

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Bacillus pumilus* Y7 KATALAZ (katX2) GENİNİN KLONLANMASI**

**GÜNCE GÖÇ**

**KOCAELİ 2017**

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

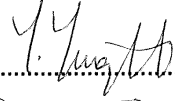
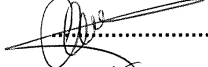
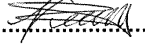
*Bacillus pumilus* Y7 KATALAZ (katX2) GENİNİN KLONLANMASI

GÜNCE GÖÇ

Yrd. Doç.Dr. Yonca  
YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ  
Danışman, Kocaeli Üniv.

Doç.Dr. Fikriye POLAT  
Jüri Üyesi, Kocaeli Üniv.

Yrd.Doç.Dr. Nuray VAROL  
Jüri Üyesi, Afyon Üniv.

  
.....  
  
.....  
  
.....

Tezin Savunulduğu Tarih: 25.12.2017

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, *Bacillus pumilus* katalazının (BPC) rekombinant üretiminin gerçekleştirilmesi ile elde edilecek rekombinant katalazın özelliklerinin incelenmesi ve olası endüstriyel uygulama alanlarının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimiyle bana katkıda bulunan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Yonca Yüzügüllü KARAKUŞ'a, bu çalışmamda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Biyoloji Bölümündeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, her zaman desteklerini hissettiğim çalışma arkadaşlarım Arzu SERTEL, Semih IŞIK, Sinem BALCI, Eda Baykal SARI ve Bedirhan ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan canım annem S. Deniz GÖÇ'e, babam Aykut GÖÇ'e ve değerli kardeşim Doğukan GÖÇ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje Numarası: 2016/004-HD) birimine şükranlarımı sunarım.

Aralık – 2017

Günce GÖÇ

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	viii
GİRİŞ .....	1
1. GENEL BİLGİLER.....	3
1.1. Enzimler .....	3
1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması .....	4
1.1.2. Katalazlar .....	5
1.1.3. Katalazların çift aktivite özelliği .....	9
1.2. Mikroorganizmalar .....	10
1.2.1. Bakteriler .....	10
1.2.2. <i>Bacillus pumilus</i> .....	12
1.3. Enzim Üretimi .....	13
1.3.1. Enzim üretimi için klonlama stratejileri .....	13
1.3.1.1. Ligasyondan bağımsız klonlama teknikleri.....	15
1.3.1.2. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama .....	15
1.3.2. Bakteriyal konak hücrelerinde rekombinant protein (enzim) üretimi.....	17
1.3.3. Katalaz enziminin rekombinant üretimi.....	20
2. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
2.1. Malzemeler.....	22
2.1.1. Kimyasallar ve enzimler .....	22
2.1.2. Plazmit ve mikroorganizmalar.....	22
2.2. Yöntem.....	22
2.2.1. Genomik DNA izolasyonu .....	22
2.2.2. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız megaprimer klonlamada primer tasarımı .....	23
2.2.3. Megaprimerin amplifikasyonu için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunun optimizasyonu .....	24
2.2.3.1. Optimum bağlanma sıcaklık aralığının belirlenmesi.....	24
2.2.3.2. Genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesi.....	25
2.2.4. Megaprimerin saflaştırılması .....	26
2.2.4.1. Megaprimerin jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırılması.....	26
2.2.4.2. Megaprimerin cam yünü tekniği ile saflaştırılması.....	27
2.2.5. Megaprimerin hedef vektöre entegresinde gerçekleştirilen PZR optimizasyonu .....	27
2.2.5.1. Megaprimer konsantrasyonu .....	28
2.2.5.2. Kimerik primer kullanımı .....	31
2.2.5.3. Polimeraz enzim optimizasyonu .....	33
2.2.5.4. Vektör:megaprimer oranı .....	36
2.2.6. DpnI enzimi ile muamele .....	37

2.2.7. Kompetan hücrelerin hazırlanışı .....	37
2.2.8. <i>E. coli</i> XL-1 Blue hücresine transformasyon.....	38
2.2.9. Plazmit DNA izolasyonu .....	38
2.2.10. Agaroz jel elektroforezi .....	39
2.2.11. Nükleik asit konsantrasyon tayini ve saflık ölçümleri.....	40
2.2.12. Koloni polimeraz zincir reaksiyonu.....	40
2.2.13. Restriksiyon enzimleri ile kesim .....	40
2.2.14. Sekans analizi .....	41
2.2.15. <i>E. coli</i> BL21 (DE3 star) hücrelerine transformasyon.....	42
2.2.16. Rekombinant protein ifadesinin optimizasyonu .....	43
2.2.14.1. SDS-PAGE analizi.....	44
2.2.14.2. Enzim aktivite tayini.....	44
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	45
3.1. <i>B. pumilus</i> Y7 Genomik DNA'sının İzolasyonu .....	45
3.2. <i>B. pumilus</i> Y7 Katalaz (katX2) Geninin Klonlanması.....	46
3.2.1. <i>B. pumilus</i> Y7 katalaz (katX2) geninin amplifikasyonu .....	46
3.2.2. katX2 megaprimerinin saflaştırılması .....	48
3.3. katX2 Megaprimerinin Hedef Vektöre Entegre Edilmesi .....	49
3.3.1. Megaprimer konsantrasyonu .....	50
3.3.2. Kimerik primer kullanımı .....	51
3.3.3. Polimeraz enzim seçimi .....	52
3.3.5. Vektör:megaprimer oranı .....	53
3.4. katX2 Megaprimerini Taşıyan pET28 Vektörünün Kompetan Hücrelere Transformasyonu .....	54
3.5. Rekombinant Klonların Analizleri.....	56
3.6. Rekombinant Katalaz İfadesinin Optimizasyonu .....	62
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	72
KAYNAKLAR.....	75
EKLER.....	80
KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER .....	87
ÖZGEÇMİŞ .....	88

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	'Hem' grupları.....	6
Şekil 1.2.	Bakterilerin üreme grafiği.....	11
Şekil 1.3.	<i>Bacillus pumilus</i> bakterisi .....	13
Şekil 1.4.	Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları.....	14
Şekil 1.5.	Bölge yönelimli mutajenez ile restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinin karşılaştırılması.....	16
Şekil 1.6.	Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama yönteminde temel basamaklar.....	17
Şekil 1.7.	pET sistemi .....	19
Şekil 1.8.	<i>E. coli</i> organizmasında rekombinant protein üretim süreci.....	20
Şekil 3.1.	<i>B. pumilus</i> genomik DNA'nın izolasyon sonrası agaroz jeldeki görüntüsü.....	45
Şekil 3.2.	Megaprimerin amplifikasyonunun optimizasyonu için gerçekleştirilen PZR denemelerinin sonuçlarının görüntüsü.....	47
Şekil 3.3.	İki farklı yöntemle saflaştırılan megaprimerin görüntüsü.....	48
Şekil 3.4.	Primer etkisinin incelendiği ikinci PZR denemelerinin agaroz jel görüntüsü.....	50
Şekil 3.5.	katX2 megaprimerinin pET28TEV vektörüne klonlanmasında kimerik primerlerin kullanılan PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	51
Şekil 3.6.	Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinde farklı polimeraz enzimleri ile gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	52
Şekil 3.7.	PZR karışımında 1:2, 1:4 ve 1:6 olan vektör:megaprimer oranının agaroz jel görüntüsü.....	54
Şekil 3.8.	İkinci PZR'de seçilen örneklerin transformasyon sonuçları.....	55
Şekil 3.9.	pET28TEVKATX2 plazmitinin <i>E. coli</i> 'nin BL21 (DE3 star) kompetan hücrelerine transformasyon sonuçları.....	56
Şekil 3.10.	İkinci transformasyondan elde edilen kolonilerin DNA izolasyonu sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	57
Şekil 3.11.	DNA izolasyon sonuçlarına göre yüksek konsantrasyona sahip klonların restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	59
Şekil 3.12.	DNA konsantrasyonu düşük olan 13 klonun koloni PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	60
Şekil 3.13.	6 numaralı klona ait plazmitin BLAST analiz sonucu.....	61
Şekil 3.14.	37 numaralı klona ait koloni PZR ürününün BLAST analiz sonucu.....	61
Şekil 3.15.	Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu.....	65
Şekil 3.16.	Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu.....	66
Şekil 3.17.	Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu.....	67
Şekil 3.18.	Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu.....	68
Şekil 3.19.	Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu.....	69

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1.	Ligasyondan bağımsız klonlama tekniklerinden birkaçının karşılaştırılması.....	15
Tablo 1.2.	Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen proteinlerin uygulama alanları.....	20
Tablo 2.1.	Megaprimer amplifikasyonunda kullanılan primerler .....	23
Tablo 2.2.	Megaprimerin amplifikasyonu için optimum bağlanma sıcaklık aralığının belirlenmesinde kullanılan denemeler .....	24
Tablo 2.3.	Megaprimerin amplifikasyonu için optimum sıcaklık aralığının belirlenmesinde kullanılan karışım .....	25
Tablo 2.4.	Megaprimerin amplifikasyonu için optimum genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan karışımlar .....	25
Tablo 2.5.	Megaprimerin amplifikasyonu için optimum genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan döngü .....	26
Tablo 2.6.	Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda megaprimer konsantrasyonlarının denenmesi.....	28
Tablo 2.7.	Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda kimerik primerlerin kullanımı ile PZR denemeleri.....	32
Tablo 2.8.	Megaprimerin vektöre entegresi için gerçekleştirilen PZR'de farklı DNA polimeraz enzimlerinin denenmesi.....	34
Tablo 2.9.	Megaprimerin vektöre entegresi için gerçekleştirilen PZR'de vektör:megaprimer oranının denenmesi .....	37
Tablo 2.10.	Koloni PZR karışımı ve koşulları .....	40
Tablo 2.11.	Restriksiyon enzim denemeleri.....	41
Tablo 2.12.	Sekans analizi için tasarlanan primerler .....	42
Tablo 2.13.	Rekombinant protein ifadesi için optimizasyon koşulları .....	43
Tablo 3.1.	Saflaştırılan megaprimerlerin konsantrasyonları.....	49
Tablo 3.2.	DNA izolasyonu sonrası klonların DNA konsantrasyonları .....	58
Tablo 3.3.	Optimizasyon koşullarının katalaz aktivite sonuçları .....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
=	: Eşittir
≤	: Daha küçük veya eşit
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
cm	: Santimetre
g	: Gram
l	: Litre
M	: Molar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
ng/μl	: Nanogram/mikrolitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
T <sub>m</sub>	: Erime sıcaklığı
U	: Unit/Enzim birimi
U/μl	: Unit/mikrolitre
μmol/ml/dk	: Unit/mililitre/dakika

## Kısaltmalar

bç	: Baz Çifti
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleozit Trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
kDA	: Kilodalton
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum Klorür
MgSO <sub>4</sub>	: Magnezyum Sülfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris Asetat EDTA
UV	: Ultra Viyole



## ***Bacillus pumilus* Y7 KATALAZ (katX2) GENİNİN KLONLANMASI**

### **ÖZET**

*Bacillus pumilus*, mezofilik bir bakteri olup penisilin oksidaz ve/veya peroksidaz gibi ikincil bir aktiviteye sahip hücre içi katalaz enzimi üretmektedir. Bu çalışmada, enzime ait ikincil peroksidaz/oksidaz özelliğinin ayrıntılı olarak irdelenebilmesi için ileride gerçekleştirilmesi planlanan yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarında kullanılmak üzere *B. pumilus* katalazını kodlayan katX2 geninin klonlanması ve *Escherichia coli*'de üretimi amaçlanmıştır. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız gerçekleştirilen klonlama tekniğinde ilk olarak katX2 geni kimerik primerler (5'katX2; 3'katX2) ile bir araya getirilerek megaprimer oluşturulmuş ve sonrasında bu megaprimer ekspresyon vektörüne başarılı bir şekilde aktarılmıştır. Klonlama sırasında genomik DNA konsantrasyonu, primer bağlanma sıcaklık aralığı, polimeraz enzim tipi, vektör:megaprimer oranı, reaksiyon döngü sayısı ve koşulu başta olmak üzere birçok parametre denenerek optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. 510 amino asitten oluşan olgun proteini kodlayan katX2 genini taşıyan pET28aTEV vektörü *E. coli* BL21 (DE3 star) hücrelerine transforme edilmiştir. Transformantlarda katalaz aktivitesi için en yüksek değer (80 µmol/ml/dk) 30°C'de, IPTG (0,1 mM) varlığında, 120 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütüldüğü ekspresyon koşullarında ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus pumilus*, Katalaz, katX2, Rekombinant Protein, Restriksiyon Enzimlerinden Bağımsız Klonlama.

## **CLONING OF CATALASE (katX2) GENE FROM *Bacillus pumilus* Y7**

### **ABSTRACT**

A mesophilic soil microorganism *Bacillus pumilus* produces an intracellular catalase with secondary penicillin oxidase/oxidase activity. The aim of this study was to clone *B. pumilus* catalase encoding gene (katX2) and express the gene in *Escherichia coli* for further investigation of its secondary activity via site directed mutagenesis studies. katX2 gene was first amplified as megaprimer which includes chimeric primers (5'katX2 and 3'katX2) by using restriction free cloning technique and then the megaprimer was successfully inserted into expression vector. During cloning, optimization studies were performed by testing several parameters including genomic DNA concentration, primer binding temperature, polymerase enzyme type, vector:megaprimer rate, number of reaction cycles and conditions. The pET28aTEV vector carrying catalase encoding katX2 gene consisting of 510 amino acids was transformed into *E. coli* BL21 (DE3 star) cells. Catalase activity of the transformants reached at their highest level (80  $\mu\text{mol/ml/min}$ ) when cells were expressed at 30°C and 120 rpm for 24 hours in the presence of IPTG (0.1 mM).

**Key words:** *Bacillus pumilus*, Catalase, katX2, Recombinant Protein, Restriction-Free Cloning.

## GİRİŞ

Enzimler, biyokimyasal tepkimeleri koordine eden özgül biyokatalizörler olup, canlı organizmada meydana gelen tüm tepkimelerde görev almaktadır. Tüm canlı organizmalar tarafından üretilen ve tepkimelerde görev alan enzimler, metabolik tepkimelerin hızını ve özgüllüğünü düzenlerken değişikliğe uğramamaktadır (Bhat, 2000).

Katalaz enzimi, hücreyi, hidrojen peroksidin zararlı etkilerinden koruyarak organizmanın yaşam süresinin uzamasında önemli bir rol oynar. Hidrojen peroksidin kullanıldığı her alanda, ekonomik ve stabil katalaz enzimine duyulan ihtiyaç artmıştır. Bu enzim başlıca gıda, tekstil, farmasötik, kağıt endüstrileri olmak üzere; immobilizasyon, detoksifikasyon sistemleri, enzimatik polimerizasyon işlemleri gibi çeşitli alanlarda da kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015). Metalloenzim sınıfına dahil olan katalaz enzimi çeşitlerinden her biri farklı bir gen tarafından kodlanmaktadır (Mulvey ve diğ., 1990). Günümüzde, yaklaşık 225 monofonksiyonel, 50 çift fonksiyonlu katalaz-peroksidaz, 25 mangan içeren katalaz olmak üzere toplamda 300'den fazla katalaz enzimini kodlayan gen bilinmektedir (Chelikani ve diğ., 2004).

Yakın zamanda rapor edilen bir bulguda, mezofilik bir bakteri olan *B. pumilus* tarafından üretilen hücre içi katalaz enziminin  $\beta$ -laktam oksidaz (penisilin) aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Sangar ve diğ., 2012). Daha sonra yapılan çalışmalar sonucunda, enzimin monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olduğu ve esas fonksiyonunun yanında peroksidaz aktivitesi de gösterdiği bulunmuştur (Loewen ve diğ., 2015). Literatürde katalaz enziminde gözlenen bu ikincil aktivite (oksidaz/peroksidaz) olgusu günümüzde hızla yaygınlaşmakta olup *Scytalidium thermophilum* (Yuzugullu ve diğ., 2013), *Thermobifida fusca* (Loncar ve Fraaije, 2015) ve *Amaranthus cruentus*'dan (Chen ve diğ., 2017; Teng ve diğ., 2016) izole edilen katalazlarda da tanımlanmıştır.

Bu çalışmada *B. pumilus* katalazının ikincil aktivitesi hakkında detaylı bilgiye ulaşabilmek için yönlendirilmiş mutasyon çalışmalarını gerçekleştirmek üzere enzimi kodlayan genin klonlanması hedeflenmiştir. Buna göre laboratuvarında hali hazırda bulunan *B. pumilus* Y7 izolatına (Sertel, 2016) ait genomik DNA izole edildi. Enzimin

rekombinant üretimi için “Restriksiyon Enzimlerinden Bağımsız Klonlama” tekniği kullanıldı. Temeli iki aşamalı polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan bu tekniğin birinci basamağında megaprimer olarak adlandırılan katalaz geni çoğaltılırken, ikinci basamakta bu megaprimerin pET28TEVCATPO (Yuzugullu ve diğ., 2013) vektöründeki catpo geni ile yer değiştirerek klonlamanın gerçekleştirilmesi hedeflendi. Her iki basamak için yapılan polimeraz zincir reaksiyonu, farklı parametreler denenerek optimize edildi. Elde edilen klonların içerdiği plazmitler, gen dizilimine uygun restriksiyon enzimleri ile muamele edildi ve bu plazmitler ile koloni polimeraz reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuçlar incelenerek, pozitif olduğu düşünülen klonlar seçildi ve klonlamanın doğruluğu sekans analizi ile teyit edildi. Rekombinant *B. pumilus* Y7 katalazının ekspresyonu için optimizasyon çalışmaları yapılarak elde edilen sonuçlar hem SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez) hem de spektrofotometrik olarak incelendi.

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Enzimler

Canlıda meydana gelen tüm tepkimelerde rol oynayan enzimler, bu tepkimeleri koordine eden özgül biyokatalizörlerdir. Enzimler, metabolik tepkimelerin hızını ve özgülüğünü düzenlerken değişikliğe uğramamaktadır (Bhat, 2000).

Enzimler, genelde protein yapıda olmalarına karşın, bazı enzimlerde, proteine, protein olmayan daha küçük organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş protein yapısı bulunmaktadır. Enzimin sadece proteinden meydana gelmiş ve kofaktör içermeyen inaktif kısmına "Apoenzim", tüm kofaktörleri ve koenzimleri içeren katalitik aktif durumuna ise "Holoenzim", enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gereken inorganik yapıdaki yan gruplarına "Kofaktör", organik yapıdaki yan gruplarına "Koenzim" adı verilmektedir. Metabolik tepkimelerde, enzimlerin dönüşüme uğrattıkları moleküllere "Substrat"; meydana gelen maddeye ise "Ürün" denilmektedir. Enzimin belirli bir bölgesinde, tepkimenin gerçekleştiği bir merkez bulunmaktadır ve bu merkez, "Aktif Merkez" olarak adlandırılmaktadır. Aktif merkezde substratın bağlandığı bir bağlanma bölgesi ve bir de katalitik dönüşüme uğratıldığı katalitik aktivite bölgesi bulunmaktadır. Bağlanmada etkin olan kuvvetlerin hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ve kovalent bağlar olduğu bilinmektedir (Önal, 2010).

Enzimler hem katalizledikleri tepkimenin çeşidine, hem de ürüne dönüştürdükleri substratlarına karşı seçicilik göstermektedir. Özgülüğün derecesi, farklı olabilmektedir. Örneğin peptidazlar, fosfatazlar ve esterazlar gibi çeşitli molekülleri substrat olarak kullanabilen bazı enzimlerin özgülükleri düşük olmaktadır. Metabolik bir tepkimede, enzimler tepkime hızını arttırmaktadır ve tepkimenin daha hızlı dengeye ulaşmasını, dengeyi değiştirmeden sağlamaktadır. Bir enzimin aktivitesi, o enzimin katalizlediği tepkimenin hızıdır. Uluslararası Biyokimya Birliği Enzim Komisyonu, aktivite birimini "Ünite (U)" olarak tanımlamaktadır. Bu birim, standart koşullar altında dakikada bir mikromol ( $\mu\text{mol}$ ) substratı dönüşüme uğratan enzim miktarı olarak ifade edilmektedir (Önal, 2010).

Bir miligram enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substratın mikromol miktarına “Spesifik Aktivite”, bir enzim molekülü tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substrat moleküllerinin sayısına “Moleküler Aktivite (Turnover Sayısı)” denilmektedir (Önal, 2010).

Enzim içeren tepkimelerin aktivitesi, sıcaklık, pH, enzim ve substrat konsantrasyonu, iyon şiddeti, aktivatör ve inhibitörlerin varlığı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Enzim içeren tepkimelerin hızı, sıcaklık arttıkça sistemdeki artan kinetik enerjiye bağlı olarak maksimum hıza ulaşıncaya dek artmaktadır. Sıcaklıktaki her 10°C artış, enzim içeren tepkimenin hızını 1,2-4 kat arttırmaktadır. Ancak enzimler çok yüksek sıcaklıklarda protein yapısı bozunduğu için etkilerini kaybetmekte; denatüre olmaktadır. İnkübasyon ortamının pH derecesi, protein molekülünün tamamının yük ve ayrışma durumunun yanı sıra, aktif merkezi de etkilemektedir. Özellikle iyonize olabilen aminoasit yan zincirleri substratın bağlanmasında ya da katalizinde etkindir. Enzimlerin maksimum aktivite gösterdiği pH derecesine “Optimum pH” denmektedir. Tepkimenin hızı başlangıçta substrata bağlı olarak önce doğrusal bir artış göstermekte, sonra ise hiperbolik şekli almaktadır. Hız, substrat konsantrasyonundaki artış ile maksimuma ulaşmaktadır. Belli bir değerden sonra, substrat konsantrasyonunun artırılması ile enzimatik tepkimenin hızı arttırılamamaktadır. Bu durum enzimin, substrata doymuş halde olduğunu göstermektedir. Enzim aktivitesinin hızı, ortamda bulunan aktivatör ve inhibitörlerden de etkilenmektedir. Enzimatik tepkimenin hızını arttıran maddelere “Aktivatör”, azaltan maddelere ise “İnhibitör” denilmektedir (Önal, 2010).

### **1.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması**

1961 yılında kurulan Uluslararası Enzim Komisyonu'nun raporuna göre, enzimler katalizledikleri tepkime çeşidine bağlı olarak altı ana sınıfa ayrılmaktadır: Oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar. Bu sınıflarda bulunan her enzim ise, dört sayıdan meydana gelen bir enzim kod numarası (EC Numarası) ile isimlendirilmektedir. Enzim kod numarasının ilk sayısı, enzimin altı ana sınıftan hangisinde yer aldığını, ikinci sayı etki ettiği kimyasal yapı ve fonksiyonel grubu, üçüncü sayı alıcı grubu (akseptör) ve dördüncü sayı ise o serideki sıra numarasını ifade etmektedir (Önal, 2010).

Oksidoredüktazlar, elektronların bir molekülden (oksidan) diğer moleküle (redükta) taşınmasını, yani indirgenme ve yükseltgenme (redoks) tepkimelerini katalizlemektedirler. Transferazlar, donör (verici) üzerindeki fonksiyonel grubun, akseptör (alıcı) substrat molekülüne taşınmasını gerçekleştirmektedirler. Hidrolazlar, suyun katıldığı parçalama ve kondenzasyon tepkimelerini katalizlemektedir. Liyazlar, çift bağın oluşmasındaki tepkimeleri hidrolitik olmayan yoldan gerçekleştirmektedirler. İzomerazlar, molekülün kendi içinde geometrik veya yapısal olarak yeniden düzenlenmesini katalizlemektedirler. Molekül içinde oksidasyon-redüksiyonu, grup transferini ve çift bağ oluşumunu gerçekleştirmektedir. Ligazlar ise adozintrifosfatın (ATP) hidrolizi ile açığa çıkan enerjiden yararlanarak iki molekülü bağlayıp sentez yapmaktadırlar (Önal, 2010).

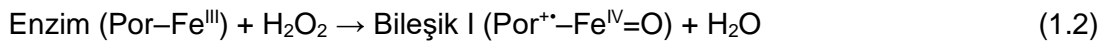
### 1.1.2. Katalazlar

Katalazlar (EC 1.11.1.6), üzerinde en çok çalışılan enzim gruplarından biridir ve hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) moleküler oksijen ve suya dönüştürerek, hücreleri hidrojen peroksidin olumsuz etkilerinden Denklem (1.1)'deki gibi;

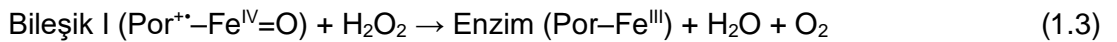


korumaktadır.

Katalazlar iki ayrı basamak ile katalitik reaksiyonu gerçekleştirmektedir (Chelikani ve diğ., 2004). Bir hidrojen peroksit molekülü, ferrik enzimi (hem grubunu) oksiferril formuna (Bileşik I) çevirip su ( $H_2O$ ) açığa çıktığında katalitik döngünün birinci basamağı Denklem (1.2)'deki gibi;



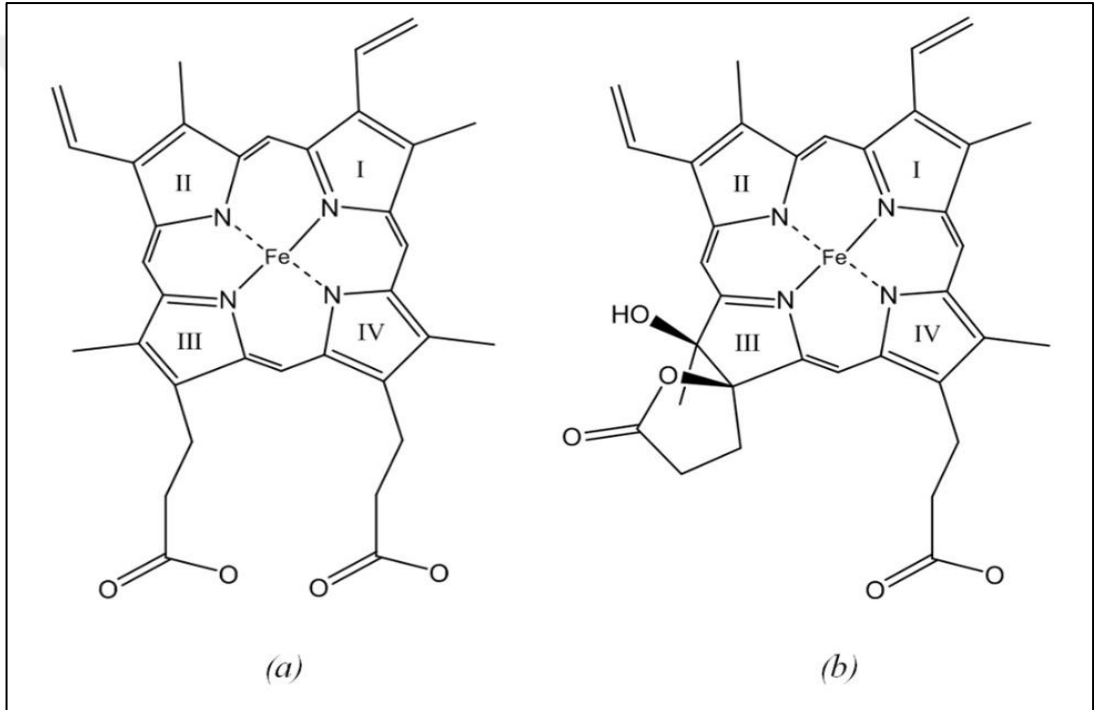
tamamlanmaktadır. İkinci  $H_2O_2$  molekülünün, Bileşik I'i, indirgeyerek enzimin tekrar orijinal formuna dönüşmesini sağlamasıyla da Denklem (1.3)'deki gibi;



ikinci basamak tamamlanır.

Genel olarak katalazlar; alt ünite büyüklüklerine, sekans gruplarının ve 'Hem' gruplarının çeşitliliğine bağlı olarak üç grupta incelenebilir. Bunlar, monofonksiyonel Demir/Hem grubu içeren katalazlar, Hem grubu içeren katalaz-peroksidazlar, Demir/Hem içermeyip Mangan içeren katalazlardır (Loewen ve diğ., 2015).

Katalazların en yaygın grubunda, aktif bölgelerinde 'Hem' grubuna sahip olan monofonksiyonel katalazlar yer almaktadır. Monomerleri 75-80 kDa ve 55-60 kDa olarak iki alt gruba ayrılmış olan monofonksiyonel katalazlar tetramerik bir yapıya sahiptir. Aktif bölgelerinde bulunan 'Hem' grubunun çeşidi, bu monomerler arasındaki temel farkı oluşturmaktadır. Küçük alt üniteli katalazların çoğu 'b' tipi 'Hem' grubuna sahiptir ve katalitik döngüde enzim formunun korunmasını sağlayan bir NAD(P)H (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) bağlanma bölgesi içermektedir. Büyük alt üniteli katalazların ise 'd' tipi 'Hem' içerdikleri ve enzimi sıcaklık ve proteolize karşı koruduğu düşünülen uzun bir C-terminal (karboksil uç) bölgesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Chelikani ve diğ., 2004; Zamocky ve diğ., 2008).



