman ve maliyetin önemli olduğu aynı zamanda verimli bir üretim sürecinin arzu edildiği çalışmalarda klasik deney tasarımı yöntemlerine göre oldukça avantaj sağlamaktadır. Yalnızca zaman, maliyet ve verim gibi bahsi geçen kriterler değil aynı zamanda üretimde etkili olduğu düşünülen faktörlerin istatistiksel

olarak birbirleri ile ilişkilerinin net bir şekilde gözlenmesi ve yorumlanmasına olanak sağlar. Deneysel tasarımın en temel amaçları arasında deneysel hatalarını minimuma indirmek ve deneysel sayısının belirlenmesine olanak sağlamasıdır (42). Bu amaçla ilk olarak 1900'lü yılların başında R.A. Fisher ve ekibi tarafından, tarım sektöründe verimlilik artışı, üretim süreçlerinin optimizasyonu ve iyileştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Böylece hem deneysel süreçinde yaşanması olası hataların minimum seviyelere düşürülmesi sağlanmış hem de üretim süreçlerinin optimizasyonu kısa sürede yapılmıştır (42).

2.6.1. Plackett-Burman Tasarımı

Plackett ve Burman tarafından 1946 yılında geliştirilen bu tasarım "Hadamard Matris tasarımı" olarak da bilinen iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımıdır (42). Kısmi faktöriyel dizaynları tam faktöriyel dizaynlardan farklı yanı, kısmi faktöriyel tasarımlarda iyi sonuç alınması için faktör ve seviyelerin olduğunca az sayıda tutulmasına gerek olmamasıdır. Özellikle bio-mühendislik sistemlerinde etkili faktörlerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Plackett-Burman klasik deneysel yaklaşımlardan farklı olarak deneysel tüm faktörlerin değerlendirilmesini ve değişik kombinasyonlarının oluşturulmasını sağlamaktadır. Böylece pek çok potansiyel faktör arasından önemli faktörlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak bu tasarımda faktörler arası etkileşim ihmal edilmektedir. Faktörler arasındaki etkileşim ihmal edilemediği durumlarda bu tasarım, kesin ana etmen ve kesin etkileşimler arasındaki farkı tanımlamaya izin vermemektedir (44) (45).

2.6.2. Box-Behnken

İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olan Plackett ve Burman (PB) tasarımı önemli faktörlerin belirlenmesini sağlasa bile faktörlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin ve optimize koşulların elde edilmesini garanti etmemektedir. Bu amaçla PB tasarımındaki bu eksiklik yanıt yüzeyi analiz metodu (RSM) kullanılarak giderilir ve optimal koşullar elde edilir (46).

1960'lı yıllarda Box ve Behnken'in geliştirdiği bu yöntem, 3 seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olarak Box ve Behnken tarafından geliştirilmiş ve yanıt yüzeyi analizinin yapılmasına olanak sağlayan istatistiksel bir yöntemdir. İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımda belirlenen ve yeterli olduğu analiz edilen faktörler polinamiyal model ile 3 seviyeli analize tabi tutulur. Böylece bu faktörlerin çeşitli kombinasyonlarıyla istatistiksel olarak anlamlı optimal seviyeler tespit edilir. Bu analizin getirdiği avantajlar; 3 seviyenin -1 (düşük), 0 (orta) ve +1 (yüksek) olarak kodlanması, ikinci dereceden bağımsız tasarım oluşturma ve sonuçların kolay bir şekilde düzenlenmesi ve yorumlanmasıdır. Bu analiz özellikle güvenilir bir sonuç verdiği ve deney sayısını azalttığı için oldukça sık tercih edilmektedir (42,46)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Proteinler yaşamın ve hücrenin temel bileşenleridir. Özellikle ilaç sektörü açısından proteinler oldukça önemlidir. Dünya nüfusu ile doğru oranda artan hastalıkların tedavisinde kullanılan protein tabanlı ilaçlara duyulan ihtiyaç yıllar içinde artmıştır. Doğal kaynaklarından saflaştırılarak elde edilen proteinlere karşı gelişen teknoloji ile birlikte daha saf, ucuz, çözünebilir ve fonksiyonel olarak daha hızlı şekilde üretim olarak sağlayan rekombinant DNA/protein teknolojileri ile üretilen proteinler günümüzde yoğun kullanılmaktadır. Bu proteinlerin üretimi için fabrika hücre olarak da bakteri, maya, bitki ve memeli hücreleri kullanılmaktadır. Kültürünün yapılmasının kolaylığı, basit besiyeri gereksinimlerinin olması, hızlı ve kolay üretilmesi, hızlı adaptasyon kabiliyeti, morfolojik, genetik ve fizyolojik özellikleri iyi bilinen bir organizma olması, çok sayıda yöntem geliştirilmiş olması gibi avantajları nedeni ile *E. coli* başta olmak üzere bakteri hücreleri rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında,

- rekombinant DNA teknolojisi ile insan insülin A ve B peptidlerini üreten bakteriyel fabrika hücre bankaları tasarlayarak oluşturmak,
- fraksiyonel faktöryel deney tasarımı ve yanıt yüzey modellemesi yöntemlerini kullanarak bu fabrika hücreler ile insülin A ve B peptidlerinin üretimi süreçlerini optimize etmek,
- üretim sonrası kromatografik olarak saflaştırılan insülin A ve B peptidlerinin düşük maliyetli bir redoks kimyası ile dimerizasyonunu sağlamak

basamaklarından oluşan rekombinant insan insülin molekülü üretim sürecinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, rekombinant insan insülin A ve B zincirlerinin bakteriyel fabrika hücrelerde üretimini ve saflaştırılmasını sağlayacak vektör tasarımları geliştirilmiş; hücre bankalarının oluşturulmasının ardından deneysel tasarım ve yanıt yüzeyi modellemesi ile protein ekspresyon düzeyleri optimize edilmiştir. Sentezlenen ürünün düşük basınçlı sıvı afinite kromatografisi ile saflaştırılmasının ardından, afinite etiketinin son üründen proteolitik olarak uzaklaştırılması sağlanmış, olgun insülin A ve B zincirleri arasındaki disülfid bağlarının kimyasal oksidasyon yolu ile kurulması ve dimerik moleküllerin ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile saflaştırılması basamakları gerçekleştirilmiştir.

4.1. Bakteriyel ekspresyon sisteminde rekombinant insan insülini üretim sürecinin tasarımı

Bakteriyel protein ekspresyon sistemleri, belirtilen avantajlarına rağmen, rekombinant insan insülini üretimi sürecinde çözümlenmesi gereken tasarım kısıtlılıklarını da beraberinde getirmektedir:

1. Bakteri hücrelerinin translasyon işlemi sonrası protein modifikasyonu yapabilme kapasitesi son derece sınırlıdır. Sırası ile sinyal peptidi-B-C-A zincirlerinden oluşan proinsülinin B-C ve C-A bileşkelerinden sindirilmesini sağlayan dibazik aminopeptidazların *Escherichia coli* hücrelerinde bulunmaması, A ve B zincirlerini üretecek ayrı hücre bankalarının oluşturulmasını gerekli kılmaktadır.
2. *Escherichia coli* sitoplazması kuvvetli redüktan bir ortam oluşturduğundan insülin A ve B zincirleri arasında disülfid bağları kurulamamaktadır.
3. Özellikle insülin gibi yüksek GC oranına sahip heterolog genlerin ekspresyonunda nadir kodon sorunu verim düşüklüğüne neden olmaktadır.

4. Bakteri hücrelerinde üretilen rekombinant proteinler için etkin bir sekresyon sistemi bulunmadığından hedef proteinin diğer hücrel proteinlerden saflaştırılması gerekmektedir.
5. Son üründe yer alacak insülin zincirlerinde orijinal diziden farklılık bulunmamalıdır.
6. Ayrı ayrı üretilip saflaştırılmış zincirlerin ucuz ve hızlı bir yöntem ile doğru şekilde disülfid bağı yapması sağlanmalıdır.

Bu tez çalışmasında, belirtilen tasarım kısıtlılıkları göz önünde tutularak, rekombinant insan insülinini elde etmek amacı ile;

- insülin A ve B zincirlerinin daha sonra kimyasal olarak birleştirilmek üzere ayrı *Escherichia coli* kültürlerinde üretilmesi,
- eksprese olacak rekombinant füzyon peptidlerin bakteri tarafından translasyonu kolay yapılabilecek N-terminal segment ile üretilmesi,
- üretim sonrası bakteri hücrelerinin parçalanması ve elde edilen lizattan 6 x histidin etiketi taşıyan füzyon peptidlerin metal şelasyon kromatografisi ile saflaştırılması,
- saf füzyon peptidlerin siyanojen bromür ile sindirilmesi ve dizide farklılık yaratacak amino asitlerin uzaklaştırılması,
- proteolitik sindirme sonucu elde edilen ürünlerin C18 ters faz kromatografi ile tuzdan arındırılması,
- insülin A ve insülin B zincirlerini içeren kesim ürünlerinin doğru stokiyometride karıştırılarak oksitleyici ortamda disülfid bağlarının oluşturulması,

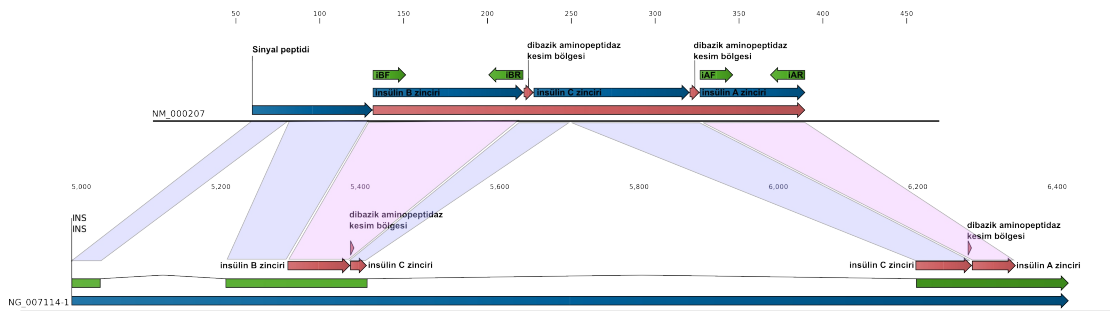
- homo- ve heterodimerik indirgenme ürünlerinin C18 ters faz kromatografisi ile ayrıştırılması

basamaklarından oluşan bir süreç geliştirilmiştir.

4.2. Materyal

4.2.1. İnsülin A ve B füzyon peptidlerini kodlayan vektör yapılarının tasarımı

İnsan insülini A ve B zincirlerinin bakteriyel ekspresyon vektörüne moleküler klonlamasının tasarımı için GenBank NM_000207 referans mRNA dizisi ile NG_007114 referans DNA dizisinden yararlanılmıştır. İnsülin sinyal peptidi, B, C, A zincirlerinin ve dibazik amino peptidaz kesim bölgelerinin genomik DNA ve mRNA üzerindeki yerleşimi ile klonlamada kullanılan primer çiftlerinin (iBF – iBR, iAF – iAR) bağlanma bölgeleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Olgun insülin A ve B zincirlerini kodlayan gen segmentleri intron içermediğinden ilgili segmentleri çoğaltmak için kullanılan primer çiftleri, hem genomik DNA hem de cDNA hedeflerine bağlanacak şekilde seçilmiştir.



Şekil 4.1. İnsülin sinyal peptidi, B, C ve A zincirleri ile insülin B ve C segmentlerinin çoğaltılması için kullanılan iBF – iBR ve iAF – iAR oligonükleotid primerlerinin mRNA (NM_000207) ve genomik DNA (NG_007114) üzerindeki yerleşimleri.

Bu tez çalışmasında, olgun insülin A ve B peptidlerini kodlayan gen segmentlerini çoğaltmak için sırası ile iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 4.1). Bu çalışma için seçilen bakteriyel ekspresyon vektörü pET28a plazmidine moleküler klonlamanın doğru yönde gerçekleşmesini sağlamak amacı ile ileri primerler 5'- NdeI, geri primerler ise 5'- XhoI tip II restriksiyon endonükleaz kesim bölgesine sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Söz konusu vektörün çoklu klonlama bölgesi ile moleküler klonlama deneyleri için seçilen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma motiflerinin yerleşimi Şekil 4.2'de göstermiştir.

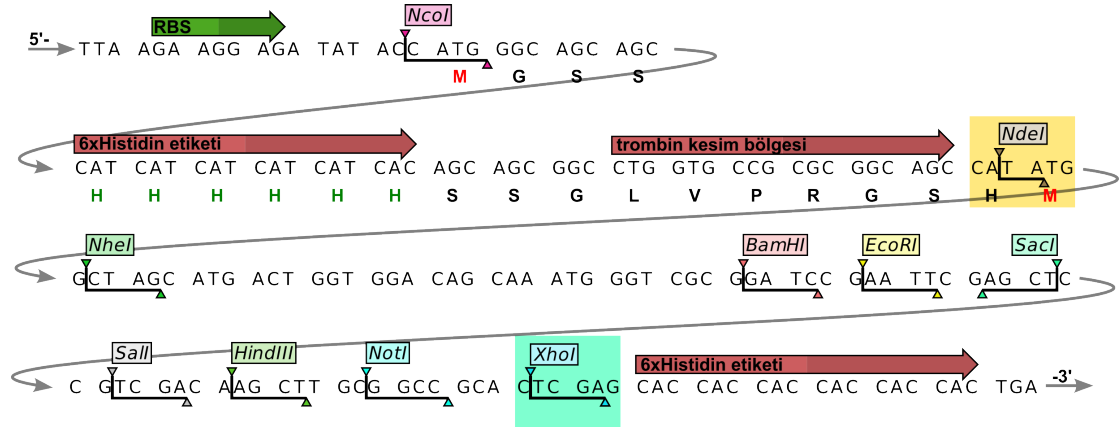
Çizelge 4.1. İnsülin A ve B zincirlerini kodlayan gen segmentlerinin pET28a plazmid vektörüne klonlanmasında kullanılan oligonükleotid primerlerin dizisi, kesim enzimi ve bağlanma sıcaklıkları.

Primer	Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı
iAR	5' -ATT <u>CTCGAG</u> TCA GTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG-3' XhoI opl	59°C
iAF	5' -ATT <u>CATATG</u> GGCATTGTGGAACAATGCTG-3' NdeI	59°C
iBR	5' -ATT <u>CTCGAG</u> TCA GGTCTTGGGTGTGTAGAAGAA-3' XhoI opl	59°C
iBF	5' -ATT <u>CATATG</u> TTTGTGAACCAACACCTGTG-3' NdeI	59°C

opl: Opal terminasyon kodunu.

Rekombinant insan insülin sentez süreci tasarımının hedeflerinden biri, fabrika hücrelerin parçalanmasının ardından sentezlenen insülin A ve B zincirlerinin hücresel

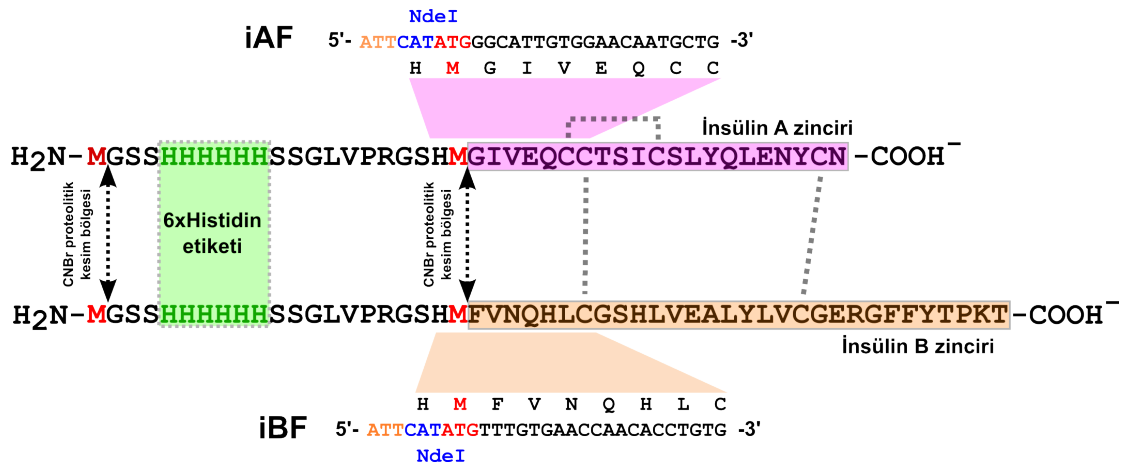
proteinlerden yüksek özgülüklü bir yöntem ile saflaştırılması olarak belirlenmiştir. Saflaştırma aşamasında immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi kullanımını mümkün kılmak için insülin zincirleri, pET28a vektörü üzerinde hali hazırda kodlanan 6 x histidin etiketi ile trombin kesim bölgesini de içeren 21 amino asit uzunluğunda bir N-terminal peptid ile füzyon oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Olgun insülin A ve B gen segmentlerinin klonlanması için kullanılan NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz kesim motifleri ile 6 x histidin etiketi ve trombin kesim bölgesinin yerleşimi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. pET28a ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesi ile ribozomal bağlanma sekası, trombin kesim bölgesi, N- ve C-terminal 6 x histidin etiketleri. İnsülin A ve B gen segmentlerinin klonlanması için kullanılan NdeI ve XhoI kesim bölgeleri işaretlenmiştir.

Rekombinant insülin üretimi sürecindeki tasarım kısıtlarından biri de sentezlenen insülin zincirlerinin amino asit dizisi üzerinde değişiklik, ekleme ya da eksiltme yapılmasının mümkün olmamasıdır. Bu nedenle, füzyon peptidlerin proteolitik olarak kesilerek son üründen uzaklaştırılmasında kesim ürünü N-terminalinde ek amino asit bırakmayan bir çözüm oluşturulması gerekmektedir. Kullanmış olduğumuz vektör pET28a, N-terminal 6 x histidin etiketinin uzaklaştırılması için trombin kesim bölgesi kodluyor olsa da, trombin sindirmesi ile elde edilen son ürünün N-terminalinde ek amino asitler uzaklaştırılmamaktadır. Bu tez çalışmasında, insülin gen segmentlerinin moleküler klonlaması için tasarlanan ileri primerler (iAF ve iBF),

okuyan çerçeveye oturacak şekilde metiyonin amino asitini kodlayan ATG nükleotid dizisine sahip NdeI restriksiyon endonükleaz enzimi tanıma bölgesi içermektedir. Bu tasarım sayesinde, bakteriyel hücreler tarafından eksprese edilen füzyon peptidin siyanojen bromid kullanılarak sindirilmesi ile doğru uzunluk ve amino asit dizisine sahip insülin A ve B zincirlerinin elde edilmesi sağlanmıştır (Şekil 4.3). Aynı nedenle, geri primerler (iAR ve iBR), XhoI motifinin yukarısında Opal terminasyon kodonu içerecek şekilde tasarlanmıştır(Çizelge 4.1).



Şekil 4.3. Rekombinant insülin A ve B füzyon peptidleri, 6 x histidin saflaştırma etiketi ve bu etiketin son üründen uzaklaştırılmasını sağlayan siyanojen bromid proteolitik sindirme bölgeleri ile klonlama ileri primerlerinin yerleşimi

4.2.2. Gen kaynağı memeli hücre hattı

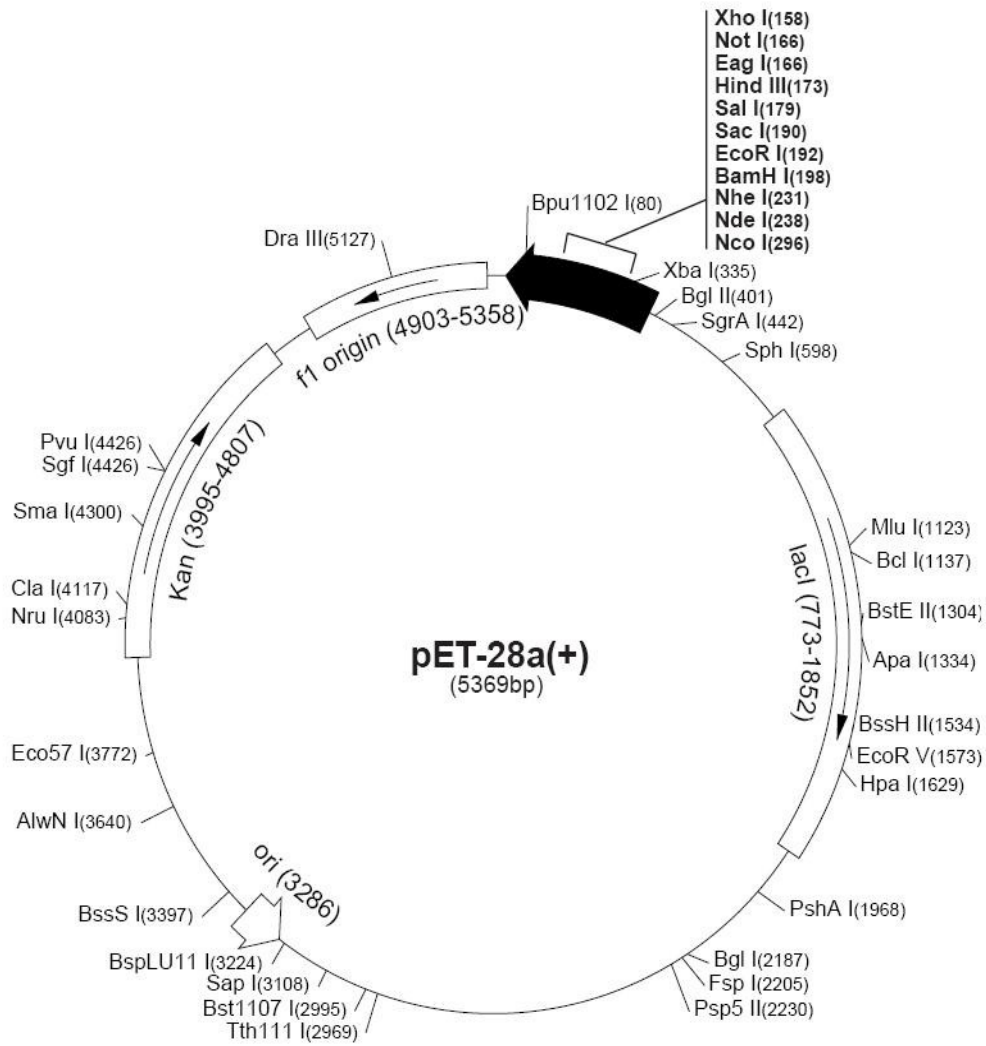
Bu tez çalışmasında, insülin geni kaynağı olarak Epstein-Barr Virus ile transforme edilen *Homo sapiens* lenfoblastik hücre hattı olan IM-9 (ATCC CCL-159) kullanılmıştır.

4.2.3. Moleküler klonlama çalışmaları ve protein ekspresyonu için bakteri suşu ve vektör seçimi

Rekombinant insülin A ve B zincirlerinin üretimi için bakteriyel pET ekspresyon

sisteminden yararlanılmıştır. Bu sistem T7 RNA polimerazı tarafından transkripte edilebilen güçlü promotorlar yardımı ile yüksek miktarda rekombinant protein üretimine olanak sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında, seriye ait kanamisin direnç kasetli pET28a plazmid vektörü seçilmiştir. Uzunluğu 5.4 kb olan bu plazmid, promotor ve ribozomal bağlanma bölgesinin arkasına yerleşmiş çoklu klonlama bölgesinde ondan fazla restriksiyon endonükleaz için kesim motifleri, okuyan çerçeveye oturacak şekilde N- ve C- terminal 6 x histidin etiketleri, N-terminal 6 x histidin etiketinin uzaklaştırılması için trombin kesim bölgesi içermektedir(Şekil 4.4).

Bu çalışmada, insülin geni A ve B zinciri segmentlerinin klonlandığı ekspresyon vektörü plazmidler sırası ile pInsA ve pInsB olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.4. Tez çalışmasında kullanılan ekspresyon vektörü pET28a'nın haritası.

İnsülin A ve B zincirlerini kodlayan ekspresyon vektörlerinin oluşturulması için moleküler klonlama çalışmaları *Escherichia coli* K12 JM109 (endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk⁻, mk⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15]) suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fizikokimyasal yöntemler ile kompetan hale getirildiğinde yüksek transformasyon frekansına sahip olan bu suş, azalmış rekombinasyon hızı ile aktarılan genetik yapının bütünlüğünün korunmasını da sağladığı için tercih edilmiştir. Ayrıca, *E. coli* K12 JM109, T7 RNA polimeraz

ifadelendiremediğinden klonlaması yapılan hedef genin sızıntı ekspresyonu sorunu bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, protein ekspresyonu için fabrika hücre olarak *E. coli* BL21 (DE3) (F⁻, ompT, hsdSB (rB⁻, mB⁻), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr) suşu kullanılmıştır. Bu suş, daha düşük transformasyon frekansına sahip olmasına rağmen, gürbüz metabolik özellikleri ile rekombinant protein üretimine daha uygundur.

Bakteri, lacUV5 promotörü kontrolü altında T7 RNA polimeraz içeren λ-DE3 lizojenine sahiptir. Bu özelliği sayesinde, *E. coli* BL21(DE3) hücrelerinde ortamda beta galaktozid varlığında T7 RNA polimeraz üretimi gerçekleşmekte, T7 viral promotora sahip pET plazmidlerinden yüksek düzeyde transkripsiyon elde edilmektedir. Ayrıca, Lon proteaz delesyonuna sahip suşta proteolitik degradasyon sorunu daha az yaşanmaktadır.

4.2.4. İnsülin A ve B zincirleri gen kaynağı

Bu tez çalışmasında, IM-9 insan lenfoma hücre hattı gen kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla, T25 hücre kültürü şişelerinde %10 fetal sığır serumu, 4 mM L-gutamin, 100 U/ml penisillin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde %5 karbondioksitli atmosferde 37 °C sıcaklıkta üç gün boyunca inkübe edilen hücreler 2000 x g ivme ile santrifüj edilerek toplanmıştır. Pellet edilen hücrelerden DNA saflaştırması yapılmıştır.

4.3. Yöntem

4.3.1. Tampon ve çözeltiler

4.3.1.1. Mikrobiyolojik besiyerlerinin hazırlanması

Tez çalışmasında, bakteri suşlarının üretilmesi için Luria – Bertani (LB) agar plakları ile buyyonu kullanılmıştır. Klonlanmış ya da boş pET28a ile transforme edilmiş suşların kültürü 50 µg/ml konsantrasyonunda kanamisin eklenmiş besiyerinde gerçekleştirilmiştir(Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Plazmid aktarımı deneylerinde transformantların seçimi ve indüksiyon öncesi bakteriyel biyokütle oluşturulması için için SOC buyyon ya da SOB agar besiyerleri kullanılmıştır(Çizelge 4.4). Rekombinant insülin A ve B zincirlerinin indüksiyonu ise, bakteri indüksiyon besiyerinde gerçekleştirilmiştir(Çizelge 4.5).

Çizelge 4.2. Luria Bertani besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Agar	15 g/l
NaOH	0.001 N
H ₂ O	

Çizelge 4.3. LB-kanamisinli katı besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya Özütü	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Agar	15 g/l
NaOH	0.001 N
Kanamisin	0.05 mg/ml
H ₂ O	

Çizelge 4.4. SOC besiyeri içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	20 g/l
Maya Özü	5 g/l
Agar	15 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N
KCl	0.003 M
Glukoz	0.020 M
MgSO ₄	0.010 M
MgCl ₂	0.010 M
H ₂ O	

Çizelge 4.5. Bakteri ekspresyon besiyeri içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	%1
Fosfat Tamponu pH 7.5/5.5	0.1 M
IPTG	0.0002 M
Kanamisin	0.050 mg/ml
LB	

Tripton, pepton, agar, maya özütü, sodyum klorür ve sodyum hidroksit gibi bileşenler otoklavda 121°C sıcaklıkta 1.5 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Yüksek sıcaklığa duyarlı bileşenlerden glukoz, kanamisin, magnezyum sülfat, magnezyum klorür stok çözeltileri 0.22µm por çaplı filtrelerden geçirilerek steril edilmiş, hazırlanan besiyerleri 55 °C sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra eklenmiştir.

4.3.2. Bakteriolojik kültürlerin üretilmesi ve stoklanması

Bakteriyolojik kültürler aseptik teknik kullanılarak yapılmıştır. Katı besiyerlerine ekimler tek koloni tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Sıvı kültürler, protokol gerektirmedikçe saflığı teyit edilmiş katı besiyerleri kültüründen alınan tek koloni ile inoküle edilmiştir.

Kriyoprezervasyon ile stoklanan kültürler için %30 (hacim/hacim) gliserol içerek Luria – Bertani buyyon kullanılmıştır. Sıvı kültür pelletleri ya da saflığı teyit edilmiş katı besiyerinden alınan koloniler gliserollü stok besiyerinde süspanse edilerek -80 °C sıcaklıkta dondurulmuştur.

4.3.3. Memeli hücre kültürü deneyleri

Bu tez çalışmasında gen kaynağı olarak kullanılan IM-9 hücreleri, T25 hücre kültürü şişelerinde %10 fetal sığır serumu, 4 mM L-gutamin, 100 U/ml penisillin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde %5 karbondioksitli atmosferde 37 °C sıcaklıkta üç gün boyunca inkübe edilmiştir. Yeterli sayıya ulaşan hücreler, 2000 x g ivme ile santrifüj edilerek toplanmıştır. Pellet edilen hücrelerden DNA saflaştırması yapılmıştır.

