

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***BACILLUS THURINGIENSIS* Xd3'E AİT *cry3Aa* GENİNİN KLONLANMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE EKSPRESYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Demet (MERT) TATAR**

**NİSAN 2008  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***BACILLUS THURINGIENSIS* Xd3'E AİT *cry3Aa* GENİNİN KLONLANMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE EKSPRESYONU**

**Biyolog Demet (MERT) TATAR**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce  
"Yüksek Lisans (Biyoloji)"  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27.03.2008  
Tezin Savunma Tarihi : 25.04.2008**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ  
Jüri Üyesi : Doç. Dr. Murat KÜÇÜK**

**Enstitü Müdürü V. : Doç. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2008**

## ÖNSÖZ

“*Bacillus thuringiensis* Xd3’e Ait *cry3Aa* Geninin Klonlanması, Karakterizasyonu ve Ekspresyonu” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenen ve tez çalışmam süresince bana her türlü imkanı sağlayıp desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU’na ve çalışmam sırasında değerli fikirleriyle bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Zihni DEMİRBAĞ’a ve tez jüri üyelerinden Doç. Dr. Murat KÜÇÜK hocama teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım ve arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Hatice KATI’ya, Yrd. Doç. Dr. İsmail DEMİR’e Yrd. Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya, Araş. Gör. Dr. Kazım SEZEN’e, Araş. Gör. Dr. İkbâl Ağah İNCE’ye, Araş. Gör. Hacer MURATOĞLU’na, Nurten GÜREL’e, Araş. Gör. Emine DEMİR’e, Araş. Gör. Yeşim AKTÜRK’e, Yüksek Biyolog Ali Adem BAHAR’a, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında çalışan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca tez çalışmam süresince laboratuvar imkanlarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji bölüm başkanı Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e ve tez süresince bana her konuda destek veren aileme minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Demet MERT

Trabzon 2008

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET .....	V
SUMMARY .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER DİZİNİ .....	IX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Tarihi.....	2
1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Plazmitleri .....	3
1.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması .....	3
1.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'lerin Habitatları .....	5
1.6. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Yapısı.....	5
1.7. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması .....	8
1.8. İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Mekanizması.....	10
1.9. Böcek Populasyonlarının <i>Bacillus thuringiensis</i> 'e Dirençliliği .....	11
1.10. <i>Bacillus thuringiensis</i> Suşlarının Biyoteknolojisi .....	12
1.11. Çalışmanın Amacı .....	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	15
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> Xd3 Bakterisi ve Büyüme Şartları.....	15
2.2. <i>B.thuringiensis</i> Xd3 Bakterisinden DNA İzolasyonu.....	15
2.3. <i>cry3Aa</i> Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması .....	16
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> Xd3 Bakterisine Ait <i>cry3Aa</i> Geninin pGEMT-Easy Vektöre Klonlanması .....	17
2.5. <i>cry3Aa</i> Geninin Elektrokompotent <i>E.coli</i> DH10 $\beta$ 'ya Aktarımı.....	17
2.6. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi .....	18
2.7. Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	18

2.8.	Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi .....	19
2.9.	<i>cry3Aa</i> Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	19
2.9.1.	pET-28a(+) Ekspresyon Vektörünün <i>NcoI/BamHI</i> Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi .....	19
2.9.2.	<i>cry3Aa</i> Geninin pGEMT-Easy Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılması ..	20
2.9.3.	<i>cry3Aa</i> Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı .....	20
2.10.	pET-28a(+)’ya Klonlanan <i>cry3Aa</i> Geninin <i>E.coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı .....	20
2.11.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Xd3 Bakterisine Ait Spor ve Kristal Süspansiyonunun Hazırlanması.....	21
2.12.	Protein Ekspresyonu ve İzolasyonu.....	21
2.13.	Protein Miktarının Belirlenmesi .....	22
2.14.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi .....	22
2.15.	İnsektisidal Etkilerin Belirlenmesi .....	22
3.	BULGULAR .....	24
3.1.	<i>cry3Aa</i> Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi.....	24
3.2.	<i>Bacillus thuringiensis</i> Xd3 Bakterisinin <i>cry3Aa</i> Geninin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	24
3.3.	<i>cry3Aa</i> Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	29
3.4.	Protein Ekspresyonu ve SDS- PAGE Analizi .....	30
3.5.	İnsektisidal Etkilerin Belirlenmesi .....	31
4.	TARTIŞMA.....	33
5.	SONUÇLAR.....	36
6.	ÖNERİLER .....	37
7.	KAYNAKLAR.....	38
8.	EKLER .....	44
ÖZGEÇMİŞ		

## ÖZET

*Bacillus thuringiensis*, bazı böcek gruplarına karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin üreten bir toprak bakterisidir. Bu özelliğinden dolayı Cry ( $\delta$ -endotoksin) proteinleri biyolojik mücadele açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada bir fındık zararlısı olan *Xyleborus dispar*'dan izole edilmiş *Bacillus thuringiensis* bakterisinden (*Bt* Xd3) elde edilen *cry3Aa* geninin farklı bir konak olan *Escherichia coli*'ye klonlanması, karakterize edilmesi, ekspresyonu ve insektisidal aktivite testi gerçekleştirilmiştir.

Bunun için *cry3Aa* geni *Bt* Xd3 bakterisinden PCR ile çoğaltıldı. Çoğaltılan genin nükleotid dizilimini belirlemek için PCR ürünü pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. *cry3Aa* geninin DNA ve aminoasit dizilimi belirlendi ve mevcut *cry3Aa* genleri ile karşılaştırıldı.