Şekil 1.1. 'Hem' grupları. (a) b tipi hem grubunun yapısı (b) d tipi hem grubunun yapısı (Yuzugullu ve diğ., 2013a)

Monofonksiyonel katalazlar gibi, katalaz-peroksidazlar da aktif bölgelerinde 'Hem' grubu içerir ve molekül ağırlığı 120-340 kDa arasında değişen homodimer yapıya sahiptirler. Bu gruptaki katalazlar, katalitik aktivitenin yanı sıra, substratı olan hidrojen peroksitin yetersiz olduğu durumlarda peroksidatif aktivite de sergilemektedir. İki katalitik aktivitenin ismini verdiği ve katG geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enziminde baskın olan aktivite, hidrojen peroksiti iki moleküler oksijen ve suya dönüştüren katalaz aktivitesidir. Daha yavaş gerçekleştiği bilinen peroksidatif tepkime için ise, hidrojen peroksiti azaltmak için *in vivo* olarak henüz karakterize edilememiş olan birçok elektron verici kullanabilmektedir. Katalaz



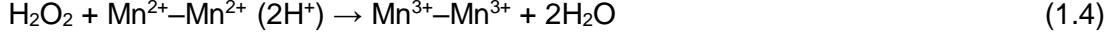
aktivitesi baskın olan katalaz-peroksidazlar ile monofonksiyonel katalazlar yapısal ve gen dizilimi açısından karşılaştırıldığında hiçbir benzerliğin görülmediği rapor edilmiştir. Katalaz-peroksidazın aktivite olarak katalaz ve peroksidaz ile sınırlı kalmadığı bilinmektedir. Ayrıca diiyonidin izonikotinic asit anhidridin uzaklaştırılması, NADH oksidasyonu ve izonikotinic-NAD oluşumu dahil olmak üzere çeşitli diğer tepkimeleri de katalizleyebildiği için çok yönlü olduğu düşünülmektedir (Fita ve diğ., 2015; Nicholls ve diğ., 2001).

katG geninin kodladığı katalaz-peroksidaz enzimi, öbakteriler, arkealar ve birçok ökaryotta bulunmaktadır. katG geninin, 'Hem' grubuna sahip monofonksiyonel katalazlara göre çok daha sonraları evrimleştiği bilinmekte olup arkea ve ökaryotlarda da var olması yanal (lateral) gen transferinin meydana geldiğine işaret etmektedir. Hidrojen peroksit, birçok biyolojik süreç sonunda yan ürün olarak meydana gelmektedir. Örneğin nötrofiller, bakteriyel enfeksiyona karşı koruma amaçlı hidrojen peroksit üretmektedir. Aşırı reaktif bir diğer oksidan olan süperoksit iyonu da birçok biyolojik süreçte üretilmekte ve antioksidan süperoksit dismutaz enzimi ile  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmektedir. Hidrojen peroksit ve metal iyonları bir araya geldiğinde ise fenton tepkimesi gibi aşırı reaktif ve tehlikeli hidroksil radikalleri üretmektedir. Bu nedenle, katalaz ve peroksidazların birlikte  $H_2O_2$ 'yi suya (peroksidazlarda) veya su ile moleküler oksijene (katalazlarda) dönüştürerek evrim sürecinde daha etkili bir antioksidan olarak meydana geldikleri bilinmektedir. Bu sebeple, katG geninin kodladığı antioksidan enzimleri olan katalaz-peroksidazların temel görevi  $H_2O_2$ 'yi daha zararlı bir radikal türe dönüşmeden metabolizmaya geri kazandırmaktır. Katalaz-peroksidaz enziminin monomerlerinin her biri, sahip oldukları metil ve vinil gruplarının uzaydaki konumları ile belirlenen ve her zaman aynı oryantasyonu gösteren 'b' tipi 'Hem' grubu içermektedir (Fita ve diğ., 2015).

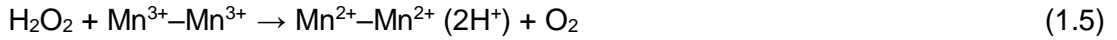
Aktif bölgesinde 'Hem' grubu yerine 'Mangan' içeren katalazlar (Mn-Katalazlar, Hem içermeyen katalazlar), katalitik olarak aktif enzimlerin üçüncü sınıfını oluşturmaktadırlar. Başlarda "Yalancı Katalazlar" olarak adlandırılan mangan katalazlar, sadece bakterilerde bulunmaktadır. Mangan katalazı içeren grubun iki farklı temsilcisi olan *Thermus thermophilus* ve *Lactobacillus plantarum* mikroorganizmalarının üç boyutlu yapıları, mangan katalazlarının, her biri 30 kDa'dan oluşan altı alt üniteye sahip olduğunu göstermektedir.

Mangan katalazlarının katalitik döngüsünde, tipik katalazlara ve katalaz-peroksidazlara göre önemli farklılıklar görülmektedir. Mangan katalazlar, katalitik

döngüsünde aktif bölge olan dimanganez çekirdeğinin hem indirgenmiş, hem de oksitlenmiş halini barındırmaktadır.  $Mn^{2+}-Mn^{2+}$  grubu, O-O bağı polarize ederek suyun açığa çıkmasını Denklem (1.4)'deki gibi;



sağlamaktadır. Elektron transferi sayesinde ise  $H_2O_2$  oksidasyonu ve iki moleküler oksijenin salınımı Denklem (1.5)'deki gibi;



şekilde gerçekleşmektedir.

Mangan katalazların gerçekleştirdiği indirgenme ve yükseltgenme tepkime aşamalarında zamansal bir düzen bulunmamaktadır. Oksidasyon durumundaki değişikliğin, oksijenler arasındaki bağın protonasyonundan ya da deprotonasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Protonasyon, Denklem (1.4)'de görüldüğü üzere indirgenmiş  $Mn^{2+}-Mn^{2+}$  durumu için geçerlidir. Bu durum, iki  $Mn^{2+}$  iyonu arasında gözlenen belirgin şekilde düşüş ile paralellik göstermektedir. Hem içeren katalazların aksine, mangan katalazların katalitik döngüsünde hiçbir reaktif ara madde meydana gelmemekte ve açığa çıkan iki su molekülü, bir reaksiyonda oluşmaktadır. Mangan katalazın katalitik döngüsünde, serbest radikallerin tutulumuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. Hidrojen peroksiti dönüştürme oranının, tipik katalaz ve katalaz-peroksidaza göre daha düşük seviyede olması, mangan katalazların neden doğada yaygın olarak bulunmadığını açıklamaktadır (Zamocky ve diğ., 2008).

Çoğu aerobik organizma, bu katalaz tiplerinden bir ya da daha fazlasına sahiptir. Ancak hangi tipte ve sayıda katalazı içereceği canlıdan canlıya değişkenlik göstermektedir. Örneğin, *Mycobacterium* cinsi sadece katalaz-peroksidaz içerirken, *Escherichia coli* hem monofonksiyonel katalaz (HPII) hem de katalaz-peroksidaz (HPI) enzimi üretmektedir. Her iki enzim üretimi birbirinden bağımsız gerçekleşmektedir. HPI üretimi büyüme ortamına  $H_2O_2$  ilavesi ile arttırılabilirken, HPII sentezi ise  $H_2O_2$ 'den etkilenmeyip bakteri durgun faza geçtiğinde uyarılmaktadır. HPI katalazı katG, HPII ise katE geni tarafından kodlanmaktadır. Bu genlerin kontrol mekanizmaları da farklıdır. Örneğin katG geni oksidatif strese karşı cevap olarak oluşturulmakta ve OxyR regülatörü tarafından düzenlenmektedir. katE geninin ekspresyonu ise katF olarak adlandırılan pozitif efektör tarafından

düzenlenmektedir. Diğer bir mikroorganizma örneği olarak *Bacillus subtilis*'te de üç farklı monofonksiyonel enzim üretilmektedir. Bu enzimler, katA, katX ve katE genleri tarafından kodlanmaktadır. Ökaryotik canlılarda da hem/demir içeren katalaz enzimlerinin sayısı değişkenlik göstermektedir. Örneğin memelilerde bu sayı bir iken, bitkilerde ve mantarlarda dörde kadar çıkabilmektedir (Loewen ve diğ., 2015).

Katalaz enzimi; başlıca gıda, tekstil, farmasötik, kağıt endüstrileri olmak üzere; immobilizasyon, detoksifikasyon sistemleri ve enzimatik polimerizasyon işlemleri gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Loncar ve Fraaije, 2015). Örneğin; hidrojen peroksit, sütün uzun süre bozulmadan kalmasında önemli bir role sahiptir. Laktoperoksidaz adı verilen, sütte tabii olarak bulunan antibakteriyal enzimin aktivite sergileyebilmesi için hidrojen peroksit ihtiyacı vardır. Ancak işlem görmeden önce sütün içerisindeki fazla hidrojen peroksitin arındırılması gerekmektedir. Aynı zamanda tekstil endüstrisinde ağartma işlemi sonrası ortamda kalan hidrojen peroksit çevreye de zararlı olacağından katalaz enzimi kullanılarak uzaklaştırılmaktadır. Katalaz enzimi, özellikle *Aspergillus niger* ve *Micrococcus lysodeikticus* organizmalarından faydalanılarak birçok firma tarafından ticari olarak elde edilmektedir (Yüzügüllü ve Ögel, 2013).

### 1.1.3. Katalazların çift aktivite özelliği

Katalaz enziminin başlıca görevi, Bölüm 1.1.2'de anlatıldığı üzere canlıyı hidrojen peroksidin zararlı etkilerinden korumak için hidrojen peroksidi su ve moleküler oksijene dönüştürmektir. Katalaz enzimi, bahsedilen esas fonksiyonunun yanı sıra, düşük molekül ağırlıklı alkoller (metanol, etanol vb.), katalitik döngüde ortaya çıkan Bileşik I ara ürününü kullanarak okside edebilmekte ve bu ikincil aktivite, "Peroksidatif Aktivite" olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca, ortamdaki hidrojen peroksidin yokluğuna bağlı olarak sergiledikleri görülen oksidaz aktivitesi, bu enzim üzerinde yaklaşık yüz yıldır çalışılmasına rağmen literatürde yeni bir bulgu olarak ele alınmaktadır. Bahsedilen oksidaz aktivitesinin reaksiyon sırasında Bileşik II'nin meydana gelmesini desteklediği gözlemlenirken porfirin halkasından aldığı bir elektron ile enzimin dinlenme haline geri döndüğü düşünülmektedir (Vetrano ve diğ., 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ikincil oksidaz aktiviteye sahip olduğu rapor edilen katalaz enzim üreticileri olarak memeli hücresi, *Scytalidium thermophilum*, *Thermobifida fusca* ve *Amaranthus cruentus* verilebilir. Memeli (chinese hamster)

hücrelerinde bulunan ve monofonksiyonel katalaz ailesine dahil edilen katalaz enziminin memeli katalazında ikincil aktivite olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yokluğunda veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesi düşük olduğunda oksidaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Vetrano ve diğ., 2005).

*S. thermophilum* termofilik mantarının hücre dışı bir fenol oksidaz enzimi salgıladığı düşünülmüş ancak sekans analizi sonucunda enzimin çift aktiviteye sahip bir katalaz enzimi olduğu bulunmuştur. Bu sebeple organizmadan elde edilen enzim, Katalaz-Fenol oksidaz anlamına gelen CATPO olarak isimlendirilmiş ve çift aktiviteye sahip ilk fungal enzim olarak rapor edilmiştir (Kocabas ve diğ., 2008; Ögel ve diğ., 2006). Oksidaz aktivitesinin insan, sığır ve *Aspergillus niger* gibi birçok canlıdan elde edilen ticari katalaz enzimlerinde gözlenmiş olması nedeniyle bahsedilen ikincil aktivitenin katalazlarda gözlenen genel bir durum olduğuna işaret etmiştir (Yuzugullu ve diğ., 2013a)

Nitrojen içeren ve bitkilere renk veren betalain pigmentinin tirozinazın monofenolaz aktivitesi vasıtasıyla L-tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu ile sentezlenmeye başladığı düşünülse de, biyokimyasal tepkimelerin araştırılması sonucunda betalain bitkisi olan *A. cruentus*'un yapraklarında katalaz-fenol oksidaz enziminin varlığı tespit edilmiş ve "AcCATPO" olarak adlandırılmıştır. Dolayısıyla çift aktiviteye sahip katalaz-fenol oksidaz enziminin bitkilerde de bulunduğu rapor edilmiş ve bu enzimin betalain pigmentinin biyosentezinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Teng ve diğ., 2015).

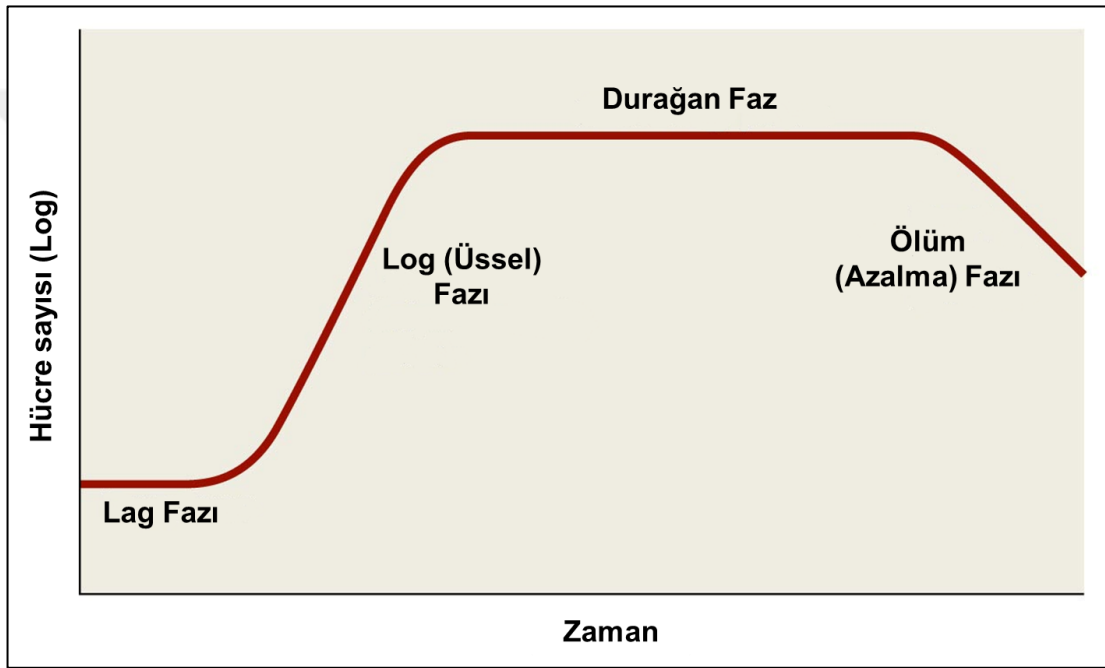
Katalaz enzimlerinin sahip olduğu çift aktivite, bu enzimleri endüstriyel kullanım alanlarında tercih sebebi haline getirmektedir.

## **1.2. Mikroorganizmalar**

### **1.2.1. Bakteriler**

Bakteriler bölünerek çoğalabilen mikroskobik canlılar olmakla birlikte, yeryüzündeki her ortamda bulunmaktadır. Hareket yeteneklerine, dış etkenlere karşı dayanıklılık sağlayan endospor oluşturma kabiliyetlerine, ihtiyaç duydukları besin maddeleri ve yaş, inkübasyon sıcaklığı, ortamın kimyasal yapısı gibi etkenlere bağlı olarak sınırlı düzeyde değişebilen hücre şekillerine ve gram boyama özelliklerine göre sınıflandırılabilir (Acar, 1987).

Bakteriler, Şekil 1.2'de görüldüğü gibi tipik bir üreme özelliği gösterirler. Başlangıçta, Lag Fazı'nda üreme yavaş gerçekleşir. Sonra, Log Fazı denilen hızlı üreme periyodu başlar. Bu faz süresince hücreler, belirli bir zaman aralığında çok sayıda bölünerek logaritmik olarak çoğalırlar. Bakteriler, mililitrede  $10^9$  hücre yoğunluğuna ulaştıkları zaman, besinler hücrelerin çoğalması için sınırlayıcı duruma gelir ve hücreler Durağan Faz'a geçerler. Log Fazı esnasında, hücrelerin iki katına çıkma zamanı yaklaşık 20 dakika olması nedeniyle, başlangıç ekiminde kültüre ilave edilen bir kaç bin hücre kolaylıkla bir gece inkübasyon sonucunda maksimum hücre yoğunluğuna erişir (Klug ve diğ., 2010).



Şekil 1.2. Bakterilerin üreme grafiği (URL-1)

Bakteriler çoğalmalarının hızlı, maliyetlerinin düşük olması, genetik yapılarının iyi bilinmesi gibi özellikleri sayesinde biyoteknolojide, dolayısıyla endüstrinin birçok alanında kullanılmaktadır. Örneğin gıda endüstrisinde *Lactobacillus*, *Lactococcus* ve *Streptococcus* cinsi laktik asit bakterileri peynir, yoğurt ve kefir üretiminde kullanılırken; ilaç endüstrisinde polimiksin ve basitrasın antibiyotiklerinin eldesinde *Bacillus* cinsi bakterilerden yararlanılmaktadır (URL-2).

Endospor oluşturmaları ve sıcaklığa dayanıklı olmaları sebebiyle diğer bakterilerden ayrılan *Bacillaceae* familyası, *Bacillus* ve *Clostridium* cinsi bakterilerden oluşmaktadır. *Bacillus*, genellikle çubuk şekilli, aerobik veya fakültatif anaerobik, kendini olumsuz şartlardan korumak için endospor oluşturan ve gram pozitif (bazı türleri değişken) olan bakterilerden oluşmaktadır (Ayhan, 2000). Organik asiti, şeker

ve alkolü karbon kaynağı olarak; amonyumu da azot kaynağı olarak kullanan *Bacillus* cinsi bakterilerin, optimum büyüme sıcaklıkları genellikle 25°C ile 37°C arasında değişmektedir. Bu cinsin termofilik ve psikrofilik türleri ise 75°C'den daha yüksek ve 3°C'den daha düşük sıcaklıklarda büyüebilmektedir (Sneath, 1986).

Yüksek miktarlarda (20-25 g/L) hücre dışı enzim üretebilmeleri ve salgılayabilmeleri sayesinde *Bacillus* cinsi bakteriler, endüstride çokça tercih edilmektedir. *Bacillus* cinsi bakterilerin biyokimyasal, fizyolojik ve genetik özelliklerinin iyi bilinmesi, bu organizmaların endüstriyel işlemlerde kullanım alanlarının çoğalmasını sağlamaktadır (Schallmey ve diğ., 2004).

### 1.2.2. *Bacillus pumilus*

Mezofilik bir bakteri olan *Bacillus pumilus*; kuraklık, basınç, besin kıtlığı, hidrojen peroksit ve kimyasal dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklıdır (Nicholson ve diğ., 2000).

*B. pumilus* bakterisinden elde edilen proteaz enziminin termostabil olması sebebiyle gıda, deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Pan ve diğ., 2004). Yapılan bir çalışmada *B. pumilus* bakterisinin bitki gelişimini destekleyen bir rizobakter olduğu rapor edilmiştir (Gutiérrez-Mañero ve diğ., 2001). Diğer bir çalışmada ise, bu mikroorganizmanın uzay araçlarında en çok bulunan ikinci *Bacillus* cinsi olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.3) (La Duc ve diğ., 2004).

*B. pumilus*, katalaz enzim üretiminden sorumlu katX1 ve katX2 olarak adlandırılan iki gen içermektedir. katX1 geni, *B. subtilis*'in sahip olduğu katX genine %83 oranında bir homoloji göstermektedir ve *B. pumilus*'un sporlarındaki 'Hem' grubu içeren katalazı kodladığı bilinmektedir. katX2 ise *B. subtilis*'in sahip olduğu katX gen sekansına %50 oranında bir homoloji sergilemektedir ve *B. pumilus*'un vejetatif hücrelerindeki 'Hem' grubu içeren katalazı kodladığı bilinmektedir (Gioia ve diğ., 2007; Handtke ve diğ., 2017; Kunst ve diğ., 1997).

Yapılan çalışmalarda, katX1 geninden rekombinant protein ifadesinin gerçekleştirilemediği gözlenmiş, bu durumun katX2 geninin *B. pumilus*'taki katalaz sentezinde baskın olmasından kaynaklı olabileceği rapor edilmiştir (Handtke ve diğ., 2017; Loewen ve diğ., 2015).

*B. pumilus* tarafından üretilen ve katX2 geni tarafından kodlanan katalaz enzimi, homotetramerik yapıda olup ve *b* tipi 'Hem' içermektedir (Loewen ve diğ., 2015).

*B. pumilus* katalazı monofonksiyonel katalaz ailesine dahil edilmiş olsa da, son yıllarda elde edilen bulgular, *B. pumilus* katalazının esas fonksiyonun yanında peroksidaz (Sangar ve diğ., 2012) ve/veya penisilin oksidaz (Loewen ve diğ., 2015) aktiviteleri de gösterdiğine işaret etmektedir.

Fermentasyon süreçlerinde çeşitli stres koşulları (örneğin tuz, ısı ve oksidatif stres), üretim gerçekleştirilen konağın ve fermentasyon ürününün kalitesini bozabilmektedir. Endüstriyel üretim için gerçekleştirilen fermentasyon sürecinin her aşamasında oksidatif stres meydana gelebileceği göz önüne alındığında, *B. pumilus*'un oksidatif strese karşı doğal olarak sahip olduğu potansiyelin ve direncin, bu amaç için kullanılan suşların iyileştirilmesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Handtke ve diğ., 2014).



Şekil 1.3. *Bacillus pumilus* bakterisi (URL-3)

### 1.3. Enzim Üretimi

#### 1.3.1. Enzim üretimi için klonlama stratejileri

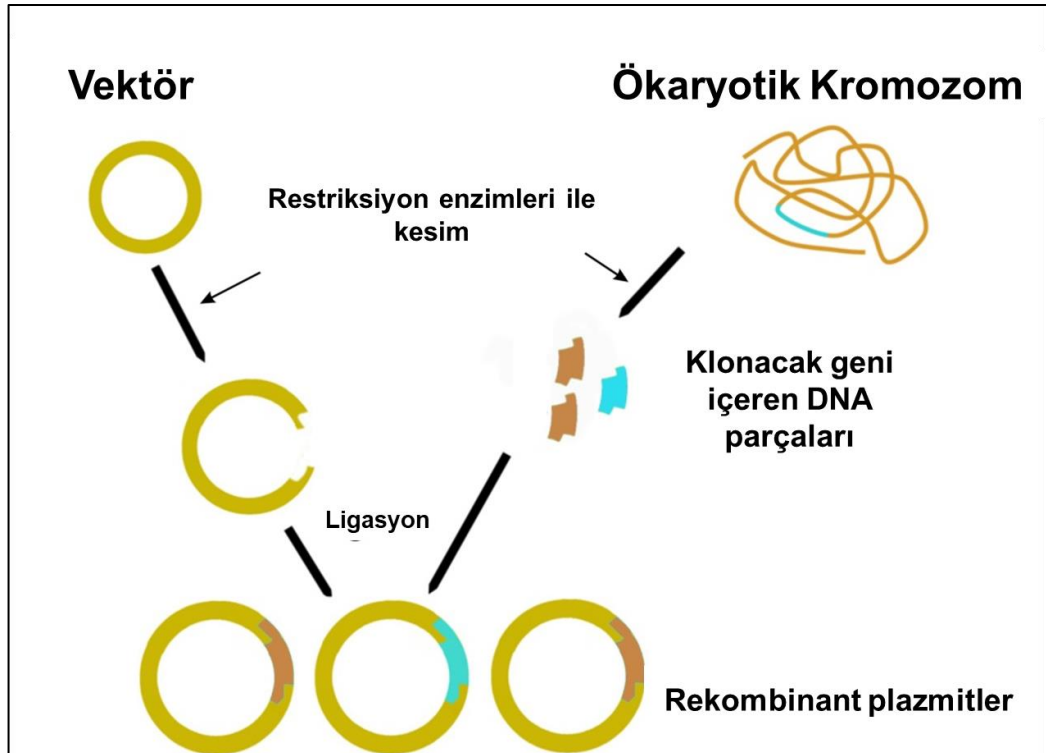
Doğada kendiliğinden bir araya gelmesi mümkün olmayan DNA moleküllerinin kombinasyonu “Rekombinant DNA” olarak tanımlanmaktadır. 1970 yıllarında restriksiyon ve ligaz enzimlerinin keşfi, rekombinant DNA teknolojisinin başlangıcı olarak varsayılmaktadır. Bu teknoloji ile farklı kaynaklardan DNA'nın saflaştırılması, kesilmesi, yapıştırılması, çoğaltımı, yapısının değiştirilmesi ve organizmaya tekrar kazandırılması mümkün hale gelmektedir (Sözen ve diğ., 2010).

Mullis ve ekibinin 1985 yılında DNA'nın birkaç saat içinde birçok kopyasının meydana gelmesini sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PZR) keşfetmesi ile rekombinant DNA teknolojisi, günümüzde başta moleküler genetik olmak üzere birçok alanda çığır açan bir teknoloji olmayı sürdürmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen ürünün, düşük maliyet ile yüksek verimde üretimi sağlanmaktadır. Sağlıklı yaşam koşulları için gerekli kaynaklar sınırlı olmasına rağmen dünya nüfusunun hızla artması, rekombinant DNA teknolojisinin önemini arttırmakta ve gelişimi hızlandırmaktadır (Klug ve diğ., 2011; Sözen ve diğ., 2010).

Rekombinant DNA teknolojisinin temeli, çalışılan organizmadaki ilgili gen bölgesinin klonlanmasına ve kendi kendine çoğalabilen bir taşıyıcı DNA (vektör) içine entegre edilmesine dayanmaktadır (Sözen ve diğ., 2010).

Rekombinant DNA'nın geleneksel üretiminde temel basamaklar şöyledir (Şekil 1.4):

- Klonlanacak geni içeren DNA'nın saflaştırılması
- Klonlanacak genin DNA'dan restriksiyon enzimleri ile kesilmesi
- Vektör DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi
- Vektör DNA'nın ve genin ligasyonu
- Rekombinant DNA'nın kompetan hücreye aktarılması
- Rekombinant DNA'nın saflaştırılması



Şekil 1.4. Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları (URL-4)



Rekombinant DNA'nın geleneksel üretimindeki bu basamaklar ancak manipüle edilecek nükleotit dizisinde restriksiyon bölgelerinin konumunun uygun olması ile gerçekleştirilebilmektedir. Uygun restriksiyon bölgelerinin bulunmaması, geleneksel rekombinant DNA üretimi için sorun haline gelmektedir (Bond ve Naus, 2012)

### 1.3.1.1. Ligasyondan bağımsız klonlama teknikleri

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte, rekombinant DNA eldesi için birçok alternatif yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler, "Ligasyondan Bağımsız Klonlama" olarak sınıflandırılmakta olup, geleneksel tekniklere göre çok daha ucuz ve güvenilir olmakla birlikte zamandan da tasarruf sağlamaktadır. Bu tekniklerin temeli, Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na dayanmaktadır. Ligasyondan bağımsız klonlama tekniklerinin arasındaki farklılıklar Tablo 1.1'de gösterilmektedir (Bryksin ve Matamura, 2010; Stevenson ve diğ., 2013).

Tablo 1.1. Ligasyondan bağımsız klonlama tekniklerinden birkaçının karşılaştırılması

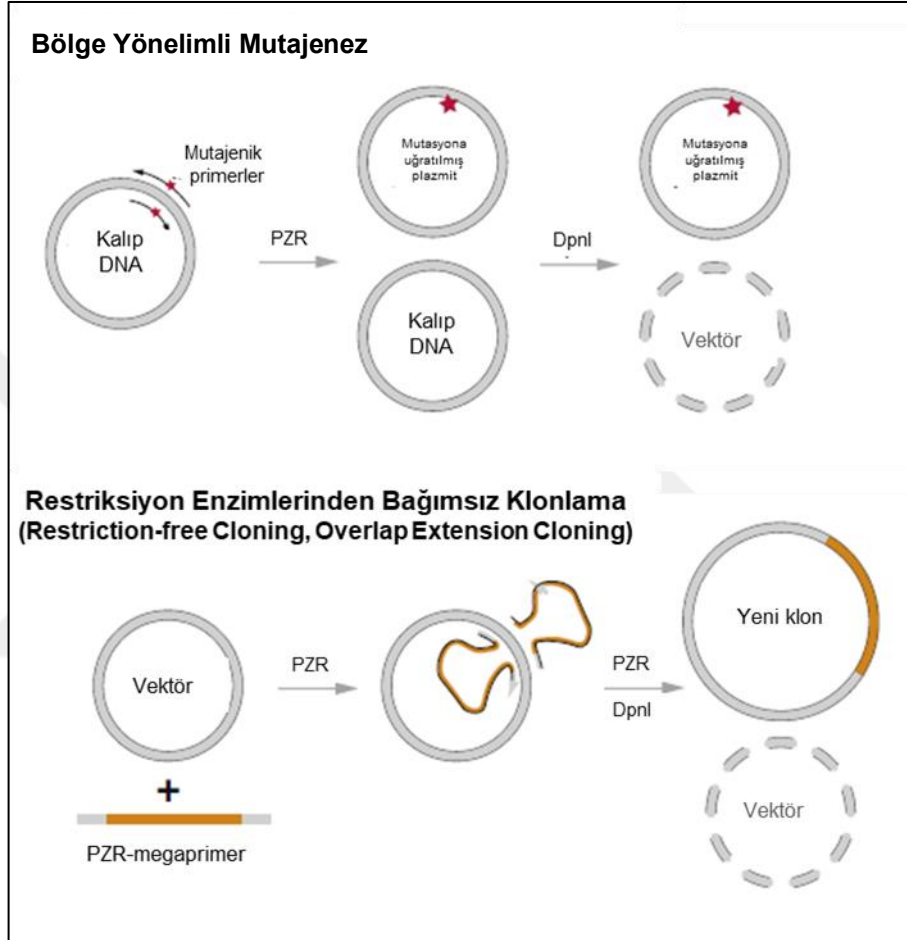
Ligasyondan Bağımsız Klonlama Teknikleri	
Eksik Primerin Polimerazla Uzatılması (Polymerase Incomplete Primer Extension)	Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında elde edilen ürünlerin 3' uçlarında boşlukların gözlemlenmesine dayanmaktadır.
TA Klonlama (TA Cloning)	Timin ve Adenin'in baş harflerinden adını alan bu klonlama yöntemi, Timin bazının Adenin bazına hibridize olmasından yararlanılarak gerçekleştirilmektedir.
Restriksiyon Enzimlerinden Bağımsız Klonlama (Overlap Extension Cloning)	İki aşamalı PZR ile klonlama gerçekleştirilmektedir. Klonlama gerçekleştiğinde gen (insert), 'çentik' durumdadır.