4.3.3.1. Memeli Hücrelerinden nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması

Memeli hücrelerinden DNA izolasyonu ve saflaştırması için hücre pelletleri, SDS ve proteinaz K içeren lizis tamponu ile parçalanmıştır(Çizelge 4.6). Elde edilen lizat, fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) karışımı ile 1:1 oranında karıştırılarak sıvı

sıvı ekstraksiyon uygulanmıştır. Oluşan emülsiyon 17000 x g ivme ile ayrıştırılmış, üstte kalan su fazı temiz tüpe aktararak 0.4 hacimde aktarılmış, üzerine 0.1 hacim 3M sodyum asetat pH 5.5 ve 0.5 hacim 2-propanol eklenmiştir. Örnekler -20°Cde inkübasyonun ardından 17000 x g ivme ile santrifüj edilmiş, çöken nükleik asitlerin pellet oluşturması sağlanmıştır. Pellet sırası ile %99 ve %70 (hacim/hacim) etanol ile yıkanmıştır. Etanolün buharlaştırılarak uzaklaştırılmasının ardından nükleik asit pelleti su içinde 8mM NaOH çözeltisi ile çözülmüştür(46).

Çizelge 4.6 Memeli hücresi lizis tamponu

Malzeme	Çalışan konsantrasyonu
Tris-klorür	10 mM
EDTA	100 mM
SDS	%0.5
Proteinaz K	0.1 mg/ml

4.3.3.2. “Midi-prep” alkalen lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu

Tez çalışmasında gerçekleştirilen moleküler klonlama deneylerinde kullanılan plazmid DNA'sı “midi-prep” alkalen lizis yöntemi saflaştırılmıştır.

Bu amaçla, 50µg/ml kanamisin eklenmiş 10 ml hacminde LB buyyon, plazmid izolasyonu yapılacak kültürden seçilen bir koloni ile inoküle edilmiştir. Hazırlanan sıvı kültür bir gece boyunca 37°C sıcaklıkta, 200 RPM hızda çalkalarak üretilmiştir. İnkübasyonun sonunda kültür, +4°C sıcaklıkta 5000 x g ivmesi ile 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Bu aşamadan kullanılan tampon, çözelti ve çalışmaya alınan örnekler buz üzerinde bekletilmiş, santrifügasyon basamakları +4°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet, 200 µl soğuk alkalen lizis I çözeltisi (Çizelge 4.7) ile süspanse edilmiştir. Hemen ardından izolasyon tüplerine taze hazırlanmış 400 µl alkalen lizis II çözeltisi eklenmiştir (Çizelge 4.8). Alt üst

edilerek nazikçe karıştırılan tüpler buz üzerinde iki dakika inkübe edilmiştir. Alkalen lizis III çözeltisinden (Çizelge 4.9) 300 µl eklenen tüpler buz üzerinde 5 dakika inkübasyonun ardından 17000 x g ivme ile beş dakika santrifüj edilmiştir. Plazmid DNA'sının çözünür halde bulunduğu üst faz temiz bir tüpe alınmış, fenol kloroform izoamil alkol (25:24:1) çözeltisi ile 1:1 oranında karıştırılarak sıvı sıvı ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Fenol kloroform izoamil alkol ile su içinde plazmid DNA'sı emülsiyonu 17000 x g ivme ile santrifüj edildikten sonra üstte yer alan su fazı temiz bir tüpe aktararak 1:1 oranında 2-propanol ile karıştırılmıştır. Soğukta çöktürülen plazmid DNA'sı 17000 x g ivme ile 20 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. DNA pelleti bir kez %99 (hacim/hacim) etanol ve bir kez de %70 (hacim/hacim) etanol ile yıkanmıştır. Etanolün kurutularak uzaklaştırılmasının ardından pellet 20 µg/ml Rnaz A ile çözülmüştür (47).

Saflaştırılan plazmid örneklerindeki RNaz A sindirme ürünlerinin uzaklaştırılması amacı ile polietilen glikol etanol presipitasyonu uygulanmış, elde edilen ürünün miktarı ve kalitesi, spektrofotometrik ölçüm ve agaroz jel elektroforezi analizi ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.7. Alkalen lizis I çözeltisinin içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl (pH 8.0)	25 mM
Glukoz	50 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

Çizelge 4.8. Alkalen lizis II çözeltisi içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
NaOH	0.2 N
SDS	%1
<ul style="list-style-type: none">• Bu çözelti taze hazırlanıp kullanılmalıdır.• Önce NaOH, suya eklenir. Sonrasında üzerine SDS <u>yavaşça</u> koyulur.	

Çizelge 4.9. Alkalen lizis III çözeltisi içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Glasiyel Asetik Asit	11.5 ml
5M Potasyum Asetat	60 ml
H ₂ O	28.5 ml

4.4. Polietilen glikol ve etanol ile DNA presipitasyonu

Escherichia coli kültürlerinden izole edilen plazmidlerin moleküler klonlama deneylerinde kullanılabilmesi için doğru bir şekilde kantite edilmesi gerekmektedir. RNaz A yıkım ürünlerinin uzaklaştırılması amacı ile polietilen glikol ve etanol presipitasyonu uygulanmıştır. Plazmid DNA'sı örneği, polietilen glikol ve etanol ile DNA presipitasyon çözeltisi (Çizelge 4.10) ile karıştırılmış, ardından 20 dakika boyunca 17000 x g ivme ile oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Oluşan plazmid DNA'sı pelleti iki kez %70 (hacim/hacim) etanol ile yıkanmıştır. Etanolün uçurulmasından sonra pellet, DNaz ve RNaz içermeyen su ile çözülmüştür (49,50).

Çizelge 4.10. Polietilen glikol ve etanol ile DNA presipitasyon çözeltisi

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl pH 7.2	5 mM
EDTA	0.5 mM
PEG-6000	%13
MgCl ₂	10 mM
Plazmid DNA'sı	
H ₂ O	

4.5. Silika matriks ile nükleik asit saflaştırması

Polimeraz zincirleme tepkimesi, restriksiyon endonükleazlar ile sindirme deneyleri sonrasında deoksिनुकлеотидler, tek ya da çift iplikçikli oligonükleotidler ve enzim gibi safsızlıkların örnekten uzaklaştırılabilmesi için silika ve kaotropik ajan kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Bu amaçla, saflaştırılacak örnek guanidinli nükleik asit silika bağlanma tamponu (Çizelge 4.11) ile karıştırılmıştır. Sonrasında, karışım mikrosantrifüj formatındaki silika matriksli kolondan 2000 x g ivmesi ile geçirilmiştir. Kaotropik ajanın uzaklaştırılması amacı ile üç kez 2-propanol ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Alkolün 10000 x g ivme ile santrifügasyon ile uzaklaştırılmasının ardından DNA'nın kolondan elüsyonu için hedeflenen konsantrasyona uygun miktarda DNaz ve RNaz içermeyen su kullanılmıştır (51,52).

Çizelge 4.11. Guanidinli nükleik asit silika bağlanma tamponu

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Na ₂ SO ₃	50 mM
GuHCl	5 M
Sodyum Asetat pH 4.6	21.5 mM
Bromtimol Mavisı	0.1 ng/ml
DNA çözeltisi	değişken
H ₂ O	

4.5.1. Saflaştırılan DNA örneklerinin spektrofotometrik yöntem ile miktar ve kalite tayini

Nükleik asit saflaştırması ürünlerinin kantitasyonu ve kalitesinin tayini için 220 – 350 nm dalgaboyu aralığında spektral absorban kaydı yapılmıştır. Tutarlı dalgaboyu absorban spektral grafiği gösteren örnekler için µg/ml cinsinden DNA kantitasyonu, 260 nm dalgaboyunda absorban ünitesi cinsinden ölçülen optik yoğunluğun 50 µg/ml birimli sabiti ile çarpılması ile bulunmuştur. Bu dalgaboyunda ölçülen optik yoğunluğun için üzerinde çıkması durumunda, örnek dilüe edilerek ölçüm tekrarlanmıştır. Ölçümü yapılan DNA örneğinin içerdiği safsızlıkların değerlendirilmesi Çizelge 4.12 'de belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiştir (53,54).

Çizelge 4.12. Spektrofotometrik yöntem ile DNA örneklerinin kalite tayini

Absorbans ölçülen dalgaboyu	Sınırlar	Değerlendirme
A_{260}	>3	Örnek dilüe edilerek ölçüm tekrarlanmalı
$A_{260/280}$	<1.8	Yetersiz saflaştırma, protein kontaminasyonu
	>2.0	RNA kontaminasyonu
$A_{260/230}$	<2.0	Organik madde (guanidin, fenol,...) kontaminasyonu

4.5.2. Agaroz jel elektroforezi

Saflaştırılan nükleik asitler ile restriksiyon endonükleaz sindirme ve polimeraz zincirleme tepkimesi ürünlerinin analizi için agaroz jel elektroforezi yönteminden yararlanılmıştır. Jel hazırlama ve yürütme tamponu olarak beklenen boyutu 2000 baz çiftinden büyük olan plazmidlerin analizi için tris – asetik asit – EDTA (TAE), 2000 baz çiftinden küçük PZT ya da restriksiyon endonükleaz sindirme ürünleri için tris – borik asit – EDTA tamponu 1x çalışan konsantrasyonunda kullanılmıştır(Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13.Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon stok çözeltileri

Tampon	Hazırlanan Stok	Malzemeler	1 lt için
TBE	5X	Tris Baz	54 g
		Borik Asit	27.5 g
		EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	20 ml
TAE	50X	Tris Baz	242 g
		Glasiyel Asetik Asit	54.1 ml
		EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	100 ml

Uygun tampon çözeltisi içinde ısı ile eritilen agaroz, tabak ve taraklardan oluşan kalıp düzeneğine dökülerek dondurulmuştur. Polimerize olan jel, uygun tampon ile doldurulmuş yatay elektroforez tankına aktarılmıştır. İncelenecek DNA örnekleri %50 gliserol ve işaretleme boyası olarak bromfenol mavisi içeren yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Örnekler ile birlikte 100 – 400 bç aralığında 100 bç'lik merdiven belirteç de jellere yüklenmiştir. Yükleme işleminin ardından 8 V/cm şiddetinde elektrik alanında elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir (55). Ardından, jel elektroforez tankından alınarak, uygun tampon çözeltisi içinde 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür içeren boyama çözeltisinde 20 dakika boyunca boyanmıştır. Boyama sonrasında dalgaboyu 302 nm merkezli mor ötesi ışık ile eksite edilen jeller, dalgaboyu 535 nm merkezli emisyon filtresi ile görüntülenmiştir (48).

4.5.3. DNA Poliakrilamid jel elektroforezi

Bu tez çalışmasındaki tasarımda, insülin geni A ve B segmentlerinin çoğaltılması ile, agaroz jel elektroforezi ile birbirinden ayrılması güç 84 ve 111 bp uzunluğunda ürünler elde edilmiştir. Bunların analizi için DNA poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Dikey elektroforez tankı kullanılarak %15 yoğunluğunda hazırlanan jel (Çizelge 4.14) polimerize olduktan sonra, agaroz jelde olduğu gibi gliserollü yükleme tamponu ile DNA örneği yüklenmiş, 8 V/cm elektrik alanı şiddeti ile yürütme gerçekleştirilmiştir (48). Yükleme tamponu boyası jelin son 1/3'üne geldiğinde yürütme sonlandırılarak jel 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür içeren TBE içinde 20 dakika boyunca boyanmıştır. Boyanan jeller dalgaboyu 302 nm merkezli ultraviyole ışığı ile eksite edilmiş, dalgaboyu 535 nm merkezli emisyon filtresi kullanılarak görüntülenmiştir.

Çizelge 4.14.DNA Yürütme jeli

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
TBE 5X	1X
Akrilamid stoğu	%15
APS	%0.05
TEMED	%0.05
H2O	

4.6. İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin polimeraz zincirleme tepkimesi ile çoğaltılması

Bu çalışmada, insülin geni A ve B zinciri bölgelerinin çoğaltılması için polimeraz zincirleme tepkimesinden yararlanılmıştır. Bu çoğaltma ürünlerinin elde edilmesi için sırası ile iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primerleri (Çizelge 4.1) kullanılmıştır. Her bir tepkime 50 µl hacminde, 10 mM Tris klorür pH 8.3 (25°C), 50 mM potasyum klorür, 3 mM magnezyum klorür, her bir deoksिनükleotid trifosfattan 0.1 mM (toplamda 4 mM dNTP), ileri ve geri primerlerin her birinden 0.4 µM, 1 U Stream DNA polimeraz ve 100 ng kalıp DNA eklenerek gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.15). Tepkime başlangıcındaki 2 dakika boyunca 94 °C sıcaklıkta denatürasyonun ardından 35 siklus boyunca 94 °C sıcaklıkta 90 saniye denatürasyon, 59 °C sıcaklıkta 5 saniye birleşme ve 72 °C sıcaklıkta 60 saniye uzama gerçekleştirilmiştir. Çoğaltma sikluslarının ardından tüpler son uzama için 72 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir(Çizelge 4.16) (56).

Çizelge 4.15. Saflaştırılmış IM-9 DNA'sından iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primer çiftleri ile insülin geni A ve B zinciri bölgelerinin çoğaltılması için PZT karışımı.

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tris klorür pH 8.3 (25 °C)	10 mM
Potasyum klorür	50 mM
Magnezyum klorür	3 mM
dNTP (dA+dT+dG+dC)	4 mM
ileri primer (iAF ya da iBF)	0.4 µM
geri primer (iAR ya da iBR)	0.4 µM
Stream Taq DNA polimeraz	1 U
Kalıp DNA (IM-9 DNA'sı)	100 ng

Çizelge 4.16. İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin PZT ile çoğaltılması için sıcaklık döngü programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	120	1 x
Denatürasyon	94	90	35 x
Bağlanma	59	5	
Uzama	72	60	
Son uzama	72	300	1 x

Polimeraz zincirleme tepkimesi ile elde edilen ürünlerin analizi, agaroz jel ve DNA poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun boyutta bant alındığı gözlenen PZT ürünleri silika matriks ile saflaştırılarak moleküler klonlama basamağı için hazırlanmıştır.

4.6.1. İnsülin A ve B PZT ürünleri ile pET28a plazmid vektörünün restriksiyon endonükleazlar ile sindirilmesi

Silika matriks ile saflaştırılmış PZT ürünleri ile alkalin lizis protokolü ardından polietilen glikol ve etanol presipitasyonu ile saflaştırılmış plazmid, miktar ve kalite tayinlerinin yapılmasının ardından NdeI ve XhoI enzimleri kullanılarak sindirilmiştir.

Her bir tepkime tüpünde, 50 µl hacimde 50 mM potasyum asetat, 20 mM tris asetat pH 7.9 (25 °C), 10 mM magnezyum asetat, 1 mM ditiyotritol, 1 – 10 µg PZT ürünü *ya da* plazmid DNA'sı, 100 µg/ml sığır serum albumini, 10 U NdeI ve 10 U XhoI enzimleri olacak şekilde hazırlanmıştır(Çizelge 4.17) (47). Bir saat süre ile 37 °C sıcaklıkta kesim gerçekleştirilmiş, ardından PZT kesim ürünleri silika matriks ile, linearize plazmid ise polietilen glikol etanol presipitasyonu ile saflaştırılarak aktif enzim ve yapışkan uçlu kısa ürünlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Çizelge 4.17. İnsülin A ve B PZT ürünleri ile pET28a plamid vektörünün NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleazları ile sindirilmesi.

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
İnsülin A ya da B PZT ürünü ya da pET28 plazmid vektör DNA'sı	1 – 10 µg
Potasyum asetat	50 mM
Tris asetat pH 7.9 (25 °C)	20 mM
Magnezyum asetat	10 mM
Ditiotreitol	1 mM
Deasetile sığır serum albumini	100 µg/ml
NheI	10 U
XhoI	10 U

4.6.2. XhoI – NdeI çift enzim kesimi yapılmış insülin geni A ve B zinciri DNA'larının pET28a plazmid vektörüne ligasyonu ile pInsA ve pInsB ekspresyon vektörlerinin oluşturulması.

İnsülin geni A ve B zinciri DNA'larının pET28a ekspresyon vektörüne doğru yönde yerleştirilebilmesi için hem “insert” DNA'ları, hem de plazmid DNA'sı NdeI – XhoI restriksiyon endonükleazları ile kesimiştir. Ligasyon öncesi yapışkan uçlu çift zincirli küçük DNA parçalarının uzaklaştırılmasının ardından “insert ve vektör DNA'ları spektrofotometrik yöntemle kantite edilmiştir.

Vektör:”insert” oran 1:8 olarak belirlenmiş ligasyon tepkimesi için 20 µl hacme 50 mM tris klorür pH 7.5 (25 °C), 10 mM magnezyum klorür, 1 mM ATP, 10 mM ditiotreitol, 50 fmol vektör, 200 fmol “insert” DNA'sı, 5 Weiss ünitesi T4 DNA ligaz

enzimi eklenmiştir(Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. İnsülin geni A ve B zinciri DNA'larının pET28a ekspresyon vektörüne klonlanması için ligasyon çözeltisi.

Malzeme	Çalışan konsantrasyon
Tris klorür pH 7.5 (25°C)	50 mM
Magnezyum klorür	10 mM
ATP	1 mM
Ditiotreitol	10 mM
Vektör DNA'sı (NdeI – XhoI çift kesim yapılmış pET28a)	50 fmol
“Insert” DNA'sı (NdeI – XhoI çift kesim yapılmış insülin A ya da B zinciri DNA'sı)	200 fmol
T4 DNA ligaz	5 Weiss ünitesi

İnsülin A ve B zinciri ekspresyon plazmidleri **pInsA** ve **pInsB** için ayrı tüplerde hazırlanan ligasyon karışımı 22 °C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir (47) .

4.6.3. *Escherichia coli* K12 JM109 hücrelerinin insülin A ve B zinciri ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB ile transformasyonu

İnsülin A ve B zincirlerini bakteriyel sistemde üretmek amacı ile hazırlanan ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB ligasyon ürünleri fizikokimyasal yöntem ile kompetan hale getirilmiş *Escherichia coli* K12 JM109 hücrelerine aktarılmıştır. Bu amaçla, LB buyyonda 37 °C sıcaklıkta 200 RPM hız ile çalkalanarak üretilen başlatıcı *E. coli* K12 JM109 kültürü 1/200 oranında dilüe edilmiştir. Dilüe kültür 33 °C sıcaklıkta 200 RPM hızı ile çalkalanarak logaritmik faza çıkarılmış, 600 nm

dalgaboyunda 0.4 – 0.6 absorbans ünitesi optik yoğunluğa ulaştırılmıştır. Bu noktada kültür +4°C sıcaklıkta 600 x g ivme ile santrifüj edilerek pellet haline getirilmiş, oluşan pellet, uygun miktarda transformasyon çözeltisi (Çizelge 4.19) ile nazikçe süspanse edilmiştir. Transformasyon çözeltisi içindeki hücre süspanسیونu 45 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, her 100 µl kompetan hücre süspanسیونuna 1 – 5 µl su içinde plazmid DNA'sı çözeltisi eklenmiştir. Buz üzerinde bir saat plazmid DNA'sı ile inkübe edilen hücrelere, bu süre sonunda, 90 saniye boyunca 42 °C sıcaklıkta ısı şoku uygulanmıştır. Birkaç dakika buz üzerinde soğutulan hücre süspanسیونu üzerine 900 µl oda sıcaklığına ısıtılmış SOC buyyon eklenmiştir. Başarılı gen aktarımı gerçekleşen transformantların, aminoglikozid 3'-fosfotransferaz (*aphA*) eksprese etmelerine ve transformasyonun stabil hale gelmesine izin vermek için SOC buyyon eklenmiş hücre kompetan hücre süspanسیونu 37°C sıcaklıkta 200 RPM hızda çalkalanarak 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda transformasyon kültürü pelletleri 200 µl hacimde SOB-kanamisin plaklarına yayılmıştır. Bir gece boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübe edilen plaklar, transformant koloniler yönünden kontrol edilmiştir (47,57,58) .

Çizelge 4.19. Escherichia coli hücrelerini kompetan hale getirmek için kullanılan transformasyon çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Polietilen glikol 6000	%10 (ağırlık/hacim)
Dimetilsülfoksit	%5 (hacim/hacim)
Magnezyum klorür	5 mM
Magnezyum sülfat	5 mM
Luria – Bertani buyyon	

4.6.4. Transformant kolonilerin polimeraz zincirleme tepkimesi ile taranması

Elde edilen transformantlardan insülin geni A ve B zinciri DNA'ları klonlanmış plazmidleri alan kolonilerin saptanması için T7-5' – T7-3' primer çifti (Çizelge 4.20) ile koloni tarama PZT gerçekleştirilmiştir. Her bir tepkime 20 µl hacminde, 10 mM Tris klorür pH 8.3 (25°C), 50 mM potasyum klorür, 3 mM magnezyum klorür, her bir deoksinükleotid trifosfattan 0.1 mM (toplamda 4 mM dNTP), ileri (T7-5') ve geri (T7-3') primerlerin her birinden 0.4 µM, 1 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl deiyonize su içinde koloni (bakteri) süspansiyonu olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 4.21). Sıcaklık döngüleri Çizelge 4.22 'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir (56) .

Çizelge 4.20. Ekspresyon vektörü pET28a'nın çoklu klonlama bölgesi çoğaltma ve sekanslama primerleri.

Primerin adı	Dizisi	Bağlanma sıcaklığı (°C)
T7-5'	5'-AATTAATACGACTCACTATAGGG-3'	54
T7-3'	5'-ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'	54

Çizelge 4.21. Transformantların “insert” alma durumunun saptanması için T7-5' – T7-3' tarama polimeraz zincirleme tepkimesi

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tris klorür pH 8.3 (25 °C)	10 mM
Potasyum klorür	50 mM
Magnezyum klorür	3 mM
dNTP (dA+dT+dG+dC)	4 mM
ileri primer (T7-5')	0.4 µM
geri primer (T7-3')	0.4 µM

Taq DNA polimeraz	0.5 U
Kalıp DNA (transformasyon plaklarından koloni süspansiyonları)	5 µl deiyonize su içinde

Çizelge 4.22. T7-5' – T7-3' polimeraz zincirleme tepkimesi için sıcaklık döngüsü.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon /ekstraksiyon	94	120	1 x
Denatürasyon	94	15	35 x
Bağlanma	54	60	
Uzama	72	60	
Son uzama	72	300	1 x

İnsülin geni A ve B zinciri DNA'larını “insert” olarak alan pInsA ve pInsB için beklenen T7 PZT ürün boyutları sırası ile 315 ve 342 bç olarak hesaplanmıştır. Söz konusu boyutlar, aynı primerler kullanılarak “insert” almamış pET28a ile elde edilen 322 bç ürün boyutu ile çok yakın olduğundan jel elektroforez yöntemi ile yeterli ayırım sağlanamaması söz konusudur. “Insert” almış ve almamış plazmid ile transforme kolonilerin ayırımını yapabilmek amacı ile T7 PZT ürünleri EcoRI restriksiyon endonükleaz ile sindirilmiştir. Yaptığımız tasarıma göre, başarılı bir klonlama işlemi pET28a plazmid vektörünün NdeI ile XhoI enzim kesim motifleri arasında kalan bölgenin, dolayısı ile EcoRI enzim kesim motifinin de kaybedilmesine yol açmaktadır. Buna göre, T7 PZT sonransı EcoRI enzimi ile gerçekleştirilen restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi deneyi sonucunda;

- pInsA için 315 bç uzunluğunda tek bant,

- pInsB için 342 bp uzunluğunda tek bant,
- “insert” almamış pET28a için 129 ve 197 bp uzunluğunda iki bant

elde edilmiştir.

Sözü edilen restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi analizi, 20 µl hacmindeki T7 PZT tüplerinin herbirine 2.5 µl EcoRI tamponu, 2.5 U (0.25 µl) EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi eklenip 25 µl son hacme su ile tamamlanması ile gerçekleştirilmiştir. Bir gece 37 °C sıcaklıkta inkübe edilen ürünler %2 (ağırlık/hacim) yoğunluğundaki agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (59)

4.7. İnsülin ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin DNA dizi analizi

İnsülin geni A ve B zinciri segmentlerinin başarı ile klonlandığı transformantların T7 PZT ve EcoRI restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi analizi ile seçilmesinin ardından, protein ekspresyon çalışmalarında kullanılacak plazmidlerin dizisi DNA dizi analizi yapılarak doğrulanmıştır. Bu amaçla, T7 PZT çoğaltma ürünleri silika matriks ve guanidin kullanılarak saflaştırılmıştır. Böylece PZT sırasında harcanmamış olan deoksinükleotidler ve oligonükleotid primerler uzaklaştırılmış, ürün dögüsel sekanslama tepkimesi için hazır hale getirilmiştir. Kantitasyonu spektrofotometrik yöntem ile yapılan saflaştırılmış çoğaltma ürünleri kalıp, T7-5' primeri ise sekanslama primeri olarak kullanılmıştır. Florofor işaretli dideoksiteminatörlerin kullanıldığı Sanger sekanslama tepkimesi çözeltisi Çizelge 4.23'de verildiği gibi hazırlanmış, tepkime Çizelge 4.24'de belirtilen sıcaklık dögü programı ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.23. Sanger sekanslama tepkimesi çözeltisi

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon / Miktarlar
DTCS Quick Start Mix (2.5 x)	1x
DNA*	30fmol
T7-5' primeri*	1600fmol
H ₂ O	20 µl hacme tamamlayacak kadar

*Kalıp DNA : Primer < 1:40

Çizelge 4.24. Ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin "insert" DNA dizi analizi için döngü sekanslama sıcaklık protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (s)	Tekrar sayısı
Denatürasyon	96	5	50 x
Bağlanma	50	10	
Uzama	60	600	

Sanger sekanslama tepkimesi ürünleri sodyum asetat – etanol yöntemi ile presipite edilerek ürün yapısına girmemiş florofor işaretli dideksinükleotidler uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla, 20 µl hacmindeki Sanger tepkimesi ürünü, 65 µl sodyum asetat etanol çözeltisi ile karıştırılarak 17000 x g ivmesi ile +4 °C sıcaklıkta 45 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından presipitat iki kez %70'lik (hacim/hacim) soğuk etanol ile yıkanmıştır(Çizelge 4.25). Etanolün evaporasyon ile uzaklaştırılmasının ardından tek iplikçikli Sanger sekans tepkimesi ürünleri deiyonize formamid ile çözülmüştür. Denatüre edilen örneklerin kapiller jel elektroforezi ile elde edilmiş kromatogramları analiz edilmiştir (60).

Çizelge 4.25. Sanger sekanslama tepkimesi ürünlerinin presipitasyonu için sodyum asetat – etanol çözeltisinin bileşimi.

Malzeme	Çalışan konsantrasyon
Sodyum asetat pH 5.2	70,60mM
Glikojen	0,24 mg/ml
Na ₂ - EDTA	2,35mM
%70 Etanol (-20°C)	%67,10
H ₂ O	65 µl'ye tamamlayacak miktarda

4.8. İnsülin ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin ekspresyon konağı *Escherichia coli* BL21 fabrika hücrelerine aktarılması

İnsülin ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin, belirlenen gen segmentlerini tasarlanan şekilde hatasız ve uygun yerleşimde “insert” olarak aldığıın sekans analizi ile gösterilmesinin ardından, söz konusu plazmidlerin, *E. coli* K12 JM109 hücrelerinden izole edilerek, ekspresyon konağı *E. coli* BL21 (DE3) fabrika hücrelere aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, *E. coli* K12 JM109/pInsA ve *E. coli* K12 JM109/pInsB kültürlerinden “midi-prep” alkalen lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu yapılmıştır. Sonrasında, saflaştırılmış olan plazmidler, transformasyon çözeltisi ile kompetan hale getirilen *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Her bir plazmid için elde edilen *E. coli* BL21 transformantlarından dört tanesi ekspresyon çalışmaları için seçilmiş, geri kalanı ise stoklanmıştır. Bu fabrika hücre kültürlerinden insülin A ve B zincirlerini en iyi eksprese edenlerin seçilmesi için ekspresyon ön çalışmaları gerçekleştirilmiş, ürünler SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleri ile analiz edilerek her bir insülin zincirini en iyi eksprese eden suşlar hücre bankası adayları olarak seçilmiştir (58).