Ligasyondan bağımsız klonlama tekniklerinin bir diğer avantajı ise, istenilen genin, herhangi bir plazmitteki herhangi bir lokasyona klonlanabilmesidir. Bu sayede, Bölüm 1.3.1'de bahsedilen geleneksel klonlama için gerekli olan restriksiyon enzimleri ile kesim ve ligasyon basamaklarına ihtiyaç kalmamaktadır.

### 1.3.1.2. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama

Ligasyondan bağımsız klonlama tekniklerinden biri olan "Restriksiyon Enzimlerinden Bağımsız Klonlama" tekniği, 1989 yılında Stefan Ho'nun keşfettiği bölge-yönelimli mutajenez prensibinden köken almaktadır (Şekil 1.5) (Bond ve Naus, 2012). İki

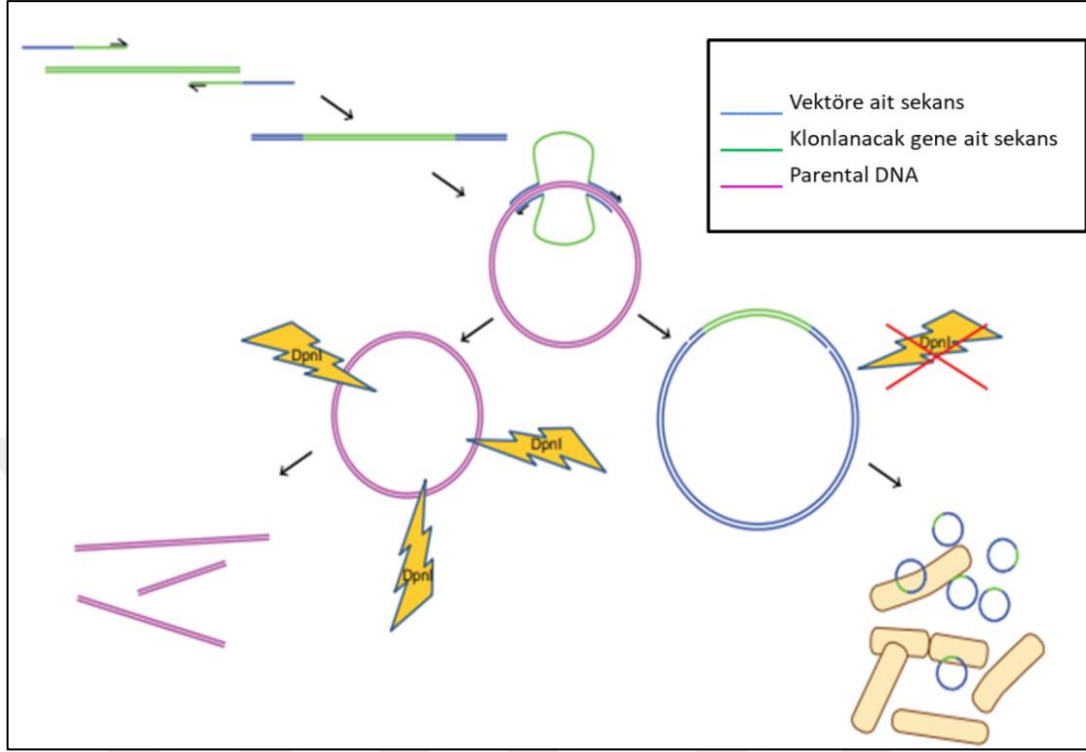
teknikte de, tamamlayıcı oligodeoksiribonükleotit (oligo) primerler, çakışan uçlara sahip iki DNA fragmanı oluşturmak için kullanılır. (Ho ve diğ., 1989) Buna göre primerlerin nükleotit dizileri, hem klonlanması istenen gen bölgesine hem de vektöre ait olacak şekilde tasarlanmaktadır. Böylelikle “Kimerik” ya da “Hibrit” primerler oluşturulmaktadır (Bond ve Naus, 2012).



Şekil 1.5. Bölge yönelimli mutajenez ile restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinin karşılaştırılması (Celie ve diğ., 2016)

Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinde iki amplifikasyon (çoğaltım) gerçekleştirilmektedir. Birinci amplifikasyonda, 5' uçları hedef plazmitten, 3' uçları genden alınarak tasarlanan kimerik (hibrit) primerler ile gen bir araya getirilerek çoğaltılmaktadır. Oluşan ürüne "Megaprimer" adı verilmektedir. İkinci amplifikasyonda megaprimer, hedef plazmiti (parental DNA) tanıyıp bağlandıktan sonra oluşan yeni rekombinant DNA çoğaltılarak klonlama gerçekleştirilmektedir. Bu reaksiyonlardan sonra oluşan yeni rekombinant DNA'da klonlanması istenilen gen "çentik" şeklinde gözlenmektedir. Bu çentik, transformasyonda kompetan hücrelerin sahip olduğu DNA tamir enzimleriyle düzeltilmektedir. Transformasyon öncesinde

ürün, metillenmiş DNA'yı tanıyıp sindiren DpnI enzimi ile muamele edilerek parental DNA'nın parçalanması sağlanmaktadır (Şekil 1.6) (Bond ve Naus, 2012).



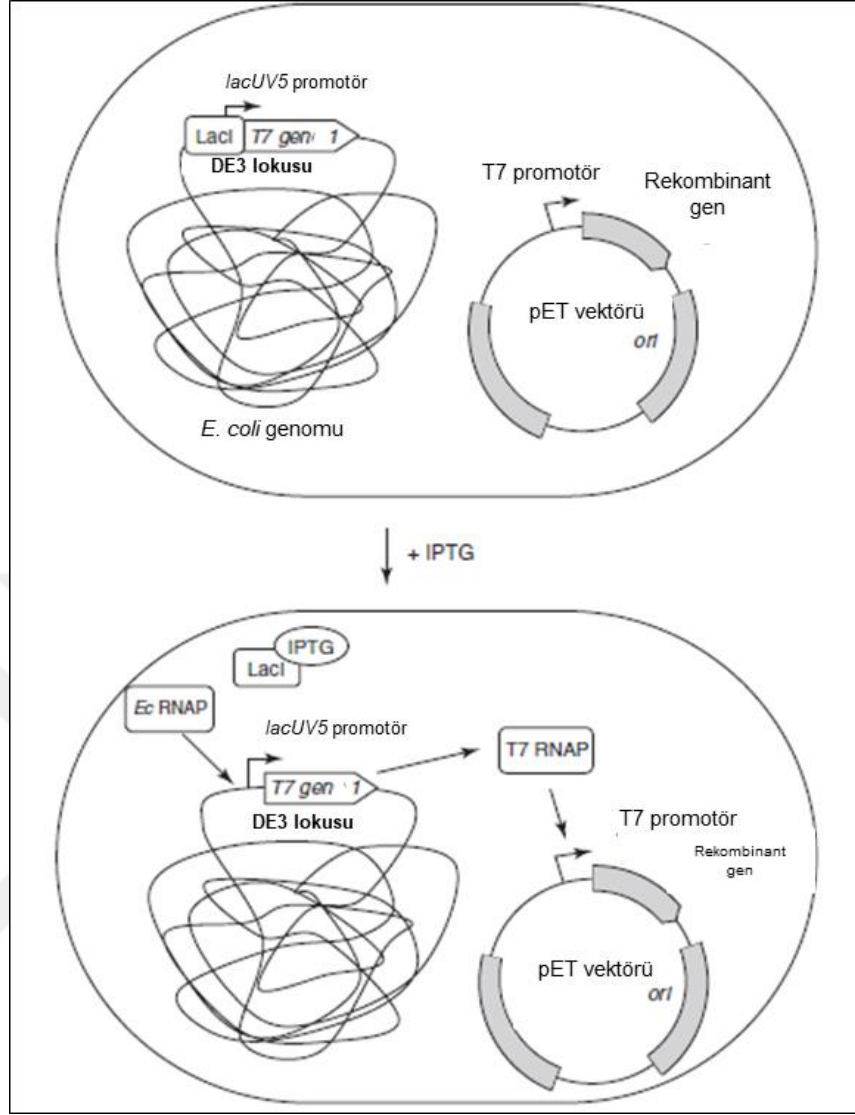
Şekil 1.6. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama yönteminde temel basamaklar (Bond ve Naus, 2012)

### 1.3.2. Bakteriyal konak hücrelerinde rekombinant protein (enzim) üretimi

Oluşturulan rekombinant DNA molekülü, konak hücreye aktarılarak çok sayıda kopyasının meydana gelmesi sağlanmaktadır (Sözen ve diğ., 2010).

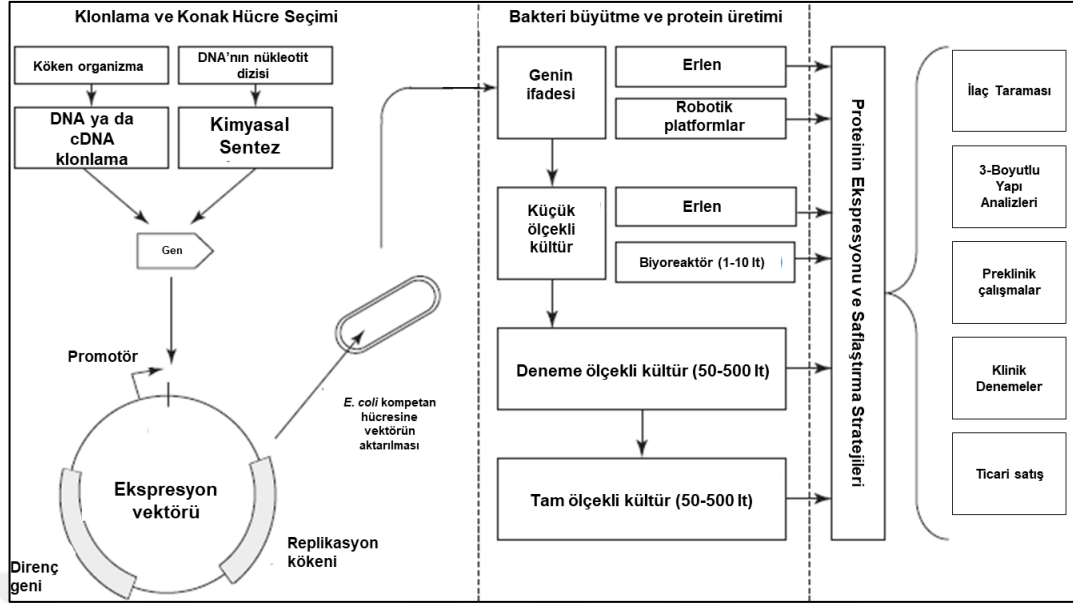
Rekombinant DNA molekülündeki genin şifrelediği enzimin yüksek miktarda üretimi sağlanarak saflaştırılması sonucunda endüstriyel öneme sahip birçok rekombinant protein elde edilmektedir (Klug ve diğ., 2011). Bunun için öncelikle proteini kodlayan gen bölgesinin, genin ekspresyonunu düzenleyen promotörün kontrolü altındaki bir ekspresyon vektörüne klonlanması gerekmektedir. Klonlanacak gen intron içeriyorsa, bakteriler intronları kesip çıkartamayacaklarından dolayı genellikle cDNA kitaplığından klonlanmaktadır. Plazmit vektör, rekombinant protein üretebilme yeteneğine sahip *E. coli* suşuna aktarılır ve elde edilen koloniler sıvı kültürde büyütülür. Büyümenin belirli bir safhasında, rekombinant proteinin üretimi, ekspresyon vektördeki promotör bölgeyi aktive eden kimyasal bir uyarıcı tarafından indüklenir. Bu sayede hücrelerden rekombinant proteinin salınımı çok daha fazla gerçekleştirilebilmektedir (Balasundaram ve diğ., 2009).

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla T7 RNA polimeraza dayalı pET sistemi kullanılmaktadır. pET sisteminin temeli, bakteriyofaj T7'nin RNA polimeraz enzimini kodlayan genin kromozomal kopyasını taşıyacak şekilde tasarlanmış *E. coli* konağına dayanmaktadır. Bu RNA polimeraz geni, IPTG (İzopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozit) ile uyarılabilecek bir promotörün (örneğin lacUV5) kontrolü altındadır. Bu bölge, bakteri kromozomundaki DE3 lokusunda yer almaktadır. IPTG eklenmediği sürece, lac promotörü, LacI represörü tarafından baskılanmaktadır. Bu durumda T7 polimeraz sentezlenmemektedir. IPTG eklendiğinde, LacI represörü, lac promotör bölgesinden uzaklaştırılır ve T7 RNA polimeraz geninin ifadesi gerçekleştirilir. T7 RNA polimeraz, ancak translasyonu gerçekleştikten sonra pET ekspresyon plazmitindeki T7 promotöründen transkripsiyonu yapabilmektedir. En önemlisi, pET ekspresyon plazmitindeki T7 promotörü, *E. coli*'nin ürettiği RNA polimeraz tarafından yeterince aktiveleştirilemediği için, klonlanan genin ekspresyonu IPTG'ye bağlıdır (Şekil 1.7) (Overton, 2014).



Şekil 1.7. pET sistemi (Overton, 2014)

Bakteri gelişiminin ölçeği, rekombinant proteinin kullanılacağı her alanda değişiklik gösterebilen en önemli faktördür. İlk büyütme deneyleri, genellikle küçük ölçekte (10-100 ml) yapılmaktadır. Genin ifadesi ile ilgili çalışmalar, çalkalamalı inkübatörde büyütülerek ya da kültürün kontrol edilebildiği otomatik sistemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (Peti ve Page, 2007). Küçük ölçekte elde edilen kültürler, büyük biyoreaktörlere aktararak yüksek miktarlarda rekombinant protein üretilmekte ve saflaştırıldıktan sonra ilaç taraması, üç boyutlu yapı analizleri, prelinik çalışmalar ve ticari amaçlar için kullanılmaktadır (Şekil 1.8) (Overton, 2014).



Şekil 1.8. *E. coli* organizmasında rekombinant protein üretim süreci (Overton, 2014)

Rekombinant proteinler, bu teknoloji sayesinde sınırsız olarak elde edilebilmekte ve endüstriyel birçok alanda kullanılmaktadır. Bu alanların başında, ilaç, gıda, tekstil endüstrisi gelmektedir. Rekombinant proteinlerin ilaç endüstrisindeki bazı kullanım alanları Tablo 1.2'de verilmektedir.

Tablo 1.2. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen proteinlerin uygulama alanları (Thieman ve Pearson, 2013)

Protein	Kullanım Alanı
Aşı	Hepatit B, sıtma, uçuklara karşı aşılama
Eritropoetin	Anemi tedavisi
İnsülin	Tip 1 ve Tip 2 şeker hastalığı tedavisi
İnterferon	Kanser, alerjiler, astım, bulaşıcı hastalıkların tedavisi
Kan Pıhtılaşma Faktörleri	Hemofili ve benzer hastalıkların tedavisi
Monoklomal Antikorlar	Kanser teşhis amaçlı

### 1.3.3. Katalaz enziminin rekombinant üretimi

İlk kez 1900'lü yıllarda çalışılmaya başlanan katalaz enzimi, bu tarihten itibaren birçok organizmada araştırma konusu olmuştur. Katalaz, analizinin ve substratı olan  $H_2O_2$ 'nin eldesinin kolay olması sebebiyle en çok çalışılan enzimlerden biri haline gelmiştir (Chelikani, 2004).

Yapılan bir çalışmada, *Mycobacterium tuberculosis* mikroorganizmasının ürettiği ve *katG* geni tarafından kodlanan katalaz-peroksidaz enziminin, enoyl redüktaz

enzimini inhibe edici antitüberküloz ajanın aktivasyonunu katalizlediği düşünülmesi sebebiyle katalaz enzimi, analizi yapılmak için saflaştırılmak üzere bölge yönelimli mutasyon ile rekombinant olarak üretilmiştir (Wei ve diğ., 2003).

*Helicobacter pylori*'nin ürettiği katalaz enziminin aktivitesini incelemek üzere yapılan başka bir çalışmada, *H. pylori* katalazını kodlayan gen bölgesi kromozomal DNA kullanılarak çoğaltılmış ve pET22b vektörüne entegre edildikten sonra rekombinant katalaz geni, *E. coli*'nin BL21 (DE3) hücrelerine aktararak ifadesi gerçekleştirilmiştir (Bai ve diğ., 2003).

İnsan katalazını kodlayan cDNA bölgesi, fetal karaciğerinden gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenerek klonlanmış ve daha sonrasında saflaştırılmak üzere *Pichia pastoris* mikroorganizmasında yüksek miktarlarda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. İnsan rekombinant katalazının *P. pastoris* mikroorganizmasında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile yüksek miktarlarda üretiminin yeni bir yaklaşım olarak ele alındığı rapor edilmiştir (Shi ve diğ., 2007).

*E. coli* HPI katalaz-peroksidaz enzimi, farklı substratlar kullanıldığında elde edilen ürünlerin enzimatik polimerizasyon uygulamalarında incelenmesi için saflaştırılmak üzere rekombinant olarak üretilmiştir (Di Gennaro ve diğ., 2014).

İnfluenza A tarafından indüklenen sıçan akciğer iltihaplanmasının, insan katalaz enzimi tarafından baskılanabileceği rapor edilerek, bu amaç doğrultusunda insan katalaz enzimini kodlayan gen, rekombinant olarak elde edilmiş ve koruma mekanizması incelenmek üzere saflaştırılmıştır (Shi ve diğ., 2014).

Termofilik bir mantar olan *Scytalidium thermophilum*'un, fenol oksidaz aktivitesine sahip özgün çift aktiviteli bir katalaz enzimini ürettiği bulunarak, bu enzimin CATPO (katalaz/fenol oksidaz) olarak adlandırıldığı rapor edilmiştir (Kocabas ve diğ., 2008). *Scytalidium thermophilum* katalazının çift aktiviteli özelliği araştırılmak üzere kodon-optimize edilmiş catpo geni klonlanmış ve *E.coli*'ye aktararak rekombinant olarak ifade edilmiştir (Yüzügüllü, 2012). Daha sonrasında ise katalaz ve fenol oksidaz aktivitelerinin gerçekleştiği aktif bölgenin aynı olup olmadığının araştırılması için bölge yönelimli mutasyon tekniği ile varyantlar elde edilmiştir (Yüzügüllü ve diğ., 2013).

## **2. MALZEME VE YÖNTEM**

### **2.1. Malzemeler**

#### **2.1.1. Kimyasallar ve enzimler**

Bu çalışmada kullanılan markörler ve enzimler dahil olmak üzere tüm kimyasallar, Sigma-Aldrich (Almanya), Merck (Almanya), Thermo Fisher Scientific (Amerika), Bio-Rad (Amerika), İtron Biotechnology (Güney Kore), Invitrogen (İngiltere), Bionline (İtalya) firmalarından temin edildi. Genomik DNA izolasyonu için Peqlab DNA izolasyon kiti (Peqlab, Almanya) kullanıldı. Jel ekstraksiyonu ve plazmit DNA izolasyonunu gerçekleştirmek üzere sırasıyla QIAquick Jel Ekstraksiyon ve DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)'dan satın alındı. Sindirim enzimi olarak DpnI (Biolab, İngiltere), EcoRI, HindIII ve PstI (Thermo Fisher Scientific, Amerika) kullanıldı.

#### **2.1.2. Plazmit ve mikroorganizmalar**

*B. pumilus* Y7 izolatu tarafından üretilen katalaz enzimini kodlayan katX2 geninin klonlanması ve *E. coli*'de ekspresyonu için laboratuvarımızda bulunan Histidin etiketli pET28TEVCATPO vektörü (Yüzügüllü, 2010) kullanıldı (Ek-B). *B. pumilus* Y7 izolatu ile *E. coli* XL-1 Blue ve BL21 (DE3 star) suşlarının üretilmesinde LB (Luria Bertani) besiyeri (Ek-A) kullanılmıştır.

Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar Ek-A'da verilmektedir.

### **2.2. Yöntem**

#### **2.2.1. Genomik DNA izolasyonu**

İzmit ve çevresindeki topraklardan alınıp moleküler ve biyokimyasal testler kullanılarak teşhis edilen *B. pumilus* Y7 izolatının kromozomal DNA'sının izolasyonu, genomik DNA izolasyon kitinin (Peqlab, Almanya) sağladığı prosedür doğrultusunda gerçekleştirildi (Sertel, 2016). Bu kapsamda, *B. pumilus* Y7 izolatu 3 ml'lik LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Sonrasında örnek, 4,000xg'de 10 dakika santrifüjlendi ve üst faz atıldı. "TE tamponu"ndan 0,1 ml



eklenerek pelet çözdürüldü, sonra tüpe 0,1 ml lizozim enziminden eklendi ve karıştırıldıktan sonra 30°C'de 20 dakika bekletildi. Tüp daha sonra 4,000xg'de 5 dakika santrifüj edilip, üst faz atıldı. 0,4 ml "DNA lizis tamponu T" ilave edilerek pelet çözdürüldü ve 20 µl "Proteinaz K" enzimi eklenerek pipetleme yapıldı. 15 µl RNase A eklenip tekrar pipetleme yapılarak 10 saniye ters düz edildi. Karışımı içeren tüp 70°C su banyosunda 30 dakika bekletildi. 0,2 ml "DNA bağlanma tamponu" eklenip, pipetleme yapıldı. Örnek daha sonra 2 ml'lik tüplere konulup son solüsyon firma tarafından verilen kolon içine eklendi. 10,000xg'de 1 dakika santrifüj edilmesi sonucunda kromozomal DNA'nın kolona bağlanması sağlandı. Kolon daha sonra temiz bir tüpe aktarılıp 0,65 ml "DNA yıkama tamponu" ilave edilerek 10,000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Tekrar 0,65 ml "DNA yıkama tamponu" ile yıkanan kolon 10,000xg'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra bu defa 10,000xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon daha sonra 1,5 ml'lik steril santrifüj tüplere aktarıldı. Oda sıcaklığındaki steril sudan 50 µl kolona eklenip, önce 70 °C'lik su banyosunda 5 dakika, sonrasında 5 dakika daha oda sıcaklığında bekletilerek 6,000xg'de 1 dakika santrifüj edildi ve DNA'nın kolondan ayrılması sağlandı. Elde edilen *B. pumilus* Y7'nin kromozomal DNA örneği -20°C'de saklandı.

### 2.2.2. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız megaprimer klonlamada primer tasarımı

Kullanılan kimerik (hibrit) primerler, katX2 geninden ve pET28TEVCATPO plazmitinin vektör sekansından toplamda yaklaşık 50 bazlık bir kısma sahip olacak şekilde tasarlandı (Bond ve diğ., 2012). Primerler, Sentegen (Ankara) firmasından satın alındı (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Megaprimer amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primer	Nükleotit Dizisi
5'katX2	5'-GCGGCGAGAACCTGTACTTCCAGGGC <b>ACAAATTC</b> AAATCATAAAAATTTGACAACG-3'
3'katX2	3'-GCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGGG <b>TTATTT</b> CATGTTTCCTTGAAGGTATGAGC-5'

\*Arzu edilen geni içeren nükleotitler kırmızı, vektör sekansına ait nükleotitler siyah renk ile belirtilmiştir.

Tasarlanan primerlerden 100 µM stok hazırlamak için öncelikle 13,000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Sonrasında ise firmaların sağladığı bilgiler doğrultusunda ddH<sub>2</sub>O eklendi ve -20°C'de muhafaza edildi.

### 2.2.3. Megaprimerin amplifikasyonu için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunun optimizasyonu

*B. pumilus* Y7'den izole edilen genomik DNA'dan, 5'katX2 ve 3'katX2 kimerik primerler kullanılarak 1,5 kb büyüklüğündeki katX2 megaprimerinin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Bu amplifikasyonun optimizasyonu için, primerlerin bağlanma sıcaklık aralığı ve genomik DNA konsantrasyonu olmak üzere iki farklı parametre test edildi.

#### 2.2.3.1. Optimum bağlanma sıcaklık aralığının belirlenmesi

Megaprimerin amplifikasyonu için gerçekleştirilen birinci polimeraz zincir reaksiyonunda üç farklı bağlanma sıcaklık aralığı denendi (Tablo 2.2). Bağlanma sıcaklık aralığının denenmesinde kullanılan karışım Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.2. Megaprimerin amplifikasyonu için optimum bağlanma sıcaklık aralığının belirlenmesinde kullanılan denemeler

	1. Deneme			
	PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
1. Deneme	Ön Denatürasyon	94	2 dakika	x1
	Denatürasyon	94	35 saniye	} x30
	Bağlanma	55-60	30 saniye	
	Uzama	68	90 saniye	
	Son Uzama	68	10 dakika	x1
	Saklama	4	Süresiz	-
2. Deneme				
PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü	
2. Deneme	Ön Denatürasyon	94	2 dakika	x1
	Denatürasyon	94	35 saniye	} x30
	Bağlanma	60-65	30 saniye	
	Uzama	68	90 saniye	
	Son Uzama	68	10 dakika	x1
	Saklama	4	Süresiz	-
3. Deneme				
PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü	
3. Deneme	Ön Denatürasyon	94	2 dakika	x1
	Denatürasyon	94	35 saniye	} x30
	Bağlanma	65-70	30 saniye	
	Uzama	68	90 saniye	
	Son Uzama	68	10 dakika	x1
	Saklama	4	Süresiz	-

Tablo 2.3. Megaprimerin amplifikasyonu için optimum sıcaklık aralığının belirlenmesinde kullanılan karışım

PZR Karışımı	Miktar	Konsantrasyon
KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X
KOD Hot Start DNA polimerazı	1 µl	1 U/µl
Genomik DNA	6 µl	28,1 ng/µl
5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM
3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM
MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM
dNTP	5 µl	2 mM
Steril ddH <sub>2</sub> O	27 µl	-
Toplam	50 µl	-

### 2.2.3.2. Genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesi

PZR bileşenlerinden biri olan genomik DNA'dan üç farklı miktarda reaksiyon karışımı hazırlanıp denenerek, megaprimer çoğaltımının optimizasyonu gerçekleştirildi (Tablo 2.4). Bu parametrenin incelenmesinde kullanılan döngü Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Megaprimerin amplifikasyonu için optimum genomik DNA konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan karışımlar

	PZR Karışımı	Miktar	Konsantrasyon
1. Karışım	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X
	KOD Hot Start DNA polimerazı	1 µl	1 U/µl
	Genomik DNA	8 µl	28,1 ng/µl
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM
	dNTP	5 µl	2 mM
	Steril ddH <sub>2</sub> O	25 µl	-
	Toplam	50 µl	-
	2. Karışım	PZR Karışımı	Miktar
KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi		5 µl	10X
KOD Hot Start DNA polimerazı		1 µl	1 U/µl
Genomik DNA		10 µl	28,1 ng/µl
5'katX2 primer		1,5 µl	10 µM
3'katX2 primer		1,5 µl	10 µM
MgSO <sub>4</sub>		3 µl	25 mM
dNTP		5 µl	2 mM
Steril ddH <sub>2</sub> O		23 µl	-
Toplam		50 µl	-

Tablo 2.4. (Devam) Megaprimerin amplifikasyonu için optimum genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan karışımlar

3. Karışım	PZR Karışımı	Miktar	Konsantrasyon
	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözültisi	5 µl	10X
	KOD Hot Start DNA polimerazı	1 µl	1 U/µl
	Genomik DNA	12 µl	28,1 ng/µl
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM
	dNTP	5 µl	2 mM
	Steril ddH <sub>2</sub> O	21 µl	-
	Toplam	50 µl	-

Tablo 2.5. Megaprimerin amplifikasyonu için optimum genomik DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan döngü

PZR Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95	2 dakika	x1
Denatürasyon	95	35 saniye	x30
Bağlanma	55-60	30 saniye	
Uzama	68	90 saniye	
Son Uzama	68	10 dakika	x1
Saklama	4	Süresiz	-

Elde edilen PZR ürünleri, her birinden 5'er µl örnek alınarak %1 w/v'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve DNA konsantrasyonları ölçüldü.

#### 2.2.4. Megaprimerin saflaştırılması

Polimeraz zincir reaksiyonundan elde edilen megaprimer, hem jel ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya), hem de cam yünü tekniği (Sun ve diğ., 2012) ile saflaştırılarak elde edilen verimler karşılaştırıldı.

##### 2.2.4.1. Megaprimerin jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırılması

Megaprimerin jelden saflaştırılması ilk olarak QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak firma tarafından tavsiye edilen protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Buna göre, 1,5 ml'lik eppendorf tüp içindeki PZR ürününü içeren jel örneği üzerine hacminin 3 katı kadar "QG tamponu" eklendi ve jel tamamen eriyinceye kadar 50°C'de 10 dakika bekletildi. Tüpe daha sonra jel miktarı kadar izopropanol (µl) ilave edilerek pipetleme yapıldı. Daha sonra bu karışım kolona eklenerek 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem

sonrasında kolon altında kalan sıvı atılarak kolonun ortasına 500 µl “QG tamponu” eklendi. Kolon 1 dakika santrifüjlendikten sonra ise alttaki sıvı tekrar atıldı ve üzerine 750 µl “PE tamponu” eklendi. Sonrasında karışımı içeren tüp 3 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve 1 dakika süreyle santrifüj edildi ve altta kalan sıvı atılarak tekrar santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında kolonun kapağı açık bir şekilde 5 dakika daha oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak kolon, kapaklı temiz bir eppendorf tüpe konularak; kolonun tam ortasına gelecek şekilde, 50°C su banyosunda önceden ısıtılan saf sudan 30 µl eklenip 4 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve bunu takiben 1 dakika 13,000 rpm’de santrifüj edildi, santrifüj sonrasında bu basamak tekrar edildi. Bu sayede DNA’nın kolondan ayrılması sağlandı (Sertel, 2016).

#### **2.3.4.2. Megaprimerin cam yünü tekniği ile saflaştırılması**

Megaprimerin jelden kit ile saflaştırılmasının yanı sıra, cam yünü tekniği de kullanıldı (Sun ve diğ., 2012). Bu tekniğe göre, 0,5 ml’lik eppendorf tüp 22G şırınga iğnesi ile delinerek, yarısına gelecek şekilde içine steril cam yünü konuldu ve jelden kesilerek çıkartılan megaprimer, tüpün içindeki cam yünün üzerine yerleştirildi. Sonrasında ise megaprimerin jelden kesilerek konulduğu 0,5 ml’lik eppendorf tüp; 1,5 ml’lik eppendorf tüpün içine yerleştirildi. Daha sonrasında 5 dakika 10,000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen megaprimer, yeni bir eppendorf tüpe konuldu. Bu teknik ile elde edilen megaprimer, etanol ile presipite edilerek daha saf hale getirildi.

Etanol ile presipitasyon işlemi için, örnek hacminin 1/10’u kadar 3 M sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 5,2) ve 3 katı kadar saf etanol eklenerek, bir gece -20°C’de bekletildi. Daha sonrasında +4°C’de 30 dakika boyunca 13,500 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı, çöktürülen megaprimerlere zarar verilmeden alındı ve tüpün ağzı açık olacak şekilde bekletilerek etanolün kuruması sağlandı. Tüpte kalan etanol kuruduktan sonra, arzu edilen miktarda ddH<sub>2</sub>O tüpe eklenerek -20°C’ye kaldırıldı.

#### **2.2.5. Megaprimerin hedef vektöre entegresinde gerçekleştirilen PZR optimizasyonu**

Saflaştırılan katX2 megaprimerinin vektöre yerleştirilmesi için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunda belirlenen dört farklı parametrenin (megaprimer

konsantrasyonu, kimerik primer kullanımı, polimeraz enzim çeşidi, vektör:megaprimer oranı) her biri, farklı PZR koşulları denenerek optimize edildi.

### 2.2.5.1. Megaprimer konsantrasyonu

Megaprimerin vektöre entegre edilmesi için gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunda, farklı megaprimer konsantrasyonlarının farklı koşullarda kurulan reaksiyonlar ile “restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama” tekniği üzerindeki etkisi incelendi.

Tablo 2.6. Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda megaprimer konsantrasyonlarının denemesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
1. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	1 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	55-60°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	31 µl	-	
Toplam	50 µl	-		
2. Deneme	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	1 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	55-60°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
Steril ddH <sub>2</sub> O	31 µl	-		
Toplam	50 µl	-		
3. Deneme	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	5 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	55-60°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
Steril ddH <sub>2</sub> O	27 µl	-		
Toplam	50 µl	-		

Tablo 2.6. (Devam) Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda megaprimer konsantrasyonlarının denenmesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
4. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	1. Deneme ürünü	8 µl	19,8 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	55-60°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	27 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
5. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	55-60°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	24 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
6. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	50-55°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	20 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
7. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	80 ng/µl	55-60°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	24 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	

Tablo 2.6. (Devam) Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda megaprimer konsantrasyonlarının denenmesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
8. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	12 ng/µl	94°C – 1 dakika } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	60-65°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	27 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
9. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	12 ng/µl	94°C – 1 dakika } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	65-70°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	24 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
10. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	12 ng/µl	94°C – 1 dakika } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	60-65°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	24 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
11. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	8 µl	12 ng/µl	94°C – 1 dakika } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	65-70°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	24 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	



Tablo 2.6. (Devam) Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda megaprimer konsantrasyonlarının denenmesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
12. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	10 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	55-60°C – 30 saniye } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 7 dakika } x1
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	72°C – 10 dakika } x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	22 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
	13. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X
KOD Hot Start DNA polimeraz		1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
Megaprimer (1,5 kb)		12 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
pET28TEVCATPO		1 µl	70 ng/µl	55-60°C – 30 saniye } x30
5'katX2 primer		1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x1
3'katX2 primer		1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika } x1
MgSO <sub>4</sub>		3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
dNTP		5 µl	2 mM	
Steril ddH <sub>2</sub> O		20 µl	-	
Toplam		50 µl	-	

### 2.2.5.2. Kimerik primer kullanımı

Megaprimerin hedef vektöre entegrasyonunda ele alınan ikinci parametre olarak kimerik primerlerin kullanımının etkisi incelendi. Bunun için KOD Hot Start DNA polimeraz (Novagen, Almanya) ile kurulan beş farklı reaksiyondan dördü kimerik primerler kullanılarak gerçekleştirilirken, bir reaksiyon da kimerik primerler kullanılmadan denendi (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda kimerik primerlerin kullanımı ile gerçekleştirilen PZR denemeleri

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
1. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	12 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	50-55°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x30
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	20 µl	-	
Toplam	50 µl	-		
2. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	12 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	55-60°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x30
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	20 µl	-	
Toplam	50 µl	-		
3. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	12 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	60-65°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x30
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	20 µl	-	
Toplam	50 µl	-		
4. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	12 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	65-70°C – 1 dakika } x30
	5'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x30
	3'katX2 primer	1,5 µl	10 µM	68°C – 10 dakika x1
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	4°C - Süresiz
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	20 µl	-	
Toplam	50 µl	-		

Tablo 2.7 (Devam) Megaprimerin vektöre entegresinin optimizasyonunda kimerik primerlerin kullanımı ile gerçekleştirilen PZR denemeleri

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
5. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz	5 µl	10X	94°C – 2 dakika x1 94°C – 35 saniye } 60-65°C – 1 dakika } x30 68°C – 7 dakika } 68°C – 10 dakika x1 4°C - Süresiz
	Tampon Çözeltisi			
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	
	Megaprimer (1,5 kb)	12 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	70 ng/µl	
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	
	dNTP	5 µl	2 mM	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	26 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	

### 2.2.5.3. Polimeraz enzim optimizasyonu

Bir PZR döngüsü, kalıp DNA'nın iplikçiklerinin birbirinden ayrıldığı denatürasyon, primerlerin DNA zincirlerine bağlanarak yeni zincirin sentezinin başlatıldığı bağlanma ve yeni zincirin sentezinin tamamen gerçekleştiği uzama evresi olarak üç aşamada gerçekleşmektedir. Elde edilen ürün miktarı ise denatürasyon, bağlanma ve uzama evrelerinin tekrarına bağlıdır.

Bu parametrede belirlenen üç farklı DNA polimeraz enziminin (KOD Hot Start DNA polimeraz (Novagen, Almanya), MyFi DNA polimeraz (Bioline, İtalya) ve Phusion polimeraz (Thermo Fisher Scientific, Amerika)) etkinlikleri, farklı PZR döngü koşulları ile denendi (Tablo 2.8). Bu sayede farklı polimeraz enzimleri arasında optimum PZR döngü koşulları belirlendi.

Tablo 2.8. Megaprimerin vektöre entegrasyonu için gerçekleştirilen PZR'de farklı DNA polimeraz enzimlerinin ve döngülerinin denenmesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
1. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	60-65°C – 30 saniye } x30
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 3 dakika } x1
	dNTP	5 µl	2 mM	72°C – 10 dakika } x1
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	4°C - Süresiz
	Toplam	50 µl	-	
2. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x30
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	72°C – 3 dakika } x30
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 10 dakika } x1
	dNTP	5 µl	2 mM	4°C - Süresiz
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
3. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x15
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	60-65°C – 30 saniye } x15
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 3 dakika } x1
	dNTP	5 µl	2 mM	72°C – 10 dakika } x1
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	4°C - Süresiz
	Toplam	50 µl	-	
4. Deneme	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika x1
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	94°C – 35 saniye } x15
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	72°C – 3 dakika } x15
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 10 dakika } x1
	dNTP	5 µl	2 mM	4°C - Süresiz
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	

Tablo 2.8. (Devam) Megaprimerin vektöre entegresi için gerçekleştirilen PZR'de farklı DNA polimeraz enzimlerinin ve döngülerinin denenmesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
5. Deneme	MyFi Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	95°C – 1 dakika x1
	MyFi DNA Polimeraz	2 µl	1 U/µl	95°C – 15 saniye } 60-65°C – 15 saniye } 72°C – 3 dakika } x30
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	72°C – 10 dakika x1
	Toplam	50 µl	-	4°C - Süresiz
6. Deneme	MyFi Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	95°C – 1 dakika x1
	MyFi DNA Polimeraz	2 µl	1 U/µl	95°C – 15 saniye } 72°C – 3 dakika } x30
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	72°C – 10 dakika x1
	Toplam	50 µl	-	4°C - Süresiz
7. Deneme	MyFi Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	95°C – 1 dakika x1
	MyFi DNA Polimeraz	2 µl	1 U/µl	95°C – 15 saniye } 60-65°C – 15 saniye } 72°C – 3 dakika } x15
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	72°C – 10 dakika x1
	Toplam	50 µl	-	4°C - Süresiz
8. Deneme	MyFi Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	95°C – 1 dakika x1
	MyFi DNA Polimeraz	2 µl	1 U/µl	95°C – 15 saniye } 72°C – 3 dakika } x15
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	
	Steril ddH <sub>2</sub> O	12 µl	-	72°C – 10 dakika x1
	Toplam	50 µl	-	4°C - Süresiz
9. Deneme	Phusion DNA Polimeraz HF Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	98°C – 30 saniye x1
	Phusion DNA Polimeraz	1 µl	1 U/µl	98°C – 10 saniye } 60-65°C – 30 saniye } x30
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	
	dNTP	5 µl	2 mM	72°C – 3 dakika x1
	Steril ddH <sub>2</sub> O	8µl	-	72°C – 5 dakika
Toplam	50 µl	-	4°C - Süresiz	
10. Deneme	Phusion DNA Polimeraz HF Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	98°C – 30 saniye x1
	Phusion DNA Polimeraz	1 µl	1 U/µl	98°C – 10 saniye } 72°C – 3 dakika } x30
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	
	dNTP	5 µl	2 mM	72°C – 5 dakika x1
	Steril ddH <sub>2</sub> O	8 µl	-	4°C - Süresiz
Toplam	50 µl	-		

Tablo 2.8. (Devam) Megaprimerin vektöre entegrasyonu için gerçekleştirilen PZR'de farklı DNA polimeraz enzimlerinin ve döngülerinin denenmesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
11. Deneme	Phusion DNA Polimeraz HF Tampon Çözeltisi	10 µl	5X	
	Phusion DNA Polimeraz	1 µl	1 U/µl	98°C – 30 saniye x1
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	12 ng/µl	98°C – 10 saniye } x15
	pET28TEVCATPO	1 µl	62 ng/µl	60-65°C – 30 saniye } x1
	dNTP	5 µl	2 mM	72°C – 3 dakika
	Steril ddH <sub>2</sub> O	8 µl	-	72°C – 5 dakika
	Toplam	50 µl	-	4°C - Süresiz
	12. Deneme	Phusion DNA Polimeraz HF Tampon Çözeltisi	10 µl	5X
Phusion DNA Polimeraz		1 µl	1 U/µl	98°C – 30 saniye x1
Megaprimer (1,5 kb)		25 µl	12 ng/µl	98°C – 10 saniye } x15
pET28TEVCATPO		1 µl	62 ng/µl	72°C – 3 dakika
dNTP		5 µl	2 mM	72°C – 5 dakika x1
Steril ddH <sub>2</sub> O		23 µl	-	4°C - Süresiz
Toplam		50 µl	-	

#### 2.2.5.4. Vektör:megaprimer oranı

Vektör:megaprimer oranı, megaprimerin vektöre entegre edilmesinde önemli bir parametredir (Bond ve Naus, 2012). Bu reaksiyonda optimum değeri belirlemek için 1:2, 1:4, 1:6 olmak üzere üç farklı vektör:megaprimer oranı, vektörün ddH<sub>2</sub>O ile dilüe edilmesiyle hazırlandı. Bu parametrenin etkisini incelemek üzere hazırlanan reaksiyon karışımında KOD Hot Start DNA polimeraz enzimi (Novagen, Almanya) kullanıldı.

Vektör:megaprimer oranı için kullanılan reaksiyon karışımı ve koşulları Tablo 2.9'da verilmiştir.

Tablo 2.9. Megaprimerin vektöre entegrasyonu için gerçekleştirilen PZR'de vektör:megaprimer oranının denemesi

	Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
1:2	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika 1
	Megaprimer (1,5 kb)	10 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x15
	pET28TEVCATPO	1 µl	50 ng/µl	72°C – 3 dakika }
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 10 dakika x1
	dNTP	5 µl	2 mM	4°C - Süresiz
	Steril ddH <sub>2</sub> O	25 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
1:4	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika 1
	Megaprimer (1,5 kb)	25 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x15
	pET28TEVCATPO	1 µl	60 ng/µl	72°C – 3 dakika }
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 10 dakika x1
	dNTP	5 µl	2 mM	4°C - Süresiz
	Steril ddH <sub>2</sub> O	10 µl	-	
	Toplam	50 µl	-	
1:6	KOD Hot Start DNA Polimeraz Tampon Çözeltisi	5 µl	10X	
	KOD Hot Start DNA polimeraz	1 µl	1 U/µl	94°C – 2 dakika 1
	Megaprimer (1,5 kb)	35 µl	10 ng/µl	94°C – 35 saniye } x15
	pET28TEVCATPO	1 µl	60 ng/µl	72°C – 3 dakika }
	MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	72°C – 10 dakika x1
	dNTP	5 µl	2 mM	4°C - Süresiz
	Steril ddH <sub>2</sub> O	-	-	
	Toplam	50 µl	-	

### 2.2.6. DpnI enzimi ile muamele

Polimeraz zincir reaksiyonunun optimizasyonundan sonra, elde edilen her 50 µl ürüne, 20 U DpnI (Biolab, İngiltere) enziminden eklendi ve 37°C'de 3-4 saat muamele edildi. Metillenmiş DNA'yı tanıyan DpnI enzimi ile, elde edilen ürünler arasında parental DNA içeren pET28TEVCATPO plazmitlerinin uzaklaştırılması sağlandı.

### 2.2.7. Kompetan hücrelerin hazırlanışı

*E. coli*'nin kompetan özelliğe sahip hücreleri XL-1 Blue ve BL21 (DE3 star) suşları, antibiyotik içermeyen Luria Bertani Agar (LBA) besiyerine çizgi ekim yapılarak 37°C'de 18 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kolonilerden bir tanesi

seçilerek 5 ml'lik LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 37°C'de bir gece 200 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan ön kültürden 500 µl alınıp 50 ml'lik LB sıvı besiyerine aktarılarak 30 dakikada bir optik yoğunluk değeri (OD) ölçümünü yapmak üzere 3 saat boyunca 200 rpm'de büyümeye bırakıldı. OD değeri, yaklaşık 0,4 olduğu zaman kültür, falkon tüpe aktarılarak 5 dakika buzda bekletildi. Hemen ardından 3.000 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üstte kalan sıvı (üst faz) atıldı. Çöktürülen hücreler (pelet), 20 ml Tfb-1 çözültisinde (Ek-A) çözdürüldükten sonra tekrar 3.000 rpm'de 10 dakika boyunca 4°C'de çöktürüldü. Santrifüj sonrası üst faz atılarak, pelet 2 ml Tfb-2 (Ek-A) çözültisinde çözdürüldü ve 15 dakika buzda bekletildi. Daha sonra hücreler, steril eppendorf tüplere aktarıldı ve sıvı azot ile dondurularak -80°C'de saklandı.

### **2.2.8. *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine transformasyon**

Elde edilen PZR ürünleri, katX2 geninin vektöre entegre edildiğini doğrulamak üzere, kompetan yeteneğine sahip *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine aktarıldı. -80°C'de saklanan hücreler buza yerleştirilerek, 200 µl hücre içeren eppendorf tüplerine reaksiyon ürününün tamamı konuldu ve buzda 30 dakika bekletildi. Buzdan alındıktan sonra hücreler, 42°C'lik sıcak su banyosunda 1 dakika inkübasyonun hemen arkasından tekrar buzda 2 dakika bekletildi. Bu işlemden sonra hücrelerin büyümeleri için ortama 20 mM MgSO<sub>4</sub> içeren LB sıvı besiyerinden 1 ml eklendi. Daha sonrasında örnekler, 37°C, 200 rpm'de 45 dakika inkübasyona bırakıldı. 45 dakika sonunda büyüyen hücreler alınarak 8000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte üstte kalan üst fazın tamamı atıldı ve taze hazırlanmış LB sıvı besiyerinden 100 µl eklenip çöktürülen hücreler yavaşça çözdürüldü. Çözdürülen hücreler, plazmitin dirençli olduğu Kanamisin antibiyotiğinden 50 µg/ml içeren LBA besiyerine yayma yöntemi ile ekimi yapıldıktan sonra bir gece boyunca 37°C'lik etüvde büyümeye bırakıldı.

Hücrelerin oluşturduğu kolonilerin kontrolü, pozitif (pET28TEVCATPO içeren) ve negatif (ddH<sub>2</sub>O içeren) transformasyon yapılarak gerçekleştirildi.

### **2.2.9. Plazmit DNA izolasyonu**

Plazmit DNA izolasyonu, DNA izolasyon kitinin satın alındığı firma (Qiagen, Almanya) tarafından sağlanan bilgiler doğrultusunda gerçekleştirildi. Buna göre, transformasyon sonucu pozitif olan örneklerden tek koloniler seçilerek, 50 µg/ml olacak şekilde Kanamisin içeren 5 ml'lik LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve bir



gece boyunca, çalkalamalı inkübatörde 37°C, 200 rpm'de büyütüldü. Büyütülen kültür, 10,000 rpm'de 3 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan üst faz atılarak, geriye kalan pelete 0,5 ml "P1 tamponu" eklenip hücreler yavaşça pipetleme yöntemi ile çözdürüldü ve 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Daha sonra üzerine 0,5 ml "P2 tamponu" eklendi ve hücreler 4-6 defa ters düz edilerek lizis tepkimesi gerçekleştirildi. Akabinde tüplere 0,7 ml "N3 tamponu" eklenerek 4-6 defa ters düz edildi. Bu işlemden sonra tüpler, 10 dakika boyunca 13,000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan üst faz, elüsyon kolonuna konuldu ve tekrar 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Elüsyon kolonundan geçen ve tüpte biriken sıvı atıldıktan sonra, kolona 0,5 ml "PB tamponu" yüklendikten sonra tekrar 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, altta kalan sıvı atıldı. 0,75 ml "PE tamponu" ile kolon yıkandı ve 13,000 rpm'de 1 dakika santrifüj sonrası altta kalan sıvı atılıp tekrar santrifüj edildi. DNA yüklü kolon, yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı. Kolonun tam ortasına gelecek şekilde 70°C'de ısıtılan ddH<sub>2</sub>O konuldu ve 1 dakika beklendikten sonra santrifüj edilerek DNA'nın kolondan ayrılması sağlandı.

#### **2.2.10. Agaroz jel elektroforezi**

DNA içeren örnekleri incelemek amacıyla Agaroz Jel Elektroforez tekniği kullanıldı. 10X Tris Asetat-EDTA (TAE) (Ek A) solüsyonu 1X elde edecek şekilde seyreltildi ve içine %1 w/v olacak şekilde tartılan agaroz ilave edildi. Sonrasında karışım mikrodalga fırında agarozun erimesi ile homojen hale getirilerek soğumaya bırakıldı. Yeterince soğuyan homojen karışıma 1 g/ml olacak şekilde RedSafe (Intron Biotechnology, Güney Kore) eklenerek çalkalama yöntemi ile çözünmesi sağlandı. Elde edilen karışım elektroforez sistemindeki tabağa döküldü ve polimerize olması için bekletildi.

Polimeraz zincir reaksiyonlarından, plazmit DNA izolasyonundan, restriksiyon enzimleri ile kesim ve koloni polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarından elde edilen örnekler yükleme tamponuna (6X; Biolab, İngiltere) 1:5 oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Aynı zamanda farklı bir kuyucuğa 6 µl markör (Biolab, İngiltere) eklendi. Örnekler 100 V'da 60 dk yürütüldü (Yuzugullu ve diğ., 2013). DNA bantları, UV ışık ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi.

### 2.2.11. Nükleik asit konsantrasyon tayini ve saflık ölçümleri

DNA örneklerinin konsantrasyonunun belirlenmesi için Qubit 2.0 Fluorometer kiti (İnvitrogen, Amerika), saflığının tayini için ise UV spektroskopisi kullanıldı. UV spektroskopisinin 260 nm ve 280 nm değerlerinde alınan ölçümlerin sonuçlarında A260/A280 oranının 1,7-2,0 arasında olmasına özen gösterildi.

### 2.2.12. Koloni polimeraz zincir reaksiyonu

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerdeki plazmit DNA'ların katX2 geni içerip içermediğinin kontrolü için "koloni polimeraz zincir reaksiyonu" gerçekleştirildi. Buna göre, petrideki kolonilerden steril çubuk yardımı ile yüzeysel olarak alınan hücreler, içerisinde 20 µl ddH<sub>2</sub>O eppendorf tüplere batırılarak karıştırıldı ve reaksiyon karışımında kullanılmak üzere +4°C saklandı. Daha sonrasında polimeraz zincir reaksiyonu Taq Polimeraz (Biolab, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünleri, -20°C'de saklandı ve %1 w/v'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçları incelendi (URL-5). Koloni PZR'nin reaksiyon içeriği ve koşulları Tablo 2.10'da verilmiştir.

Tablo 2.10. Koloni PZR karışımı ve koşulları

Karışım	Miktar	Konsantrasyon	PZR Koşulları
Taq Polimeraz Tampon Çözeltisi	2 µl	10X	
Taq Polimeraz	0,5 µl	1 U/µl	95°C – 6 dakika x1
Koloni örneği	1 µl	10 ng/µl	95°C – 30 saniye } x30
5'katX2	1,5 µl	10 µM	55°C – 30 saniye } x30
3'katX2	1,5 µl	10 µM	68°C – 7 dakika } x30
MgSO <sub>4</sub>	3 µl	25 mM	68°C – 10 dakika x1
dNTP	2,5 µl	2 mM	4°C - Süresiz
Steril ddH <sub>2</sub> O	8 µl	-	
Toplam	20 µl		

### 2.2.13. Restriksiyon enzimleri ile kesim

Elde edilen plazmit DNA örneklerinin katX2 genini içerdiğinin tespiti için EcoRI, PstI ve HindIII (Thermo Fisher Scientific, Amerika) restriksiyon enzimleri seçilerek 37°C su banyosunda 5-16 saat inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon karışımları, firmanın sağladığı prosedür doğrultusunda hazırlandı (Tablo 2.11).

Tablo 2.11. Restriksiyon enzim denemeleri

	Reaksiyon Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
	EcoRI	10X Buffer EcoRI	2 µl
Plazmit DNA örneği		1 µl	0,5-1 µg/µL
ddH <sub>2</sub> O		16 µl	-
EcoRI (5000U, Thermo Fisher Scientific)		1 µl	10U/µL
Toplam		20 µl	
PstI	Reaksiyon Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
	10X Buffer O	2 µl	1X
	Plazmit DNA örneği	1 µl	0,5-1 µg/µL
	ddH <sub>2</sub> O	16 µl	-
	PstI (3.000U, Thermo Fisher Scientific)	1 µl	10U/µL
Toplam	20 µl		
HindIII	Reaksiyon Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
	10X Buffer R	2 µl	1X
	Plazmit DNA örneği	1 µl	0,5-1 µg/µL
	ddH <sub>2</sub> O	16 µl	-
	HindIII (5000U, Thermo Fisher Scientific)	1 µl	10U/µL
Toplam	20 µl	-	
EcoRI & PstI	Reaksiyon Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
	10X Buffer Tango	2 µl	1X
	Plazmit DNA örneği	1 µl	0,5-1 µg/µL
	ddH <sub>2</sub> O	14 µl	-
	EcoRI (5000U, Thermo Fisher Scientific)	1 µl	10U/µL
PstI (3.000U, Thermo Fisher Scientific)	1 µl		
Toplam	20 µl		
EcoRI & HindIII	Reaksiyon Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
	10X Buffer Tango	2 µl	1X
	Plazmit DNA örneği	1 µl	0,5-1 µg/µL
	ddH <sub>2</sub> O	14 µl	-
	EcoRI (5000U, Thermo Fisher Scientific)	1 µl	10U/µL
HindIII (5000U, Thermo Fisher Scientific)	1 µl		
Toplam	20 µl		

#### 2.2.14. Sekans analizi

Plazmit örneklerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi ve transformasyon sonrası katX2 gen bölgesinin kontrolü için gerçekleştirilen koloni PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre seçilen örnekler, T7 promotör, terminatör primerleri

ve plazmit sekansından alınarak tasarlanan primerler ile Sentegen (Ankara), MedSanTek (İstanbul) ve BMLabosis (Ankara) firmalarına sekans analizi için gönderildi (Tablo 2.12). Sekans sonuçları, nükleotit dizileri protein sekansına dönüştürüldükten sonra NCI ile analiz edildi.

Tablo 2.12. Sekans analizi için tasarlanan primerler

Primer	Oligonükleotit Dizisi
T7 Promotör	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 Terminatör	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
F76	5'-GCTGGTCACCGCGGTCC-3'
F142	5'-CGTGAACGCATTCCAGAGC-3'
F172	5'-GCAAGAGGCGCCGGCGC-3'
F250	5'-CGTGACGCATTCCAGAGCG-3'
F582	5'-GCGCGTTCTGGTGTGC-3'
F1059	5'-GCCCATTCGGTGAAGTGTCC-3'

#### 2.2.15. *E. coli* BL21 (DE3 star) hücrelerine transformasyon

Sekans sonuçlarına göre, katX2 genine sahip plazmitlerin, rekombinant protein üretimi için *E. coli*'nin kompetan yeteneğine sahip BL21 (DE3 star) hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.

-80°C'de muhafaza edilen kompetan hücreler, buzun içerisinde konarak yaklaşık 5 dakika erimesi beklendi. Hemen sonrasında, her 50 µl hücreye, en az 1-10 ng DNA içeren plazmit ürününden 3-4 µl eklendi ve buzda 30 dakika bekletildi. Daha sonra, 42 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 1 dakika inkübe edildi, bu işlemin arkasından örnekler alınarak tekrar buzda 2 dakika bekletildi. Tüplere, 450 µl LB sıvı besiyeri eklendi. Hücreler, 37°C ve 200 rpm olarak ayarlanan çalkalamalı inkübatörde bir saat büyümeye bırakıldı. Sonrasında 8000 rpm'de 3 dakika santrifüjden sonra üstte kalan LB sıvı besiyerinden 400 µl atılarak hücreler geri kalan 100 µl içinde tekrar çözdürüldü. Çözdürülen hücreler, 50 µg/ml kanamisin içeren LBA besiyerine yayma yöntemi ile inoküle edildi (Yuzugullu ve diğ., 2013b).

Transformasyon sonrası hücre stoğu yapmak üzere, seçilen tek koloni Kanamisin (50 µg/ml) içeren 10 ml'lik LB sıvı besiyerine öze yardımıyla inoküle edilerek 37°C ve 200 rpm'de bir gece büyümeye bırakıldı. Sonrasında elde edilen hücre kültürü, %80 w/v gliserol içeren ortama aktarılarak sıvı azot ile dondurulduktan sonra -80°C'de saklandı.

## 2.2.16. Rekombinant protein ifadesinin optimizasyonu

Rekombinant protein ifadesini optimize etmek için, başta sıcaklık olmak üzere, inkübasyon süresi, IPTG (İzopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranozit) varlığı, çalkalama hızı ve erlen hacmi olmak üzere beş farklı büyüme parametresi (Tablo 2.13) denendi.

Öncelikle, -80°C'de muhafaza edilen örnekten, Kanamisin (50  $\mu$ g/ml) içeren LBA besiyerine tek koloni elde etmek üzere çizgi ekim yapılarak, 37°C etüvde bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kolonilerden bir tanesi seçilip Kanamisin (50  $\mu$ g/ml) içeren LB sıvı besiyerine inoküle edildi, böylece ekspresyon optimizasyonu için ön kültür hazırlandı. Elde edilen ön kültürden belirli miktarlarda alınarak, önceden belirlenen Tablo 2.13'teki koşullar uygulanmak üzere büyük hacimdeki LB sıvı besiyerine aktarıldı. Belirlenen koşullarda büyütülen hücrelerden 16. ve 24. saatlerde 1,5 ml örnek alınıp eppendorf tüplere aktararak 6.000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst faz atıldı ve pelete endonükleaz içeren 100  $\mu$ l lizis çözeltisi (pH 8) eklenerek 2 saat bekletildi. Lizis işlemi sonrasında örnekler +4°C'de 10,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Üst faz ve alt faz (pelet) örnekleri, SDS-PAGE jel elektroforezinde yürütülerek katalaz aktiviteleri ölçüldü.