4.9. Escherichia coli BL21 fabrika hücrelerde insülin A ve B zincirleri ekspresyon deneyleri

İnsülin A ve B zinciri ekspresyon vektörlerini taşıyan dört adet *E. coli* BL21/pInsA(DE3) kolonisi ve dört adet *E. coli* BL21(DE3)/pInsB kolonisi seçilerek protein ekspresyon ön çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, SOB-kanamisin plaklarında üretilen suşlardan birer koloni, 10 ml hacmideki SOC-kanamisin buyyona aktarılmış, kültürlerin 37°C sıcaklıkta 200 RPM hızda çalkalanarak 600 nm dalgaboyunda 0.4 absorbans ünitesi bulanıklığa kadar üremesi sağlanmıştır. Yeterli bulanıklığa ulaşan kültürler oda sıcaklığında 2500 x g ivme ile santrifüjlenerek pellet haline getirilmiştir. Bakteri pelletleri, %1 tripton ile zenginleştirilmiş, 100 mM sodyum fosfat tamponu pH7.5 ile tamponlanmış LB – kanamisin buyyondan oluşan protein ekspresyonu induksiyon besiyeri (Çizelge 4.26) içinde tekrar süspanse edilmiştir. Ortama 0.2 mM IPTG eklenerek *E. coli* BL21(DE3) hücrelerindeki lacUV5 promotörü kontrolü altındaki T7 RNA polimeraz geninin aktive olması sağlanmış, tasarımımda T7 promotörü arkasına yerleştirdiğimiz insülin A ve B zincirleri için yüksek transkripsiyon düzeyleri elde edilmiştir. Bir gece boyunca 24 °C sıcaklıkta, 200 RPM hızda çalkalanarak gerçekleştirilen rekombinant protein ekspresyon induksiyonu, inkübasyon süresinin sonunda, hücrelerin santrifüjlenerek pellet haline getirilmesi ile sonlandırılmıştır (61,62)

Çizelge 4.26. Escherichia coli BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinde protein ekspresyonu için induksiyon besiyeri bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Tripton	%1
Sodyum fosfat tamponu pH 7.5	100 mM
Kanamisin	50 µg/ml
Izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG)	0.2 mM

Luria – Bertani buyyonu	Hacmi tamamlayacak kadar
-------------------------	--------------------------

4.10. İndüklenmiş *E. coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB bakteri hücresi pelletlerinden protein izolasyonu

Protein izolasyonu için, parçalanacak her 10 ml sıvı kültür için 1.5 ml bakteri hücre pelleti lizis çözeltisi (Çizelge 4.27) kullanılmıştır. İşlem sırasında açığa çıkan nükleik asitlerden kaynaklanan viskoziteyi azaltmak amacı ile lizat, 5 dakika boyunca buz üzerinde sonike edilmiştir. Sonikasyon işlemi, her 3 saniyede 2 saniye boyunca 5 watt güç uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.27. Bakteri hücre pelleti lizis çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Tris klorür pH 8.0	50 mM
Sodyum klorür	400 mM
Gliserol	%10
Tween – 20	%0.5
Triton X – 100	%0.5
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	%1
Deiyonize su	Hacmi tamamlayacak kadar

Lizat 10000 x g ivmesi ile +4 °C sıcaklıkta santrifüj edilmiştir. Proteinden zengin üst faz temiz bir tüpe aktarılarak ileri işlemler için saklanmıştır. Pellet ise, tekrar bakteri hücre pelleti lizis tamponu ile süspanse edilmiş, ekstraksiyon işlemi tekrarlanmıştır (63,64).

4.11. Bakteri hücresi lizatlarından immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile 6 x histidin etiketli proteinlerin saflaştırılması

İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinden protein izolasyonu yapılmasının ardından ekspresyon vektörlerinin tasarımı uyarınca insülin A ve B peptidleri immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Kromatografi basamağından önce 0.1 M potasyum klorür eklenen proteinden zengin üst faz, 10000 x g ivme ile +4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiş, lizis çözültisinden gelen SDS, kromatografi basamağını olumsuz etkilememesi için uzaklaştırılmıştır.

Kromatografi basamağı için nitrilotriasetik asit ile dekore edilmiş, ortalama 30 µm çapında sefaroz boncuk dolgu materyalinden sabit faza sahip 1.5 ml yatak hacimli kolon kullanılmıştır. Kolon dolgu materyalinin nitrilotriasetik asit fonksiyonel grupları, 0.1 M kobalt sülfat mobil fazı ile yıkanarak kobalt iyonları ile yüklenmiştir.

Kolondan bağlanmayan kobaltı uzaklaştırmak ve mobil faz dengesini kurmak için önce 5 kolon hacmi kadar elüsyon tamponu (Çizelge 4.29) geçirilmiş, ardından yine 5 kolon hacmi kadar bağlanma tamponu (Çizelge 4.28) geçirilerek protein çözültisi enjekte edilmeye hazır hale getirilmiştir.

Kolona enjekte edilecek protein çözültisinden potasyum klorür ile SDS'in uzaklaştırılmasının ardından, kromatografi bağlanma tamponu ile 2 kat dilüe edilmiştir. Kolona bir seferde 25 ml hacimde SDS'i uzaklaştırılmış dilüe edilmiş hücre pelleti ekstraktı 1 ml/dakika hızda izokratik akım ile enjekte edilmiştir (65). Enjeksiyonun ardından, kolon 5 hacim bağlanma tamponu ile yıkanmıştır. Elüsyon, 8 kolon hacmi boyunca 1 ml/dakika akım hızında bağlanma ve elüsyon tamponları arasında doğrusal gradiyent yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elüat, her biri 4 ml hacmindeki fraksiyonlar halinde toplanmış, kolon çıkışında mobil fazın iletkenliği ve 230 nm dalgaboyundaki absorbansı spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir. Elüsyon işleminin tamamlanmasının ardından kolon, bir sonraki enjeksiyona hazır hale

gelmesi için 5 kolon hacmi bağlanma tamponu geçirilmiştir (66).

Çizelge 4.28. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi bağlanma tamponu bileşimi.

Malzeme	Çalışan konsantrsyon
Tris klorür pH 8.0	50 mM
Sodyum klorür	400 mM
Gliserol	%10
Deiyonize su	

Çizelge 4.29. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi elüsyon tamponu bileşimi.

Malzeme	Çalışan konsantrsyon
Tris klorür pH 8.0	50 mM
Sodyum klorür	400 mM
Gliserol	%10
İmidazol	300 mM
Deiyonize su	

Her dört enjeksiyonda bir kolonun bağlanma kapasitesi 5 kolon hacmi 100 mM kobalt sülfat ile rejenere edilmiştir. Gerekli durumlarda, her bir basamaktan sonra 5 kolon hacmi kadar deiyonize su ile yıkanmak şartı ile, 5 kolon hacmi 6 M guanidin hidroklorür ile agregate olmuş proteinlerin çözünür hale getirilmesi, 100 mM EDTA ile metal iyonlarının sökülmesi, 2-propanol ile protein agregatları ve çökelme eğilimindeki tuzların uzaklaştırılması ile sanitize edilmiştir. Sanitizasyon sonrası kolon tekrar kobalt iyonları ile yüklenmiştir.

4.12. Bakteri hücre pelletlerinden izole edilmiş proteinlerin, denatüre edici gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi

İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültür pelletlerinden izole edilmiş proteinlerin analizi için %5 – 20 gradiyent SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, %20 (yüksek) (Çizelge 4.30) ve %5 (düşük) (Çizelge 4.31) yoğunluktaki jel çözeltileri hazırlanmıştır. Her iki çözeltiye APS ve TEMED ekelenerek polimerizasyonun başlatılmasının ardından, 10 ml hacmindeki bir serolojik pipete sırası ile, önce %5 (düşük) yoğunluktaki jel çözeltisi, ardından %20 (yüksek) yoğunluktaki jel çözeltisi çekilmiştir. Son olarak, 0.5 ml hacminde bir hava baloncuğu oluşturularak, serolojik pipete çekili durumdaki düşük ve yüksek yoğunluktaki jel sütunlarının gradiyent oluşturacak şekilde karışması sağlanmıştır. Karışım, 1 mm kalınlığındaki aralayıcıların kullanıldığı ön ve arka cam sandviçi içine dökülmüş, üzeri su ile doyurulmuş n-butanol ile kapatılmıştır (66).

Çizelge 4.30. Yüksek yoğunluklu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel çözeltisi bileşimi

Malzeme	Çalışan konsantrasyon
Tris klorür pH 8.8	375 mM
Akrilamid:bisakrilamid (%39:1 ağırlık/hacim stok)	%20
SDS	%0.1
Gliserol	%10
APS	%0.05
TEMED	%0.05
Deiyonize su	

Çizelge 4.31. Düşük yoğunluklu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel çözeltisi bileşimi

Malzeme	Çalışan konsantrasyon
Tris klorür pH 8.8	375 mM
Akrilamid:bisakrilamid (%39:1 ağırlık/hacim stok)	%5
SDS	%0.1
Gliserol	%10
APS	%0.05
TEMED	%0.05
Deiyonize su	

Gradyent jelin polimerize olmasının ardından, n-butanol uzaklaştırılmış, yerine %5 yoğunluğunda hazırlanmış yığılma jeli (Çizelge 4.32) dökülerek tarak parçası yerleştirilmiştir.

Çizelge 4.32. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid yığılma jeli çözeltisi bileşimi.

Malzeme	Çalışan konsantrasyon
Tris klorür pH 6.8	300 mM
Akrilamid:bisakrilamid (%29:%1 ağırlık/hacim stok)	%5
SDS	%0.1
Gliserol	%10
APS	%0.05
TEMED	%0.05

Deiyonize su	
--------------	--

Analiz edilecek protein örnekleri, yükleme tamponu (Çizelge 4.33) ile 2:1 oranında karıştırılarak 80 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Denatüre edilmiş örneklerden jelin her bir kuyucuğuna 20 µl yüklenmiştir.

Çizelge 4.33. Denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi için örnek yükleme tamponu

Malzeme	Çalışan konsantrasyon
Tris klorür pH 6.8	300 mM
Gliserol	%30
Sodyum dodesil sülfat	%5
2-Merkaptoetanol	%0.5
Bromtimol mavisi	%0.02
Deiyonize su	

Jeller, monofazik tampon sistemi (Çizelge 4.34) ile, 8V/cm sabit voltaj ile 80 dakika boyunca bromtimol mavisi boya öncülü jelin alt kenarına ulaşana dek elektroforez edilmiştir. Sürenin sonunda jel sandviçi açılarak hızlı fiksasyon çözeltisi (Çizelge 4.35) ile 40 dakika boyunca 120 RPM hızı ile çalkalanarak fikse edilmiş, ardından iki saat boyunca çalkalayıcı üzerinde Coomassie mavisi ile boyama (Çizelge 4.36) yapılmıştır.

Çizelge 4.34. Denatüre edici gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi için monofazik tampon çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Tris baz	125 mM
Glisin	960 mM
SDS	%0.5
Deiyonize su	

Çizelge 4.35. Protein poliakrilamid jelleri için hızlı fiksasyon çözeltisi bileşimi

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Glasiyal asetik asit	%10 (hacim/hacim)
2-propanol	%25 (hacim/hacim)
Deiyonize su	

Çizelge 4.36. Protein poliakrilamid jelleri için Coomassie mavisi boyama çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Coomassie Brilliant Blue G-250	%0.006 (ağırlık/hacim)
Glasiyal asetik asit	%10 (hacim/hacim)
Deiyonize su	

4.13. Bakteri hücre pelletlerinden izole edilmiş ve kromatografik olarak saflaştırılmış proteinlerin, denatüre edici tris – trisin poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi

Tris glisin jelleri, 2.38 kDa'luk insülin A ve 3.42 kDa'luk insülin B zinciri peptidlerinin başarılı bir şekilde ayrılmasını sağlamamaktadır. Tez çalışmasında, bu boyuttaki peptidlerin analizi için denatüre edici tris trisin gradiyent jelleri kullanılmıştır. Bu jellerin hazırlanması tris glisin gradiyent jellerine benzer düzenek kullanılmış, ancak jel bileşimi, Çizelge 4.37 ve Çizelge 4.38'de tarif edildiği gibi hazırlanmıştır (68).

Çizelge 4.37. Denatüre edici tris trisin gradiyent jeller için 3x konsantrasyonunda jel hazırlama tamponu bileşimi.

Malzemeler	Konsantrasyon
Tris baz	3 M
Hidroklorik asit	1 M (tampon pH'sı 8.45 olacak şekilde)
Sodyum dodesil sülfat	%0.3 (ağırlık/hacim)

Çizelge 4.38. Denatüre edici tris trisin gradiyent ayırıcı jel çözeltisi bileşimi

Malzemeler	Konsantrasyon
3x Jel hazırlama tamponu (Çizelge [TTJelTamp])	1x
Akrilamid:bisakrilamid (%46.5:3) çözeltisi	%20 (yüksek yoğunluklu jel) %5 (düşük yoğunluklu jel)
Gliserol	%10
APS	%0.05
TEMED	%0.05

Deiyonize su	

Yığılma jeli yerine ise %4 yoğunluğunda ve ayırıcı jel ile aynı pH'ya sahip olacak şekilde örnek yükleme jeli hazırlanmıştır (Çizelge 4.39)

Denatüre edici tris trisin gradiyent jellerinde, tris glisin jellerinde olduğu gibi bir yığılma jeli bulunmaması nedeni ile yüksek miktarda protein yüklenmesi, jelin sıkı yapısı nedeni ile proteinlerin birbirleri ile etkileşime girerek sürüklenmesine, bantların birbirinden ayrılamamasına ve sürüntü şeklinde yürütülmesine neden olmaktadır. Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış peptidler için böyle bir sorun yaşanmazken, bakteri hücre pelletlerinden saflaştırılmış proteinlerin tris trisin jellerinde yürütülebilmesi için yüksek molekül ağırlıklı proteinler polietilen glikol ve sodyum klorür ile presipite edilerek, düşük molekül ağırlıklı proteinlerin konsantrasyonunun göreceli olarak artırılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla, potasyum klorür ile SDS uzaklaştırılmış olan hücre pelleti protein çözeltileri %8 polietilen glikol 6000 ve 300 mM sodyum klorür eklenerek 10000 x g ivmesi ile +4°C sıcaklıkta 20 dakika santrifüj edilmiştir.

Polietilen glikol – tuz presipitasyonu süpernatantları, pH 8.45 örnek yükleme tamponu ile karıştırılıp 85 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilerek jele yüklenmiştir.. Denatüre edici tris trisin gradiyent jelleri, anod ve katod tampon bileşimlerinin sırası ile Çizelge 4.40 ve Çizelge 4.41'da belirtildiği bifazik bir sistemde yürütülmüştür. Yürütme işlemi, 8 V/cm sabit voltaj ile boya öncüsü jel uzunluğunun 2/3'ünü katedene kadar sürdürülmüştür. İşlem sonunda sandviçin açılması, jelin fiksasyonu ve boyanması, tris glisin jellerinde tarif edildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.39. Denatüre edici tris trisin gradiyent örnek yükleme jel çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Konsantrasyon
3x Jel hazırlama tamponu (Çizelge [TTJelTamp])	0.75x
Akrilamid:bisakrilamid (%46.5:3) çözeltisi	%4
APS	%0.05
TEMED	%0.05

Çizelge 4.40. Denatüre edici tris trisin gradiyent jel elektroforezi için 10x konsantrasyonda anod tampon çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Tris baz	1 M
Hidroklorik asit	225 mM (tampon pH'sı 8.9 olacak şekilde)
Deiyonize su	

Çizelge 4.41. Denatüre edici tris trisin gradiyent jel elektroforezi için 10x konsantrasyonda katod tampon çözeltisi bileşimi.

Tris baz	1 M
Trisin	1 M
Deiyonize su	

Not: Trisin eklenmesi ile pH 8.9'a geleceğinden ayrıca ayarlama gerektirmemektedir.

4.14. İndüklenmiş hücre pelletlerinde rekombinant insülin A ve B füzyon peptidlerinin western blotlama ve anti-His-tag antikoları ile işaretleme ile gösterilmesi

İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültür pelletlerinden izole edilen proteinler, gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılmış, ıslak transfer ile 0.22 µm por çaplı poliviniliden florid membrana aktarılmıştır. Bu amaçla, anoddan katoda doğru fiber keçe, iki tabaka kalın filtre kağıdı, poliakrilamid jel, poliviniliden florid membran, iki tabaka kalın filtre kağıdı ve fiber keçe tabakalarından oluşan western blot sandviçi hazırlanmıştır. Transfer ıslak transfer tamponu(Çizelge 4.42) içinde 25 V sabit voltaj ile 80 dakika boyunca elektroforetik olarak gerçekleştirilmiştir (69).

Çizelge 4.42. Islak transfer için 1x western blot tampon çözeltisi bileşimi.

Malzeme	Konsantrasyon
Tris baz	3.03 g/l
Glisin	14.4 g/l
Metanol	%20 (hacim/hacim)
Deiyonize su	

Transferin tamamlanmasının ardından PVDF membran, %5 sığır serum albuminli bloklama çözeltisi (Çizelge 4.44) ile bir saat boyunca çalkalanarak bloklanmıştır. Sürenin sonunda bloklama tamponu uzaklaştırılmıştır. Anti-His-tag antikoru stoğu bloklama tamponu içinde 1:2000 oranında dilüe edilerek membran üzerine

eklenmiştir. Oda sıcaklığında iki saat boyunca çalkalanarak inkübasyonun ardından membran, TBST(Çizelge 4.43) ile üç kez beşer dakika yıkanmıştır. Bağlanmayan antikörlerin uzaklaştırılmasının ardından membran, bloklama tamponu içinde 1:1000 dilüe edilmiş HRP konjuge sekonder antikörler eklenmiş, bir saat çalkalanarak inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.43. Tris ile tamponlanmış salin – Tween-20 (TBST) çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Konsantrasyon
Tris baz	2.423 g/l
Sodyum klorür	8.006 g/l
Tween – 20	%0.1
Deiyonize su	

Çizelge 4.44. Western blot membran bloklama çözeltisi bileşimi.

Malzeme	Konsantrasyon
Sığır serum albumini	5 g/l
TBST	hacmi tamamlayacak kadar

Membranın görüntülenmesi için, Tris pH 8.5 ile tamponlanmış luminol ve p-kumarik asit çözeltisine hidrojen peroksit eklenmiştir. Hazırlanan çözelti membranın antikör işaretli yüzeyine eklenir eklenmez, her biri karanlıkta 30 saniye pozlama süresi ile alınmış beş görüntünün akümüasyonu ile western blot görüntülemesi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.45. Rekomboninat kimerik insülin A zinciri için CNBr ile sindirme protokolü

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
HCl	0.01 M
CNBr	4.25 M
İnsA	0,0850 M

Çizelge 4.46. Rekomboninat kimerik insülin B zinciri için CNBr ile sindirme protokolü

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
HCl	0.01 M
CNBr	4.25 M
İnsB	0,040 M

Çizelge 4.47. Saf bakteriyel protein çözme çözeltisi

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Tampon pH 8.0	0.05 M
NaCl	0.25 M
Gliserol	%10
H ₂ O	

4.14.1.1. Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler

Çizelge 4.48. Bradford 1X tampon

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Commassie BB G-250	0.1 g/l
Fosforik Asit	%8.5
Etanol	%4.75
H ₂ O	

Çizelge 4.49. Standartlar

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Bradford Tampon	1X
Tampon/H ₂ O	0.1 M
BSA	x
H ₂ O	
<ul style="list-style-type: none">• BSA Standartları 2 ug/ul stoktan çalışan konsantrasyonu 1ug/ul 0.8 ug/ul 0.6 ug/ul 0.4 ug/ul ve 0.2 ug/ul olacak şekilde hesaplanmıştır.	

Çizelge 4.50. DNA izolasyon tamponu

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl	10mM
EDTA	100mM
SDS	0,5%
H ₂ O	
Proteinaz K	0,1 mg/ml

4.15. *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB fabrika hücre bankalarında rekombinant insan insülini A ve B peptidi üretiminin fraksiyonel faktöryel deneysel tasarım ve yanıt yüzeyi modellemesi yöntemleri ile optimizasyonu

Rekombinant insan insülin A ve B zincirlerini füzyon peptidler olarak üretmek üzere tasarlanmış ve hazırlanmış olan bakteriyel fabrika hücrelerinin protein üretim süreçlerinin optimizasyonu için rekombinant protein üretimi üzerinde etkisi olduğu bilinen

- indüksiyon sırasında inkübasyon sıcaklığı,
- besiyeri pH'sı
- indüksiyon için kullanılan IPTG konsantrasyonu,
- indüksiyon başlangıç biyokütle yoğunluğu
- indüksiyon süresi
- kültürün oksijenasyon durumunu belirleyen çalkalama hızı

parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Bu faktörlerden süreç üzerinde etkin olanların belirlenebilmesi amacı ile fraksiyonel faktöryel tasarımlardan, iki düzeyli tarama testi Plackett – Burman tasarımı uygulanmıştır (Çizelge 4.51) Yukarıda sayılan faktörlerin düşük ve yüksek düzeylerinin rekombinant protein ekspresyonu üzerindeki etkileri ve faktörleri birbirleri ile etkileşimleri taranmıştır (44,70). Deney matriksinin tasarımı ve deneyler sonunda elde edilen protein ekspresyon düzeyi yanıtlarının analizi R-cran FrF2 paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (71).

Çizelge 4.51. Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin üretimi sürecinde etkili olan faktörlerin taranması amacı ile oluşturulmuş Plackett – Burman deney tasarımı matriksi.

Deney No:	inkübasyon sıcaklığı (°C)	pH	IPTG konsantrasyonu (mM)	indüksiyon başlangıç hücre yoğunluğu	İndüksiyon süresi (saat)	Çalkalama hızı (RPM)
-----------	---------------------------	----	--------------------------	--------------------------------------	--------------------------	----------------------

				(AU)		
1	37	7,5	0,02	0,4	12	100
2	22	7,5	0,2	0,8	12	100
3	22	5,5	0,2	0,4	24	100
4	37	5,5	0,2	0,8	12	100
5	22	5,5	0,02	0,4	12	100
6	22	5,5	0,02	0,8	12	200
7	37	5,5	0,02	0,4	24	200
8	22	7,5	0,02	0,4	24	200
9	22	5,5	0,2	0,8	24	200
10	37	7,5	0,2	0,4	24	100
11	37	7,5	0,02	0,8	12	200
12	22	7,5	0,2	0,4	12	200
13	37	5,5	0,02	0,8	24	100
14	37	7,5	0,2	0,8	24	200
15	22	7,5	0,02	0,8	24	100
16	37	5,5	0,2	0,4	12	200

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre bankaları ile rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin üretimi sürecinde etkili olduğu Plackett – Burman tarama testi ile saptanan faktörlerden en belirgin etkiye sahip üç tanesi seçilerek Box – Behnken tasarımı ile yanıt yüzey modellemesi gerçekleştirilmiştir (44,72,73). Box – Behnken tasarımına göre, seçilen faktörlerden inkübasyon sıcaklığı, indüksiyon süresi ve indüksiyon başlangıç yoğunluğu faktörlerinin her biri için iki seviyeli tasarımdakine ek olarak orta seviyeler için de protein ekspresyon düzeyleri yanıt

olarak ölçülmüştür. Böylelikle, her bir faktörün değişen düzeyleri için elde edilen rekombinant protein ekspresyon düzeyleri ikinci dereceden lineer bir denklem ile modellenmiştir. Seçilen üç faktörün ikili etkileşimleri ile elde edilen rekombinant protein ekspresyon yanıtları kullanılarak yanıt yüzeyleri oluşturulmuştur. Deney matrisinin oluşturulması ve yanıtlardan lineer modellerin hesaplanarak yanıt yüzeylerinin oluşturulması amacı ile R-cran DoE.wrapper ve rsm paketleri kullanılmıştır (74).

Çizelge 4.52. Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin üretiminde etkili olduğu saptanan faktörlerin yanıt yüzey modellemesi için gerçekleştirilen Box – Behnken deney matrisi.

Deney No:	Çalkalama hızı	İndüksiyon süresi (saat)	indüksiyon başlangıç hücre yoğunluğu (AU)
1	100	12	3
2	150	18	0,4
3	100	18	3
4	100	12	1,7
5	200	18	3
6	100	24	1,7
7	150	18	1,7
8	200	24	1,7
9	150	24	0,4

10	150	12	0,4
11	200	18	0,4
12	150	24	3
13	200	12	1,7

Bu tez çalışmasında, Plackett – Burman ve Box – Behnken deney tasarımlarında yanıt olarak rekombinant protein ekspresyon düzeylerinin total hücresel proteinlere oranı kullanılmıştır. Bu amaçla, her bir protein ekspresyon deneyi, ilgili fabrika hücre için deney matrislerinde belirtilen faktör düzeyleri sağlanarak tekrarlanmıştır. Her deney, bakteri hücre pelletlerinden protein izolasyonu yapılması ile sonlandırılmıştır. Total hücresel proteinlerin analizi için izole edilen proteinler, denatüre edici gradiyent tris glisin poliakrilamid jellerde elektroforez edilerek görüntülenmiştir. Jellerde, “hareket eden küre yarıçapı” yöntemi ile arka plan normalizasyonunun ardından, her bir deneye ait kulvar için bant profil analizi yapılmış, protein bandı tepelerinin eğri altında kalan alanları entegre edilerek o örnek için toplam protein miktarı hesaplanmıştır. Rekombinant insülin A ve B zinciri füzyon peptidi düzeylerinin ölçümü için polietilen glikol – sodyum klorür ile fraksiyonel presipitasyonu ile yüksek molekül ağırlıklı hücresel proteinlerin uzaklaştırılmasının ardından süpenatantlar, denatüre edici gradiyent tris trisin poliakrilamid jellerde elektroforez edilmiştir. Görüntülenen jellerde arka plan normalizasyonunun ardından rekombinant insülin füzyon peptidine ait bant profilinde eğri altında kalan alan entegre edilerek hesaplanmıştır. Her bir deney için yanıt, rekombinant protein ekspresyon bandı ile total hücresel protein bantlarının profil analizinden elde edilen değerlerin oranlanması ile hesaplanmıştır. Tüm bant profillemeye işlemleri ImageJ ve Gel Analyzer yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir (75).

4.16. Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılması

Bu tez çalışmasında indüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültür pelleti protein izolatlarından insülin füzyon peptidlerinin saflaştırılması için immobilize metal şelasyon afinite kromatografisinden yararlanılmıştır. Bu amaçla, pInsA ve pInsB ekspresyon vektörü plazmidlerin tasarımı, siyanojen bromür proteolitik sindirmesi ile uzaklaştırılabilecek N-terminal 6 x histidin etiketi içerecek şekilde yapılmıştır.

Kromatografik saflaştırma yapılacak protein örneklerine, 0.1 M potasyum klorür eklenip 17000 x g ivme ile 20 dakika santrifüj edilerek hücre pelleti lizis tamponundan kaynaklanan SDS'in uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Kromatografi basamağı için nitrilotriasetik asit ile dekore edilmiş, ortalama 30 µm çapında sefaroz boncuk dolgu materyalinden sabit faza sahip 1.5 ml yatak hacimli kolon kullanılmıştır. Kolon dolgu materyalinin nitrilotriasetik asit fonksiyonel grupları, 0.1 M kobalt sülfat mobil fazı ile yıkanarak kobalt iyonları ile yüklenmiştir.

Kolondan bağlanmayan kobaltı uzaklaştırmak ve mobil faz dengesini kurmak için önce 5 kolon hacmi kadar elüsyon tamponu (Çizelge 4.54) geçirilmiş, ardından yine 5 kolon hacmi kadar bağlanma tamponu (Çizelge 4.53) geçirilerek protein çözeltisi enjekte edilmeye hazır hale getirilmiştir.

Kolona enjekte edilecek protein çözeltisinden potasyum klorür ile SDS'in uzaklaştırılmasının ardından, kromatografi bağlanma tamponu ile 2 kat dilüe edilmiştir. Kolona bir seferde 25 ml hacimde SDS'i uzaklaştırılmış dilüe edilmiş hücre pelleti ekstraktı 1 ml/dakika hızda izokratik akım ile enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun ardından, kolon 5 hacim bağlanma tamponu ile yıkanmıştır. Elüsyon, 8 kolon hacmi boyunca 1 ml/dakika akım hızında bağlanma ve elüsyon tamponları arasında doğrusal gradiyent yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elüat, her biri 4 ml hacmindeki fraksiyonlar halinde toplanmış, kolon çıkışında mobil fazın iletkenliği ve 230 nm dalgaboyundaki

absorbansı spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir. Elüsyon işleminin tamamlanmasının ardından kolon, bir sonraki enjeksiyona hazır hale gelmesi için 5 kolon hacmi bağlanma tamponu geçirilmiştir (66).

Çizelge 4.53. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi bağlanma tamponu bileşimi.

Malzeme	Çalışan konsantrsyon
Tris klorür pH 8.0	50 mM
Sodyum klorür	400 mM
Gliserol	%10
Deiyonize su	

Çizelge 4.54. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi elüsyon tamponu bileşimi.

Malzeme	Çalışan konsantrsyon
Tris klorür pH 8.0	50 mM
Sodyum klorür	400 mM
Gliserol	%10
İmidazol	300 mM
Deiyonize su	

Her dört enjeksiyonda bir kolonun bağlanma kapasitesi 5 kolon hacmi 100 mM kobalt sülfat ile rejenere edilmiştir. Gerekli durumlarda, her bir basamaktan sonra 5 kolon hacmi kadar deiyonize su ile yıkanmak şartı ile, 5 kolon hacmi 6 M guanidin

hidroklorür ile agrege olmuş proteinlerin çözünür hale getirilmesi, 100 mM EDTA ile metal iyonlarının sökülmesi, 2-propanol ile protein agregatları ve çökeltme eğilimindeki tuzların uzaklaştırılması ile sanitize edilmiştir. Sanitizasyon sonrası kolon tekrar kobalt iyonları ile yüklenmiştir.

4.17. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin konsantrasyonlarının Bradford yöntemi ile ölçülmesi

Saflaştırılan insülin A ve B füzyon proteinlerin siyanojen bromür ile kesilmeden önce konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu amaçla, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/µl sığır serum albuminin içeren kantitasyon standartları ile konsantrasyonu bilinmeyen kromatografi fraksiyonlarının her birinden 2.5 µl hacmindeki alikot, 97.5 µl hacminde Bradford çözeltisi ile karıştırılmıştır(Çizelge 4.55) (76).

Çizelge 4.55. Protein kantitasyonu deneylerinde kullanılan Bradford çözeltisi bileşimi.

Malzemeler	Çalışan konsantrasyon
Coomassie brilliant blue G-250	0.1 g/l
Fosforik asit	%8.5
Etanol	%4.75
Deiyonize su	

Kantitasyon standartları ve bilinmeyen örneklerin 595 nm dalgaboyundaki absorbansı spektrofotometrik olarak okunmuştur. Tüm ölçümler üç kez tekrarlanmış, ortalama absorbans ile %değişkenlik katsayısı hesaplanmıştır. Değişkenlik katsayısı %5'ten büyük okumalar tekrar edilmiştir. Bilinen konsantrasyondaki standart sığır serum albumini çözeltileri için elde edilen A_{595} değerlerine regresyon analizi yapılarak birinci dereceden lineer absorbans – konsantrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Hesaplanan R^2 değeri 0.95'in altında olması halinde deney tekrarlanmıştır. Bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları, regresyon denkleminin ölçülen A_{595} değerleri için çözümlenmesi ile hesaplanmıştır.

4.18. İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin siyanojen bromür kullanılarak sindirilmesi

Rekombinant insan insülin hormonu üretiminde son ürünün amino asit dizisinin orijinal insülin molekölü ile aynı olması zorunluluğu, temel gerekliliklerden birini oluşturmaktadır. Bu nedenle, bakteriyel protein ekspresyonu ve saflaştırmada kolaylık sağlayamak üzere tasarıma eklenen N-terminal füzyon peptidinin proteolitik sindirme ile uzaklaştırılması gerekmektedir. Afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan insülin A ve B füzyon peptidlerini içeren kromatografi fraksiyonlarından Bradford yöntemi ile protein konsantrasyon tayini gerçekteştirilmiş, bu fraksiyonların insülin A ve B füzyon peptidi molaritesi hesaplanmıştır. Proteolitik sindirme için örneklere 10 mM hidroklorik asit ve hesaplanan protein molaritesinden 25 katı molaritede siyanojen bromür eklenmiş, 1 gece oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (77).

4.19. Siyanojen bromür ile proteolitik sindirme uygulanan insülin A ve B zinciri füzyon proteinlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi ve saflaştırılması

Siyanojen bromür ile bir gece boyunca sindirilen insülin A ve B zinciri füzyon peptidleri C18 ters faz kromatografisi ile analiz edilerek sindirmenin gerçekteşip gerçekteşmediği araştırılmıştır.

Bu amaçla, 20 µl hacminde sindirme tepkimesi çözeltilisi, 0.6 ml/dakika debide %5 asetonitril %95 su, %0.05 trifluoroasetik asit iyonik eşleyiciden oluşan mobil faz ile izokrattik olarak dengelenmiş 4.6 x 50 mm boyutlarındaki makroporöz C18 ters faz kolona enjekte edilmiştir. Enjeksiyonun ardından 20 dakika boyunca mobil fazdaki organik modifiye edici asetonitrilin konsantrasyonu %5'ten %80'e gradiyent şeklinde artırılmıştır. Kolon çıkışındaki mobil fazda sürekli olarak 215 nm dalgaboyunda

spektrofotometrik okumalar gerçekleştirilerek kaydedilmiş, protein içeren fraksiyonlar toplanmıştır.

Ters faz kromatografisi ile ayrıştırma insülin A ve B zincirlerinin herbiri için dört kez tekrarlanmış, toplanan fraksiyonlar -80 °C sıcaklıkta dondurulmuştur. Dondurulan fraksiyonlar liyofilize edilerek 100 µl pH 8.0 tris klorür tamponu ile çözülmüştür.

4.20. Ters faz kromatografisi ile saflaştırılan siyanojen bromür sindirme ürünlerinin indirgenme ve yükseltgenme ile dimerizasyonu

Afinite kromatografisi ile saflaştırılmış, siyanojen bromür ile sindirme sonrası ters faz kromatografisi ile sindirme tamponundan saflaştırılan ürünler liyofilizasyon ile konsantre edilmiş, redüksiyon ve oksidasyon ile dimerize edilmeye hazır hale getirilmiştir.

Henüz heterodimerleşme için birleştirilmemiş rekombinant insan insülin A ve B peptidi çözeltilerine 2 mM β-merkaptolanol eklenerek spontan oksidasyon ile oluşmuş homodimerlerin ayrıştırılması sağlanmıştır. İndirgen ortamda bir saat inkübasyonun ardından insülin A ve B peptidi çözeltileri, ölçüm sonrası kayıplar göz ardı edilerek sindirme öncesi gerçekleştirilen protein konsantrasyon ölçümlerine göre izomolar oranda karıştırılmıştır. Oksidasyonun gerçekleşmesi için karışıma 10 mM hidrojen peroksit eklenmiş, iki saat boyunca inkübe edilmiştir (78–80).

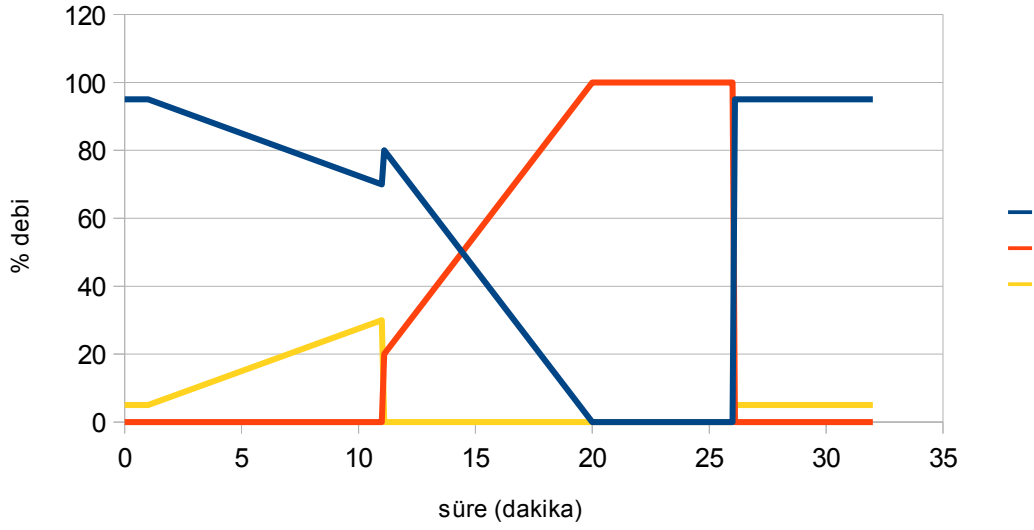
Oluşan insülin A – B heterodimerlerinin analizi için 4.6 x 50 mm boyutlarında ters faz makroporöz C18 proteomik kolon ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Mobil faz su, organik modifiye edici asetonitril olarak belirlenmiştir. Mobil faz ve organik modifiye ediciye iyon eşleyici olarak %0.05 (hacim/hacim) konsantrasyonunda trifluoroasetik asit eklenmiştir. Mobil faz akım hızı 0.6 ml/dakika olarak belirlenmiştir. Her analiz için %1 asetonitril, %99 su ile dengelenmiş kolona, 10 µl hacminde örnek enjekte edilmiştir. Mobil fazın kompozisyonunu zamana karşı belirleyebilmek amacı ile, A (saf su), B (saf asetonitril) ve C (%20 asetonitril, %80 su karışımı) pompaları izokratik ve gradiyent akım programlarına göre çalıştırılmıştır

(Çizelge 4.56, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Çizelge 4.56. Redüksiyon ve oksidasyon tepkimeleri ile oluşan rekombinant insülin dimerlerinin ters faz C18 proteomik kolon kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için mobil faz akım protokolü.

Süre (dak)	%A pompası	%B pompası	%C pompası	%Su	%Asetonitril
0	95	0	5	99	1
1	95	0	5	99	1
11	70	0	30	94	6
11,1	80	20	0	80	20
20	0	100	0	0	100
26	0	100	0	0	100
26,1	95	0	5	99	1
32	95	0	5	99	1

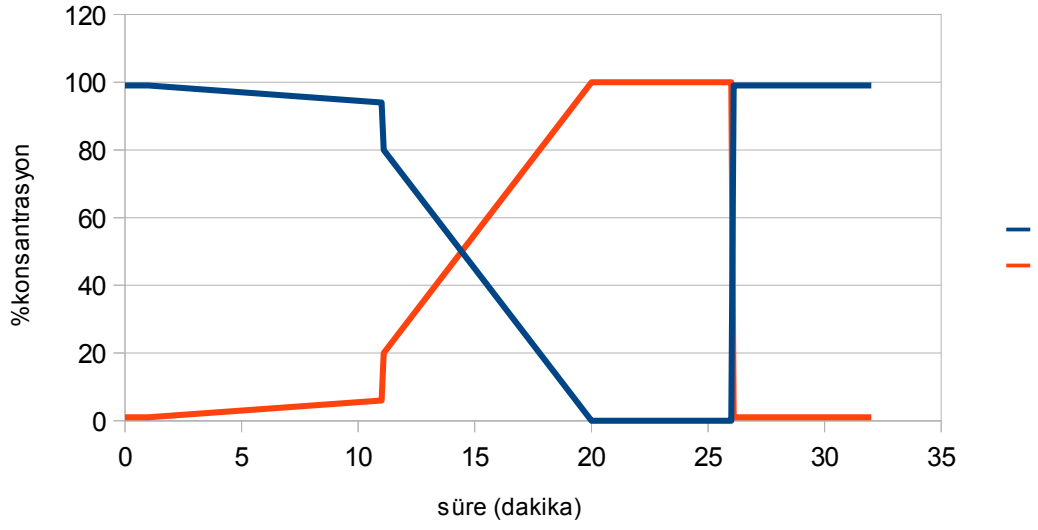
Not: A pomp



Şekil 4.5. Redüksiyon ve oksidasyon tepkimeleri ile oluşan rekombinant insülin dimerlerinin ters faz C18 proteomik kolon kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için mobil faz akım protokolü. Not: A pompası: saf su, B pompası: saf asetonitril, C pompası: %20 asetonitril, %80 su karışımı.

Enjeksiyon sonrası organik modifiye edici asetonitrilin mobil fazdaki konsantrasyonunun artması ile elüe olan proteinlerin retansiyon zamanları saptanmıştır. Heterodimer ve redükte monomerler formundaki insülin peptidlerinin retansiyon zamanlarını belirleyebilmek amacı ile, ticari regüler insülin preparatı olan Humulin R'nin hem nativ formda hem de 2 mM β -merkaptetanol ile redükte edilmiş formunun kromatografik analizi yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında kullandığımız redüksiyon – oksidasyon kimyası ile olası A-A ve B-B homodimer yapılarının kromatografik retansiyon zamanlarının saptanabilmesi için β -merkaptetanol ile redükte edilmiş A ve B zincirleri hidrojen peroksit ile karıştırılmadan oksitlenmiş ve analiz edilmiştir.

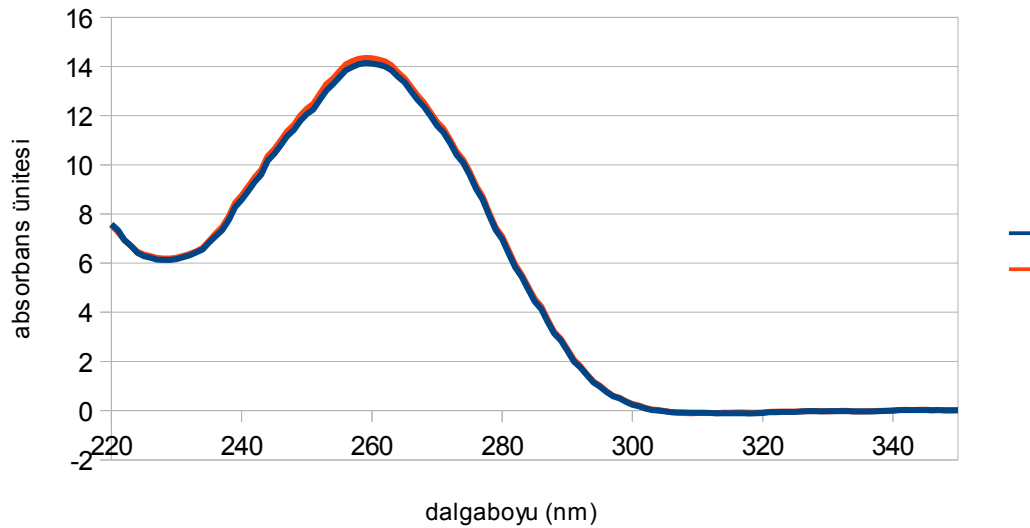


Şekil 4.6. Redüksiyon ve oksidasyon tepkimeleri ile oluşan rekombinant insülin dimerlerinin ters faz C18 proteomik kolon kullanılarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analizi için mobil faz bileşimi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. IM-9 insan B lenfoblastik hücre pelletlerinden DNA eldesi

Bu tez çalışmasında, insülin A ve B zincirlerini kodlayan gen segmentlerinin çoğaltılması amacı ile, IM-9 insan B lenfoblastik hücre pelletlerinden, SDS ve proteinaz K ile lizat hazırlanmasının ardından, fenol kloroform izoamil alkol ile saflaştırılan DNA kullanılmıştır. Saflaştırılmış örneğin kantitasyonunun ve kalitesinin belirlenmesi için 220 – 350 nm dalgaboyları arasında yapılan spektral spektrofotometrik ölçüm sonuçları Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. DNA1. IM-9 hücre pelletinden saflaştırılmış DNA örneğinin 220 – 350 nm dalgaboyları arası spektral spektrofotometrik ölçümü.

Elde edilen DNA örneğinin konsantrasyonu A_{260} değerinden yararlanılarak, 711.52 ± 5.36 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmış, RNA ve fenol kontaminasyonu bulunmadığı saptanmıştır(Çizelge 5.1) (52).

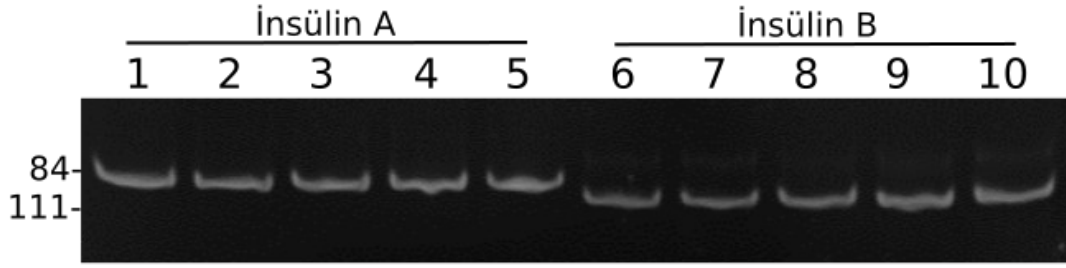
Çizelge 5.1. IM-9 hücre pelletlerinden saflaştırılan DNA örneğinin 230, 260 ve 280 nm dalgaboylarındaki absorbans değerleri ile oranları.

Absorbans dalgaboyu	Absorbans ünitesi
A ₂₃₀	6.19±0.03
A ₂₆₀	14.23±0.11
A ₂₈₀	7.04±0.06
A _{260/280}	2.02±0.00
A _{260/230}	2.30±0.01

Çalışmamızda DNA'dan insülin a ve b zincir genleri elde etmek amacıyla bu bölgelere spesifik olarak ve öncelikli olarak bakteride üretim için pET28a vektörüne klonlamaya uygun olacak şekilde dizayn edilmiş primer (Çizelge 4.54) ile PZT yapılmıştır. Bu amaçla gradient PZT ile optimal bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra insülin a ve b zincir genlerine özgün olan insülin a zincir için ve insülin b zincir için bandlar elde edilmiştir(Şekil 5.2).

5.2. İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin PZT ile çoğaltılması

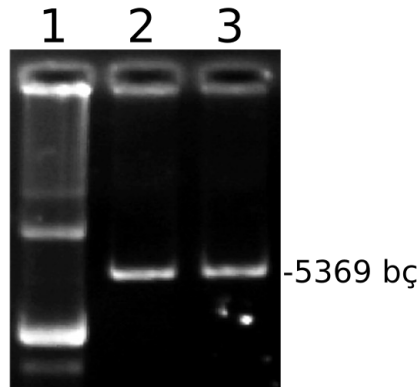
İnsülin A ve B zinciri ekspresyon vektörleri pInsA ve pInsB'nin yapımının ilk aşamasında, ilgili segmentler, IM-9 DNA'sından sırası ile iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primer çiftlerini kullanarak PZT yardımı ile çoğaltılmıştır. Ürünler, poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmiş, A ve B zincirleri için sırası ile 84 ve 111 bp uzunluğunda ampikonlar elde edildiği saptanmıştır(Şekil 5.2).



Şekil 5.2. İnsülin geni A ve B zinciri bölgelerinin iAF – iAR ve iBF – iBR oligonükleotid primerler ile elde edilmiş 84 ve 111 bç uzunluğundaki çoğaltma ürünlerinin DNA PAGE ile analizi.

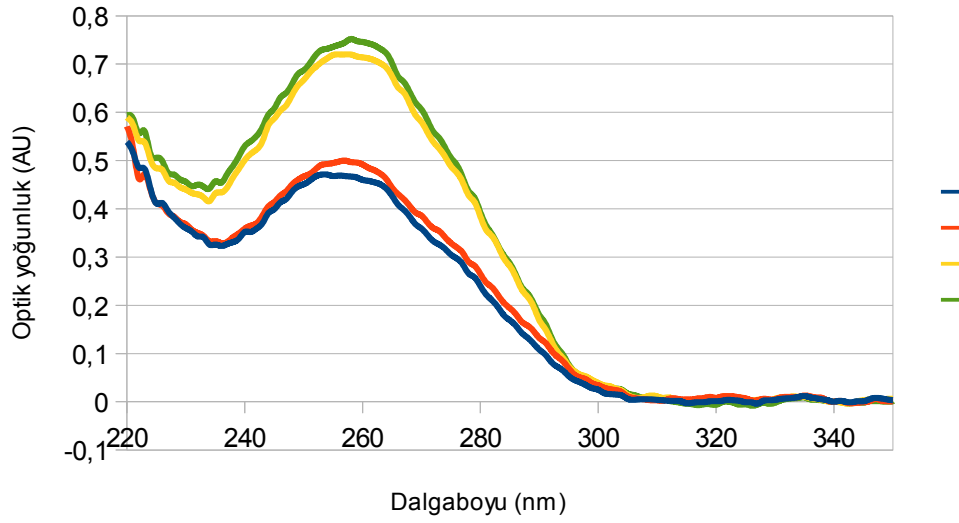
5.3. İnsülin geni A ve B segmentlerinin pET28a omurgasına klonlanarak pInsA ve pInsB ekspresyon vektörü plazmidlerinin elde edilmesi

Bu tez çalışmasında bakteriyel ekspresyon vektörü omurgası olarak kullanılan pET28a, *E. coli* K12 JM109 hücrelerinde üretilmiş, “midiprep” plazmid izolasyonu protokolü ve ardından polietilen glikol presipitasyonu ile elde edilmiştir. İnsülin A ve B gen segmentlerinin moleküler klonlaması için vektör DNA'sı NdeI ve XhoI tip II restriksiyon endonükleazları ile sindirilmiştir. Sindirme ürünleri %0.8 (ağırlık/hacim) agaroz jelde kontrol edilmiş (Şekil 5.3), ürünlerin miktar ve kalite tayini spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir(Şekil 5.4 ve Çizelge 5.2).



Şekil 5.3. Süpersarmal çembersel (kulvar 1), NdeI (kulvar 2) ve XhoI (kulvar 3) enzimleri ile sindirilmiş pET28a'nın agaroz jel eletroforezi ile görüntüsü.

Polimeraz zincirleme tepkimesi ile elde edilen insülin geni A ve B segmentlerinin NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleazları ile sindirilmesi elektroforetik olarak saptanabilecek bir boyut farkına yol açmadığından bu ürünlerin miktar ve kalite tayini doğrudan spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir.



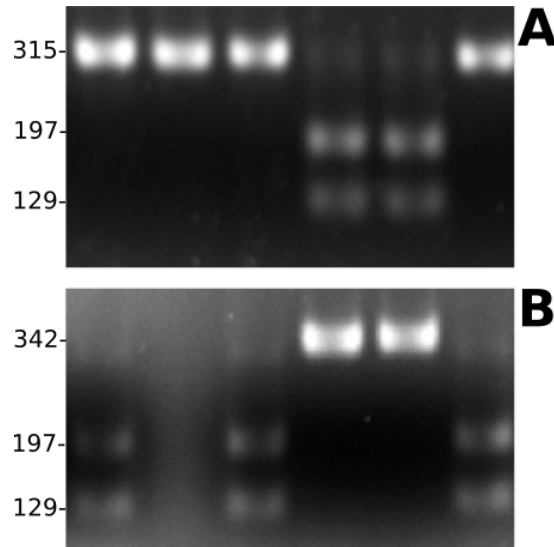
Şekil 5.4. İnsülin A ve B polimeraz zincirleme tepkimesi ürünleri ile pET28a plazmid vektör DNA'sının NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile sindirilmesi sonrası spektrofotometrik analizi.

Çizelge 5.2. İnsülin A ve B polimeraz zincirleme tepkimesi ürünleri ile pET28a plazmid vektör DNA'sının NdeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile sindirilmesi sonrası spektrofotometrik yöntem ile miktar ve kalite tayini

Sample ID	pET28a/NdeI/XhoI	insülin A PZT/NdeI/XhoI	insülin B PZT/NdeI/XhoI
DNA konsantrasyonu (ng/µl)	24,580	35,690	37,300
A ₂₃₀	0,368	0,440	0,456
A ₂₆₀	0,492	0,714	0,746
A ₂₈₀	0,265	0,384	0,393
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,850	1,860	1,900
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	1,340	1,620	1,640

Plazmid vektör omurgası ve “insert” PZT ürünlerinin NdeI ve XhoI enzimleri ile

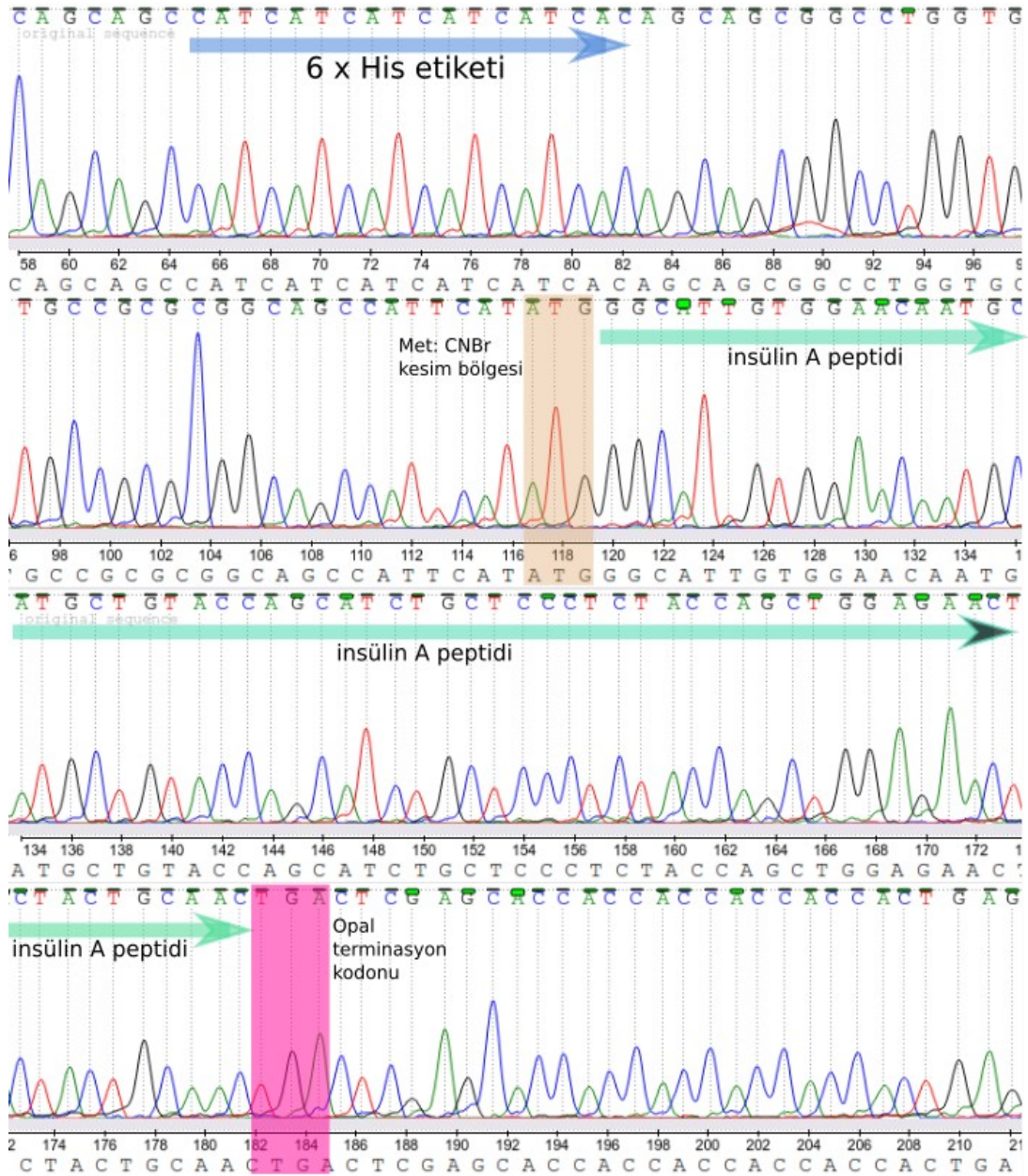
sindirilmesinin ardından, *E. coli* K12 JM109 hücreleri, her bir insülin zinciri ekspresyon plazmidini için vektör:"insert" oranı 1:2, 1:4 ve 1:8 olarak ayarlanmış ligasyon tepkisi ürünleri ile transforme edilmiş, SOB kanamisin plaklarında $10^1 - 10^3$ mertebesinde transformant koloni elde edilmiştir. Bu transformantlardan "insert" içerenlerin saptanması amacı ile, T7-5' – T7-3' oligonükleotid primerleri ile PZT ve ardından EcoRI enzimi ile restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi analizi gerçekleştirilmiştir. Ek almamış plazmidler için 129 ve 197 bp uzunluğunda iki bant elde edilirken, insülin A DNA'sı ekli plazmidler için 315 bp, insülin B DNA'sı ekli plazmidler için 342 bp uzunluğunda ürün edilmiştir(Şekil 5.5).



Şekil 5.5. İnsülin geni A ve B zinciri DNA'sı ekli plazmidleri alan transformantların polimeraz zincirleme tepkimesi ardından restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi analizi ile saptanması.

Polimeraz zincirleme tepkimesi ve restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi analizi ile taranan kolonilerden DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Sanger döngüsel sekanslama tepkimesi, ürünlerin temizlenmesi ve kapiller jelde elektroforez edilmesinin ardından elde edilen kromatogram dizileri, insan genomik ve transkriptomik veritabanlarında BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) ile

aranmıştır. İnsülin geni A ve B zincirleri için oluşturulan pInsA ve pInsB plazmidlerine doğru DNA dizilerinin doğru yerleşimde eklendiği saptanmıştır(Şekil 5.6).

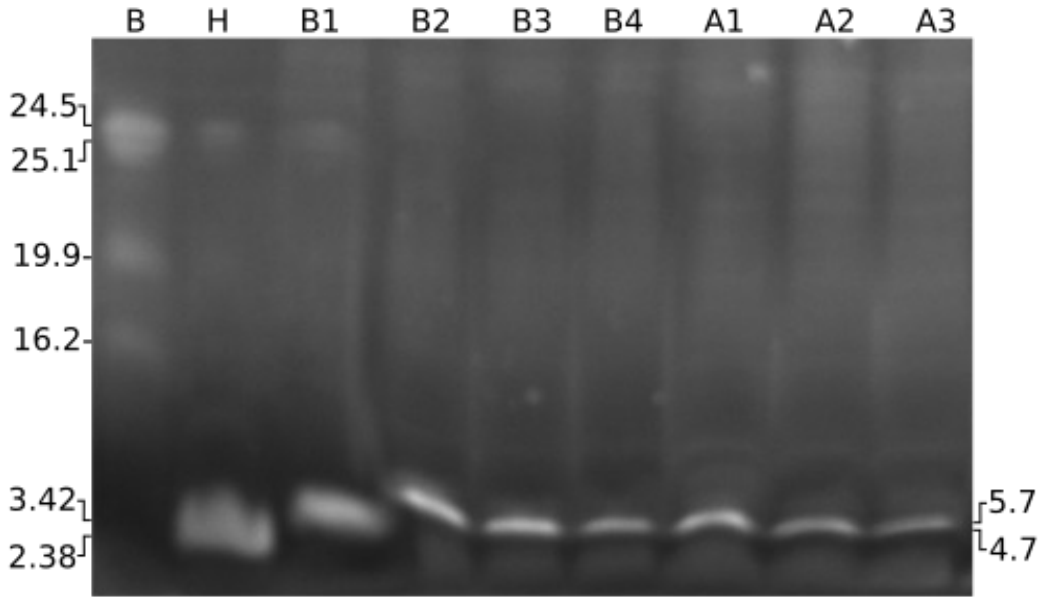


Şekil 5.6. Ekspresyon plazmidini pInsA'nın Sanger yöntemi ile elde edilmiş DNA dizi analiz kromatogramı.