Tablo 2.13. Rekombinant protein ifadesi için optimizasyon koşulları

Koşul	IPTG	Sıcaklık	Rpm	Tepe boşluğu
1	-	37°C	120	2,5X
2	+	37°C	120	2,5X
3	-	37°C	200	2,5X
4	+	37°C	200	2,5X
5	-	30°C	120	2,5X
6	+	30°C	120	2,5X
7	-	30°C	200	2,5X
8	+	30°C	200	2,5X
9	-	20°C	120	2,5X
10	+	20°C	120	2,5X
11	-	20°C	200	2,5X
12	+	20°C	200	2,5X
13	+	37°C	200	5X
14	+	30°C	120	5X

### 2.2.14.1. SDS-PAGE analizi

Rekombinant protein üretiminden elde edilen üst faz ve pelet örneklerinin SDS-PAGE analizi ile ekspresyon optimizasyon koşullarının karşılaştırılarak optimum koşullarının belirlenmesi için Bio-Rad Mini Protean (Amerika) sistemi kullanıldı.

SDS PAGE Elektroforez jeli için; %5 (v/v) yükleme jeli (125 mM Tris-HCl [pH 6,8], %0,1 w/v SDS, %5 v/v Akrilamid ve TEMED) ve %15 (v/v) ayırma jeli (375 mM Tris-HCl [pH 8,8], %0,1 w/v SDS, %15 v/v Akrilamid ve TEMED) hazırlandı (Laemmli, 1970). Örnekler,  $\beta$ -merkaptoetanol (indirgeme ajanı) ile 90°C su banyosunda 10 dk bekletilerek denatüre edildi. Proteinlerin molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla BioRad Low Range, 14,4-97,4 kDa (161-0304) marköründen yararlanıldı. Bio-Rad Mini Protean (Amerika) sistemine yüklenen örnekler, 150 V'da 60 dk yürütüldü. Sonrasında jel sistemden çıkartılarak, Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası ile boyanması gerçekleştirildi. Jelde örneklerin boyanmasından sonra, boyanın uzaklaştırılması için Destain solüsyonu (Ek-A) kullanıldı.

### 2.2.14.2. Enzim aktivite tayini

Rekombinant protein üretiminde elde edilen supernatan ve pelet örneklerinin katalaz aktivitelerin spektrofotometre cihazı (Cary 60, Agilent) ile ölçülerek ekspresyon koşullarının verimliliği analiz edildi.

Reaksiyon karışımında 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM (pH 7,0) sodyum fosfat tamponu ve toplam hacim 1 ml olacak şekilde supernatan ve peletten elde edilen örnekler kullanıldı. İlk olarak 37°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunda, substrat solüsyonu (tampon çözeltisinde hazırlanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 dk inkübe edildi. Inkübe edilen solüsyon plastik UV küvete (Brand, Almanya) aktarılarak örnek eklendi. Sonrasında ise cihazın absorbans değeri 240 nm'ye ayarlanarak ölçüm yapıldı. Enzim aktivitesi başlangıç reaksiyon hızı ve hidrojen peroksitin yok olma katsayı değeri (39,4 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) kullanılarak belirlendi (Merle, 2007).

Bir enzim ünitesi, dakikada 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ayrışmasını katalize eden enzim miktarı olarak tanımlanarak aşağıdaki Denklem (2.1)'deki gibi;

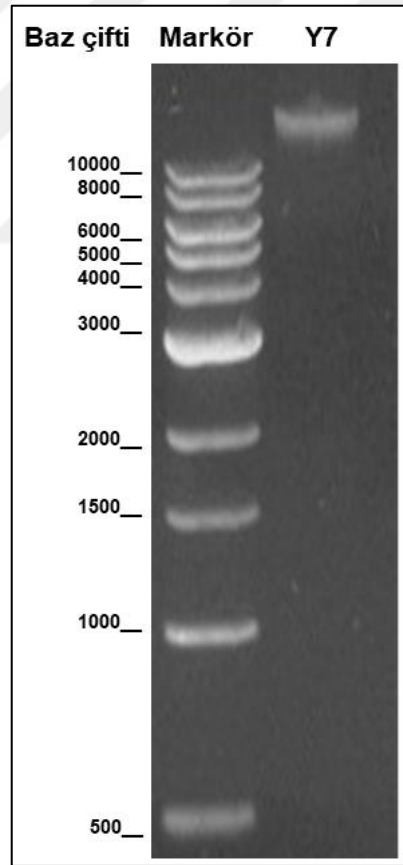
$$\text{Katalaz Aktivite}(\mu\text{mol ml}^{-1}\text{dk}^{-1}) = \frac{(\Delta\text{OD}/\Delta t) \times \left(\frac{1}{\epsilon}\right) \times \text{Reaksiyon Hacmi (ml)} \times 100}{\text{Enzim Hacmi (ml)}} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \quad (2.1)$$

hesaplandı.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. *B. pumilus* Y7 Genomik DNA'sının İzolasyonu

Moleküler ve biyokimyasal testler ile tanımlanan *B. pumilus* Y7 (Sertel, 2016) bakterisinin genomik DNA izolasyonu, Bölüm 2.2.1'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Bölüm 2.2.11'de açıklanan şekilde Qubit 2.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen, Amerika) ile ölçülen genomik DNA'nın konsantrasyonu 28,1 ng/µl olarak belirlendi. Sonrasında ise izole edilen ve 3,704,464 baz çifti olduğu bilinen (URL-6) *B. pumilus* bakterisinin genomik DNA'sı, %1 w/v'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek istenilen bant görüntüsü elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *B. pumilus* genomik DNA'nın izolasyon sonrası agaroz jeldeki görüntüsü

### **3.2. B. pumilus Y7 Katalaz (katX2) Geninin Klonlanması**

Genomik DNA'sı izole edilen *B. pumilus* Y7 izolatu tarafından üretilen katalazın özelliklerinin araştırılması amacıyla, bu katalazı kodlayan katX2 geninin rekombinant olarak üretiminde tercih edilen "Restriksiyon Enzimlerinden Bağımsız Klonlama" tekniği, son yıllarda rekombinant DNA'nın eldesinde alternatif olarak geliştirilen birçok yöntemden biri olup, Bölüm 1.3.3.2'de bahsedildiği üzere basit, güvenilir ve zamandan tasarruf sağlayan bir teknik olarak literatürde yer almaktadır.

Yöntem, ilki "megaprimer üretimi ve amplifikasyonu", ikincisi "megaprimerin vektöre yerleştirilmesi" amacıyla gerçekleştirilen iki polimeraz zincir reaksiyonundan meydana gelmektedir (Bond ve Naus, 2012).

#### **3.2.1. B. pumilus Y7 katalaz (katx2) geninin amplifikasyonu**

Bölüm 1.3.3.2'de açıklanan bölge yönelimli mutajenezde olduğu gibi, bu teknikte de yüksek verimde ürün elde edilebilmesi için denenecek parametrelerin başında primerlerin "bağlanma sıcaklığı" gelmektedir (Celie ve diğ., 2016).

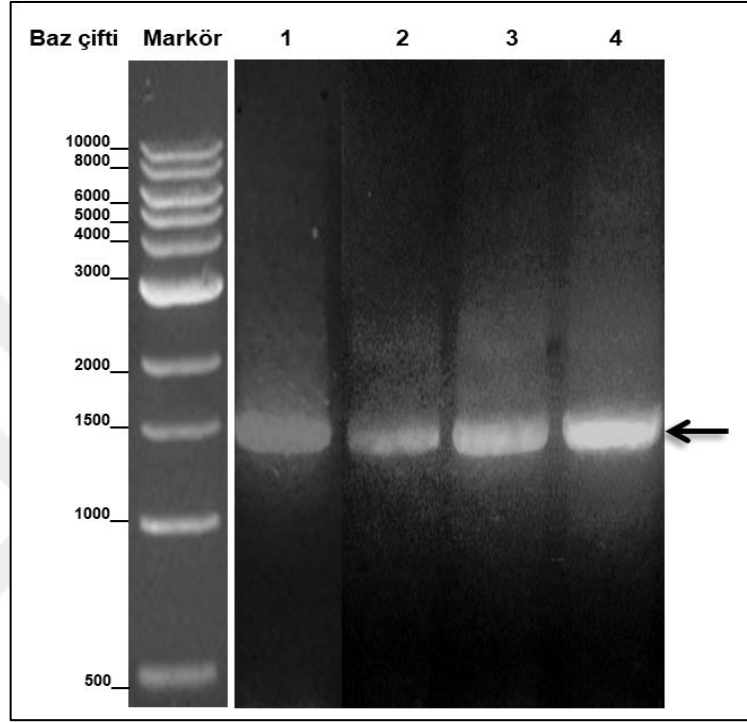
Uzunluğu 20 bp veya daha fazla olan çoğu primer için reaksiyon protokolünde başlangıç bağlanma sıcaklığı 54°C olarak seçilir; çünkü bağlanma sıcaklığı; primerlerin erime sıcaklığından ( $T_m$ ) yola çıkılarak belirlenir. Primerlerin sahip olduğu baz diziliminde GC oranı çok yüksek olmadığı sürece, DNA zincirlerinin eşleşmesi ve tekrar bağlanması için gereken sıcaklık aralığı 55-65°C'dir. İstenilen ürün elde edildiği sürece bağlanma sıcaklığının değiştirilmesi, primer dimerleri ya da özgün olmayan ürünleri oluşturacağından önerilmemektedir (Bardakçı ve Yenidünya, 2010).

*B. pumilus* katalazını kodlayan katX2 geninin, Bölüm 2.2.2'de verilen 5'katX2 ve 3'katX2 kimerik primerleri ile bir araya getirilerek meydana getirilen megaprimerin çoğaltılması için kurulan reaksiyonlarda optimum bağlanma sıcaklığı ile reaksiyon karışımındaki genomik DNA miktarı parametreleri denendi, ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

Agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre, Tablo 2.2'de verilen bağlanma sıcaklıklarının optimizasyonu için gerçekleştirilen koşullardan sadece birinci denemenin (94°C'de 2 dakika ön denatürasyon evresi, 30 döngüye sahip 94°C'de 35 saniye denatürasyon, 60-65°C'de 1 dakika bağlanma, 68°C'de 90 saniye uzama evreleri, 68°C'de 10 dakika son uzama evresi), ürün verdiği gözlemlendi. Tablo 2.4'te



verilen reaksiyon karışımlarından ise *B. pumilus* Y7 izolatının genomik DNA'sından 12 µl alınarak hazırlanan reaksiyon karışımının ürün elde edilen en iyi üçüncü karışım olmasının yanı sıra tüm karışımlarda megaprimerin elde edildiği tespit edildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda jelde gözlemlenen bantların 1,5 kb boyutunda olması, katX2 geninin boyutu ile uyumlu olduğuna işaret etmektedir (Şekil 3.2).

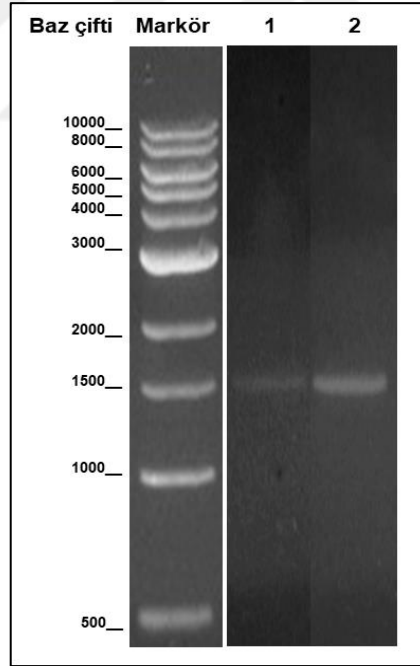


Şekil 3.2. Megaprimerin amplifikasyonunun optimizasyonu için gerçekleştirilen PZR denemelerinin sonuçlarının görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, Tablo 2.2'de verilen birinci PZR ürünü; 2, Tablo 2.4'teki birinci karışım kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünü; 3, Tablo 2.4'teki ikinci karışım kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünü; 4, Tablo 2.4'teki üçüncü karışım kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünü (Hedef DNA'ya ait bant, ok ile gösterildi)

Sonuç olarak katX2 megaprimerinin amplifikasyonu için gereken polimeraz zincir reaksiyonunda Tablo 2.2'de gerçekleştirilen denemeler arasından optimum bağlanma sıcaklık aralığının 55-60°C olduğu belirlendi. Bu bağlanma sıcaklığı kullanılarak gerçekleştirilen konsantrasyon denemeleri arasından, agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre en yoğun DNA bandının görüntülediği Tablo 2.4'te verilen üçüncü karışım tercih edildi ve bir sonraki aşama olan megaprimerin hedef vektöre entegrasyonunda kullanılmak üzere saflaştırıldı.

### 3.2.2. katX2 megaprimerinin saflaştırılması

Stevenson ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmalarda, megaprimer ve vektör bir araya getirilmeden önce, megaprimerin amplifikasyonunda gerçekleşebilecek primer dimerlerin oluşması ya da spesifik olmayan bölgelerin çoğaltılması gibi safsızlığa sebep olacak ihtimallere karşı, bu reaksiyon sonucunda elde edilen megaprimerin saflaştırılması gerektiği rapor edilmiştir. Buna göre, megaprimer amplifikasyonundan elde edilen ürünler, Bölüm 2.2.4'te açıklandığı şekilde hem jel ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) hem de cam yünü tekniği ile saflaştırıldı. Her iki yöntemle elde edilen megaprimerler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek yöntemlerin verimlilikleri karşılaştırıldı (Şekil 3.3). Ayrıca saflaştırılan megaprimerlerin DNA konsantrasyonları Qubit 2.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen, Amerika) ile ölçüldü (Tablo 3.1). Her iki teknikte benzer konsantrasyonlarda DNA eldesi mümkün olduğundan megaprimer saflaştırılmasında cam yünü tekniğinin hem maliyetinin ucuz olması hem de uygulamanın basit olması nedeniyle kullanılması daha uygun olduğuna karar verildi.



Şekil 3.3. İki farklı yöntemle saflaştırılan megaprimerin görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, Jel ekstraksiyon kit aracılığı ile saflaştırılan megaprimer; 2, Cam yünü tekniği ile saflaştırılan megaprimer

Tablo 3.1. Saflaştırılan megaprimerlerin konsantrasyonları

Megaprimer Numarası	Saflaştırma sonrası DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	Saflaştırılma Yöntemi
1	13,3	Kit
2	12,4	Cam yünü

### 3.3. katX2 Megaprimerinin Hedef Vektöre Entegre Edilmesi

katX2 gen bölgesini çoğaltmak için yapılan birinci PZR'de elde edilen ürün, saflaştırıldıktan sonra ikinci PZR'de hedef plazmite yerleşmesi için "megaprimer" olarak kullanıldı. Megaprimer olarak elde edilen katX2 geninin, yaklaşık 7,4 kb olan pET28TEVCATPO (Yuzugullu ve diğ., 2013a) plazmitindeki *catpo* geninin bulunduğu bölgeye yerleşmesi suretiyle 6,7 kb büyüklüğündeki pET28TEVKATX2 plazmitinin elde edilmesi amaçlandı.

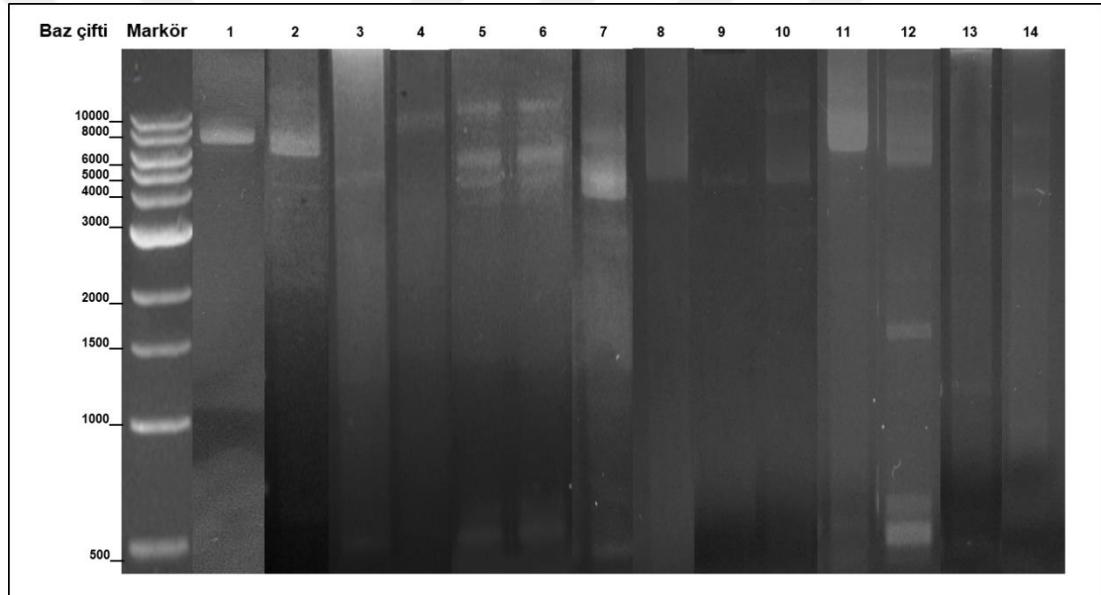
Geleneksel polimeraz zincir reaksiyonunda, sentez sırasında oluşan nokta mutasyonları çoğaltılabildiği için ürün, geometrik olarak genişler. Diğer yandan, restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinde gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonunda megaprimer, parental hedef plazmiti tanıyan uçlara sahip olduğu için sadece amplifikasyonu başlatıcı olarak görev alır. Bu durum, DNA moleküllerinin aritmetik olarak birikmesine yol açar. Böylece, klonlanma amacı ile gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonlarında mutasyonların en aza indirgenmesi sağlanır. Şekil 1.6'da gösterildiği üzere; yeni sentezlenen iplikçikler bağlandığında, megaprimerler, çentikli bir hibrid molekül oluşturarak plazmiti halkasal hale getirip, uzunlamasına tamamlayıcı çıkıntılar gibi davranırlar. DpnI enzimi, metillenmiş parental plazmiti parçalanması için kullanılır ve bu sayede geride sadece metillenmemiş ve *in vitro* sentezlenmiş hibrit plazmitler kalır. Bu sayede, hibrit plazmitlerin, kompetan bakteri hücrelerine transformasyon için hazır hale gelmesi sağlanır (Bond ve Naus, 2012).

katX2 geni ile hedef vektörde bulunan *catpo* genlerinin (pET28TEVCATPO) yer değiştirmesi için gerçekleştirilen PZR'de verimi arttırmak amacıyla dört farklı parametre (megaprimer konsantrasyonu, kimerik primerlerin etkisi, polimeraz enzimi, vektör:megaprimer oranı) denendi. Hedef vektör, plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya) aracılığı ile saflaştırıldı. Qubit 2.0 Fluorometer cihazı (Invitrogen, Amerika) ile 160 ng/μl konsantrasyonunda elde edilen plazmitin saflığı 1,79 olarak

hesaplandı. Elde edilen plazminin saflığının ve konsantrasyonunun yeterli olması sebebiyle PZR reaksiyonlarında bu plazmit kullanıldı.

### 3.3.1. Megaprimer konsantrasyonu

Saflaştırılan megaprimerin hedef vektöre yüksek verimde entegrasyonu için gerçekleştirilen PZR denemelerinde (ikinci PZR) ilk hedef kullanılan megaprimerin konsantrasyonunun belirlenmesi üzerine kuruldu. Buna göre farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PZR karışımları primer bağlanma ve uzama sıcaklıklarının ile değiştirildiği on üç reaksiyon denemesine (Tablo 2.6) maruz bırakıldı. Elde edilen ürünlerin %1 w/v'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri, Tablo 2.6'da isimlendirildiği gibi Şekil 3.4'te verilmiştir.

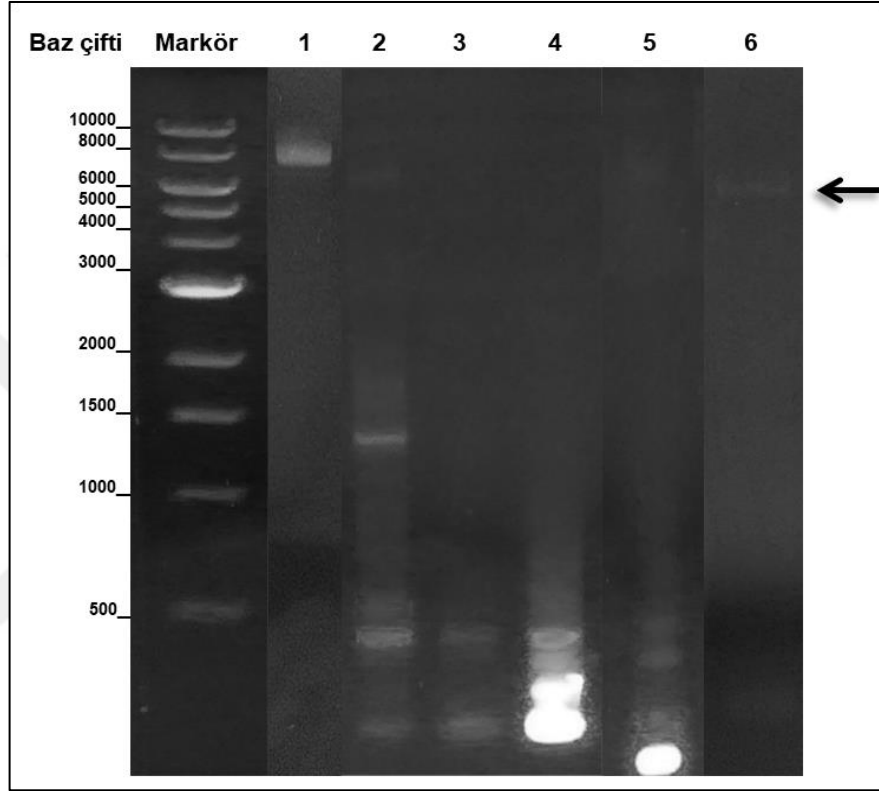


Şekil 3.4. Primer etkisinin incelendiği ikinci PZR denemelerinin agaroz jel görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, pET28TEVCATPO plazmiti (7,4 kb); 2, Deneme 1; 3, Deneme 2; 4, Deneme 3; 5, Deneme 4; 6, Deneme 5; 7, Deneme 6; 8, Deneme 7; 9, Deneme 8; 10, Deneme 9; 11, Deneme 10; 12, Deneme 11; 13, Deneme 12; 14, Deneme 13

Sonuç olarak, Bölüm 2.2.5.1'de verilen Tablo 2.6'daki denemeler arasından 7. deneme ürünü (94°C'de 2 dakika ön denatürasyon evresi, 30 döngüye sahip 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 60-65°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 7 dakika uzama evreleri, 72°C'de 10 dakika son uzama evresi), diğer deneme ürünlerine göre primer dimerlerin görülmemesi ve istenilen plazmit boyutu olan 6,7 kb büyüklüğüne daha yakın olması sebebiyle tercih edildi.

### 3.3.2. Kimerik primer kullanımı

katX2 megaprimerinin pET28 vektörüne klonlanmasında kimerik primerlerin etkisinin incelenmesi amacıyla dört farklı reaksiyon, KOD Hot Start DNA polimeraz (Novagen, Almanya) enzimi ile kuruldu ve ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. katX2 megaprimerinin pET28TEV vektörüne klonlanmasında kimerik primerlerin kullanılarak gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, pET28TEVCATPO plazmiti (7,4 kb); 2, Deneme 1; 3, Deneme 2; 4, Deneme 3; 5, Deneme 4; 6, Deneme 5

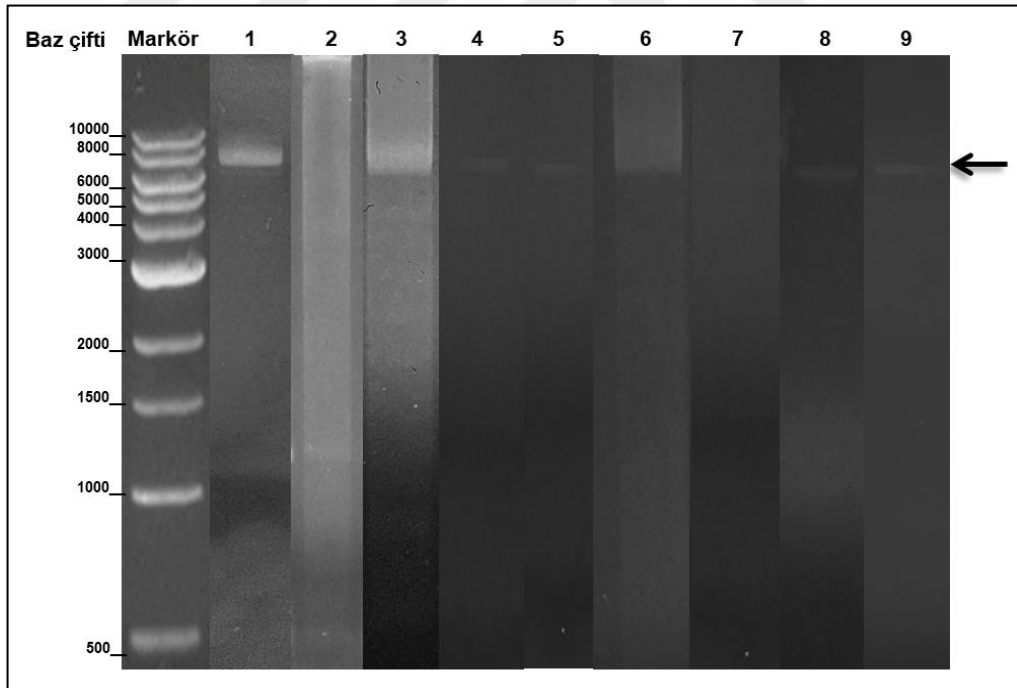
Kimerik primerler kullanılmadan gerçekleştirilen reaksiyonun, kimerik primer kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonlara göre, istenilen büyüklükte (6,7 kb) bant vermesi ve primer dimerleri içermediği gözlemlendi. Bu nedenle, katX2 megaprimerinin hedef vektöre entegrasyonunda (ikinci PZR) kimerik primerlerin kullanılmamasına karar verildi.

### 3.3.3. Polimeraz enzim seçimi

Klonlamanın hatasız gerçekleştirilmesi amacıyla, polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan polimeraz enziminin hata okuma yeteneğinin olması önemlidir. Bu sayede nokta mutasyonlarının oluşması önlenir (Bond ve Naus, 2012).

Bu hususta, seçilen üç farklı polimeraz enzimi (KOD Hot Start DNA polimeraz enzimi, Phusion DNA polimeraz enzimi ve MyFi DNA polimeraz enzimi) kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonların optimizasyon denemeleri Bölüm 2.2.5.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Buna göre, katX2 geninin pET28 vektörüne yerleştirilmesi için gerçekleştirilen restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinde optimum PZR koşullarının en uygun polimeraz enzimi ile gerçekleştirilmesinin tespiti amaçlandı (Tablo 2.8).

Optimum PZR koşullarının ve polimeraz enziminin seçimi için gerçekleştirilen denemeler sonucunda elde edilen reaksiyon ürünlerinin %1 w/v'lik agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6. Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniğinde farklı polimeraz enzimleri ve koşulları gerçekleştirilerek elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, pET28TEVCATPO plazmiti (7,4 kb); 2, Tablo 2.8'de verilen deneme 1; 3, Tablo 2.8'de verilen deneme 2; 4, Tablo 2.8'de verilen deneme 3; 5, Tablo 2.8'de verilen deneme 4; 6, Tablo 2.8'de verilen deneme 9; 7, Tablo 2.8'de verilen deneme 10; 8, Tablo 2.8'de verilen deneme 11; 9, Tablo 2.8'de verilen deneme 12 (Hedef DNA'ya ait bant, ok ile gösterildi)

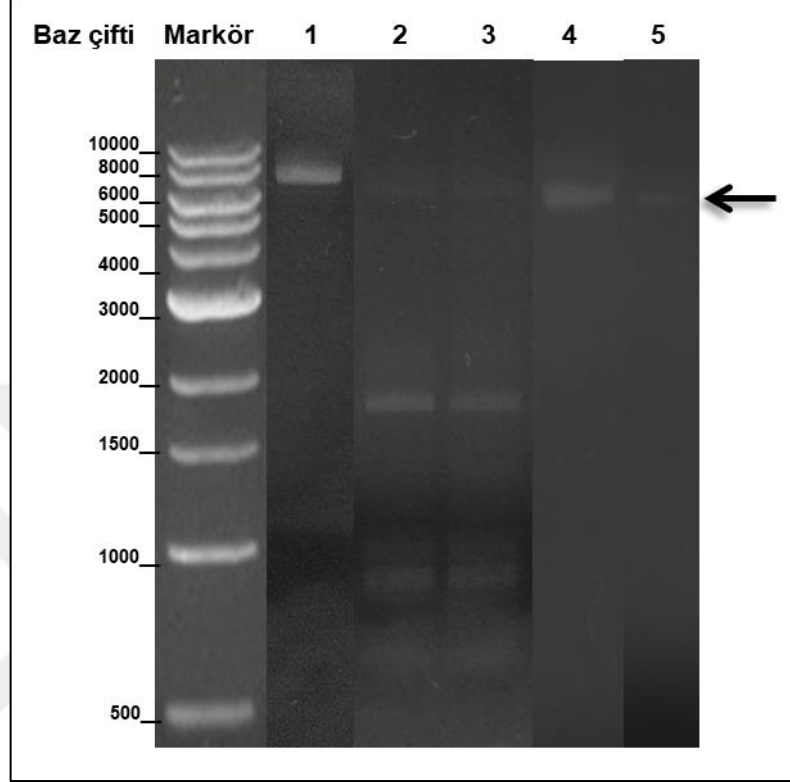
Jel sonuçları, Bryksin ve Matsumura (2010) ile Bond ve Naus (2012) tarafından yapılan çalışmalarda bu aşama için etkinliğinin daha yüksek olduğu bu tip polimeraz enzimlerinin kullanılması ile daha verimli sonuçların elde edileceğinin rapor edilmesi ile desteklenmektedir. Diğer yandan aynı enzimler varlığında PZR döngü koşullarında yapılan değişiklikler farklı sonuçlar elde edilmesine neden olmuştur. Örneğin, Phusion ve KOD Hot Start DNA polimeraz enzimleri, bağlanma evresinin yapılmadığı PZR denemelerinde yine istenilen büyüklükte DNA bandının olmasına olanak verirken, MyFi DNA polimeraz enziminin kullanıldığı aynı koşullarda gerçekleştirilen PZR denemelerinde ürün oluşumu gözlenmedi. MyFi DNA polimeraz enziminin sahip olduğu 3'-A aktivitesinin (DNA zincirinin 3' ucuna Adenin bazının bağlanması) restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlanma tekniği üzerine sahip olduğu negatif etkinin bant görülmemesinin sebebi olduğu düşünüldü. Bu nedenle MyFi DNA polimeraz enziminin sonraki aşamalarda kullanılmamasına karar verildi.