İnsülin A ve B peptidlerinin üretiminde kullanılacak pInsA ve pInsB ekspresyon

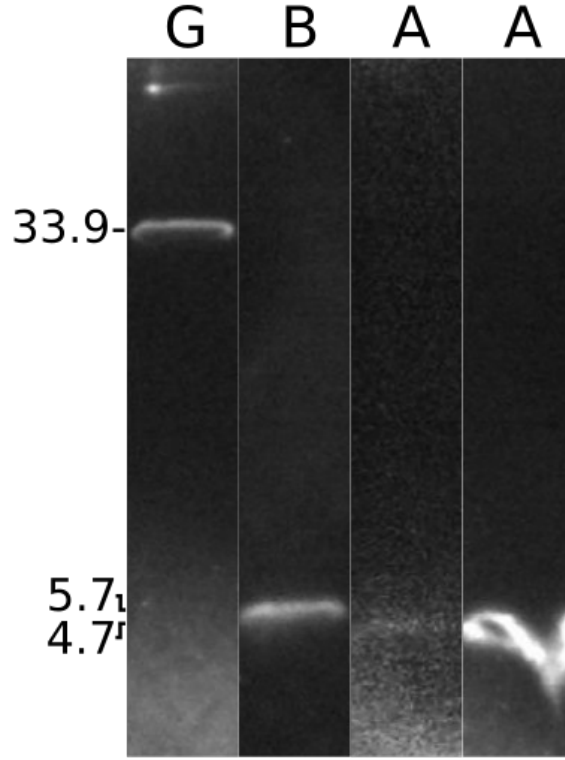
plazmidleri, moleküler klonlama işlemlerinin gerçekleştirildiği *E. coli* K12 JM109 hücrelerinden izole edilerek, rekombinant protein üretimi için fabrika hücre olarak kullanılan *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Her bir plazmid için $10^1 - 10^2$ mertebesinde transformant elde edilmiştir.

Rassal olarak seçilen *E. coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kolonileri, deneme ekspresyon çalışmasına alınarak indüklenmiştir. İndüklenmiş kültürlerden izole edilen proteinler polietilen glikol – sodyum klorür presipitasyonu ile fraksiyonel olarak çöktürülmüştür. Yüksek molekül ağırlıklı hücresel proteinlerin pellet edilerek uzaklaştırılmasının ardından süpernatantlar denatüre edici tris trisin gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edilmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5.7. İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinden izole edilmiş proteinlerin polietilen glikol – sodyum klorür fraksiyonel presipitasyonu sonrası denatüre edici tris trisin gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi. (B: belirteç – süt tozu proteinleri; H: Humulin R; B1 – 4: *E. coli* BL21(DE3)/pInsB kolonileri; A1 – 3: *E. coli* BL21(DE3)/pInsA kolonileri).

Denatüre edici tris trisin gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile indüklenmiş kültürlerde üretilmiş muhtemel rekombinant insülin A ve B zinciri peptidlerinin gösterilmesinin ardından, N-terminal 6 x histidin etiketi taşıyan rekombinant insülin A ve B peptidleri western blotlama yöntemi ile analiz edilmiştir. Western blotlama deneyi iç kontrolü olarak kullanılmış olan rekombiant yeşil floresan protein ile insülin A ve B zinciri N-terminal 6 x histidin etiketi füzyon peptidleri, anti-His-tag antikoru ile saptanmıştır(Şekil 5.8).



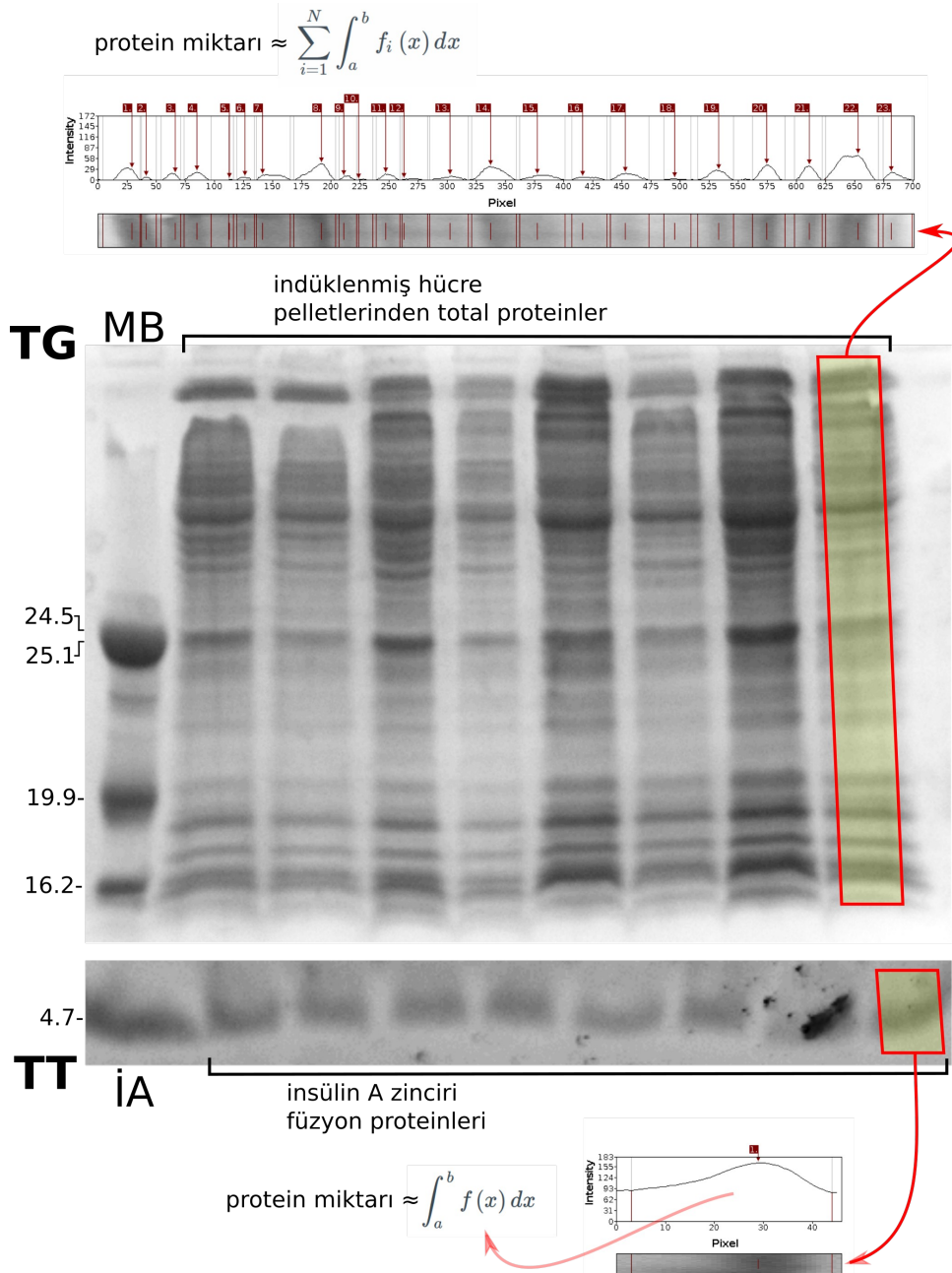
Şekil 5.8. İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB kültürlerinden izole edilmiş proteinlerin anti-His-tag antikoru ile western blot analizi. (G: rekombinant yeşil floresan protein; B: *E. coli* BL21(DE3)/pInsB kültürü; A: *E. coli* BL21(DE3)/pInsA kültürleri)

5.4. *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB fabrika bankalarında rekombinant insan insülini A ve B zinciri füzyon peptidi üretiminin fraksiyonel faktryel deneysel tasarım ve yanıt yüzeyi modellemesi yöntemleri ile optimizasyonu

Bu tez çalışmasında, bakteriyel fabrika hücrelerde rekombinant heterolog proteinlerin üretiminde etkisi olduğu bilinen inkübasyon sıcaklığı, pH, IPTG konsantrasyonu, indüksiyon başlangıcındaki biyokütle, indüksiyon süresi ve çalkalama hızı faktörlerinin rekombinant insan insülin peptidlerinin üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. İki seviyeli Plackett – Burman deney tasarımına dahil edilen 6 faktörden ekspresyon düzeyleri üzerinde etkili olanları saptamak amacı ile insülin A

zinciri füzyon peptidi için 16 ve insülin B zinciri füzyon peptidi için 16 olmak üzere toplan 32 ekspresyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Her bir ekspresyon deneyi sonunda elde edilen hücre pelletlerinden saflaştırılan total hücresel proteinlerin ve rekombinant insülin füzyon peptidlerinin oranlanması için sırası ile denatüre edici tris glisin ve tris trisin gradiyent poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılan proteinlere bant profil analizi yapılmıştır (Şekil 5.9).

Her bir deney için, jelde yürüme mesafesi – protein boyanma yoğunluğu grafiği şeklinde oluşturulan bant profillerinde, arka plan normalize edildikten sonra eğri altında kalan alanlar belirlenmiş, rekombinant insülin füzyon peptidleri ile total hücresel proteinler için hesaplanan değerler birbiri ile oranlanarak rekombinant protein ekspresyon verimi ($Y_{\text{rekombinant protein}} / Y_{\text{total protein}} \approx Y_{\text{ürün}} / Y_{\text{biyokütle}}$) hesaplanmıştır. Elde edilen değerler, her bir deneye ait kültürün biyokütlesine göre normalize edilmiş rekombinant protein ekspresyon yanıtı olarak alınmıştır(Çizelge 5.3, Çizelge 5.4).



Şekil 5.9. İndüklenmiş hücre pelletleri total proteinlerinin tris glisin, rekombinant insülin fraksiyonlarının ise, tris trisin jellerinde yürütülmesi ile elde edilen kulvar bant profilleri. TG: denatüre edici tris glisin gradiyent poliakrilamid jeli; TT: denatüre edici tris trisin gradiyent poliakrilamid jeli; MB: moleküler belirteç (sığır sütü proteinleri); IA: İmmobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılmış insülin A zinciri füzyon peptidi.

Çizelge 5.3. Plackett-Burman tasarımına göre gerçekleştirilmiş deneylerde elde edilmiş rekombinant insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Y_{insülin A} / Y_{total protein})

Deney No	Y _{insülin A} / Y _{total protein}
1	0,19021739
2	0,20858896
3	0,054722639
4	0,04790419
5	0,0750750751
6	0,06274008
7	0,07344633
8	0,03952569170
9	0,06378601
10	0,067061144
11	0,22375691
12	0,06868687
13	0,11904762
14	0,13931889
15	0,1425120773
16	0,24941725

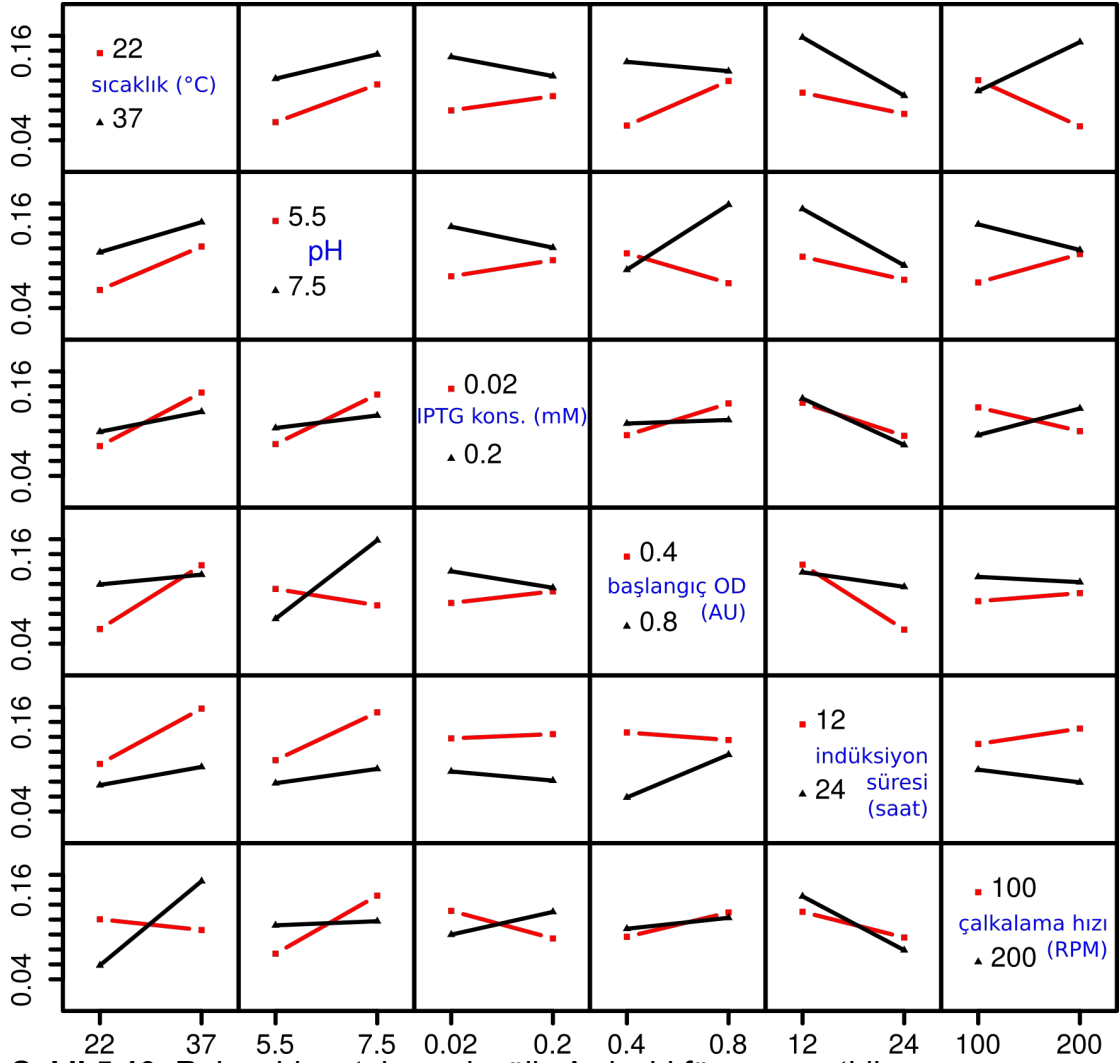
Çizelge 5.4. Plackett-Burman tasarımına göre gerçekleştirilmiş deneylerde elde edilmiş rekombinant insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Y_{insülin B} / Y_{total protein})

Deney No	Y _{insülin B} / Y _{total protein}
1	0,279527556
2	0,02275
3	0,12341198
4	0,07471264
5	0,27659574
6	0,0626506
7	0,23690205
8	0,11127379
9	0,0453964
10	0,06603774
11	0,15482234
12	0,05405405
13	0,17857143
14	0,20304569
15	0,20450886
16	0,20809249

Plackett – Burman deney tasarımı için elde edilen rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidi ekspresyon yanıtları R-cran FrF2 paketi ile analiz edilerek ana etkilere yönelik tahminler ile test edilen faktörlerin ikili etkileşim grafikleri elde edilmişti(Çizelge 5.5 ve Çizelge 5.6) ,(Şekil 5.10 ve Şekil 5.11)

Çizelge 5.5. Rekombinant insan insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile ana etkilerin tahmini ve istatistiksel önem testi.

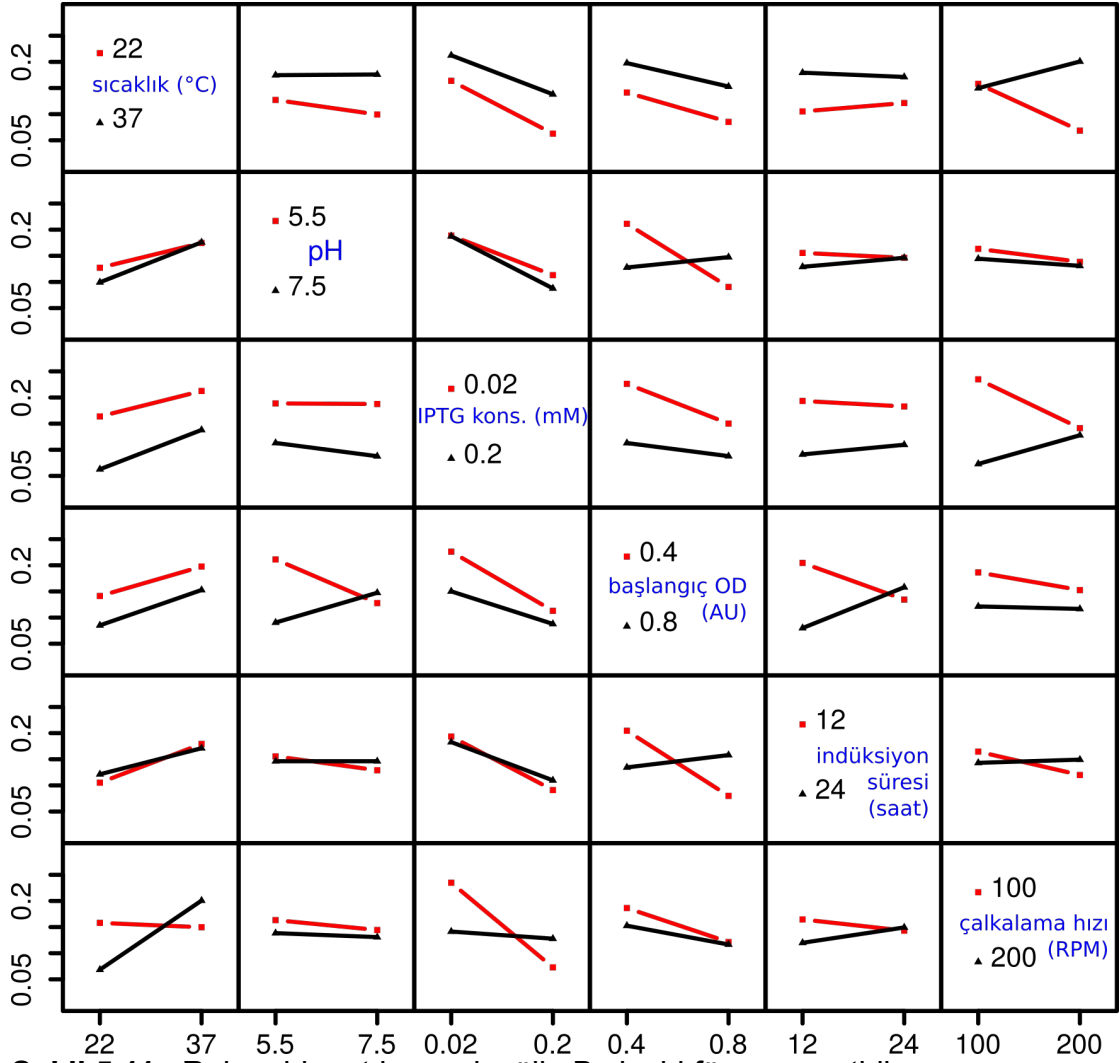
	Tahmin	Standart hata	t değeri	Pr(> t)	Önemlilik testi
(kesişim)	0,11	0,02	6,42	0,02	*
sıcaklık (°C)	0,02	0,02	1,38	0,3	
pH	0,02	0,02	1,17	0,36	
IPTG konsantrasyonu (mM)	0	0,02	-0,09	0,94	
başlangıç OD (AU)	0,01	0,02	0,66	0,58	
indüksiyon süresi (saat)	-0,03	0,02	-1,5	0,27	
çalkalama hızı (RPM)	0	0,02	0,05	0,96	
sıcaklık : pH	0	0,02	-0,25	0,82	
sıcaklık : IPTG konsantrasyonu	-0,01	0,02	-0,63	0,59	
sıcaklık : başlangıç OD	-0,02	0,02	-1,02	0,42	
sıcaklık : indüksiyon süresi	-0,01	0,02	-0,7	0,56	
sıcaklık : çalkalama hızı	0,03	0,02	1,79	0,22	
IPTG konsantrasyonu : başlangıç OD	-0,01	0,02	-0,53	0,65	



Şekil 5.10. Rekombinant insan insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile taranan faktörlerin ikili etkileşim grafikleri.

Çizelge 5.6. Rekombinant insan insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile ana etkilerin tahmini ve istatistiksel önem testi.

	Tahmin	Standart hata	t değeri	Pr(> t)	Önemlilik testi
(kesişim)	0,14	0,01	17,35	0	**
sıcaklık (°C)	0,03	0,01	3,73	0,07	.
pH	-0,01	0,01	-0,8	0,51	
IPTG konsantrasyonu (mM)	-0,04	0,01	-5,28	0,03	*
başlangıç OD (AU)	-0,03	0,01	-3,04	0,09	.
indüksiyon süresi (saat)	0	0,01	0,24	0,83	
çalkalama hızı (RPM)	-0,01	0,01	-1,16	0,37	
sıcaklık : pH	0,01	0,01	0,88	0,47	
sıcaklık : IPTG konsantrasyonu	0,01	0,01	0,8	0,51	
sıcaklık : başlangıç OD	0	0,01	0,34	0,77	
sıcaklık : indüksiyon süresi	-0,01	0,01	-0,73	0,54	
sıcaklık : çalkalama hızı	0,04	0,01	4,23	0,05	.



Şekil 5.11. Rekombinant insan insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyonunda Plackett – Burman deney tasarımı ile taranan faktörlerin ikili etkileşim grafikleri.

Bu tez çalışmasında tasarlanmış ve oluşturulmuş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB hücre bankalarını kullanarak rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin üretim sürecinde belirlenen faktörlerin etkisinin araştırılması için fraksiyonel faktöryel deney tasarım yöntemleri kullanılmıştır. Plackett – Burman tarama testi ile ana etkiler ile bunların istatistiksel önemleri ve ikili etkileşim grafikleri hesaplanmıştır. Bunlara göre süreçte etkili olduğu saptanan

- çalkalama hızı
- indüksiyon süresi
- başlangıç OD'si (biyokütle miktarı)

faktörlerinin rekombinant protein üretim düzeylerine etkisinin lineer modellerinin oluşturulması amacı ile Box – Behnken yanıt yüzeyi modellenmesi yapılmıştır. Deney serisinin oluşturulmasında indüksiyon sıcaklığı, besiyeri pH'sı ve IPTG konsantrasyonu parametreleri, rekombinant protein ekspresyonunu artırdıkları Plackett – Burman deney serisinde gözlenen düzeylerde sabit tutulmuştur.

Rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon proteinleri için Box – Behnken deney serisi yanıtları, Plackett – Burman deney serisindekine benzer şekilde, her bir deneyde izole edilen düşük molekül ağırlıklı protein fraksiyonunun total hücresel proteinlere oranı olarak belirlenmiştir. Rekombinant insülin peptidi ekspresyon verimi $Y_{\text{insülin A}} / Y_{\text{total protein}}$ ya da $Y_{\text{insülin B}} / Y_{\text{total protein}}$ olarak ifade edilmiştir(Çizelge 5.7 ve Çizelge 5.8)..

Çizelge 5.7. Box – Behnken tasarımına göre gerçekleştirilmiş deney serisinde elde edilmiş rekombinant insülin A zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi ($Y_{\text{insülin B}} / Y_{\text{total protein}}$)

Deneme No	$(Y_{\text{insülin B}} / Y_{\text{total protein}})$
1	0,054152
2	0,10798812
3	0,036822
4	0,0951327434
5	0,8421705
6	0,36104
7	0,1488095
8	0,0360360
9	0,0947368
10	0,1552632
11	0,126522
12	0,145833
13	0,0769231

Çizelge 5.8. Box – Behnken tasarımına göre gerçekleştirilmiş deney serisinde elde edilmiş rekombinant insülin B zinciri füzyon peptidi ekspresyon verimi (Y_{insülin B} / Y_{total protein})

Deneme No	(Y _{insülin B} / Y _{total protein})
1	0,073569
2	0,083333
3	0,110000
4	0,5072464
5	0,262357
6	0,1174242
7	0,185226316
8	0,173333
9	0,044674
10	0,0702128
11	0,1346154
12	0,1493038
13	0,1122449

Yanıt yüzey modelinin hesaplanabilmesi için rekombinant protein ekspresyon verimleri, R-cran DoE.wrapper ve rsm paketleri ile analiz edilmiş, rekombinant insülin A ve B zinciri füzyon proteinleri için birinci derece, ikinci derece ve tam kuadratik denklem katsayıları hesaplanmıştır(Çizelge 5.9 ve Çizelge 5.10). Buna göre, insülin A üretim süreci için yanıt yüzey modeli;

$$y=f(x)=-0.0000125(x_1)^2-0.0008509(x_2)^2-0.003362(x_3)^2-0.00007114x_1x_2+0.0005108x_1x_3+0.004878x_2x_3+0.004283x_1+0.03373x_2-0.1599x_3-$$

0.3498 denklemi ile ifade edilmiştir.

İnsülin B üretim süreci için yanıt yüzeyi modeli ise;

$$y=f(x)=-0.00001893(x_1)^2-0.000681(x_2)^2+0.005697(x_3)^2-0.000004677x_1x_2+0.0003887x_1x_3+0.01426x_2x_3+0.005904x_1+0.01184x_2-0.2761x_3-0.3369$$

denklemi ile ifade edilmiştir.

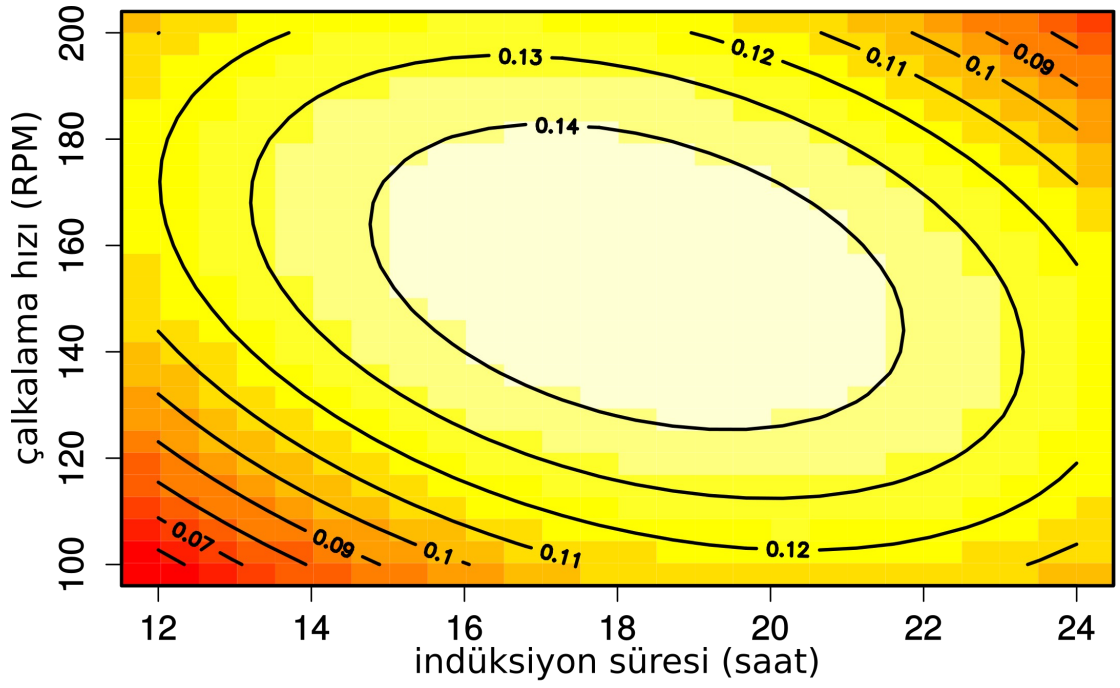
Çizelge 5.9. Box – Behnken deney tasarımı ile çalkalama hızı, indüksiyon süresi ve başlangıç OD'sinin, rekombinant insülin A füzyon peptidi ekspresyon verimi yanıt yüzeyi modeli polinomiyal denkleminin katsayıları.

çalkalama hızı (RPM)	indüksiyon süresi (saat)	başlangıç OD (AU)
x_1	x_2	x_3
4,28E-003	3,37E-002	-1,60E-001
çalkalama hızı : indüksiyon süresi	çalkalama hızı : başlangıç OD	indüksiyon süresi : başlangıç OD
x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3
-7,11E-005	5,11E-004	4,88E-003
(çalkalama hızı) ²	(indüksiyon süresi) ²	(başlangıç OD) ²
$(x_1)^2$	$(x_2)^2$	$(x_3)^2$
-1,25E-005	-8,51E-004	-3,36E-003
kesişim		
c		
-3,50E-001		

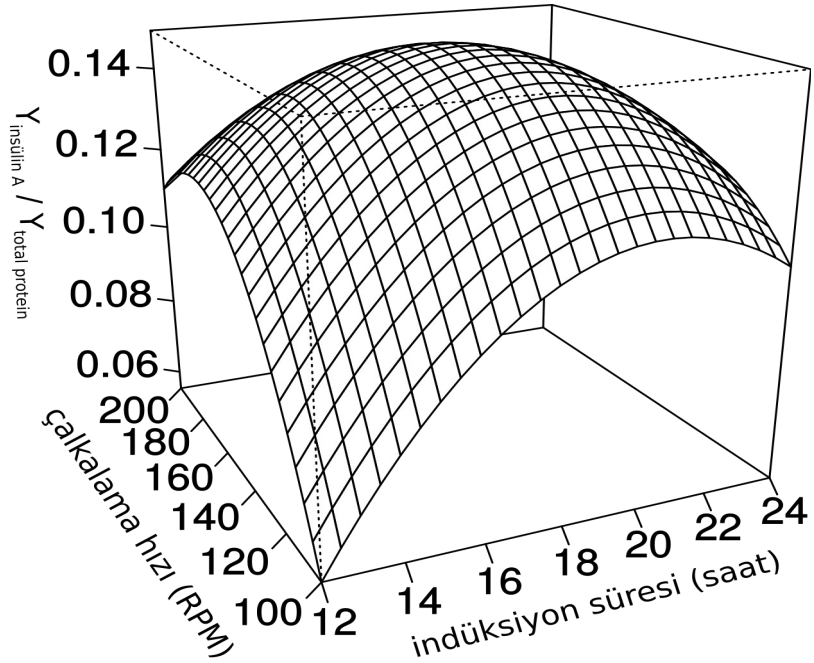
Çizelge 5.10. Box – Behnken deney tasarımı ile çalkalama hızı, indüksiyon süresi ve başlangıç OD'sinin, rekombinant insülin B füzyon peptidi ekspresyon verimi yanıt yüzeyi modeli polinomial denkleminin katsayıları.

çalkalama hızı (RPM)	indüksiyon süresi (saat)	başlangıç OD (AU)
x_1	x_2	x_3
5,90E-003	1,18E-002	-2,76E-001
çalkalama hızı : indüksiyon süresi	çalkalama hızı : başlangıç OD	indüksiyon süresi : başlangıç OD
x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3
-4,68E-006	3,89E-004	1,43E-002
(çalkalama hızı) ²	(indüksiyon süresi) ²	(başlangıç OD) ²
$(x_1)^2$	$(x_2)^2$	$(x_3)^2$
-1,89E-005	-6,81E-004	5,70E-003
kesişim		
c		
-3,37E-001		

Çalkalama hızı, başlangıç OD'si ve indüksiyon süresi faktörlerinin düşük, orta ve yüksek düzeyleri için Box – Behnken deney tasarımı ile gerçekleştirilmiş yanıt yüzeyi modellemesi ile elde edilen ikinci dereceden lineer yanıt yüzeyi denklemlerine göre, faktörlerin ikili etkileşiminin protein ekspresyon verimine etkisini gösteren kontür ve yanıt yüzeyi grafikleri çizilmiştir(Şekil 5.12, Şekil 5.13, Şekil 5.14, Şekil 5.15, Şekil 5.16, Şekil 5.17, Şekil 5.18, Şekil 5.19, Şekil 5.20, Şekil 5.21, Şekil 5.22, Şekil 5.23).

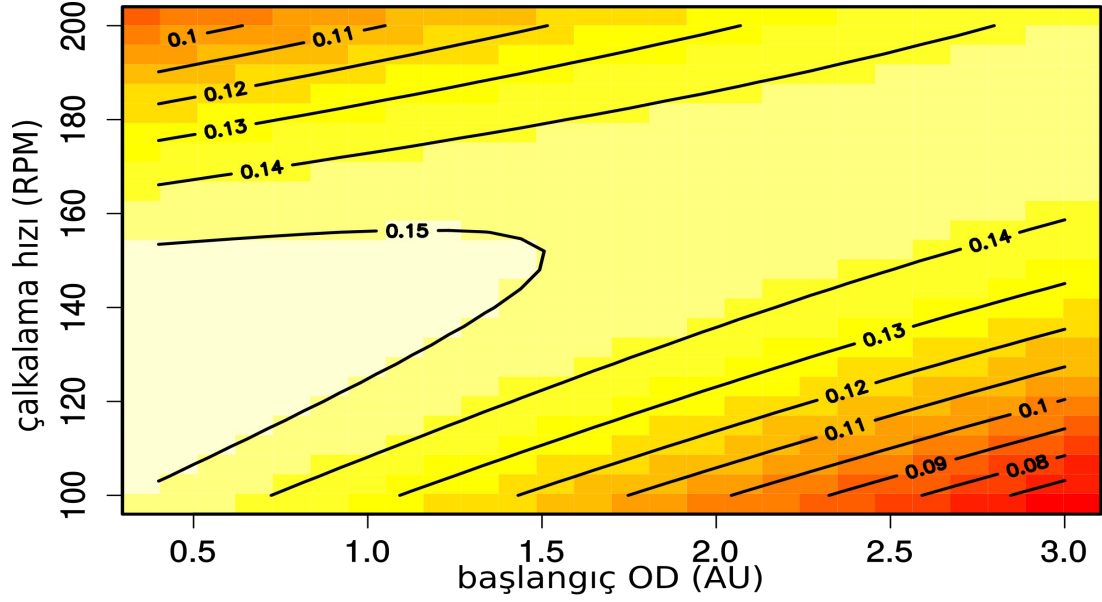


Şekil 5.12. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.



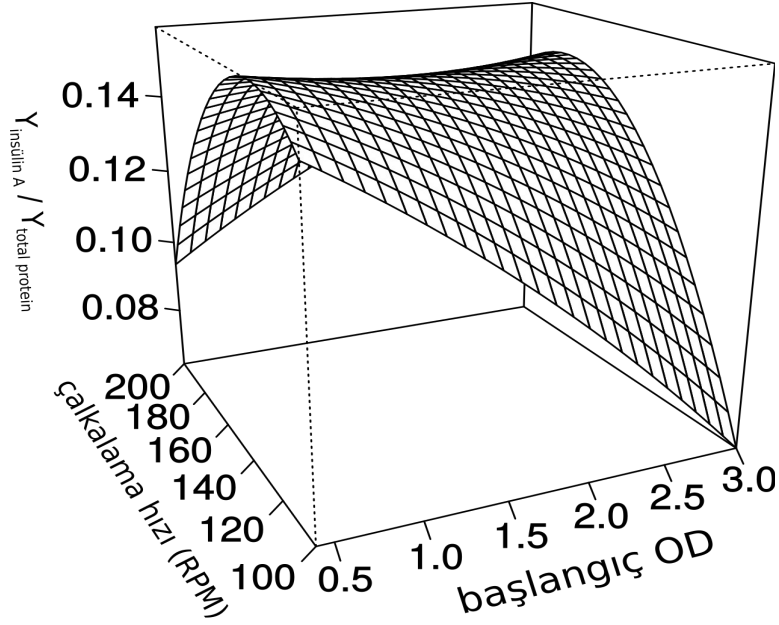
başlangıç OD = 1.7 dilimi

Şekil 5.13. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.



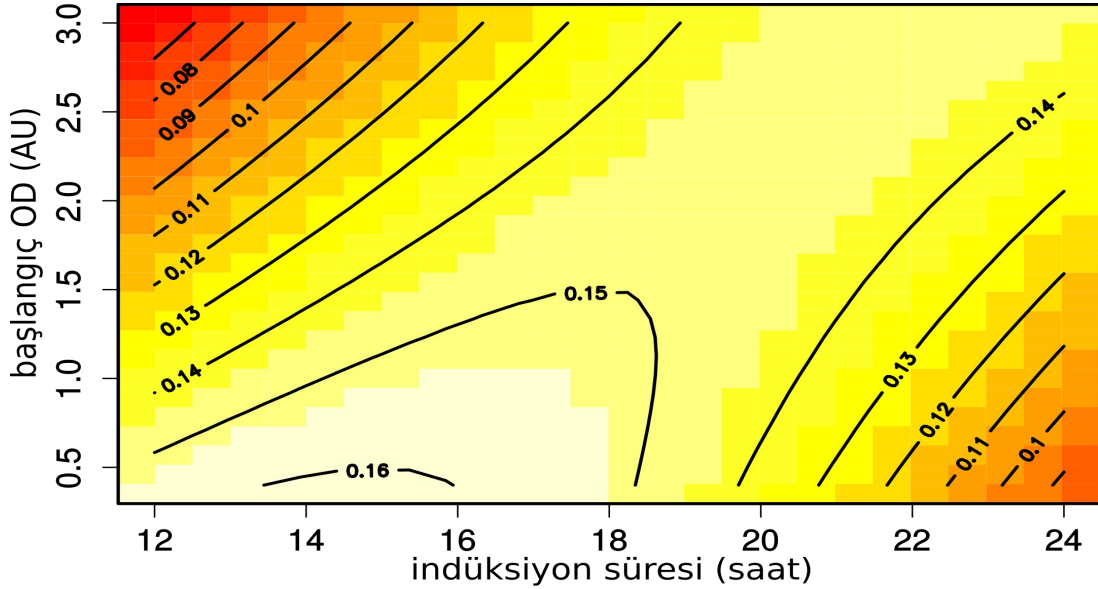
indüksiyon süresi = 18 saat dilimi

Şekil 5.14. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.



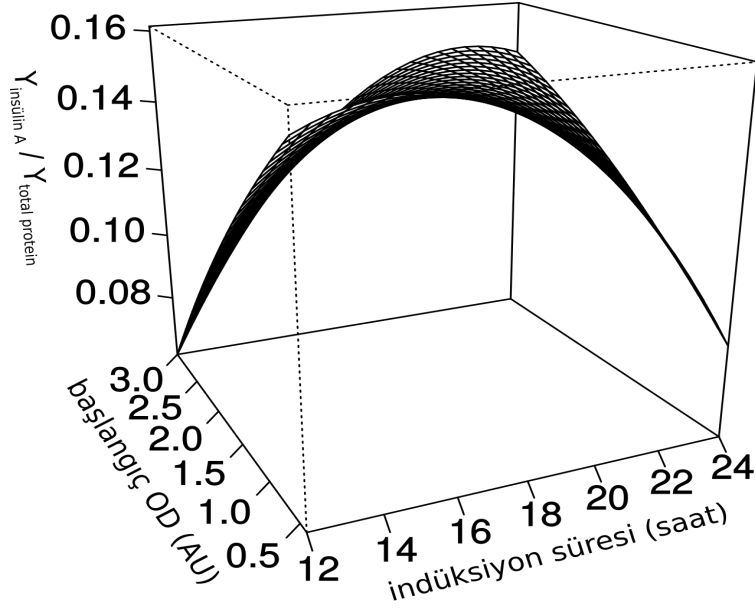
indüksiyon süresi = 18 saat dilimi

Şekil 5.15. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.



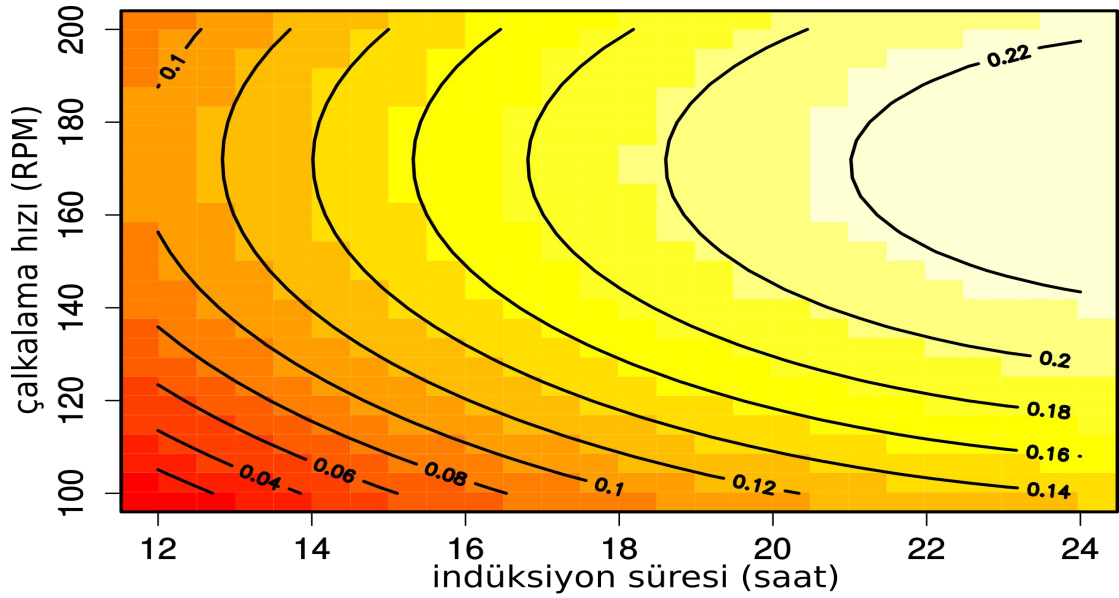
çalkalama hızı = 150 RPM dilimi

Şekil 5.16. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.



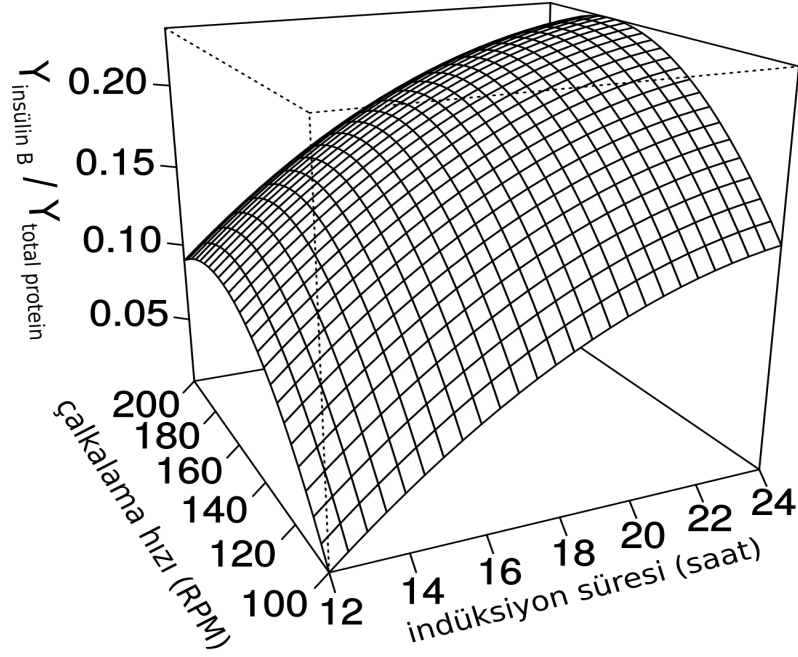
çalkalama hızı = 150 RPM dilimi

Şekil 5.17. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri A füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.



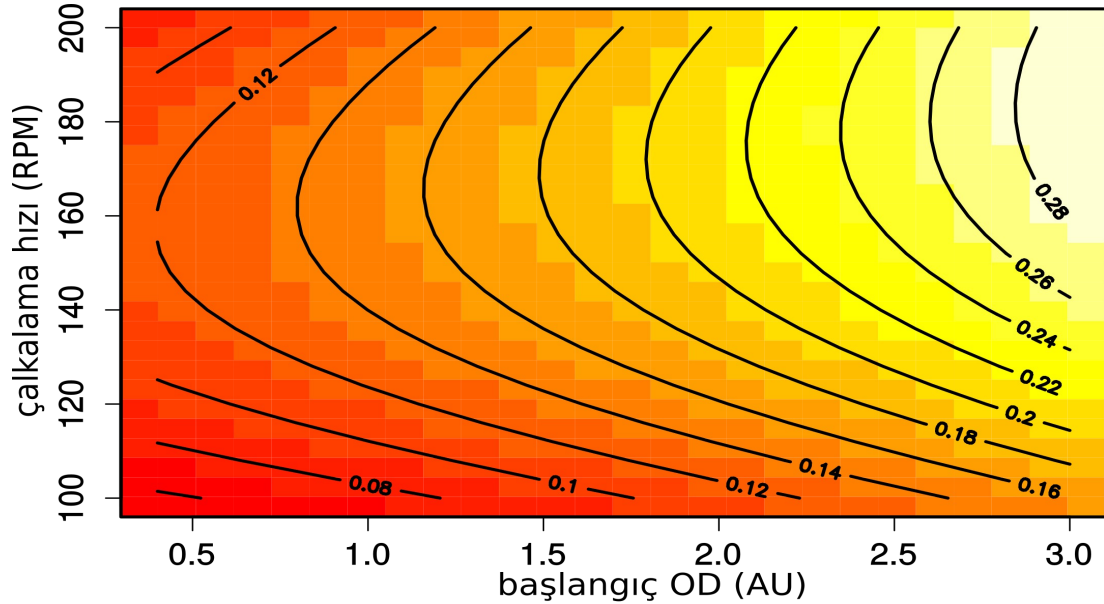
başlangıç OD = 1.7 AU dilimi

Şekil 5.18. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.



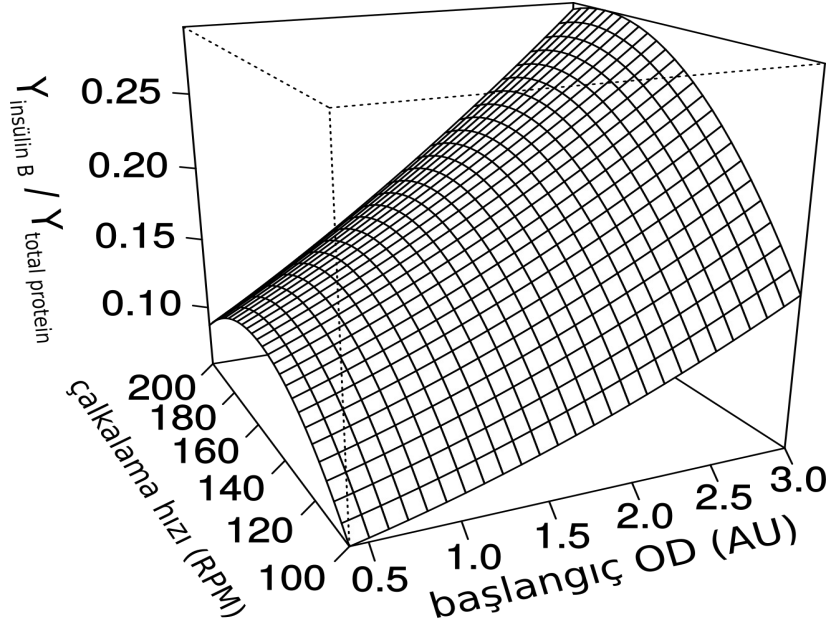
başlangıç OD = 1.7 AU dilimi

Şekil 5.19. Çalkalama hızı ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.

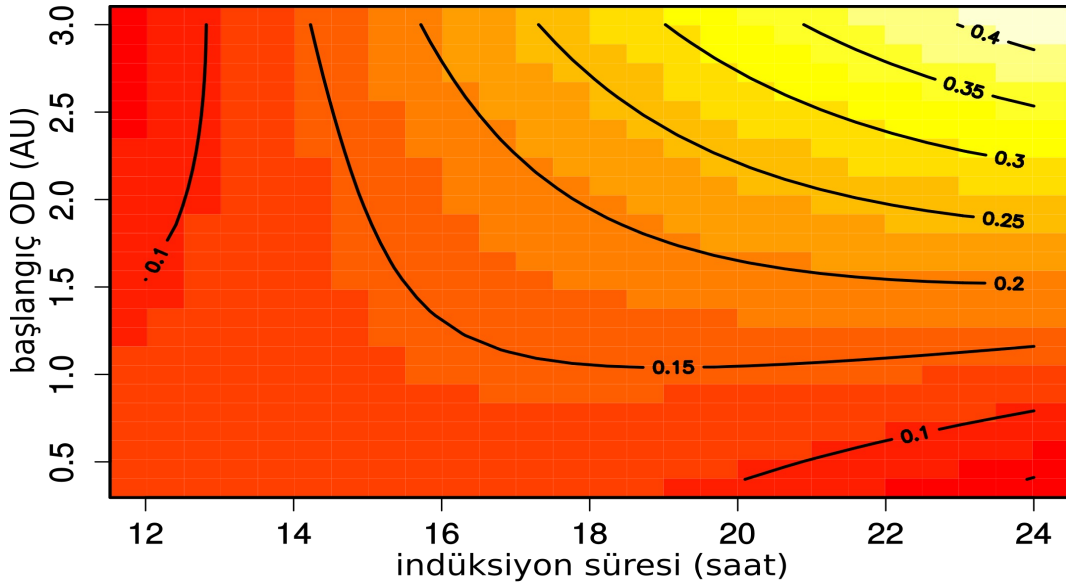


indüksiyon süresi = 18 saat dilimi

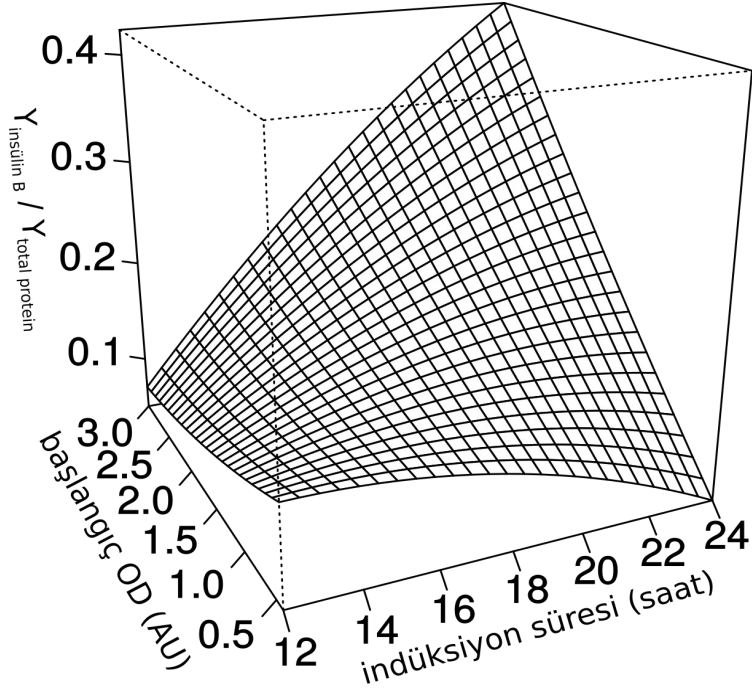
Şekil 5.20. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.



indüksiyon süresi = 18 saat dilimi
Şekil 5.21. Çalkalama hızı ve başlangıç OD'sinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.



çalkalama hızı = 150 RPM dilimi
Şekil 5.22. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin kontür grafiği.

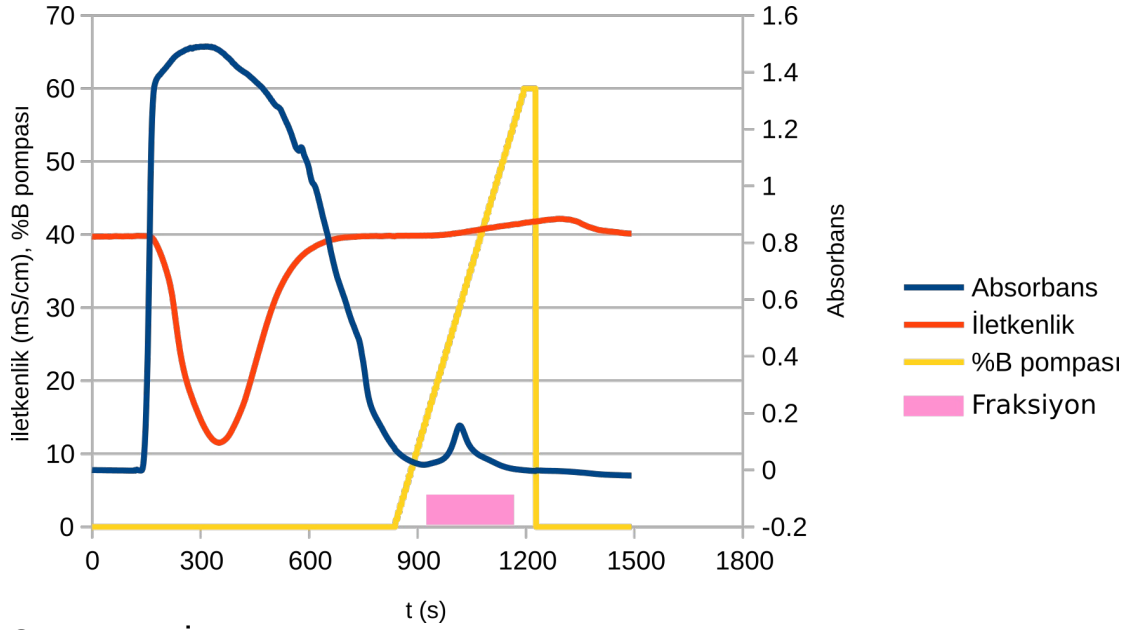


çalkalama hızı = 150 RPM dilimi

Şekil 5.23. Başlangıç OD'si ve indüksiyon süresinin rekombinant insan insülin zinciri B füzyon peptidinin ekspresyon verimi üzerindeki birleşik etkisinin yanıt yüzeyi grafiği.

5.5. İndüklenmiş hücre pelletlerinden izole edilmiş proteinlerin kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi ile saflaştırılması

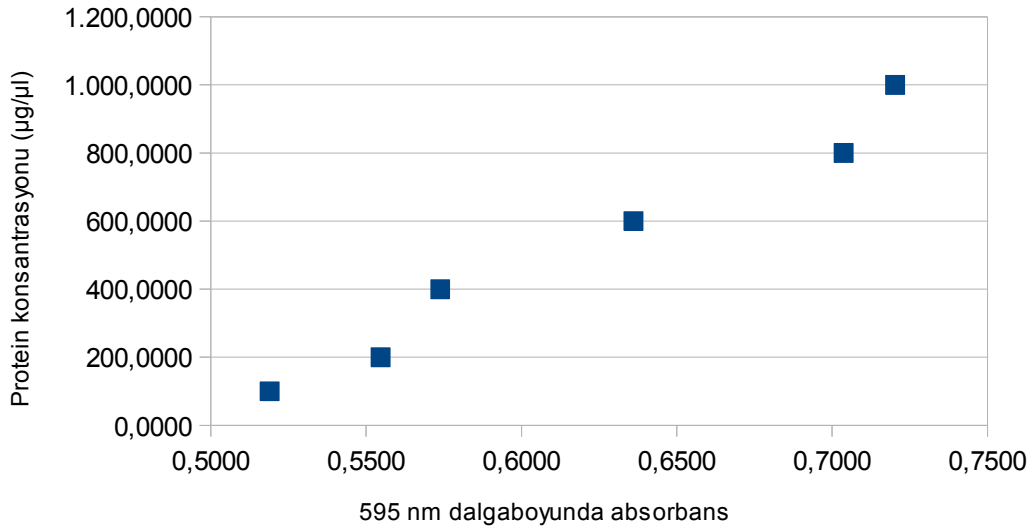
İnsan rekombiant insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerini eksprese eden *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB hücre bankaları ile üretim sürecinin, Plackett – Burman ve Box – Behnken deney tasarımı yöntemlerinden yararlanılarak optimize edilmesinin ardından, füzyon peptidler kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. İmidazol gradiyenti ile elüsyon sırasında 6 x histidin etiketi taşıyan füzyon peptidleri içeren fraksiyonlar toplanmıştır (Şekil 5.24, Şekil 5.25).



Şekil 5.24. İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA pelletlerinden saflaştırılan rekombinant insülin A zinciri füzyon peptidinin kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatogramı. Absorbans 215 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Toplanan fraksiyon, pembe kutu ile işaretlenmiştir.

Şekil 5.25. İndüklenmiş *Escherichia coli* BL21(DE3)/pInsA pelletlerinden saflaştırılan rekombinant insülin B zinciri füzyon peptidinin kobalt immobilize metal şelasyon afinite kromatogramı. Absobans 215 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Toplanan fraksiyon pembe kutu ile işaretlenmiştir.

Elde edilen ürünlerin kantitasyonu için Bradford deneyi gerçekleştirilmiştir. Sığır serum albumini standart protein çözeltileri ile kantitasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 5.26). İnsülin A ve B füzyon peptidleri için sırası ile ortalama 0.595 ± 0.013 ve 0.540 ± 0.005 AU optik yoğunlukta okumalar elde edilmiştir. Buna göre $421.158 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonunda insülin A ve $190.117 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonunda insülin B füzyon peptidi elde edilmiştir. Elde edilen ürünlerin N-terminal füzyon peptidinin sindirilerek uzaklaştırılması için gereken siyanojen bromür konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için insülin A ve B füzyon peptidlerinin molariteleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.11).