KOD Hot Start DNA polimeraz ve Phusion DNA polimeraz enzimlerinin kullanıldığı reaksiyonlarda elde edilen ürünlerdeki sürüntülerin, döngü sayısının düşmesiyle birlikte daha az görülmesi, bahsedilen sürüntülerin döngü sayısındaki artışa ve bağlanma evresinin varlığına bağlı olarak oluştuğunun düşünülmesine neden oldu. Bu konuda Bryksin ve Matsumura (2010) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda PZR koşullarında döngü sayısı 15 olduğunda rekombinant klon sayısında geometrik artış gerçekleştiği, bu sayının 18'den fazla olduğunda üretilen klonların sayısında %30 düşüş gözlemlendiği ve aynı zamanda agaroz jel elektroforezinde yüksek moleküler ağırlığa sahip DNA ürünlerinin ve sürüntülerin görüldüğü rapor edilmiştir. Bu durum agaroz jel elektroforez sonuçları ile desteklenmektedir. Buna göre (Şekil 3.6) en yüksek verimin KOD Hot Start DNA polimeraz ve Phusion DNA polimeraz enziminin bağlanma evresi içermeyen koşullarda gerçekleştirilen ve 15 döngüye sahip reaksiyonlarda elde edildiği, bir sonraki aşama olan *E. coli* XL-1 Blue hücrelerine gerçekleştirilen transformasyon sonucunda elde edilen klon sayısına göre gözlemlendi (Tablo 2.8'de verilen 4 ve 12 numaralı deneme).

### **3.3.5. Vektör:megaprimer oranı**

İkinci polimeraz zincir reaksiyonunda gerçekleşecek olan klonlamada, parental DNA ile kullanılan megaprimer oranının sekans analiz sonuçlarına göre sahip olduğu etki, Bryksin ve Matsumura (2010) ile Stevenson ve diğerleri (2013) tarafından yapılan çalışmalar ile paralellik göstermiştir.

Vektör:megaprimer oranı Tablo 2.10'da açıklandığı şekilde uygulanan polimeraz zincir reaksiyonlarından sadece 1:6 orana sahip olan ürün agaroz jel elektroforezinde görüntülendi (Şekil 3.7).

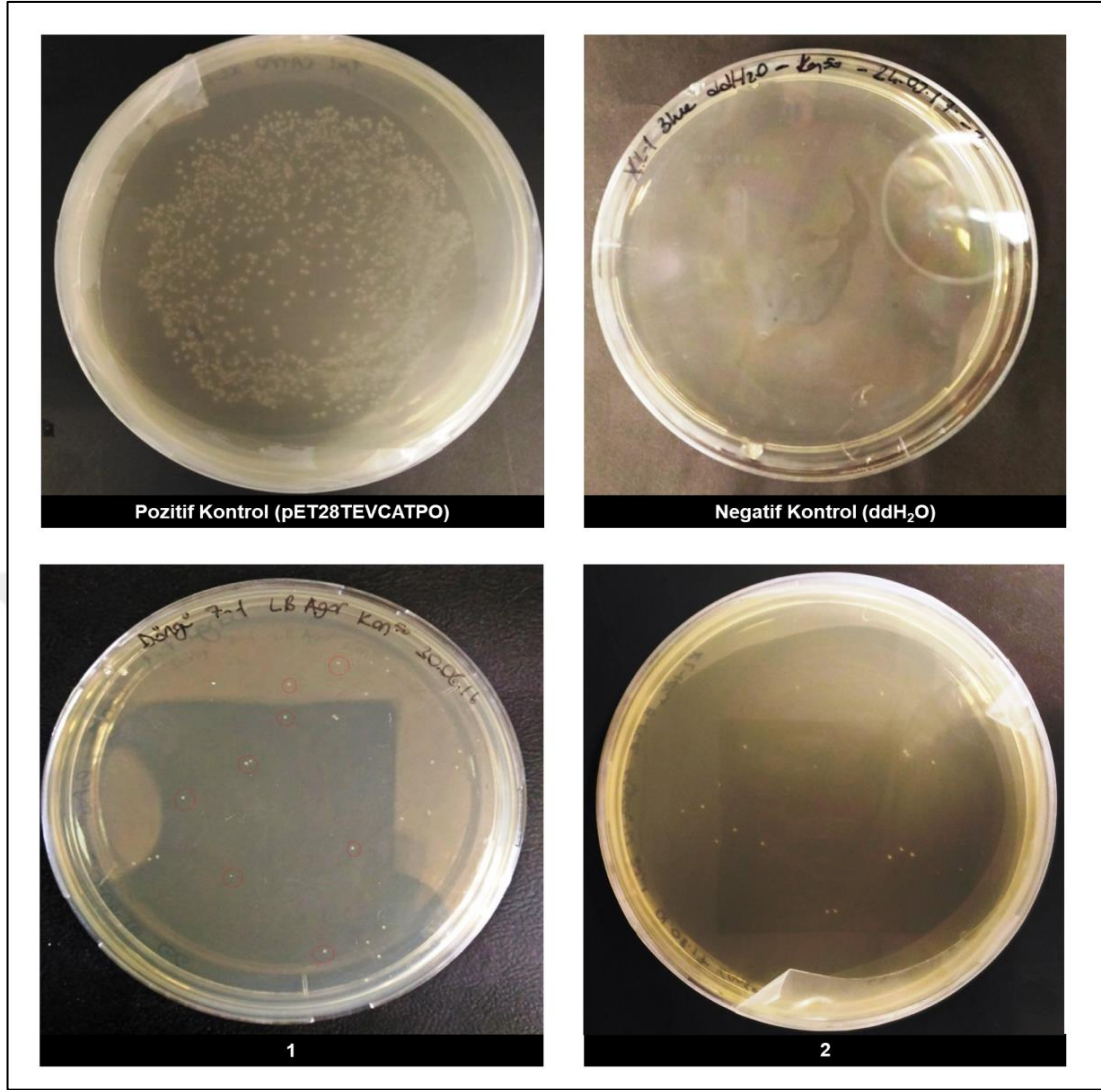


Şekil 3.7. PZR karışımında 1:2, 1:4 ve 1:6 olan vektör:megaprimer oranının agaroz jel görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, pET28TEVCATPO plazmiti (7,4 kb); 2, Vektör:megaprimer oranı 1:2 olan PZR ürünü; 3, Vektör:megaprimer oranı 1:4 olan PZR ürünü; 4, Vektör:megaprimer oranı 1:6 olan PZR ürünü (DpnI ile muamele öncesi); 5, Vektör:megaprimer oranı 1:6 olan PZR ürünü (DpnI ile muamele sonrası). Hedef DNA'ya ait bant, ok ile gösterildi

#### 3.4. katX2 Megaprimerini Taşıyan pET28 Vektörünün Kompetan Hücrelere Transformasyonu

Megaprimer, hedef vektöre bağlandıktan sonra oluşan "çentik", kompetan yeteneği olan hücrelere aktarıldığında, hücrelerin sahip olduğu DNA tamir enzimleri sayesinde düzeltilir (Bond ve Naus, 2012). Bölüm 2.2.6'daki açıklandığı üzere DpnI enzimi ile muamele edildikten sonra, Bölüm 2.2.8'de açıklandığı şekilde klonlamanın doğruluğunun tespiti için gereken plazmit DNA'larını izole etmek üzere *E. coli*'nin XL-1 Blue kompetan hücrelerine transforme edildi (Şekil 3.8).



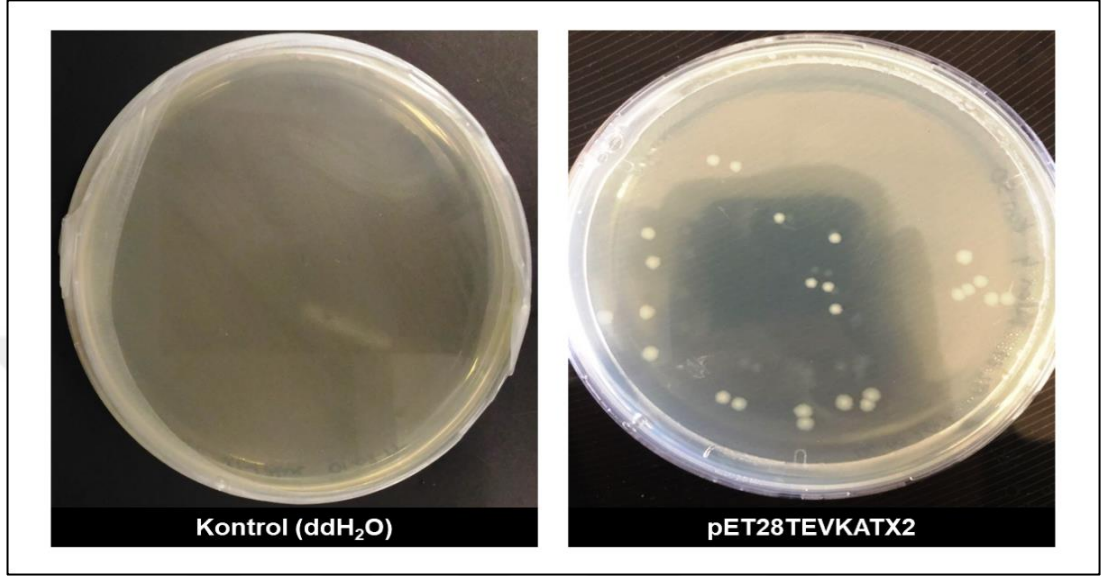


Şekil 3.8. İkinci PZR'de seçilen örneklerin DpnI ile muamele sonrasında *E. coli*'nin XL-1 Blue kompetan hücrelerine gerçekleştirilen transformasyon sonuçları. 1, KOD Hot Start DNA polimeraz kullanılarak PZR'nin transformasyon sonucu; 2, Phusion DNA Polimeraz kullanılarak gerçekleştirilen PZR'nin transformasyon sonucu

Bryksin ve Matsumura (2010) tarafından yapılan çalışmalarda Phusion polimeraz enziminin diğer polimeraz enzimlerine göre daha etkili olduğu rapor edilmesine rağmen, bu çalışmada Phusion DNA polimeraz ile elde edilen ürünlerin, DpnI enzimi ile muamelesinden sonraki transformasyon sonucunda koloni görülmesi ve bunların istenilen geni taşıdığı koloni PZR ve sekans analizi ile teyit edilmesine karşın rekombinant proteinin eldesi için ekspresyon hücresi olan BL21 (DE3 star) hücrelerine transformasyonu negatif şekilde sonuçlandı.

Ent ve Löwe (2005) tarafından yapılan çalışmada ise, KOD Hot Start DNA polimerazın etkinliğinin büyük yapılar elde edilmesinde yararlı olabileceği rapor edilmiştir. Bu sonuca paralel olarak KOD Hot Start DNA polimeraz enzimi ile kurulan

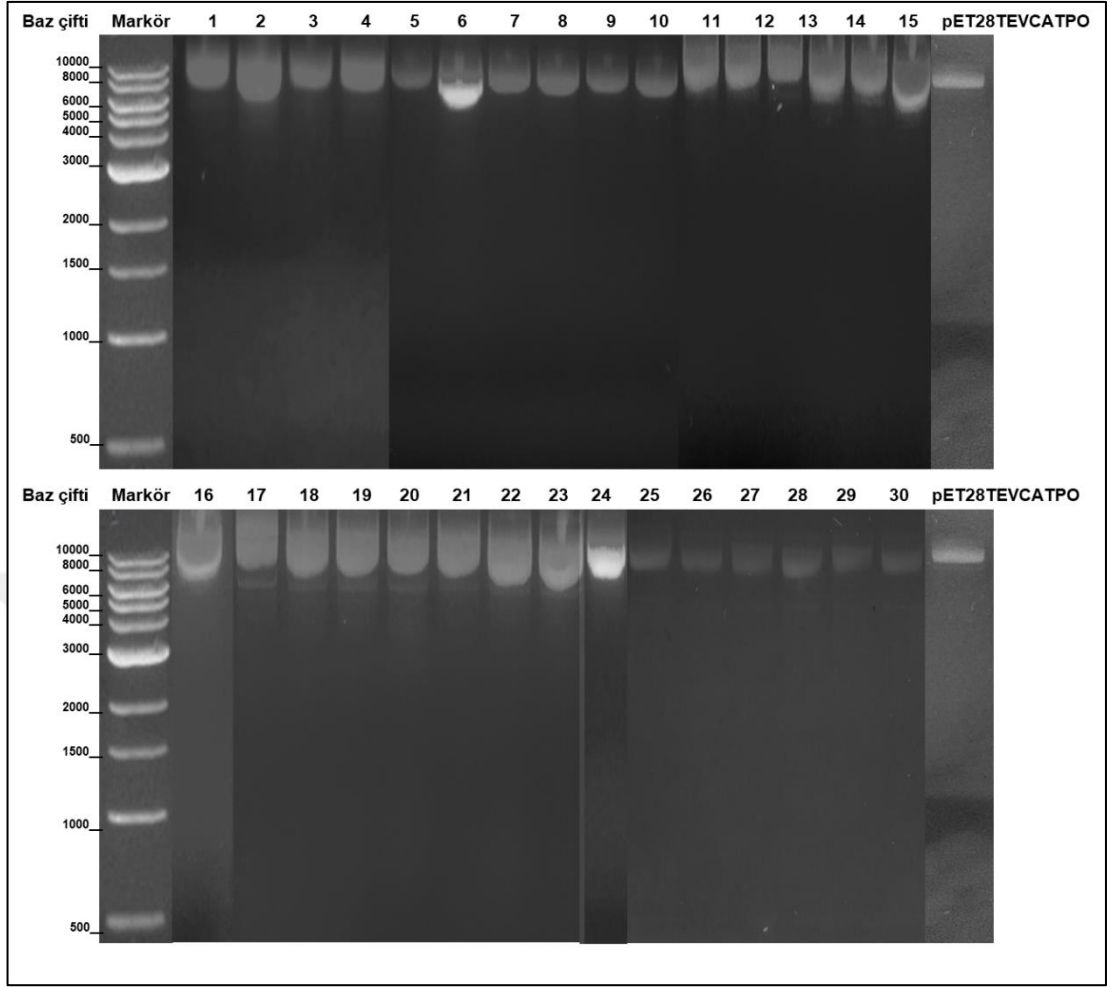
polimeraz zincir reaksiyon ürünlerinin; DpnI ile muamelesinden sonraki transformasyon sonucunda görülen kolonilerin pozitif klonlar içerdiği, restriksiyon kesim ve sekans analizi ile teyit edildi ve rekombinant proteinin üretimi için BL21 (DE3 star) ifade hücrelerine transformasyonu pozitif olarak sonuçlandı (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. katX2 geni içerdiği onaylanan pET28TEVKATX2 plazmitinin *E. coli*'nin BL21 (DE3 star) kompetan hücrelerine gerçekleştirilen transformasyon sonuçları. 1; Klonlamanın onaylandığı 6 numaralı klonun *E. coli*'nin BL21 (DE3 star) hücrelerine transformasyonundan elde edilen koloniler

### 3.5. Rekombinant Klonların Analizleri

Transformasyon sonuçlarından elde edilen kolonilerden Bölüm 2.2.9'da açıklandığı şekilde klonları analiz etmek üzere plazmit DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyon sonuçları agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 3.10).



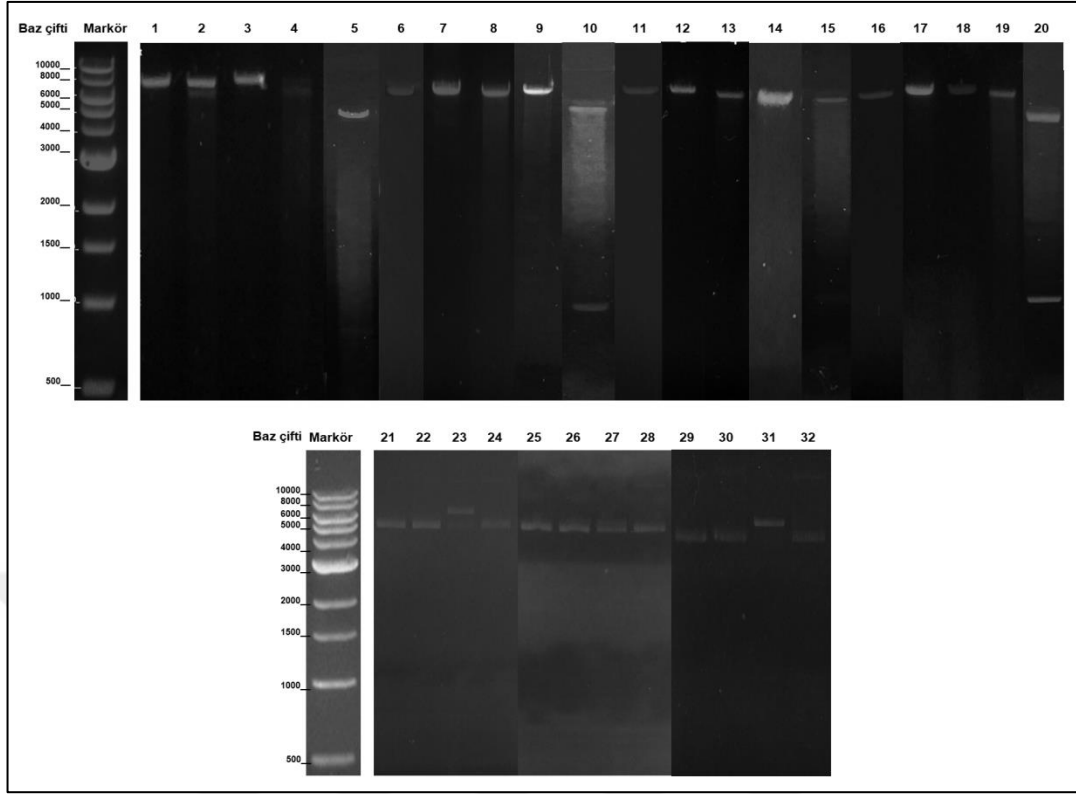
Şekil 3.10. İkinci transformasyondan elde edilen kolonilerin DNA izolasyonu sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1-30, Kolonilerden elde edilen plazmit DNA'lar

Şekil 3.10'da gözlenen klonların DNA konsantrasyonları Qubit 2.0 Fluorometer kiti (İnvitrogen, Amerika) ile belirlendi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. DNA izolasyonu sonrası klonların DNA konsantrasyonları

Klon Numarası	DNA konsantrasyonu (ng/ $\mu$ l)
1	102
2	122
3	81,3
4	106
5	62,3
6	100,1
7	109,1
8	98,2
9	88,63
10	61,7
11	98,9
12	77,3
13	72
14	123,9
15	78,9
16	110,2
17	93
18	105,6
19	63,5
20	86
21	75,95
22	120,6
23	100
24	112,5
25	166
26	99,1
27	107
28	96,5
29	112
30	97,1

Yüksek DNA konsantrasyonuna sahip olan ve agaroz jel elektroforez sonucuna göre katX2 genini içerdiği ön görülen plazmiti taşıyan klonlardan yedi tane (Şekil 3.10'da verilen 2, 6, 16, 23, 25, 28, 30 numaralı klonlar) seçilip, restriksiyon enzimleri ile Bölüm 2.2.13'te açıklandığı gibi muamele edildi. Sonuçlar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 3.11).

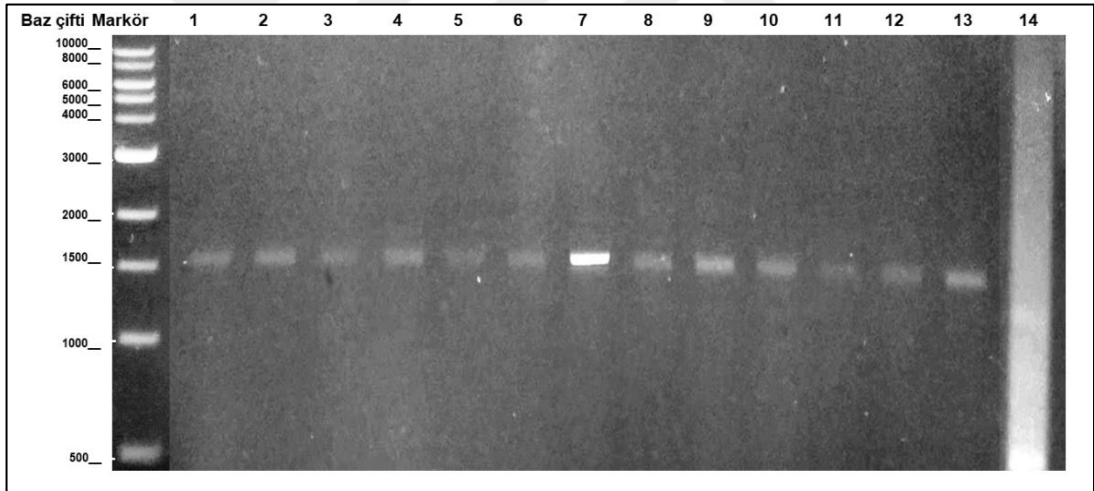


Şekil 3.11. DNA izolasyon sonuçlarına göre yüksek konsantrasyona sahip klonların restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, EcoRI ve Klon 2; 2, PstI ve Klon 2; 3, HindIII ve Klon 2; 4, EcoRI & PstI ve Klon 2; 5, EcoRI & HindIII ve Klon 2; 6, EcoRI ve Klon 6; 7, PstI ve Klon 6; 8, HindIII ve Klon 6; 9, EcoRI & PstI ve Klon 6; 10, EcoRI & HindIII ve Klon 6; 11, EcoRI ve Klon 16; 12, PstI ve Klon 16; 13, HindIII ve Klon 16; 14, EcoRI & PstI ve Klon 16; 15, EcoRI & HindIII ve Klon 16; 16, EcoRI ve Klon 23; 17, PstI ve Klon 23; 18, HindIII ve Klon 23; 19, EcoRI & PstI ve Klon 23; 20, EcoRI & HindIII ve Klon 23; 21, EcoRI ve Klon 25; 22, PstI ve Klon 25; 23, HindIII ve Klon 25; 24, EcoRI & PstI ve Klon 25; 25, EcoRI ve Klon 28; 26, PstI ve Klon 28; 27, HindIII ve Klon 28; 28, EcoRI & PstI ve Klon 28; 29, EcoRI ve Klon 30; 30, PstI ve Klon 30; 31, HindIII ve Klon 30; 32, EcoRI & PstI ve Klon 30

Restriksiyon enzimleri ile gerçekleştirilen analize göre, pET28TEVCATPO plazmitinin, EcoRI enzimi tarafından tek yerden, PstI enzimi tarafından iki yerden, PstI ve EcoRI enzimleri tarafından üç yerden, HindIII ve EcoRI enzimleri tarafından ise tek yerden kesilmesi beklenmektedir. Klonlanması gerçekleşen pET28TEVKATX2 plazmitinin ise, EcoRI enzimi tarafından bir yerden, PstI ve EcoRI enzimleri tarafından bir yerden, HindIII ve EcoRI enzimleri tarafından iki yerden kesilmesi beklenmektedir. Ayrıca, PstI enziminin pET28TEVKATX2 plazmitini kesmemesi gerekmektedir. HindIII enziminin ise geni yerine, vektörü sadece bir yerden kesmesi beklendi.

Şekil 3.11'de gözleendiği üzere, 2, 6, 16, 23, 25, 28 ve 30 numaralı klonlara ait plazmitler, EcoRI ile kesildiğinde 6,7 kb; HindIII ile 6,7 kb; EcoRI ve PstI ile kesildiğinde yaklaşık 6,7 kb büyüklüklerinde DNA bantları verdi. 2, 6, 16 ve 23 numaralı klonların plazmitleri EcoRI ve HindIII ile kesildiğinde ise 5,8 kb ile 1 kb büyüklüklerinde iki farklı DNA bandı elde edildi. pET28TEVCATPO olması durumunda PstI ile iki yerden kesilmesi beklenen 2, 6, 16, 23, 25, 28 ve 30 numaralı klonlara ait plazmitlerin bu enzim ile muamele sonucunda kesilmediği gözleendi. Sonuçlar, bu yedi plazmitin klonlanması istenen katX2 genini taşıdığına işaret etmektedir.

Bölüm 1.3.2'de açıklandığı üzere, pET28 sistemi rekombinant proteininin ifadesi indüklendiğinde bakterideki metabolik yükü dengelemek adına düşük sayıda plazmit replike etmektedir (Overton, 2014). Bu sebeple düşük konsantrasyonda olan klonlar için, Bölüm 2.2.12'de açıklanan şekilde koloni PZR gerçekleştirildi ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. DNA konsantrasyonu düşük olan 13 klonun koloni PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. Markör (10 kbç, Biolab, İngiltere); 1, Klon 31; 2, Klon 32; 3, Klon 33; 4, Klon 34; 5, Klon 35; 6, Klon 36; 7, Klon 37; 8, Klon 38; 9, Klon 39; 10, Klon 40; 11, Klon 41; 12, Klon 42; 13, Klon 43; 14, negatif kontrol (pET28TEVCATPO plazmitinin katX2 primerleri ile gerçekleştirilen koloni PZR ürünü)

Şekil 3.12'de verilen agaroz jel elektroforez görüntüsüne göre, koloni PZR gerçekleştirilen DNA konsantrasyonu düşük olan klonların katX2 genini içerdikleri gözleendi. Yoğun olarak bant gözlenen 36, 37, 38 ve 40 numaralı klonlar ile, kesim sonuçlarına göre seçilen 2, 6, 16, 23 ve 28 numaralı klonlar, klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin kesinliği için sekans analizi ile doğrulanmak üzere hizmet alımı gerçekleştirildi.

Sekans dizileme işleminden alınan nükleotit dizileri, “http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\_aa” web sayfasından (URL-7) aminoasit dizilerine dönüştürülerek “https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi” web sayfası üzerinden (URL-8) kontrol edildi.

Sekans analizine göre, plazmitleri gönderilen klonlardan 6 numaralı klonun %100 benzerlikle *B. pumilus* olduğu bulundu (Şekil 3.13).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_058014433.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: catalase [Bacillus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_034663722.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_061407229.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_050945423.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus safensis]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_034282264.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_088003968.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: catalase [Bacillus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_024426596.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus safensis]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_044333630.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_003211348.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus safensis]	201	201	77%	4e-60	100%	WP_070325647.1

Şekil 3.13. 6 numaralı klona ait plazmitin BLAST analiz sonucu

Koloni PZR ürünleri gönderilen klonlardan 37 numaralı klonun BLAST analiz sonucuna göre %99 oranında benzerlik ile pozitif sonuç elde edildi (Şekil 3.14).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	572	649	91%	0.0	99%	WP_088003968.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	572	649	91%	0.0	99%	WP_061407229.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	570	647	91%	0.0	99%	WP_012009409.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	570	647	91%	0.0	99%	WP_058014433.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	569	646	91%	0.0	99%	WP_003211348.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: catalase [Bacillus]	568	645	91%	0.0	99%	WP_034663722.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: catalase [Bacillus]	567	642	91%	0.0	99%	WP_017360350.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: catalase [Bacillus]	567	644	91%	0.0	99%	WP_046343069.1
<input type="checkbox"/> catalase [Bacillus pumilus]	567	642	91%	0.0	99%	WP_099680016.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: catalase [Bacillus]	567	644	91%	0.0	99%	WP_035703421.1

Şekil 3.14. 37 numaralı klona ait koloni PZR ürününün BLAST analiz sonucu

Bryksin ve Matsumura (2010) tarafından yapılan çalışmalarda, restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniği ile elde edilen ikinci PZR ürünüde oluşan “çentik” sebebiyle, agoroz jel elektroforezinde net bir DNA bandının görüntülenemeyeceği rapor edilmesine rağmen, bu çalışmada %100 pozitif klon elde edilen polimeraz zincir reaksiyonunda, DpnI ile muamele öncesi ve sonrasında düşük miktarda da olsa DNA bandı görüntülendi (Şekil 3.7).