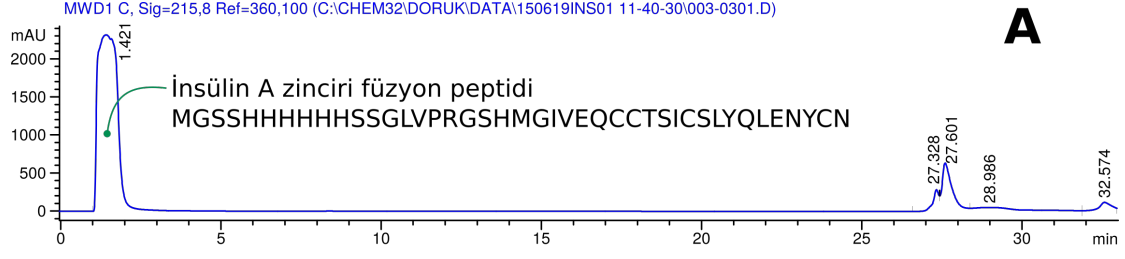
Şekil 5.26. Kromatografik saflaştırma ürünlerinin kantitasyonu için gerçekleştirilen Bradford deneyi standart eğrisi.

Çizelge 5.11. Saflaştırılan rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptid fraksiyonlarının konsantrasyonları.

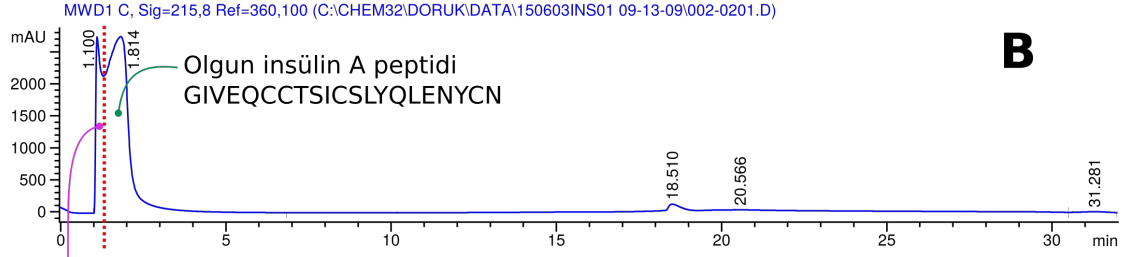
	Moleküler ağırlık (Da/molekül)	Konsantrasyon (µg/µl)	Konsantrasyon (mM)
insülin A zinciri füzyon peptidi	4678,22	421,16	90,06
insülin B zinciri füzyon peptidi	5724,47	190,12	42,08

5.6. Rekombinanti insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin siyanojen bromür ile sindirilerek N-terminal füzyon peptidinin uzaklaştırılması

Bu tez çalışmasında, ekspresyonu gerçekleştirilen ve saflaştırması yapılan rekombinant insan insülin A ve B zinciri füzyon peptidler, siyanojen bromür ile proteolitik olarak sindirilmiştir. Sindirme tepkimesi ürünleri ters faz C18 kolonda %5 – 80 asetonitril gradiyenti ile elüe edilerek analiz edilmiştir. Kolonda retansiyon zamanları sırası ile 1.421 (Şekil 5.27 A) ve 1.380 (Şekil 5.27 C) dakika olarak ölçülen insülin A ve B zinciri füzyon peptidleri, kesim sonrasında 1.814 (Şekil 5.27 B) ve 1.881 (Şekil 5.27 D) dakika retansiyon zamanına sahip olmuşlardır. Kesim sonrasında N-terminal füzyon peptidi kolon çıkışında, daha hidrofilik yapısı nedeni ile, 1.093 – 1.100 retansiyon zamanlı tepe olarak izlenmiştir(Şekil 5.27 B- D). Ayrıca, kesim ürünlerini içeren fraksiyonlar, redüksiyon ve oksidasyon basamağında dimerize edilmek üzere toplanmıştır.

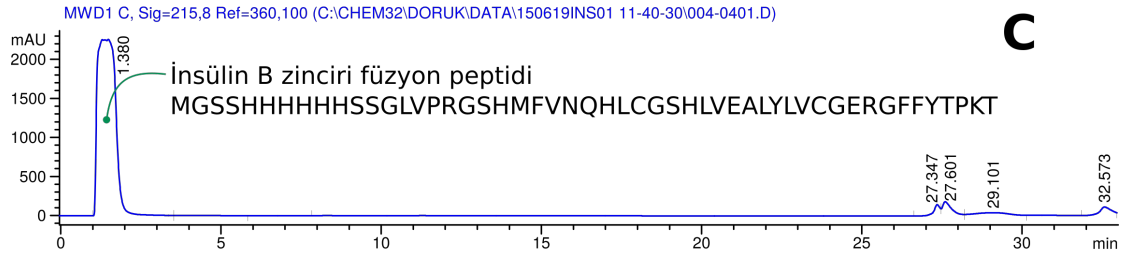


A

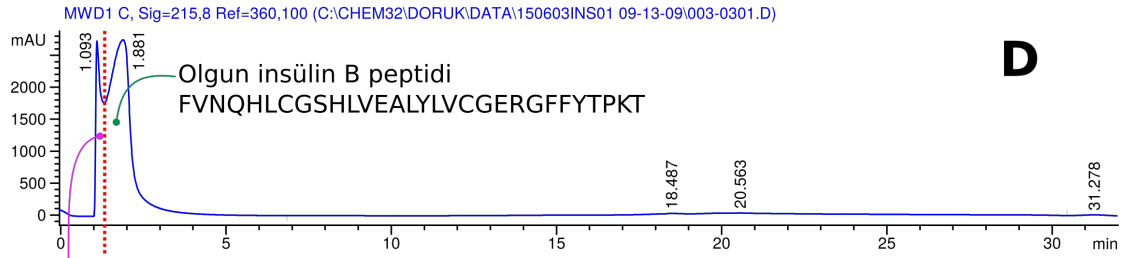


B

M GSSHHHHHHSSGLVPRGSHM



C



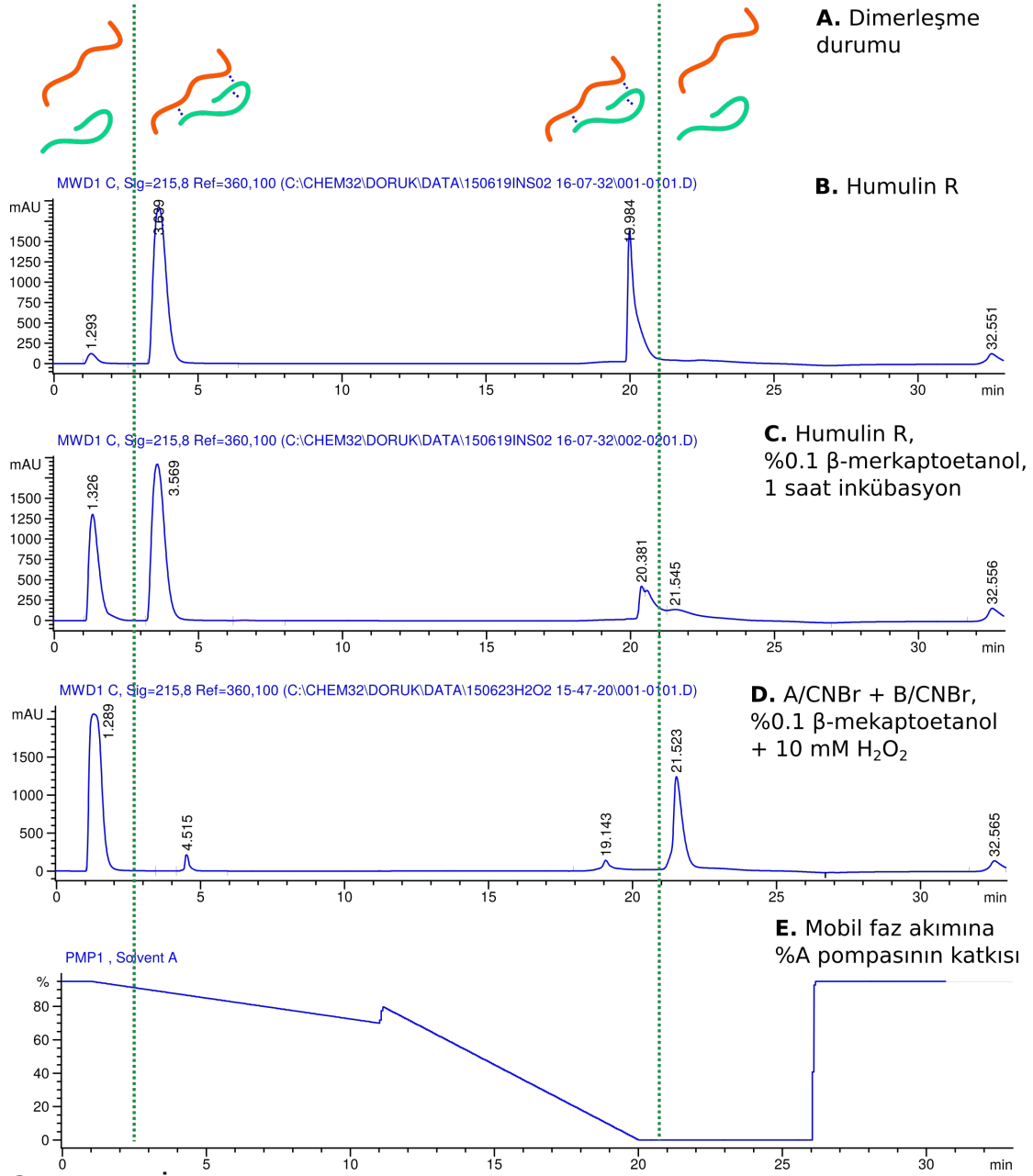
D

M GSSHHHHHHSSGLVPRGSHM

Şekil 5.27. Rekombinant insan insülin A(A) ve B(C) zinciri füzyon peptidleri ile bunların siyanojen bromür kesim ürünlerinin (B, D) ters faz C18 kromatografisi ile analizi.

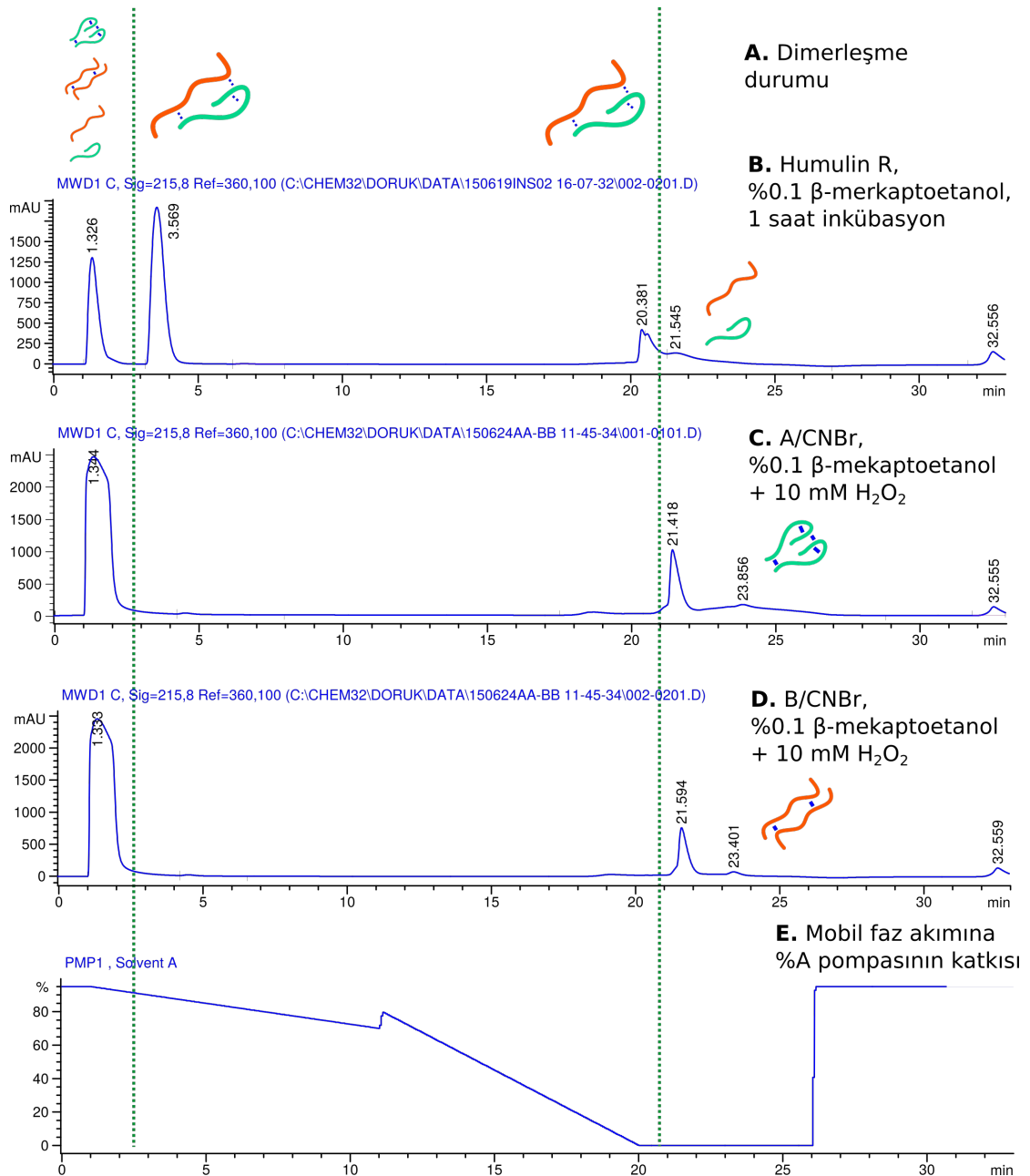
5.7. Rekombinant insülin A ve B peptidlerinin indirgenme ve yükseltgenme tepkimesi ile dimerizasyonu

Siyanojen bromür kesim ürünlerinin ters faz C18 kolon ile saflaştırılmasının ve liyofilizasyon ile konsantre edilmesinin ardından atmosferik oksijen ile spontan olarak homodimerize olmuş insülin zincirleri, 2 mM β -merkaptolanol eklenerek indirgenmiştir. Her bir zincire ait indirgenme ürünü, izomolar konsantrasyonda karıştırılarak 10 mM H_2O_2 ile oksitlenme tepkimesi gerçekleştirilmiştir. İndirgenme – yükseltgenme tepkimesi ürünleri ters faz C18 kolonda su asetonitril gradiyenti ile analiz edilmiştir (Şekil 5.28). Okside (heterodimerik) ve redükte durumdaki insülin moleküllerinin retansiyon zamanları, ticari insülin preparatı Humulin – R'nin nativ ve β -merkaptolanol ile okside formlarının kromatogramlarından yararlanılarak belirlenmiştir. Buna göre, indirgenmiş insülin monomerlerinin 2.5 dakikadan önce ve 21 dakikadan sonra elüe olduğu, oksidasyon sonucu oluşmuş heterodimerlerin ise, 3.5 – 4.5 dakika ile 19.143 – 19.894 dakika retansiyon zamanına sahip iki tepe halinde elüe olduğu saptanmıştır.



Şekil 5.28. İzomolar oranda karıştırılarak oksitlenen indirgenmiş rekombinant insülin A ve B zincirlerinin dimerizasyon ürünlerinin ters faz C18 kromatografisi ile analizi. A: Monomer ve dimerlerin retansiyon zamanı limitleri; B: nativ formda Humulin R; C: indirgenmiş Humulin R; D: siyanojen bromür kesim ürünü insülin A ve B peptidlerinin oksitlenme tepkimesi ürünleri; E: Mobil faz akımına A pompasının katkısı.

Bu tez çalışmasında uygulanan indirgenme – oksidasyon protokolü ile oluşabilecek insülin A – A ve B – B homodimerlerinin analizi için ise hidrojen peroksit, zincirler karıştırılmadan eklenmiş, oluşan ürünler ters faz C18 kromatografisi ile analiz edilmiştir (Şekil 5.29). Monotip insülin zinciri oksitlendiğinde, 1.3 dakika retansiyon zamanlı tepenin kalınlaştığı ve 23.5 dakika dolaylarında geniş bir tepe oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca, heterodimerik moleküller için gözlenen 3.5 – 4.5 dakika ile



Şekil 5.29. İndirgenmiş rekombinant insülin A ya da B peptidlerinin oksidasyon ürünlerinin ters faz C18 kromatografisi ile analizi. A: Monomer ve dimerlerin retansiyon zamanı limitleri; B: indirgenmiş Humulin R; C: insülin A peptidlerinin oksitlenme tepkimesi ürünleri; D: insülin B peptidlerinin oksitlenme tepkimesi ürünleri; E: Mobil faz akımına A pompasının katkısı.

bulunması durumunda sarta bağı ve çok yüksek protein ekspresyon düzeylerine ulaşabilmektedir (61,62). Bu tez çalışmasında ekspresyon konağı olarak *E. coli* BL21(DE3) suşu kullanılmıştır. Plackett – Burman deney tasarımında rekombinant insülin füzyon peptidi ekspresyon verimi yanıt olarak alındığında, yüksek IPTG konsantrasyonlarında indüklemenin düşük konsantrasyonlarda indüklemeye üstün olmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde, Larentis ve diğerleri, yüksek IPTG konsantrasyonlarının fabrika hücrenin protein sentez sistemini doyuma ulaştırdığını, hatta hücrelere zarar verdiğini bildirmiştir (81).

Heterolog rekombinant protein ekspresyonunda nadir kodon sorunu, özellikle endüstriyel amaçlı protein üretiminin önemli darboğazlarından birini oluşturmaktadır (24,82,83) *Escherichia coli*'nin kodon tercihleri göz önüne alındığında, insülin A ve B zincirlerinin bu konak hücre tarafından nadir olarak kullanılan kodonları içerdiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, ekspresyon veriminin olumsuz yönde etkilenmesinin önüne geçmek amacı ile insülin A ve B zincirlerinin N-terminal füzyon peptid ile eksprese edildiği bir tasarım şablonu benimsenmiştir. Bununla birlikte, N-terminal parçanın daha sonra kolaylıkla kesilerek uzaklaştırılabileceği bir tasarım gerçekleştirilmiştir. Rekombinant insülin üretiminde farklı N-terminal füzyon peptidler ile benzer tasarım yaklaşımları bildirilmiştir (84,85). İnsülin üretiminde son ürünün orijinal insülin amino asit dizisi ile farklılık göstermemesi gerekliliği, füzyon peptidin uzaklaştırılması için seçilebilecek proteazları ve füzyon peptidler halinde üretim stratejilerini kısıtlamaktadır.

Nadir kodon sorununu ortadan kaldırmak için alternatif yaklaşımlar arasında, söz konusu tRNA'ların gen kopya sayısını artırmak (86,87) ve hedef proteini kodlayan genin dizisinin *E. coli* kodon tercihine göre düzenlenmesi sayılmaktadır. Bu amaçla, hedefe yönelik mutagenез teknikleri kullanılabileceği gibi, tüm genin sentetik olarak üretilmesi de olanaklıdır (51,88).

Çalışmamızda, öncelikle protein ifadenme düzeylerinde etkili faktörlerin taranması

ve sonrasında ise etkili bulunan faktörlerin yanıt yüzeylerinin modellendiği iki kademeli bir yaklaşım benimsenmiştir.

İlk aşamada, heterolog rekombinant protein ekspresyonu üzerinde etkisi olduğu bilinen besiyeri pH'sı, indüksiyon için kullanılan IPTG konsantrasyonu, indüksiyon süresi, indüksiyon sırasındaki inkübasyon sıcaklığı, indüksiyon başlangıç hücre yoğunluğu faktörlerinden hangilerinin *E. coli* BL21(DE3)/pInsA ve /pInsB hücrelerinin rekombinant insan insülini A ve B zinciri füzyon peptidlerini eksprese etmesinde etkili olduğu taranmıştır (81,82,89,90).

Schein ve arkadaşları, insan proteinlerinin heterolog üretimi için optimal sıcaklık aralığının 30-37 derece olduğunu belirtmişlerdir (91). Bununla birlikte, yeşil floresan protein *E. coli* hücrelerinde ekspresyonunun düşük sıcaklıklarda daha verimli olduğu bildirilmektedir (92). Bu tez çalışmasında da, Plackett – Burman tasarımı ile, rekombinant insan insülin füzyon peptidlerinin ekspresyonunun 37°C sıcaklıkta arttığı saptanmıştır.

Plackett – Burman deney tasarımı ile fabrika hücrelerimizin insülin füzyon peptidi üretimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı diğer bir faktör, indüksiyon sırasında hücrelerin oksijenasyon durumunu belirleyen çalkalama hızıdır. Sadeghi ve arkadaşlarının *E. coli* fabrika hücreleri ile yapmış olduğu çalışmada, çalkalamanın gerekliliği vurgulanırken, çok yüksek hızlarda hücrelerin uğradığı mekanik hasar nedeni ile sürecin olumsuz etkilendiği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında da, Box – Behnken yanıt yüzeyi modellemesi ile insülin A füzyon peptidi için optimal çalkalama hızı 100 – 140 RPM olarak saptanırken, insülin B füzyon peptidinin 160 – 200 RPM hızında çalkama ile daha yüksek ekspresyon verimine ulaştığı belirlenmiştir. İnsülin A zinciri üreten fabrika hücrelerin mekanik hasara daha duyarlı olduğu, insülin B zinciri üretenlerin ise, daha iyi oksijenasyona gereksinim duyduğu düşünülmüştür.

Bakteri hücrelerinin metabolik özelliklerini etkileyen önemli faktörlerden biri de içinde

buldukları kültürün fazıdır. Bu tez çalışmasında, fabrika hücrelerin protein üretimi için indüklendiklerindeki biyokütle yoğunluğunun, ekspresyon verimi üzerinde etkili olduğu Plackett – Burman tarama deney serisinde ve Box – Behnken yanıt yüzeyi modellerinde saptanmıştır. Verimli insülin A füzyon peptidi üretimi için indüklemeye düşük hücre yoğunluğunda başlanması gerekirken, insülin B füzyon peptidi için 3 absorbansa varan optik yoğunluklarda indüklemenin daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen, insülin B peptidi üreten kültürlerin oksijenasyona daha fazla gereksinim duyması da yüksek hücre yoğunluğundan kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, kromatografik saflaştırma sonunda daha düşük miktarda insülin B füzyon peptidi elde edilmesinin nedeni, hücrelerin mekanik hasar ile kaybediliyor olması ile açıklanabilir (7,90,93).

Jensen ve arkadaşları, ortam pH'sının rekombinant protein üretiminde önemli olduğunu bildirmelerine rağmen, bu tez çalışmasında Plackett – Burman deney serisi ile bu faktöre ait bir ana etki gözlenmemiştir (93).

Rekombinant protein üretim verimini belirleyen diğer bir faktör de indüksiyon süresidir. İndüklenmiş bir fabrika hücre kültüründe protein sentez ve yıkım hızı, verimi belirleyen ana bileşenleri oluşturmaktadır. Bunlara ek olarak inklüzyon cismi oluşumu, üretilen proteinleri yıkımdan koruyan faktörler arasında sayılmaktadır (82). Bu tez çalışmasında, maksimal miktarda insülin A füzyon peptidi üretimi için 12 – 18 saatlik indüksiyon süresinin uygun olduğu belirlenmiştir. Maksimal insülin B füzyon peptidi üretimi için ise 24 saatlik inkübasyon süresine gereksinim bulunmaktadır. İnsülin A füzyon peptidinin proteolitik aktiviteye B peptidinden daha duyarlı olduğu, ya da ilerleyen inkübasyon süresi boyunca, insülin B zincirlerinin inklüzyon cismi oluşturmaya A zincirinden daha yatkın olduğu düşünülebilir (63,93,94).

İnsülin üretim sürecinin kolaylaştırılabilmesi, sentez sonrası saflaştırma ve doğru stokiyometri ve konformasyonda disülfid bağı yapmış zincirlere sahip moleküllerin verimli bir şekilde elde edilebilmesine bağlıdır. Bu amaçla bir çok farklı yaklaşım önerilmiştir (94,96,97). Çalışmamızda, zincirlerin füzyon proteinler olarak ayrı ayrı

üretip saflaştırılmasına ve ardından proteolitik kesime uğratarak yeniden saflaştırılmasına, son olarak, indirgenme – yükselgenme ile disülfid bağları oluşturulduktan sonra yeniden saflaştırılmasına dayanan bir strateji uygulanmıştır.

Birçok protein fonksiyonel olabilmek için intramoleküler ya da intermoleküler (alt üniteler arası) disülfid bağlarına gereksinim duymaktadır . Bakteriyel ekspresyon sistemleri, sağladıkları tüm avantajlara karşın, bakteri sitoplazmasının kuvvetli indirgen ortamı nedeni ile üretilen proteinlerde disülfid bağı oluşumunu desteklememektedir. Bu tez çalışmasında rekombinant insan insülin sentezi süreci, insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin bakteriyel sistem ile ayrı fabrika hücreleri ile ekspresyonu, afinite kromatografisi ile saflaştırılması, N-terminal füzyon peptidlerinin uzaklaştırılmasının ardından redüksiyon – oksidasyon kimyası ile insülin A – B heterodimerlerinin oluşturulması ile tamamlanmıştır. Intramoleküler ya da intermoleküler *in vitro* disülfid bağı oluşturulması için bir dizi yöntem tanımlanmıştır. Bunlar arasında, katı faz üzerinde kimyasal olarak sentezlenen peptidlerin kimyasal gruplar ile “korunmuş” sisteinler kullanılarak sentezlenmesi, sonrasında kimyasal yöntemler ile “deprotection” yapılarak disülfid bağlarının oluşturulması da yer almaktadır . Ancak, bu tür yaklaşımlar yüksek maliyetler ve teknik zorluklar içerdikleri için kitlesel üretime uygun değildir. Bu tez çalışmasında, üretim süreçleri ile de uyumlu, zayıf indirgen (β -merkaptöetanol) ve yükseltgenin (H_2O_2) kullanıldığı, “disülfid bağı yer değiştirme” stratejisi tercih edilmiştir .

Son ürün analiz edildiğinde, insülin A-A ve B-B homodimer oluşumunun göz ardı edilebilecek düzeyde olduğu, ancak A-B heterodimer oluşumunun ticari regüler insülin preparatına göre verimsiz olduğu belirlenmiştir. Disülfid bağı oluşumunun veriminin artırılması için, bu tez çalışmasında mikrobiyal ekspresyon için yapıldığı gibi fraksiyonel faktöryel deney tasarımı ve yanıt yüzeyi modellemesi yöntemlerinin uygulanması önerilebilir.

Birçok protein fonksiyonel olabilmek için intramoleküler ya da intermoleküler (alt üniteler arası) disülfid bağlarına gereksinim duymaktadır (98,99). Bakteriyel ekspresyon

sistemleri, sağladıkları tüm avantajlara karşın, bakteri sitoplazmasının kuvvetli indirgen ortamı nedeni ile üretilen proteinlerde disülfid bağı oluşumunu desteklememektedir (2). Bu tez çalışmasında rekombinant insan insülin sentezi süreci, insülin A ve B zinciri füzyon peptidlerinin bakteriyel sistem ile ayrı fabrika hücreleri ile ekspresyonu, afinite kromatografisi ile saflaştırılması, N-terminal füzyon peptidlerinin uzaklaştırılmasının ardından redüksiyon – oksidasyon kimyası ile insülin A – B heterodimerlerinin oluşturulması ile tamamlanmıştır. Intramoleküler ya da intermoleküler *in vitro* disülfid bağı oluşturulması için bir dizi yöntem tanımlanmıştır. Bunlar arasında, katı faz üzerinde kimyasal olarak sentezlenen peptidlerin kimyasal gruplar ile “korunmuş” sisteinler kullanılarak sentezlenmesi, sonrasında kimyasal yöntemler ile “deprotection” yapılarak disülfid bağlarının oluşturulması da yer almaktadır (80). Ancak, bu tür yaklaşımlar yüksek maliyetler ve teknik zorluklar içerdikleri için kitlesel üretime uygun değildir. Bu tez çalışmasında, üretim süreçleri ile de uyumlu, zayıf indirgen (β -merkaptöetanol) ve yükseltgenin (H_2O_2) kullanıldığı, “disülfid bağı yer değiştirme” stratejisi tercih edilmiştir (79,100).

Son ürün analiz edildiğinde, insülin A-A ve B-B homodimer oluşumunun göz ardı edilebilecek düzeyde olduğu, ancak A-B heterodimer oluşumunun ticari regüler insülin preparatına göre verimsiz olduğu belirlenmiştir. Disülfid bağı oluşumunun veriminin artırılması için, bu tez çalışmasında mikrobiyal ekspresyon için yapıldığı gibi fraksiyonel faktöryel deney tasarımı ve yanıt yüzeyi modellemesi yöntemlerinin uygulanması önerilebilir.