Sekans analizi ile klonlamanın gerçekleştiği teyit edilen 6 numaralı klon, bir sonraki aşama olan rekombinant protein üretimi için BL21 (DE3 star) hücrelerine Bölüm 2.2.15’te açıklandığı şekilde transforme edildi (Şekil 3.9).

Klonlamanın gerçekleştiği kesinleşen bir diğer örnek olan 37 numaralı klon ise BL21 (DE3 star) hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilemedi. Bunun sebebi olarak 37 numaralı klonun sahip olduğu düşük DNA konsantrasyonu (5,4 ng/ $\mu$ l) gösterilebilir.

### 3.6. Rekombinant Katalaz İfadesinin Optimizasyonu

Rekombinant *B. pumilus* Y7 katalazının ifadesinin optimizasyonu için BL21 (DE3 star) hücrelerine Bölüm 2.2.15'te açıklandığı Şekilde transformasyon gerçekleştirildikten sonra gliserol kullanılarak stok hücreler hazırlandı ve -80°C'ye kaldırıldı.

Rekombinant *B. pumilus* katalazının tahmini molekül ağırlığı ve pI değeri, "http://web.expasy.org/compute\_pi/" web sayfasından hesaplandı (URL-9). Buna göre, rekombinant *B. pumilus* katalazının molekül ağırlığı 58,9 kDa; pI değeri ise 5,59 olarak bulundu. Bölüm 2.2.16'da açıklanan rekombinant *B. pumilus* Y7 katalazının ifadesinin optimizasyonu için büyüme sıcaklığı, inkübasyon süresi, oksijen miktarı ve indükleyici ajan varlığı gibi parametreler denendi (Tablo 2.13). Her bir koşul için 16. ve 24. saatlerde alınan örneklerin katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemle llerek sonuçlar karşılaştırıldı (Tablo 3.3) ve SDS-PAGE elektroforezinde yürütüldü (Şekil 3.15-19).



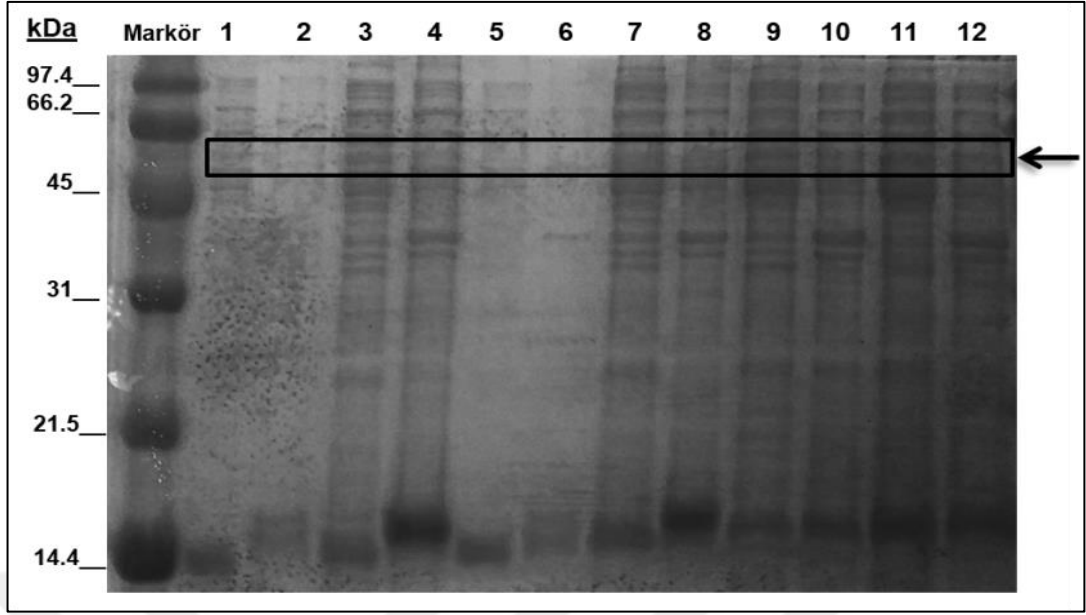
Tablo 3.3. Optimizasyon koşullarının katalaz aktivite sonuçları

Koşul	Bağıl Katalaz Aktivite (%)
Kontrol (XL-Blue)	0
IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	64
IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	3
IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	26
IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	25
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	8
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	34
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	-
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	47
IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	20
IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	13
IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	21
IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	-
IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	67
IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	-
IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	93
IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	4,1
IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	8
IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	0,8
IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	13
IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	-
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	58
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	-
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	100
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	32
IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	26
IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	-
IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	13
IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	12
IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	25
IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	10
IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	18
IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	-
IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	2
IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	-
IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	-
IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	0,3
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	8
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	5
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	0,7
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	-
IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	12
IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	5
IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	10
IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	-

Tablo 3.3. (Devam) Optimizasyon koşullarının katalaz aktivite sonuçları

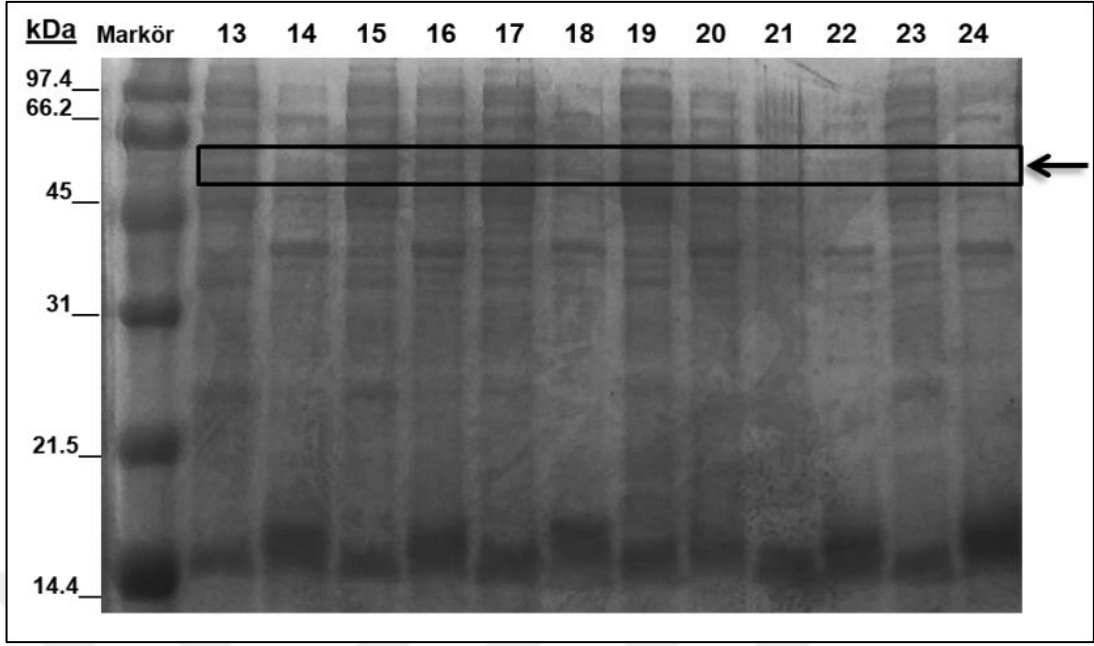
Koşul	Bağıl Katalaz Aktivite (%)
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği	35
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği	24
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği	-
IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği	10
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; üst faz örneği	21
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; pelet örneği	18
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; üst faz örneği	-
IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; pelet örneği	17
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; üst faz örneği	15
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; pelet örneği	0,5
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; üst faz örneği	29
IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; pelet örneği	12

Yüksek bağıl katalaz aktiviteleri ise sırasıyla indükleyici ajan (IPTG) varlığında, düşük havalandırılmalı, 30°C, 120 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütülen hücrelerin üst faz örneğinden (%100); indükleyici ajan (IPTG) varlığında, düşük havalandırılmalı, 37°C, 200 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütülen hücrelerin üst faz örneğinden (%93); indükleyici ajan (IPTG) içeren, düşük havalandırılmalı, 37°C, 200 rpm çalkalama hızında 16 saat büyütülen hücrelerin üst faz örneğinden (%67) ve indükleyici ajan (IPTG) içermeyen, düşük havalandırılmalı, 37°C, 120 rpm çalkalama hızında 16 saat büyütülen hücrelerin üst faz örneğinden (%64) elde edildi. Yüksek verimler karşılaştırıldığında IPTG varlığının, rekombinant katalaz üretimini indüklediği gözlemlendi. Sıcaklığın 30°C ve 37°C olduğu koşullardan alınan örneklerin pelet ve üst fazlarından, sıcaklığın 20°C olduğu koşullardan alınan örneklere göre daha yüksek bağıl katalaz aktivitesi elde edildi.



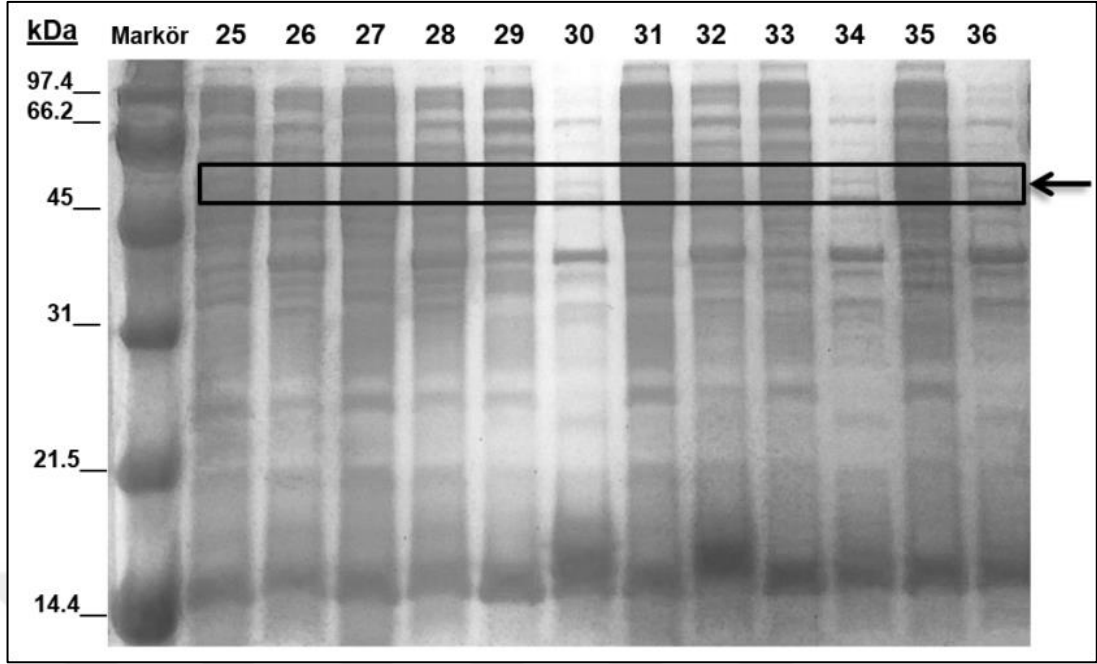
Şekil 3.15. Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu. Markör (Biorad Low Range, Amerika); 1, IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 2, IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 3, IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 4, IPTG (-); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 5, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 6, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 7, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 8, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 9, IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 10, IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 11, IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 12, IPTG (-); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği (Hedef bant ok ile gösterildi)

Şekil 3.15'te verilen sıcaklığın 37°C, çalkalama hızının 120 rpm ve IPTG'nin kullanılmadığı koşulda 16. saatte alınan örneğin üst ve alt fazlarında 58,9 kDa'da beklenen bant gözlemlenmezken, bu koşuldan 24. saatte alınan örneğin üst fazında, alt fazına oranla 58,9 kDa'da beklenen bandın daha belirgin olduğu tespit edildi. İndükleyicinin kullanıldığı aynı koşullarda ise 58,9 kDa'da beklenen protein bantlarının daha yoğun gözlemlendiği sonucuna varıldı.



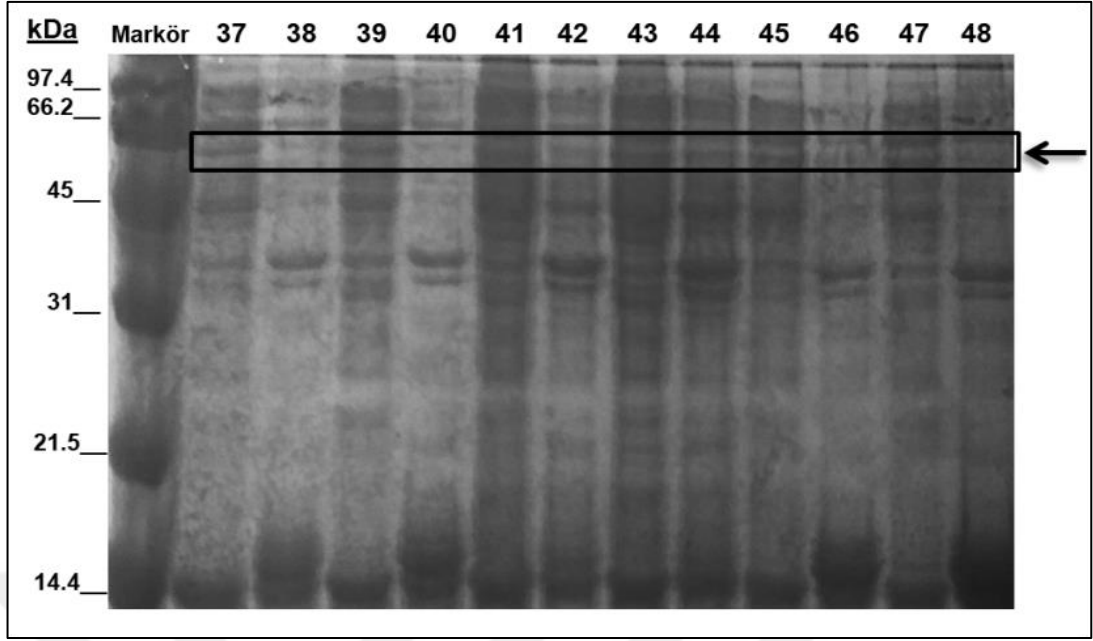
Şekil 3.16. Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu. Markör (Biorad Low Range, Amerika); 13, IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 14, IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 15, IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 16, IPTG (+); 37°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 17, IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 18, IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 19, IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 20, IPTG (-); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 21, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 22, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 23, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 24, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği (Hedef bant ok ile gösterildi)

Şekil 3.16'da verilen sıcaklığın 37°C, 200 rpm çalkalama hızında 16 ve 24. saat büyüme süresine sahip olan koşulların üst fazlarında yoğun bantlar gözlenmesi ve yüksek bağıl katalaz aktiviteleri (%67 ve %93) elde edilmesi, hücre kültürünün daha fazla büyümesini sağladığı için avantaj olarak değerlendirilse de, hücrelerin toksik maddeleri de üretebileceği anlamına geldiği için tercih edilmedi. Fakat 30°C, 120 rpm çalkalama hızında 16 ve 24. saat büyüme süresine sahip olan koşulların üst fazlarının SDS-PAGE sonuçlarında 58,9 kDa'da indüklenmiş bantlar gözlemlendi ve diğer koşullarla karşılaştırıldığında en yüksek bağıl katalaz aktivitesi, bu koşulun 24. saatte alınan üst faz örneğinden elde edildi.



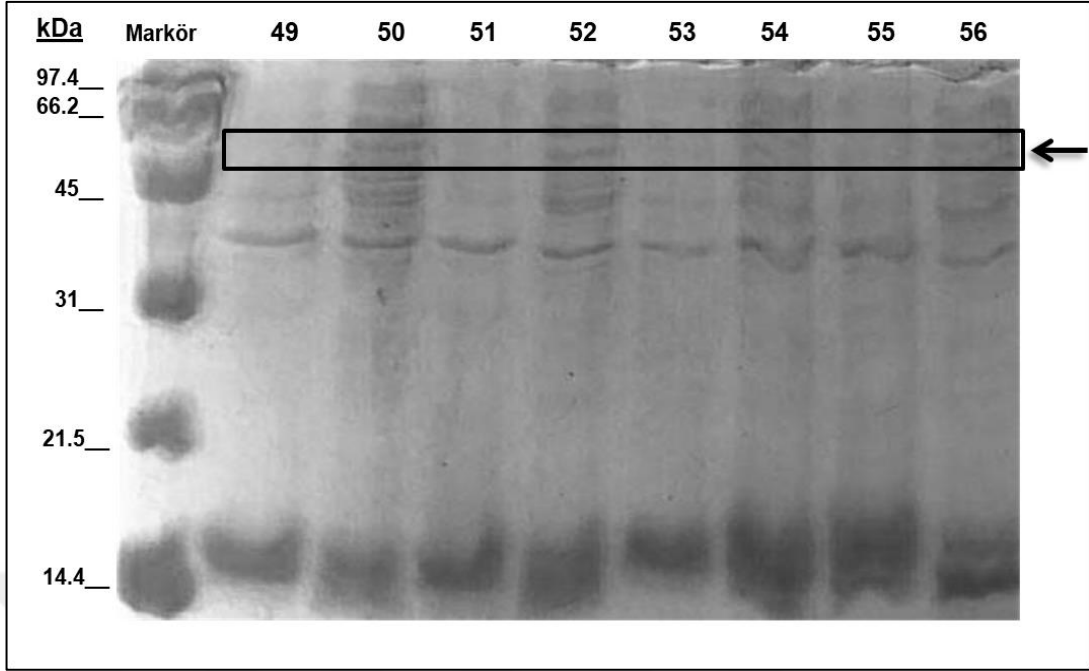
Şekil 3.17. Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu. Markör (Biorad Low Range, Amerika); 25, IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 26, IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 27, IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 28, IPTG (-); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 29, IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 30, IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 31, IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 32 IPTG (+); 30°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 33, IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 34, IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 35, IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 36, IPTG (-); 20°C; 120 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği (Hedef bant ok ile gösterildi)

Şekil 3.17'de verilen 30°C ve 20°C'de 200 rpm yüksek çalkalama hızına sahip koşulların belirlenen saatlerinde alınan örneklerinin pelet ve üst fazlarının SDS-PAGE analiz sonuçlarında 58,9 kDa dışında da gözlenen yoğun bantlar, kirliliklerin fazla olduğunu işaret etmesi sebebiyle tercih edilmedi. Sıcaklık farkı ve indükleyici ajan varlığı gözetmeksizin elde edilen yoğun bantların yüksek çalkalama hızı ve düşük havalandırma sebebi ile olduğu düşünüldü.



Şekil 3.18. Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu. Markör (Biorad Low Range, Amerika); 37, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 38, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 39, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 40, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 41, IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 42, IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 43, IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 44, IPTG (-); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği; 45, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; üst faz örneği; 46, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 16. saat; pelet örneği; 47, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; üst faz örneği; 48, IPTG (+); 20°C; 200 rpm; 2,5X; 24. saat; pelet örneği (Hedef bant ok ile gösterildi)

Şekil 3.18'de verilen, 20°C'de büyütülen bütün örneklerin üst fazlarının SDS-PAGE sonuçlarına göre daha yoğun bantlar elde edildiği gözlemlendi. İstenilen protein bandının dışında da bantların yoğun olarak gözlenmesi, rekombinant katalaz üretiminde hücre kültürünü negatif yönde etkilediği söylenebilir.



Şekil 3.19. Rekombinant protein ifadesinde belirlenen optimizasyon koşullarının SDS-PAGE sonucu. Markör (Biorad Low Range, Amerika); 49, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; üst faz örneği; 50, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; pelet örneği; 51, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; üst faz örneği; 52, IPTG (+); 30°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; pelet örneği; 53, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; üst faz örneği; 54, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 16. saat; pelet örneği; 55, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; üst faz örneği; 56, IPTG (+); 37°C; 120 rpm; 5X; 24. saat; pelet örneği (Hedef bant ok ile gösterildi)

Şekil 3.19'da verilen, yüksek havalandırmaya sahip 30°C'de 120-200 rpm çalkalama hızına sahip koşulların 16. ve 24. saatlerinin üst ve alt fazlarının SDS-PAGE sonucunda beklenen 58,9 kDa'lık bir protein bandı elde edilemezken, indükleyicinin bu durumu değiştirmedeği gözlemlendi.

Şekil 3.15-19 göz önüne alındığında en yoğun bantların elde edildiği koşulların sırasıyla; indükleyici (IPTG) içermeyen, 37°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 37°C, 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat pelet faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 30°C; 120 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içeren, 30°C; 120 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 30°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 16. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 30°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 16. saat pelet faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 30°C; 200 rpm çalkalama

hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 30°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat pelet faz örneği; indükleyici (IPTG) içeren, 30°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 16. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içeren, 30°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içeren, 20°C; 120 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 20°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 16. saat üst faz örneği; indükleyici (IPTG) içermeyen, 20°C; 200 rpm çalkalama hızında, 2,5 kat tepe boşluğuna sahip koşulun 24. saat üst faz örneği olarak belirlendi. Elde edilen yoğun bantlar, bağıl katalaz aktiviteleri ile karşılaştırıldığında Şekil 3. 15'te verilen sıcaklığın 37°C, çalkalama hızının 120 rpm ve IPTG'nin kullanılmadığı koşulda 16. saatte alınan örneğin üst fazının bağıl aktivite sonucu %64 olmasına karşın 58,9 kDa'da beklenen bant gözlemlenmedi. 16. saatten alınan örneğin alt fazında ise bağıl aktivite ile paralel olarak jel sonucunda bantların silik olduğu gözlemlendi. Yine bu koşullar altında 24. saatte alınan örneğin üst ve alt fazında bağıl aktivite sonuçları birbirine yakın elde edildi fakat 58,9 kDa yerine diğer bantların daha yoğun gözlenmesi, kirliliğin fazla olduğunun düşünülmesine neden oldu. Sıcaklığın 37°C, çalkalama hızının 120 rpm ve IPTG'nin kullanıldığı koşulda 16. saatte alınan örneğin alt ve üst fazında düşük yoğunluklarda bant gözlenmesi ve bağıl aktivitelerinin de düşük olduğu bulundu. 24. saatte alınan örneğin alt ve üst fazlarında 58,9 kDa'da bant gözlenmesine karşın bağıl aktivitenin düşük olduğu hesaplandı. Sıcaklığın 37°C, çalkalama hızının 200 rpm ve IPTG'nin kullanılmadığı koşulda 16. ve 24. saatlerde alınan örneklerin üst fazlarının SDS-PAGE sonuçlarına göre 58,9 kDa'da daha yoğun bantlar olduğu gözlemlenmesine karşın bağıl katalaz aktivitelerinin düşük olması nedeniyle rekombinant katalazın ifadesinde kullanılacak koşul olarak tercih edilmedi. Sıcaklığın 37°C, 200 rpm çalkalama hızında 16 ve 24. saat büyüme süresine sahip olan koşulların üst fazlarında yoğun bantlar gözlenmesi ve yüksek bağıl katalaz aktiviteleri (%67 ve %93) elde edilmesi, hücre kültürünün daha fazla büyümesini sağladığı için avantaj olarak değerlendirilse de, hücrelerin toksik maddeleri de üretebileceği anlamına geldiği için tercih edilmedi. Fakat 30°C, 120 rpm çalkalama hızında 16 ve 24. saat büyüme süresine sahip olan koşulların üst fazlarının SDS-PAGE sonuçlarında 58,9 kDa'da indüklenmiş bantlar gözlemlendi ve diğer koşullarla karşılaştırıldığında en yüksek bağıl katalaz aktivitesi, bu koşulun 24. saatte alınan üst faz örneğinden elde edildi. 30°C'de 200 rpm yüksek çalkalama hızına sahip



koşulların belirlenen saatlerinde alınan örneklerinin pelet ve üst fazlarının SDS-PAGE analiz sonuçlarında en yoğun bantları veren koşullardan olduğu gözlenmesine karşın bağıl katalaz aktivitelerinin düşük olması sebebiyle tercih edilmedi. Bu durumda bahsedilen koşullarda ayırıcı parametrenin indükleyicinin yanı sıra yüksek çalkalama hızı olduğu söylenebilir. 20°C'de büyütülen örneklerin pelet (alt) ve üst fazlarından belirlenen saatlerde alınan örneklerin SDS-PAGE sonuçlarında bantlar yoğun olarak elde edilse de aktiviteleri ya çok düşük elde edildi ya da ölçülemedi. Bu durumda sıcaklığın düşük olmasının, indükleyici varlığına ve çalkalama hızına bakılmaksızın rekombinant katalazın üretiminde hücre kültürünü negatif yönde etkilediği söylenebilir.

Sonuç olarak sıcaklığın 37°C olması ve yüksek çalkalama hızı, hücre kültürünün daha fazla büyümesini sağladığı için avantaj olarak değerlendirilse de, hücrelerin toksik maddeleri de üretebileceği anlamına geldiği için tercih edilmedi. Enzim aktivitesinin düşük olması ve SDS-PAGE analizine göre 58,9 kDa'da beklenen protein bandının silik olmasının sebepleri arasında, hücrenin az yoğunlukta ve/veya indüklenmemiş olması gösterilebilir.

pET28TEVKATX2 plazmiti, *E. coli* BL21 (DE3 star) hücrelerine aktarılıp, 30°C'de, IPTG (0,1 mM) varlığında, 120 rpm çalkalama hızında 24 saat büyütüldüğü koşulda en yüksek katalaz aktivitesi (80 µmol/ml/dk) gözlemlendi.

#### 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kuraklık, basınç, besin kıtlığı, hidrojen peroksit ve kimyasal dezenfektanlara karşı oldukça dayanıklı bir bakteri olan *B. pumilus*, *B. subtilis*'in sahip olduğu katX genine sırasıyla %83 ve %50 oranlarında homoloji gösteren katX1 ve katX2 olarak adlandırılan iki gen içermektedir. katX1 geni, *B. pumilus* bakterisinin sporlarındaki 'Hem' içeren katalazı kodlarken, katX2 geni ise vejetatif hücrelerindeki 'Hem' içeren katalazın üretiminden sorumludur (Gioia ve diğ., 2007; Handtke ve diğ., 2017; Kunst ve diğ., 1997).

Son yıllarda elde edilen bulgular, katX2 tarafından kodlanan katalaz enziminin monofonksiyonel katalaz ailesine dahil olduğu ve esas fonksiyonunun yanında peroksidaz ve penisilin oksidaz aktivitesi gibi ikincil aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Loewen ve diğ., 2015; Sangar ve diğ., 2012). İkincil aktivite özelliğinin ileride ayrıntılı analizi için bu çalışmada, *B. pumilus*'un sahip olduğu katX2 geninin, son yıllarda gelişen rekombinant DNA teknoloji yöntemlerinden olan restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniği ile klonlanması ve bu gen tarafından kodlanan katalazın rekombinant üretimi hedeflendi. Bu amaç doğrultusunda, *B. pumilus* Y7 izolatından genomik DNA izole edildi. Daha sonrasında restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlamanın gerektirdiği ilk aşama için megaprimer amplifikasyonu ve optimizasyonu gerçekleştirildi. katX2 geni, tasarlanan hibrit primerler ile çoğaltılarak megaprimer elde edildi. Hibrit primerler (5'katX2; 3'katX2) için belirlenen üç farklı bağlanma sıcaklık aralığı (50-55°C, 55-60°C ve 60-65°C) arasından 55-60°C'nin megaprimerin amplifikasyonu için optimum sıcaklık aralığı olduğu belirlendi. Megaprimerin amplifikasyonunda kullanılan *B. pumilus* Y7 izolatına ait genomik DNA'nın konsantrasyon artışına bağlı olarak daha fazla verim elde edildiği gözlemlendi.

Megaprimer, bir sonraki aşama için cam yünü tekniği ve jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırılarak elde edilen verimler karşılaştırıldı. Buna göre her iki teknikte benzer konsantrasyonlarda DNA eldesinin mümkün olduğu tespit edildi ve maliyetinin ucuz olması sebebiyle cam yünü tekniğinin daha kullanışlı olduğuna karar verildi. Megaprimerin hedef ve göre entegrasyonu için gerçekleştirilen ikinci polimeraz zincir reaksiyonunda ise laboratuvarımızda bulunan pET28TEVCATPO vektöründeki

(Yuzugullu ve diğ., 2013b) gen bölgesiyle yer değiştirerek, plazmitte “çentik” oluşturması beklendi. katX2 megaprimerinin pET28 vektörüne entegrasyonunda gerçekleştirilen ikinci polimeraz zincir reaksiyonunun optimizasyonunda ise megaprimer konsantrasyonunun yanı sıra, kimerik primerlerin kullanımının etkisi ve vektör oranlarının etkisini gözlemek için farklı vektör:insert oranları (1:2, 1:4, 1:6) denendi. Aynı zamanda, üç farklı DNA polimeraz enziminin her biri (KOD Hot Start DNA polimeraz, MyFi DNA polimeraz, Phusion DNA polimeraz), çeşitli polimeraz zincir reaksiyon döngü koşulları altında optimize edildi ve etkinlikleri tespit edildi. Transformasyonu doğrulanan kolonilerden plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. Klonlamanın teyidi için, sahip oldukları plazmit DNA konsantrasyonlarına göre koloni polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu veya plazmite uygun olarak seçilen restriksiyon enzimleri (EcoRI, HindIII ve PstI) ile muamele edildi. Alınan sonuçlara göre pozitif olduğu düşünülen klonlar, sekans hizmeti alınarak onaylandı. Sekans analizi onaylanan klonun, ekspresyon hücresi olan BL21 (DE3 star) suşuna transforme edilmesi ile rekombinant katalaz üretiminin optimizasyonu gerçekleştirildi. Sonuçlar, SDS-PAGE ve katalaz aktivite ölçümleri ile incelendi.

Elde edilen sonuçlara göre katX2 megaprimerinin pET28 vektörüne klonlanması için gerçekleştirilen ikinci polimeraz zincir reaksiyonunda, kimerik primerlerin kullanılması ve döngü sayısının artırılması ile doğru orantılı olarak transformasyonda koloni sayısında artış gözlemlendi fakat pozitif klon elde edilemedi. Bunun nedeni, 5'katX2 ile 3'katX2 primerlerinin kullanımının ve döngü sayısının artmasının sürüntülerle birlikte primer dimerlerine neden olması olarak düşünüldü. Fakat bu parametrelerin yarattığı olumsuz etkinin polimeraz enziminin aktivitesi ve megaprimer konsantrasyonunun yüksek tutulduğu reaksiyonlarda en aza indirgenebileceği tespit edildi. Polimeraz enzimleri arasında, Phusion DNA polimeraz enzimi kullanılarak elde edilen ürünlerde %99 benzerlikle pozitif klonlar elde edildiği sekans ve koloni polimeraz zincir reaksiyonu ile teyit edilse de ekspresyon hücresi olan *E. coli* BL21 (DE3) star hücrelerine başarılı bir transformasyon gerçekleştirilemedi. Bunun sebebi olarak klonlardan elde edilen plazmit DNA'ların düşük konsantrasyona sahip olması gösterilebilir. Sekans analizine göre %100 benzerlikle *B. pumilus* katalazı olarak elde edilen klonun *E. coli* BL21 (DE3) star ekspresyon hücresine transforme edilmesi ile rekombinant katalazın ekspresyon optimizasyonu; büyüme sıcaklığı, inkübasyon süresi, oksijen miktarı ve indükleyici ajan (IPTG) varlığı gibi özelliklerin farklı kombinasyonları ile 15 farklı parametre denenerek gerçekleştirildi. İndükleyici ajanın (IPTG) kullanılmadığı

ve sıcaklığın 37°C olduğu parametrelerin SDS-PAGE sonuçlarında 58,9 kDa'nın dışında da çok yoğun bantlar gözlemlendi. Bunun sebebi olarak, hücrelerin optimum büyüme sıcaklıkları olan 37°C'nin sadece istenilen katalaz enzimini değil, diğer birçok enzimi de üretmelerine neden olduğu düşünüldü. 20°C sıcaklık kullanılarak gerçekleştirilen parametreler, SDS-PAGE sonucunda istenilen büyüklükte bantlar verse de, düşük aktivite nedeni ile tercih edilmedi. Diğer yandan, sıcaklığın 30°C ve indükleyicinin (IPTG) olduğu koşullarda indüklenmiş bantlar görüldü. Tüm parametreler SDS-PAGE ve katalaz enzim aktivitelerine göre değerlendirildiğinde rekombinant *B. pumilus* Y7 katalazının optimum ekspresyon koşullarının, 24 saatlik büyüme ile 30°C sıcaklıkta, 120 rpm çalkalama hızında, IPTG (0,1 mM) varlığında olduğu ve üst fazda elde edildiği sonucuna varıldı.

Restriksiyon enzimlerinden bağımsız klonlama tekniği ile rekombinant DNA'nın elde edilmesi, geleneksel klonlama yöntemlerine göre birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajların başında zaman tasarrufu, maliyet düşüklüğü ve güvenilir bir teknik olması gibi özellikler gelmektedir. katX2 geninin bahsedilen bu özellikler ile klonlanması ve kodladığı enzim olan *B. pumilus* Y7 katalazının yüksek verimde üretilmesi, endüstriyel amaçlı gerçekleştirilen çalışmaların temel sebeplerine anlam kazandırmaktadır. Özellikle enzimin sahip olduğu düşünülen ikincil aktivitenin bölge yönelimli mutasyon çalışmalarıyla artırılması ile endüstrinin farklı alanlarına hizmet etmesinin olası olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Ayhan K., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, 2. basım, Sim Matbaası, Ankara, 2000.

Bai Y., Zhang Y. L., Jin J. F., Wang J. D., Zhang Z. S., Zhou D. Y., Recombinant *Helicobacter pylori* catalase, *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2003, **9**(5), 1119.

Balasundaram B., Harrison S., Bracewell D. G., Advances in product release strategies and impact on bioprocess, *Trends in Biotechnology*, 2009, **27**, 477-485.

Bardakçı F., Yenidünya A. F., *Moleküler Biyoloji*, 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010.

Bhat M. K., Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 2000, **18**, 355-383.

Bond R. S., Naus C. C., RF-Cloning.org: an online tool for the design of restriction-free cloning projects, *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**, 209-213.

Bryksin V. A., Matsumura I., Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids, *BioTechniques*, 2010, **48**, 463-465.

Celie P. H. N., Parret A. H. A., Perrakis A., Recombinant cloning strategies for protein expression, *Structural Biology*, 2016, **38**, 145-154.

Chelikani P., Fita I., Loewen P. C., Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, **61**, 192-208.

Comporti M., Signorini C., Leoncini S., Gardi C., Ciccoli L., Giardini A., Vecchio D., Arezzini B., Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge, *Genes Nutr*, 2010, **5**, 101-109.

Ent F., Löwe J., *RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2005, **67**, 67-74.

Gioia J., Yerrapragada S., Qin X., Jiang H., Igboeli O.C. et al., Paradoxical DNA Repair and Peroxide Resistance Gene Conservation in *Bacillus pumilus* SAFR-032, *PLoS ONE*, 2007, **9**, 1-4.

Maimoni Gonçalves V., Cezar de Cerqueira Leite L., Raw I., Cabrera-Crespo J., Purification of catalase from human placenta, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, **29**, 73-77.

Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., Mehouchi J. R., Tadeo F., The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins, *Physiologia Plantarum*, 2001, **111**, 206-211.

Handtke S., Albrecht D., Zühlke D., Otto A., Becher D., Schweder T., Riedel K., *Bacillus pumilus* katX2 confers enhanced hydrogen peroxide resistance to a *Bacillus subtilis* PkatA::katX2 mutant strain, *Microb Cell Fact.*, 2017, DOI 10.1186/s12934-017-0684-y.

Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., Pease L. R., Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene*, 1989, **77**, 51-59.

Kirkman H. N., Gaetani G.F., Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, **81**, 4343-4347.

Klug W. S., Cummings M. R., Spencer C. A., Genomik Analiz, Editörler: Öner C., Sümer S., Öner R., Ögüş A., Açık L., *Genetik Kavramlar*, 8. basım, Palme Yayıncılık, Ankara, 457-484, 2011.

Kocabas D.S., Bakir U., Phillips S. E. V., McPherson M. J., Ogel, Z. B., Purification, characterization, and identification of a novel bifunctional catalasephenol oxidase from *Scytalidium thermophilum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, **79**, 407-415.

Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A. M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M. G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature*, 1997, **390**, 249-256.

Kurakov A. V., Kupletskaya M. B., Skrynnikova E. V., Somova N. G., Search for Micromycetes Producing Extracellular Catalase and Study of Conditions of Catalase Synthesis, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2001, **37**, 67-72.

La Duc M. T., Kern R., Venkateswaran K. Microbial monitoring of spacecraft and associated environments, *Microb. Ecol.*, 2004, **47**, 150-158.

Laemmli U. K., A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation, *Journal of Molecular Biology*, 1970, **47**, 69-74.

Loewen P. C., Carpena X., Rovira C., Ivancich A., Perez-Luque R., Haas R., Odenbreit S., Nicholls P., Fita I., Structure of *Helicobacter pylori* catalase with and without formic acid bound at 1.6Å resolution, *Biochemistry*, 2004, **43**, 3089-3103.

Loewen P. C., Villanueva J., Switala J., Donald L., Unprecedented access of phenolic substrates to the heme active site of a catalase: Substrate binding and peroxidase-like reactivity of *Bacillus pumilus* catalase monitored by X-ray crystallography and EPR spectroscopy, *Proteins*, 2015, **83**, 853-866.

Loncar N., Fraaije M., Catalases as biocatalysis in technical applications: current state and perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-015-6512-6.

Loncar N., Fraaije M., Not so monofunctional-a case of thermostable *Thermofibida fusca* catalase with peroxidase activity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, **99**, 2225-2232.

- Mate M., Murshudov G., Bravo J., Melik-Adamyany W., Loewen P. C., Fita I., Heme-catalases, *In: Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, 2001, **100**, 486-502.
- Merle P. L., Sabourault C., Richier S., Allemand D., Furla P., Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic anemone, *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, **42**, 236-246.
- Mulvey M. R., Switala J., Borys A., Loewen P. C., Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, 1990, **172**, 6713-6720.
- Nicholls P., Fita I., Loewen P. C., Enzymology and structure of catalases, *Advances in Inorganic chemistry*, 2001, **51**, 51-106.
- Nicholson W. L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. J., Setlow P., Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, **64**, 548-572.
- Overton T., R., Recombinant protein production in bacterial hosts, *Drug Discovery Today*, 2014, **19**, 590-601.
- Önal S., Enzimler, Editörler: Yıldırım A., Bardakçı F., Tanyolaç B., Karataş M., *Moleküler Biyoloji*, 2. basım, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 249-296, 2010.
- Pan J., Huang Q., Zhang Y., Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*, *Current Microbiology*, 2004, **49**, 165-169.
- Peti, W., Page, R., Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost, *Protein Expr. Purif.*, 2007, **51**, 1-10.
- Sangar S., Pal M., Moon S. L., Jolly R. S., A catalase-peroxidase for oxidation of  $\beta$ -lactams to their (*R*)-sulfoxides, *Bioresource Technology*, 2012, **115**, 102-110.
- Schallmeyer M., Singh A., Ward O. P., Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Can J Microbiol.*, 2004, **50**, 1-17.
- Sertel A., İzmit ve Çevresindeki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 2016, 455539.
- Sneath P. H. A., Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci, Editors: Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1104-1139, 1986.
- Sözen E., Yıldırım A., Arslanyolu M., Parmaksız İ., Rekombinant DNA Teknolojisi, Editörler: Yıldırım A., Bardakçı F., Tanyolaç B., Karataş M., *Moleküler Biyoloji*, 2. basım, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 471-519, 2010.
- Stevenson J., Krycer J. R., Phan L., Brown A. J., A practical comparison of ligation-independent cloning techniques, *PLoS ONE*, 2013, **8**, 1-7.

Sun Y., Sriramajayam K., Luo D., Liao D. J., A quick, Cost-Free Method of Purification of DNA Fragments from Agarose Gel, *Journal of Cancer*, 2012, **3**, 93-95.

Switala J., Loewen P. C., Diversity of properties among catalases, *ABB Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002, **401**, 145-154.

Teng X., Chen N., Xiao X., Identification of a Catalase-Phenol Oxidase in Betalain Biosynthesis in Red Amaranth (*Amaranthus cruentus*), *Front. Plant Sci.*, 2016, **6**, 1228-1304.

Thieman W. J., Palladino M. A., Ürün Olarak Proteinler, Editör: Tekeoğlu M., *Biyoteknolojiye Giriş*, 3. basım, Palme Yayıncılık, Ankara, 101-120, 2013.

Unger T., Jacobovitch Y., Dantes A., Bernheim R., Peleg Y., Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression, *Journal of Structural Biology*, 2010, **172**, 34-44.

URL-1: [http://textbookofbacteriology.net/kt\\_toc.html](http://textbookofbacteriology.net/kt_toc.html), (Ziyaret tarihi: 28 Ekim 2017)

URL-2: [http://textbookofbacteriology.net/bacteriology\\_6.html](http://textbookofbacteriology.net/bacteriology_6.html), (Ziyaret tarihi: 28 Ekim 2017)

URL-3: <https://www.hgsc.bcm.edu/bacillus-pumilus-safr-032>, (Ziyaret tarihi: 19 Eylül 2017)

URL-4: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemisInt/ch10s03.html>, (Ziyaret tarihi: 19 Eylül 2017)

URL-5: [http://2013.igem.org/wiki/images/6/66/Colony\\_PCR.pdf](http://2013.igem.org/wiki/images/6/66/Colony_PCR.pdf), (Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2017)

URL-6: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Bacillus+pumilus+SAFR-032>, (Ziyaret tarihi: 10 Şubat 2016)

URL-7: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, (Ziyaret tarihi: 19 Ağustos 2017, 27 Eylül 2017)

URL-8: [http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa), (Ziyaret tarihi: 27 Mayıs 2016)

URL-9: [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/), (Ziyaret tarihi: 27 Mayıs 2016)

Villanueva J., Switala J., Ivancich A., Loewen P. C., Genome sequence of *Bacillus pumilus* MTCC B6033, *Genome Announc.*, 2014, **2**, 1-2.

Wang W., Sun M., Liu W., Zhang B., Purification and characterization of a psychrophilic catalase from Antarctic *Bacillus*, *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, **54**, 823-828.

Wei C. J., Lei B., Musser J. M., Tu S. C., Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*KatG*) mutants evident in *InhA* inhibitor production, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, **47**(2), 670-675.



Yuzugullu Y., Trinh C. H., Smith M. A., Pearson A. R., Phillips S. E. V., Sutay Kocabas D., Bakir U., Ogel Z. B., McPherson M. J., Structure, recombinant expression and mutagenesis studies of the catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*, *Acta Crystallographica Section D*, 2013, **69**, 398-408.

Yüzügüllü Y., Functional and Structural Analysis of Catalase-Phenol Oxidase From *Scytalidium thermophilum*, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010, 255456.

Yüzügüllü Y., Ögel Z. B., Çift aktiviteli katalaz- fenol oksidazın ve diğer katazların gıda sanayisindeki önemi, *Gıda*, 2013, **38**, 111-118.

Zamocky M., Furtmüller P. G, Obinger C., Evolution of Catalases from Bacteria to Humans, *Antioxid Redox Signal*, 2008, **10**, 1527-1548.





## EK-A

### Büyüme Ortamı Hazırlanması

#### Luria-Bertani Broth:

10 g Tripton

5g Yeast Ekstrakt

10 g NaCl

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır ve sterilizasyon için otoklavlanır.

#### Luria-Bertani Broth (20mM MgSO<sub>4</sub>):

10 g Tripton

5g Yeast Ekstrakt

10 g NaCl

4,8 g MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır ve sterilizasyon için otoklavlanır.

#### Luria Bertani Agar

10 g Tripton

5g Yeast Ekstrakt

10 g NaCl

20 g Agar-agar

Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su ile tamamlanır ve sterilizasyon için otoklavlanır.

### Solüsyonların Hazırlanması:

Kanamisin: 0,5 g tartılan Kanamisin, 10 ml distile su içerisinde çözündürülür ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilir. Sterilizasyonu tamamlanan besiyerinin sıcaklığı yeteri kadar düştüğünde ortama 50 µg/ml olacak şekilde eklenir.

EDTA (0,5 M, pH 8): 7,3 g tartılan EDTA, 30 ml distile su içerisinde çözündürülür. pH 8 olana kadar 1 M NaOH eklenir, 0,22 µm'lik filtreden geçirilir.

IPTG (1 M): 2,4 g tartılan IPTG, 10 ml distile su içerisinde çözündürülür ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilir. 2 ml'lik eppendorf tüplere paylaşılır ve -20°C'de muhafaza edilir.

Lizis Tamponu (100 ml): 50 mM HEPES (Na Salt), %25 (w/v) Sükroz, %1 (v/v) Triton-X 100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O bir araya getirilir ve son konsantrasyon 100 ml olacak şekilde distile su ilave edilir. pH 8'e ayarlanır. 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve 4°C'de saklanır. Kullanmadan hemen önce 1 mg/ml lizozim tartılır, 5 µl Benzonaz nükleaz (Sigma) ve 50 µl proteaz inhibitör (EDTA içermeyen) tampona eklenir

Coomassie Blue Stain Solüsyonu (1 litre): 2,5 g Coomassie Blue, 450 ml metanol içerisinde 1 gece boyunca çözündürülür. 70 ml Asetik asit ve 480 ml distile su eklenerek 1 litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede 4°C'de saklanır.

## EK-A (Devam)

Destain Solüsyonu (1 litre): 250 ml Metanol, 150 ml Asetik Asit, 675 ml dH<sub>2</sub>O, koyu renkli şişede karıştırıldıktan sonra 4°C'ye saklanılmak üzere kaldırılır.

Plazmit İzolasyonu için P1 Tampon Çözeltisi: 6,06 g Tris; 3,72 g EDTA-2H<sub>2</sub>O tartılır, 800 ml distile su içerisinde çözündürülür ve HCl kullanılarak pH:8'e ayarlanır. Son konsantrasyon 1 litre olacak şekilde distile su eklendikten sonra 100 mg RNase A eklenir ve +4°C'de saklanır.

Plazmit İzolasyonu için P2 Tampon Çözeltisi: 8,09 g NaOH, 950 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 50 ml %20 SDS solüsyonundan eklenerek son konsantrasyon 1 litreye tamamlanır ve oda sıcaklığında saklanır.

TFB 1: 30 mM Potasyum asetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, %15 (v/v) Gliserol bir araya getirilir, 1 M asetik asit kullanılarak pH 5.8'e ayarlanır. Steril 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

TFB 2: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, %15 (v/v) Gliserol bir araya getirilir, 1 M KOH kullanılarak pH 6.5'a ayarlanır. Steril 0,22 µm'lik filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) Koşturma Tamponu (1 litre): 242 g Tris base 600 ml distile su içerisinde çözündürülür. 57 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ilave edilerek son konsantrasyon 1 l'ye tamamlanır.

EDTA (0,5 M, pH 8, 100 ml): 7,3 g EDTA tartılır, 30 ml distile su içerisinde çözündürülür. Karıştırıcıda pH 8 olana kadar 1 M NaOH eklenir ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Daha sonra filtreden geçirilir.

NaOH (1M, 100 ml): 4 g NaOH tartılır, 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. Üzerine 100 ml'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenir ve oda sıcaklığında saklanır.

1,5 M Tris HCl Tampon, 100 ml (pH 8.8): 18,5 g Tris Base; 0,4 g SDS 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. 1 M HCl ile pH 8.7 'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

1 M Tris HCl Tampon 100 ml (pH 6.8): 10,2 g Tris Base ve 0,4 g SDS tartılır, 80 ml distile su içerisinde çözündürülür. 1 M HCl ile pH 6.7 'ye ayarlanır. Steril filtreden geçirilir ve +4°C'de saklanır.

%10 v/v APS (Amonyumpersülfat): 10 g APS tartılır, 10 ml distile su içerisinde çözündürülür. 1 ml olacak şekilde ependorf tüplere aktarılır ve -80°C'de muhafaza edilir.

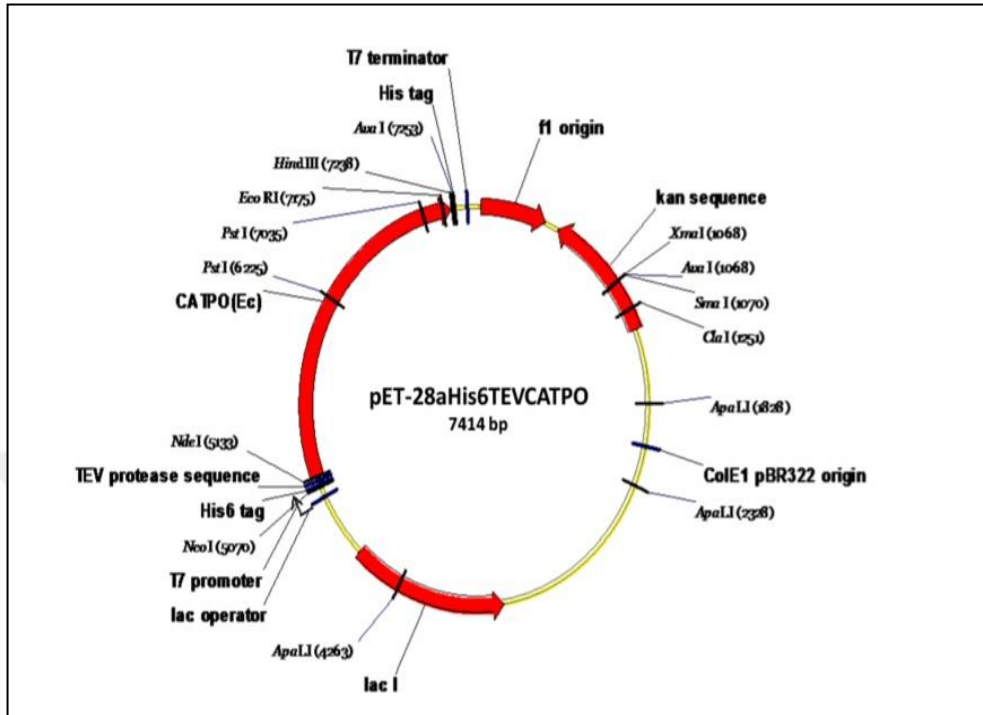
## EK-A (Devam)

Tablo A.1. Deneylerde kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka ve model
ProFlex™ 3 x 32-well PCR System	Thermo Fisher Scientific
-80°C Ultra Derin Dondurucu	WiseCryo
Buzdolabı	Arçelik,5243 Biolab No-Frost
Saf Su Cihazı	Milipore,Direct-Q UV
Hassas Terazı	Scaltec SPB31
Vorteks	IKA, GENIUS3
Otoklav	HMC Hiclave HG-80
Yatay Elektroforez	Biorad
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad
UV Transilüminatör	UVP-GelDoc-It 310 imaging system
UV Visible Spektrofotometre	Agilent Cary-60
Ultra Santrifüj	Sigma 4-17K
Mini Santrifüj	Eppendorf 5418
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, MR-HeiStandart
Sıvı azot tankı	MVE
Mikrodalga Fırın	Samsung
Çalkalamalı İnkübatör	New Brunswick Scientific Excella E24
pH metre	Inolab WTW cond 3401
Etüv	Nüve FN500
Buz Makinası	Scotsman AF80
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen

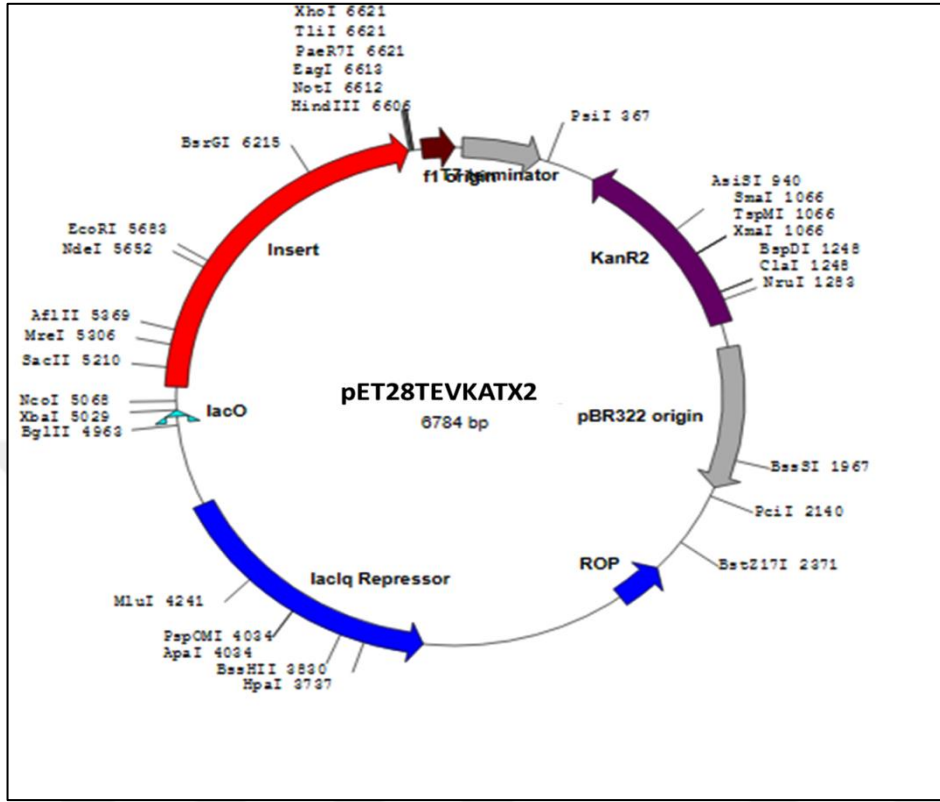
## EK-B

### pET-28aHis6TEVCATPO Ekspresyon vektör haritası



## EK-B (Devam):

pET28TEVKATX2 ekspresyon vektörünün haritası:



katX2 gen dizilimi:

```
ATGACAAATTCAAATCATAAAAATTTGACAACGAACCAAGGCGTACCTGTTGGC
GATAATCAAACACTCAAGAACAGCTGGTCACCGCGGTCCTACATTTCTTGATGAT
TACCATTTGATTGAAAACTTGCACACTTCGATCGTGAACGCATTCCAGAGCGT
GTTGTTTCATGCAAGAGGCGCCGCGCTTATGGTGTGTTTGAAGTTGAAAATAG
CATGGAGAAACATACAAAAGCTGCCTTCTTAAGTGAAGATGGAAAACAGACAGA
TGTTTTTGTTTCGTTCTCTACCGTTATTCATCCTAAAGGTTACCTGAAACATTG
CGTGATCCGCGCGGCTTTGCTGTCAAATTTTATACAGAAGAAGGCAACTATGAT
CTAGTTGGTAATAACTTGCCGATCTTCTTTATACGTGATGCATTGAAATTCCTG
ATATGGTTCACTCTCTCAAACCAGATCCTGTAACGAATATCCAAGATCCTGACC
GTTATTGGGATTTTATGACCTTAACACCTGAATCCACTCATATGCTCACATGGCT
CTTCTCTGATGAAGGAATTCCTGCGAACTACGCTGAAATGCGCGGTTCTGGTG
TGCATACATTTAGATGGGTCAACAAATATGGAGAAACAAAATATGTGAAATATCA
CTGGAGACCTTCAGAAGGCATTTCGTAATTTATCAATGGAAGAAGCAGCAGAAAT
CCAAGCGAATGATTTCCAGCATGCGACAAGAGACTTATATGACCGCATTGAAAA
CGGCAACTATCCAGCCTGGGACTTATATGTCCAGTTGATGCCGCTGAGCGATT
ATGATGATCTTGATTATGATCCATGTGATCCAACAAGACATGGAGTGAAGAAG
ATTACCGCTTCAAAAAGTAGGACGCATGACACTGAACCGCAATCCTGAGAAC
TTCTTTGCTGAAACAGAGCAATCTGCTTTACACCAAGTGCCTTGTTCAGGA
ATTGAAGCATCTGAAGATAAACTGCTTCAAGGTCGTCTGTTCTCATATCCAGAT
ACGCAGCGTCATCGTCTTGGTGCCAACTATATGCGCATTCCGGTGAACGTCC
TTATGCACCTGTACACAATAATCAGCAGGATGGCTTTATGACAACGACTCGTCC
AAGCGGTCATATTA ACTATGAACCAAACCGTTACGATGATCAGCCAAAAGAAAA
CCCTCACTACAAGGAAAGTGAACAAGTCCTTACGATGATCGTATGGTGAGAC
```

AAAAATTGAAAAACCAAACGATTTCAAACAAGCTGGGGAAAAATATCGAAGCT  
ACTCAGAAGAAGAGAAACAAGCATTGATCAAAAACCTAACAGCTGATCTGAAAG  
ACGTAAATGATAAAACAAAATTA CTTGCGATCTGCAACTTCTATCGTGCAGATG  
AAGATTACGGACAACGATTAGCCGATTCACTTGGCGTAGATATCCGCTCATACC  
TTCAAGGAAACATGAAATA





## KİŞİSEL YAYINLAR VE ESERLER

Balci S., Yüzügüllü Y., **Göç G.**, Zengin M., Avcı Duman Y., *Scytalidium thermophilum* Katalazının Yanal Kanalı Üzerine Kristalografi Çalışmaları, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, Türkiye, 18-19 Aralık 2015.

Yuzugullu Y., Balci S., **Goc G.**, Zengin M., Avcı Duman Y., Pearson A. R., Crystallographic Studies of Catalase from the Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum*, COST Action CM1306 3<sup>rd</sup> MC Meeting and 2<sup>nd</sup> Scientific Meeting, Lisboa, Portugal, 24-26 February 2016.

Yuzugullu Y., Zengin M., Balci S., **Goc G.**, Avcı Duman Y., Role of active site residues on catalytic activity of catalase with oxidase activity from *Scytalidium thermophilum*, *Procedia Social and Behavioral Sciences*, 2015, **195**, 1728-1735.

Yuzugullu Y., Zengin M., Balci S., **Goc G.**, Avcı Duman Y., *Scytalidium thermophilum* Katalaz-Fenol Oksidaz (CATPO) Yanal Kanalının Aktivitedeki Rolü, *Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, Afyon, Türkiye, 21-24 Ağustos 2015.

**Göç G.**, Yüzügüllü Karakuş Y., *Bacillus pumilus* Katalaz (katX2) Geninin Klonlanması, 19. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye, 1-3 Aralık 2017.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1992 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Düzce'de tamamladı. 2010 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında mezun oldu. 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2016 yılında kazandığı COST Action CM1306 tarafından sağlanan STSM (Short Term Scientific Mission) bursu ile Hamburg Üniversitesi'nde Prof. Dr. Arwen Pearson'ın araştırma laboratuvarında ziyaretçi araştırmacı olarak bir buçuk ay protein kristalografisi üzerine araştırma yaptı.