6.1. Sonuç

Rekombinant insan insülini üretimi için

- A ve B zinciri füzyon peptidlerini eksprese eden ayrı hücre bankalarının oluşturulduğu,
- bakteriyel ekspresyonun fraksiyonel faktöryel deney tasarımı ve yanıt yüzeyi

modellemesi ile optimize edildiği,

- her iki insülin füzyon peptidinin saflaştırılıp sindirilerek insülin A ve B peptidlerinin elde edildiği,
- insülin A ve B peptidlerinin arasında, kitlesel üretim süreçleri ile uyumlu bir indirgenme – yükseltgenme kimyası ile disülfid bağı oluşturulduğu

bu tez çalışmasında, çalkalama hızının, indüksiyonun başlangıç biyokütle hücre yoğunluğunun ve indüksiyon süresinin bakteriyel protein ekspresyonunda etkili olduğu bulunmuştur. Ekspresyon düzeylerinin artırılması için kodon optimizasyonu *Escherichia coli*'ye göre yapılmış ekspresyon vektörleri kullanılması ve in vitro disülfid bağı oluşumunun deney tasarımı ile optimize edilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

1. T.C., BİLİM, SANAYİ VE TEKNOLOJİ BAKANLIĞI. Ulusal-Biyoteknoloji-Ar-Ge-ve-Yenilik-Stratejisi-ve-Eylem-Planı.doc [Internet]. [kaynak 24 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://teknokent.istanbul.edu.tr/wp-content/uploads/2014/12/Ulusal-Biyoteknoloji-Ar-Ge-ve-Yenilik-Stratejisi-ve-Eylem-Plan%C4%B1.doc>
2. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnol Adv.* Ekim 2012;30(5):1102–7.
3. Baker EN, Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, Dodson EJ, Dodson GG, vd. The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 06 Temmuz 1988;319(1195):369–456.
4. Bhatia E, Aggarwal A. Insulin therapy for patients with type 1 diabetes. *J-Assoc PHYSICIANS INDIA.* 2007;55(L):29.
5. Jia X-Y, Guo Z-Y, Wang Y, Xu Y, Duan S-S, Feng Y-M. Peptide models of four possible insulin folding intermediates with two disulfides. *Protein Sci Publ Protein Soc.* Kasım 2003;12(11):2412–9.
6. History of insulin [Internet]. Big Picture. [kaynak 24 Mayıs 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://bigpictureeducation.com/history-insulin>
7. Yuzyilin_Molekulu_Insulin.pdf [Internet]. [kaynak 24 Mayıs 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: http://vizyon21yy.com/documan/genel_konular/bilim_teknoloji/Bil_ve_Tekn_Ta_rihi/Yuzyilin_Molekulu_Insulin.pdf
8. Frederick Sanger | biography - British biochemist [Internet]. Encyclopedia Britannica. [kaynak 24 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://global.britannica.com/biography/Frederick-Sanger>
9. King H. WHO and the International Diabetes Federation: regional partners. *Bull-WORLD Health Organ.* 1999;77(12):954–954.

10. The Telegraph. Rosalyn Yalow [Internet]. 2011 [kaynak 24 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.telegraph.co.uk/news/obituaries/8553122/Rosalyn-Yalow.html>
11. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin-History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. J-Assoc PHYSICIANS INDIA. 2007;55(L):19.
12. Insulin.pdf [Internet]. [kaynak 24 Mayıs 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/fatma-ezel-uslu/Insulin.pdf>
13. Sağlık Bakanlığı. Türkiye diyabet önleme ve kontrol programı: eylem planı (2011-2014). Ankara: Sağlık Bakanlığı; 2011.
14. Zimmet P, Williams J. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care. Ocak 2010;33(Suppl 1):S62–9.
15. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pract. Aralık 2011;94(3):311–21.
16. Türkiye Diyabet Vakfı. DİYABET REHBERİ 2013.pdf [Internet]. [kaynak 24 Mayıs 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.turkdiab.org/i/2013/D%C4%B0YABET%20REHBER%C4%B0%202013.pdf>
17. Rabson-Mendenhall syndrome [Internet]. Genetics Home Reference. 2015 [kaynak 05 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/rabson-mendenhall-syndrome>
18. Dr.Seyfettin Uludağ. GEBELİKDE DİYABET TANI VE YÖNETİM 2013 49 Diyabet Kongresi [Internet]. [kaynak 05 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.diabetcemiyeti.org/var/cdn/8/2/seyfettin-uludag.pdf>
19. Souza AMF de, López JA. Insulin or Insulin-Like Studies on Unicellular Organisms: A Review. Braz Arch Biol Technol. Kasım 2004;47(6):973–81.
20. T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI OKMEYDANI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ. dr_ebru_onuker_basaran.pdf [Internet]. [kaynak 02 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/aile_hekimligi/dr_ebru_onuker_basaran.pdf
21. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı. Tip 2 DİYABET [Internet]. [kaynak 05 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://hastane.omu.edu.tr/saglikli-bilgiler/endokrin-belgeler/T%C4%B0P%202%20D%C4%B0YABET.pdf>
22. Balbás P, Lorence A. Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols. Springer Science & Business Media; 2004. 505 p.

23. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. Ekim 1999;10(5):411–21.
24. Otto CM, Niagro F, Su X, Rawlings CA. Expression of recombinant feline tumor necrosis factor is toxic to *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol*. Kasım 1995;2(6):740–6.
25. Laura A. Palomares SE-M. Production of Recombinant Proteins [Internet]. [kaynak 24 Mayıs 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloadaddocument/9781588292629-c2.pdf?SGWID=0-0-45-396816-p173727940
26. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol*. Nisan 2002;13(2):117–23.
27. Jiechao Yin GL. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol*. 2007;127(3):335–47.
28. Tanhauser SM, Jewell DA, Tu CK, Silverman DN, Laipis PJ. A T7 expression vector optimized for site-directed mutagenesis using oligodeoxyribonucleotide cassettes. *Gene*. 01 Ağustos 1992;117(1):113–7.
29. Jensen PR, Hammer K. Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol Bioeng*. 20 Nisan 1998;58(2-3):191–5.
30. Paulsson J, Ehrenberg M. Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Q Rev Biophys*. Şubat 2001;34(1):1–59.
31. Ciftci IH, Asik G. Antibiotic Resistance Mechanisms of *Acinetobacter baumannii*. *ANKEM Derg*. 01 Kasım 2011;25(3):196–207.
32. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. DNA Cloning with Plasmid Vectors. 2000 [kaynak 05 Haziran 2015]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/>
33. Howard LA, Ortlepp SA. Construction of cloning/sequencing vectors with an alternative polylinker. *BioTechniques*. Ekim 1989;7(9):940–2.
34. Ramos CRR, Abreu P a. E, Nascimento ALTO, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*. Ağustos 2004;37(8):1103–9.
35. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 05 Mayıs 1986;189(1):113–30.

36. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 26 Ocak 2005;115(2):113–28.
37. Healthcare GE. Affinity chromatography principles and methods. 2007 [kaynak 16 Mayıs 2015]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://ir.nmu.org.ua/handle/123456789/130822>
38. afinite.ppt.
39. 401-Biochemistry Laboratory - Modern Theory and Techniques (2nd Edition)-Rodney F. Boyer-01360430.pdf.
40. Zhang Z, Kou X, Fugal K, McLaughlin J. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. *J Agric Food Chem.* 25 Şubat 2004;52(4):688–91.
41. Qian H-Y. HPLC in Clinical Chemistry. *Yale J Biol Med.* 1991;64(4):411–2.
42. Plackett RL, Burman JP. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika.* 01 Haziran 1946;33(4):305–25.
43. Fisher SRA, Genetiker S, Fisher RA, Genetician S, Fisher RA, Généticien S. The design of experiments [Internet]. Oliver and Boyd Edinburgh; 1960 [kaynak 24 Haziran 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <https://www.etcases.com/media/cnews/1420782013117205015.pdf>
44. Keskin Gündoğdu T, Deniz I, Çalışkan G, Sahin ES, Azbar N. Experimental design methods for bioengineering applications. *Crit Rev Biotechnol.* 06 Kasım 2014;1–21.
45. Marini G, Luchese MD, Argondizzo APC, Góes ACMA de, Galler R, Alves TLM, vd. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli* and preliminary purification process. *BMC Biotechnol.* 09 Ocak 2014;14(1):1–13.
46. Kumar A, Prasad B, Mishra IM. Optimization of process parameters for acrylonitrile removal by a low-cost adsorbent using Box–Behnken design. *J Hazard Mater.* 15 Ocak 2008;150(1):174–82.
47. Sambrook, Joseph, and David William Russell. *molecularprotocols.pdf* [Internet]. [kaynak 03 Temmuz 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://140.226.22.38/DERC/protocols/molecularprotocols.pdf>
48. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001. 778 p.

49. John T. Lis RS. Size fractionation of double -stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol [Internet]. [kaynak 03 Temmuz 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://gene.bio.jhu.edu/Ourspdf/19.pdf>
50. Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* 25 Mart 1991;19(6):1346.
51. Tian H, Hühmer AF, Landers JP. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Anal Biochem.* 01 Ağustos 2000;283(2):175–91.
52. Carter MJ, Milton ID. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res.* 25 Şubat 1993;21(4):1044.
53. Huss VA, Festl H, Schleifer KH. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol.* 1983;4(2):184–92.
54. Spectrophotometer for nucleic acid measurements [Internet]. Wikipedia, the free encyclopedia. 2015 [kaynak 03 Temmuz 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Spectrophotometer_for_nucleic_acid_measurements&oldid=651873701
55. Sambrook Joseph DWR. Agarose Gel Electrophoresis.” In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, [Internet]. [kaynak 03 Temmuz 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/jczs/ml-introduction/content.pdf>
56. Sambrook J, Russell DW. *The Basic Polymerase Chain Reaction. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* CSHL Press; 2001. s. 8.18–8.24.
57. Chung CT, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 25 Nisan 1988;16(8):3580.
58. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nisan 1989;86(7):2172–5.
59. Engin AB, Karahalil B, Engin A, Karakaya AE. DNA repair enzyme polymorphisms and oxidative stress in a Turkish population with gastric carcinoma. *Mol Biol Rep.* Kasım 2011;38(8):5379–86.
60. França LTC, Carrilho E, Kist TBL. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys.* 2002;35(02):169–200.
61. Mairhofer J, Scharl T, Marisch K, Cserjan-Puschmann M, Striedner G. Comparative Transcription Profiling and In-Depth Characterization of Plasmid-Based and Plasmid-Free *Escherichia coli* Expression Systems under Production

- Conditions. *Appl Environ Microbiol*. Haziran 2013;79(12):3802–12.
62. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl Environ Microbiol*. Temmuz 2011;77(13):4634–46.
 63. Golovanov AP, Hautbergue GM, Wilson SA, Lian L-Y. A Simple Method for Improving Protein Solubility and Long-Term Stability. *J Am Chem Soc*. 01 Temmuz 2004;126(29):8933–9.
 64. Tsumoto K, Abe R, Ejima D, Arakawa T. Non-Denaturing Solubilization of Inclusion Bodies. *Curr Pharm Biotechnol*. 01 Nisan 2010;11(3):309–12.
 65. Hejazi SM, Erfan M, Mortazavi SA. Precipitation Reaction of SDS and Potassium Salts in Flocculation of a Micronized Megestrol Acetate Suspension. *Iran J Pharm Res IJPR*. 2013;12(3):239–46.
 66. Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T, Tsumoto K. Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. *Biochem Biophys Res Commun*. 10 Nisan 2009;381(3):306–10.
 67. Jones GD, Wilson MT, Darley-Usmar VM. A method for the preparation of low-pH dodecyl sulphate/polyacrylamide-gradient gels. *Biochem J*. 01 Mart 1981;193(3):1013–5.
 68. Tricine-SDS-PAGE: Article: Nature Protocols. *Nat Protoc*. Haziran 2006;1(1):16–22.
 69. Mahmood T, Yang P-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North Am J Med Sci*. Eylül 2012;4(9):429–34.
 70. Papanephytous CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expr Purif*. Şubat 2014;94:22–32.
 71. Ulrike Grömping. R Package FrF2 for Creating and Analyzing Fractional Factorial 2-Level Designs. *J Stat Softw*. 2014;56(1):1–56.
 72. Chou CP. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 01 Eylül 2007;76(3):521–32.
 73. Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ. Framework for the Rapid Optimization of Soluble Protein Expression in *Escherichia coli* Combining Microscale Experiments and Statistical Experimental Design. *Biotechnol Prog*. 01 Ocak 2007;23(4):785–93.

74. Rasch D, Pilz J, Verdooren R, Gebhardt A. Optimal Experimental Design with R. *J Stat Softw.* Ekim 2011;43(5):1–4.
75. Abramoff, M.D M, Paulo J, Ram, Sunanda J. Image Processing with Imagej [Internet]. [kaynak 06 Temmuz 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://dspace.library.uu.nl/bitstream/handle/1874/204900/ImageJ.pdf?sequence=1>
76. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 07 Mayıs 1976;72(1–2):248–54.
77. Yaroslav A Andreev SAK. Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. *Anal Biochem.* 2010;407(1):144–6.
78. Muller R. The Formation of Hydrogen Peroxide During Oxidation of Thiol-Containing Proteins. *J Inst Brew.* 10 Eylül 1997;103(5):307–10.
79. Tam JP, Wu CR, Liu W, Zhang JW. Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *J Am Chem Soc.* 01 Ağustos 1991;113(17):6657–62.
80. Yang Y, Sweeney WV, Schneider K, Chait BT, Tam JP. Two-step selective formation of three disulfide bridges in the synthesis of the C-terminal epidermal growth factor-like domain in human blood coagulation factor IX. *Protein Sci Publ Protein Soc.* Ağustos 1994;3(8):1267–75.
81. Larentis AL, Nicolau JFMQ, Esteves G dos S, Vareschini DT, de Almeida FVR, dos Reis MG, vd. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Res Notes* [Internet]. 25 Eylül 2014 [kaynak 07 Temmuz 2015];7. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4190419/>
82. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* [Internet]. 17 Nisan 2014 [kaynak 07 Temmuz 2015];5. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029002/>
83. Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res GMR.* 2011;10(1):519–25.
84. Cho CW, Park SH, Nam DH. Production and purification of single chain human insulin precursors with various fusion peptides. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 01 Nisan 2001;6(2):144–9.
85. Berg H, Walter M, Mauch L, Seissler J, Northemann W. Recombinant human

- preproinsulin expression, purification and reaction with insulin autoantibodies in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol Methods*. 15 Eylül 1993;164(2):221–31.
86. Rosano GL, Ceccarelli EA. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb Cell Factories*. 2009;8:41.
 87. Jacinto-Loeza E, Vivanco-Domínguez S, Guarneros G, Hernández-Sánchez J. Minigene-like inhibition of protein synthesis mediated by hungry codons near the start codon. *Nucleic Acids Res*. Ağustos 2008;36(13):4233–41.
 88. Shenoy AR, Visweswariah SS. Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal Biochem*. 15 Ağustos 2003;319(2):335–6.
 89. Mahalik S, Sharma AK, Mukherjee KJ. Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories* [Internet]. 19 Aralık 2014 [kaynak 07 Temmuz 2015];13. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4300154/>
 90. Vernet E, Kotzsch A, Voldborg B, Sundström M. Screening of genetic parameters for soluble protein expression in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. Mayıs 2011;77(1):104–11.
 91. Schein CH. Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nat Biotechnol*. Kasım 1989;7(11):1141–9.
 92. Tsien RY. The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67(1):509–44.
 93. Jensen PR, Hammer K. The Sequence of Spacers between the Consensus Sequences Modulates the Strength of Prokaryotic Promoters. *Appl Environ Microbiol*. Ocak 1998;64(1):82–7.
 94. Schmidt M, Babu K, Khanna N, Marten S, Rinas U. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. ubat 1999;68(1):71–83.
 95. Kramer RM, Shende VR, Motl N, Pace CN, Scholtz JM. Toward a Molecular Understanding of Protein Solubility: Increased Negative Surface Charge Correlates with Increased Solubility. *Biophys J*. 18 Nisan 2012;102(8):1907–15.
 96. Chung Woo Cho SHP. Production and purification of single chain human insulin precursors with various fusion peptides. 2001;6(2):144–9.
 97. Leng C, Li Q, Wu F, Chen L, Su P. Detection of the Single-Chain Precursor in the Production and Purification Process of Recombinant Human Insulin.

- Monoclon Antibodies Immunodiagn Immunother. Ağustos 2013;32(4):255–61.
98. Wall JS. Disulfide bonds. Determination, location, and influence on molecular properties of proteins. *J Agric Food Chem.* Temmuz 1971;19(4):619–25.
 99. Woycechowsky KJ, Raines RT. Native Disulfide Bond Formation in Proteins. *Curr Opin Chem Biol.* Ekim 2000;4(5):533.
 100. Young-Jin S, Kim C-K, Choki B-T, Park Y-C, Seon J-H. Effects of β -Mercaptoethanol and Hydrogen Peroxide on Enzymatic Conversion of Human Proinsulin to Insulin. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(5):983–9.

EKLER

EK 1 – Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler

EK 2 – Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler

EK 3 – Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri

EK 4 – Tez Deneylerinde Kullanılan R-Kodları

EK 1 – Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler

Malzemenin Adı	Markası	Katalog Numarası	Kullanım Amacı
Agar (bakteriyel)	Bioshop	#AGR001.1	Besiyeri hazırlanması
Agaroz	Bioshop	#AGA001.500	Jel Elektroforezi
Akrilamid	Bioshop	#ACR001.500	Jel Elektroforezi
Amonyum persülfat (APS)	Bioshop	#AMP001.25	Jel Elektroforezi
Bisakrilamid	Bioshop	#BIS001.100	Jel Elektroforezi
Borik Asit	Bioshop	#BOR001.1	Tampon hazırlama
Brom fenol mavisi (BPB)	Bioshop	#BRO777.25	Tampon hazırlama
Commassie Brilliant Blue R-250	Bioshop	#CBB250.25	Jel Elektroforezi
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Bioshop	#DMS555.500	Transformasyon
EDTA	Bioshop	#EDT001.1	Tampon hazırlama
Etidyum bromür	Bioshop	#ETB333.5	Jel Elektroforezi
Etanol	Tekkim	TK.200655.0250 0	Genel kullanım
Etanol	JT Baker	8462	Genel kullanım
Etanol (masa alkolü)			Temizlik
Fenol kloroform izoamil alkol	Amresco	K169-400ML	DNA İzolasyonu
Glasiyal asetik asit	Riedel	27225	Tampon hazırlama
Glasiyal asetik asit	Tekkim	TK.010030.0250 0	Tampon hazırlama

Glasiyal asetik asit	Bioshop	#ACE222.1	Tampon hazırlama
Gliserol	Bioshop	#GLY002.1	Tampon hazırlama
Glisin	Bioshop	#GLN001.1	Tampon hazırlama
Glisin USP/BP	Kimetsan	#KIM- GLN/01CP/1205 18	Tampon hazırlama
D(+) Glukoz monohidrat	Aklar		Besiyeri hazırlama
Guanidyum (guanidine thiocyanate)	Fluka	50980	DNA İzolasyonu / Saflaştırma
Guanidyum (guanidine thiocyanate)	Sigma	#G9277	DNA İzolasyonu / Saflaştırma
IPTG			Protein ekspresyonu
İsopropanol	Tekkim	TK.090250.0250 0	Genel kullanım
İsopropanol	Fisher Bioreagents	#UN1219	Genel kullanım
Kanamisin	Vetap		Antibiyotik
Luria Bertani besiyesi (LB Broth)	Bioshop	#LBL405.1	Besiyeri hazırlama
Maya özütü (granüle)	Merck	1.03753.0500	Besiyeri hazırlama
Maya özütü (toz)	Bioshop	#YEX401.1	Besiyeri hazırlama
Magnezyum klorür (MgCl ₂ .6H ₂ O)	Acros	#413415000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck	1.05882.2500	Besiyeri / Tampon hazırlama
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Acros	#213115000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Fischer Scientific	BP358-1	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Amresco	x190-1KG	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum asetat (NaOAC)	Riedel	25022	DNA İzolasyonu

Sodyum hidroksit (NaOH)	Riedel	06203	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum hidroksit (NaOH)	Fischer Scientific	BP359-500	Besiyeri / Tampon hazırlama
PBS			Genel kullanım
Polietilen glikol (PEG) 6000	Bioshop	#PEG600.1	Transformasyon
Pepton (bakteriyolojik)	Conda Pronadisa	1616.00	Besiyeri hazırlama
Pepton (bakteriyolojik)	Bioshop	#YEX401.1	Besiyeri hazırlama
Potasyum asetat	Fischer Scientific	#P/3760/60	Tampon hazırlama
Potasyum klorür	Merck	1.04936.1000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Potasyum fosfat	Acros	#215470010	Tampon hazırlama
ProteinazK			Protein izolasyonu
SDS (sodyum dodesil sülfat)	Bioshop	#SDS001.100	Tampon hazırlama
Süttozu	Pýnar		PAGE Belirteci
TEMED	Amresco	#0761-50ML	Jel Elektroforezi
Tris (hidrometil) aminometan	Bioshop	#TRS001.1	Tampon hazırlama
Trizma Baz	Sigma	T1503-1KG	Tampon hazırlama
Tris hidroklorür	Bioshop	#TRS002.500	Tampon hazırlama
Tripton	Conda Pronadisa	1612.00	Besiyeri hazırlama
Triton			Protein izolasyonu

EK 2 – Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler

Wizard® PCR Preps DNA Purification system	Promega	#A2180	Safılaştırma
Pierce™ Blue Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix	Thermo Scientific	#26681	SDS-PAGE belirteci
Taq polymerase	Sibenzyme	#E341	PCR/PZT
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega	#M820B	Defosforilasyon
EcoRI Restriction Endonuclease	New England BioLabs (NEB)	#R0101S	Restriksiyon endonükleaz kesimi
T4 DNA Ligase	Fermentas	#EL0014	Ligasyon
Dnase I, Rnase-free	Thermo Scientific	#EN0521	DNA'dan arındırma

EK 3 – Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri

Kullanılan Cihaz	Markası	Katalog Numarası
Çalkalamalı İnkübator	SheaLab	SL
Buz Makinesi	Scotsman	AF80
Soğutmalı Santrifüj (KÜÇÜK)	Thermo	IEC MICROCL 17R Centrifuge
Soğutmalı Santrifüj (ORTA)	Sigma	3K30
Soğutmalı Santrifüj (BÜYÜK)	Beckman Coulter	Allegra X-15R Centrifuge
Orbital Shaker	FinePCR	SH30

Shaker (JEL)	Heidolph	Unimax 1010
Thermal Cycler (BIOMETRA)	Biometra	Thermocycler
Thermal Cycler (BIORAD)	BioRad	DNA Engine Gradient Cycler
Spektrofotometre	BioRad	
Nanodrop	NanoDrop	ND-1000
Versadoc Görüntüleme Sistemi	BioRad	VersaDoc Imaging System
Agaroz Elektroforez	Thermo	owl
Page	BioRad	Mini Protean Tetra System
İnkübatör	Binder	
İki Yana Çalkalamalı Shaker	Daigger Rocker	
Ph Metre	Hanna instruments HI221	
Ph Metre Kağıdı	Sigma	P-4661
Ph Metre Kağıdı	Merck	1.09535.0001
Realtime Cihazı	Roche	Light Cycler 480
Su Cihazı	Millipore	ELIX + MilliQ (Gradient)
Su Banyosu	Lab Line	Aquabath
Kuru Isı Bloğu	MS Major Science Dry Bath Incubator	
Mikroskop	Leica	DM LS2
Floresan Mikroskop	Zeiss	Axio Version 4.3

		Imager M1
Otoklav	ALP	
Vorteks	Labnet	VX100
Pastör Fırını	Memmert	
Tartı	Shimadzu	AX200 / BX320H
Magnetik Karıştırıcı	Cimarec	
Sonikatör	Sonics	Vibra Cell

EK 4 – Tez Deneylerinde Kullanılan R-Kodları

```
# TODO: Add comment
```

```
#
```

```
# Author: cerencan
```

```
#####
```

```
library("RrF2")
```

```
# factors with predefined levels
```

```
factorNamesL = list(temp = c(22, 37),
```

```
  pH = c(5.5, 7.5),
```

```
  iptg = c(0.02, 0.2),
```

```
  startOD = c(0.4, 0.8),
```

```
  indTime = c(12, 24),
```

```
  rpm = c(100, 200))
```

```
# RESPONSE: protein production
```

```
insA <- c(
```

```
  0.190217,
```

```
  0.208589,
```

```
  0.055472,
```

```
  0.047904,
```

```
  0.075075,
```

```
0.062740,  
0.073446,  
0.039526,  
0.063786,  
0.067061,  
0.223757,  
0.068687,  
0.119048,  
0.139319,  
0.142512,  
0.249417  
)
```

```
insB <- c(
```

```
0.279528,  
0.027500,  
0.123412,  
0.074713,  
0.276596,  
0.062651,  
0.236902,  
0.111274,  
0.045936,  
0.066038,  
0.154822,  
0.054054,  
0.178571,  
0.203046,  
0.204509,  
0.208092  
)
```

```
# replicating a fractional design is not so useful
```

```
insDesign <- FrF2(nruns = 16,  
  nfactors = length(factorNamesL),
```

```

        factor.names = factorNamesL,
        replications = 1,
        seed = 1024,
    )

```

```

insADesign <- add.response(insDesign, insA)
insBDesign <- add.response(insDesign, insB)

```

```

TinmodInsA <- Tm(insADesign)
summary(TinmodInsA)
IAPlot(TinmodInsA)

```

```

TinmodInsB <- Tm(insBDesign)
summary(TinmodInsB)

```

.Box-Behnken deneysel tasarım R-kodu

```

# TODO: Add comment
#
# Author: donuk
#####

library("boE.wrapper")
library("rsm")

bbdFactors = list(
  rpm = c(100, 200),
  indTime = c(12, 24),
  startOD = c(0.4, 3.0)
)

bbdInsDesign <- bbd.design(nfactors = 3,
                           ncenter = 1,

```

```
factor.names = bbdFactors,
```

```
seed = 1024
```

```
)
```

```
insAResponse <- c(
```

```
0.054152,
```

```
0.1079812,
```

```
0.030822,
```

```
0.0951327434,
```

```
0.1821705,
```

```
0.1396104,
```

```
0.1488095,
```

```
0.036036,
```

```
0.0947368,
```

```
0.1552632,
```

```
0.126522,
```

```
0.145833,
```

```
0.0769231
```

```
)
```

```
insBResponse <- c(
```

```
0.073569,
```

```
0.083333,
```

```
0.11,
```

```
0.050724,
```

```
0.262357,
```

```
0.1174242,
```

```
0.185263,
```

```
0.17333333,
```

```
0.04467,
```

```
0.0702128,
```

```
0.1346154,
```

```
0.493038,
```

```
0.1122449
```

```
)
```

```
bbdInsDesign
```

```

insADesignResponse <- add.response(design = bbdInsDesign, response = insAResponse)
insBDesignResponse <- add.response(design = bbdInsDesign, response = insBResponse)

# insA
fa = rsmformula(design = insADesignResponse,
               degree = 2,
               coded = FALSE)

TinmodInsA = rsm(formula = fa, data = insADesignResponse)
print(TinmodInsA)

persp.lm(TinmodInsA, rpm ~ indTime, zlab = insAResponse, )
contour.lm(TinmodInsA, rpm ~ indTime)
image.lm(TinmodInsA, rpm ~ indTime)

persp.lm(TinmodInsA, rpm ~ startOD, zlab = insAResponse, )
contour.lm(TinmodInsA, rpm ~ startOD)
image.lm(TinmodInsA, rpm ~ startOD)

persp.lm(TinmodInsA, startOD ~ indTime, zlab = insAResponse, )
contour.lm(TinmodInsA, startOD ~ indTime)
image.lm(TinmodInsA, startOD ~ indTime)

# insB
fb = rsmformula(design = insBDesignResponse,
               degree = 2,
               coded = FALSE)

TinmodInsB = rsm(formula = fb, data = insBDesignResponse)
print(TinmodInsB)

persp.lm(TinmodInsB, rpm ~ indTime, zlab = insBResponse, )
contour.lm(TinmodInsB, rpm ~ indTime)
image.lm(TinmodInsB, rpm ~ indTime)

persp.lm(TinmodInsB, rpm ~ startOD, zlab = insBResponse, )

```

contour.1m(finmodİnsB, rpm ~ startOD)
image.1m(finmodİnsB, rpm ~ startOD)
ersp.1m(finmodİnsB, startOD ~ İndİme, zlab = İnsBResponse,)
contour.1m(finmodİnsB, startOD ~ İndİme)
image.1m(finmodİnsB, startOD ~ İndİme)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ceren CAN

Doğum Yeri : GAZİANTEP

Doğum Tarihi : 13/12/1986

Medeni Hali : Evli

Uyruğu: TC

Yabancı Dili : Almanca

Eğitim Kurumu (Kurum ve Yıl)

- **Lisans :** Hacettepe Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji Öğretmenliği Bölümü,2012
- **Lise :** Fitnat Nuri Tekerekoğlu Anadolu Lisesi, 2004

Çalıştığı Kurumlar: 2C Biyoteknoloji Sağlık Laboratuvar ve Tıbbi Cihazlar araştırma Geliştirme San. Tic. Ltd. Şti., 2014 -

Yayımlar:

Can C, Kolçak P, Yalınkılıç A, Engin D. Production of active human interferon alpha [Escherichia coli](#) cells. 2014 September; 8 – 10. 17th International Pharmaceutical

Technology Symposium(poster).

Kolçak P, Can C, Engin D. Production of active human interferon gamma in [Escherichia coli cells](#). 2014 September; 8 – 10. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium(poster).

Ödüller:

2014 yılı Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı Teknogirişim Sermayesi Desteği

2014 yılı Yeni Fikirler Yeni İşler Genel Kategori Birinciliği

2014 yılı Yeni Fikirler Yeni İşler Amerika Kampı Özel Ödülü

2015 yılı KOSGEB ArGe İnovasyon Desteği