Bu bakteriye ait Cry3Aa proteininin literatürdeki *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (*morrisoni*)'in sahip olduğu Cry3Aa2, Cry3Aa3, Cry3Aa5 ve Cry3Aa6 ile %100 benzer olduğu belirlendi. *Bt* Xd3 *cry3Aa* gen sırası gen bankasına *cry3Aa12* numarası ile geçirildi.

*cry3Aa* geni tarafından üretilen proteini farklı bir konakta ekspres etmek ve aktivitesini belirlemek için gen, ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)'ya klonlandı. Ekspresyon vektöründe ekspres edilen protein izole edildi ve proteinin SDS-PAGE analizi yapıldı. Jel üzerinde *cry3Aa* genine ait 73kDa'luk protein bandı gözlemlendi.

Elde edilen bu Cry3Aa  $\delta$ -endotoksininin Coleoptera ordosuna ait *Alphitobius diaperinus* larvalarına karşı olan insektisidal etkileri belirlendi. Yapılan biyotest sonucunda *E.coli* BL21(DE3)'de ekspres edilen rekombinant proteinin larvalar üzerinde *B. thuringiensis*'teki spor-kristal karışımından daha az etkili olduğu tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus thuringiensis*, Kristal Protein, Cry3Aa  $\delta$ -endotoksin ve Ekspresyon

## SUMMARY

### **Cloning, Characterization and Expression of *cry3Aa* Gene of *Bacillus thuringiensis* Xd3**

*Bacillus thuringiensis*, is a soil bacterium which produce insecticidal crystal toxin against some insect orders. Because of this feature, Cry3Aa ( $\delta$ -endotoxin) proteins have great importance in terms of biological control.

In the present study, cloning in a different host *Escherichia coli*, characterization, expression and bioassay of *cry3Aa* gene of *Bacillus thuringiensis* (*Bt* Xd3) isolated from *Xyleborus dispar* which is a hazelnut pest were performed.

For this reason *cry3Aa* gene was amplified from *Bt* Xd3 bacteria by PCR. For identifying the nucleotide sequence of the amplified gene, PCR product was cloned into the pGEM-T Easy cloning vector. Nucleotide sequence of *cry3Aa* gene and its deduced amino acid sequence were determined and compared with other *cry3Aa* genes.

The Cry3Aa protein belong to *B.thuringiensis* (*Bt* Xd3) has %100 homology with Cry3Aa2, Cry3Aa3, Cry3Aa5 and Cry3Aa6 proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp *tenebrionis* (*morrisoni*) in literature. *Bt* Xd3 *cry3Aa* gene sequence was recorded in gene bank as *cry3Aa12*.

To express the protein produced by *cry3Aa* gene in a different host and detect its insecticidal activity the gene was cloned into pET-28a(+) expression vector. The protein expressed in expression vector was isolated and SDS-PAGE analysis of the protein was performed. 73kDa protein band belonged to *cry3Aa* gene was observed on polyacrylamide gel.

Insecticidal activity of this obtained Cry3Aa  $\delta$ -endotoxin against *Alphitobius diaperinus* larvae belong to Coleoptera order was determined. As a result of the performed bioassay, recombinant protein expressed in *E.coli* BL21(DE3) is found as less effective than spor-crystal complex in *B. thuringiensis* on Coleoptera larvae.

**Key Words:** *Bacillus thuringiensis*, Crystal Protein, Cry3Aa  $\delta$ -endotoxin and Expression

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Bacillus thuringiensis</i> bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü .....	2
Şekil 2. <i>B. thuringiensis</i> suşlarına ait Cry proteinlerinin yapısı .....	6
Şekil 3. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü .....	9
Şekil 4. <i>Bacillus thuringiensis</i> 'in hedef böceklerdeki etki mekanizması .....	11
Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış <i>cry3Aa</i> geninin agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	24
Şekil 6. <i>cry3Aa</i> geninin DNA sırası .....	25
Şekil 7. <i>cry3Aa</i> geninin amino asit sırası .....	26
Şekil 8. <i>NcoI/ BamHI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve <i>cry3Aa</i> 'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü .....	29
Şekil 9. <i>cry3Aa</i> 'nın klonlandığı pET-28a(+) vektörünün <i>NcoI</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon enzimleriyle kesimi .....	30
Şekil 10. <i>E.coli</i> BL21(DE3)'de üretilen Cry3Aa proteininin SDS-PAGE analizi .....	31



## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Mevcut <i>B. thuringiensis</i> 'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması .....	4
Tablo 2. Etkili oldukları hedef böcek türlerine göre kristal proteinler ve bu böcek türlerinin ait oldukları böcek grupları .....	6
Tablo 3. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı ve etkilediği böcek grupları .....	8
Tablo 4. Ticari olarak kullanılan <i>Bacillus thuringiensis</i> 'ler .....	12
Tablo 5. <i>Bt</i> Xd3'ten elde edilen Cry3Aa proteinine ait aa diziliminin diğer Cry3Aa proteinleri ile karşılaştırılması .....	26
Tablo 6. Ekspreslenmiş olan Cry3Aa'nın (100µg) <i>Alphitobius diaperinus</i> larvaları üzerindeki insektisidal etkisi .....	32
Ek Tablo 1. <i>cry3Aa</i> geninin diğer <i>cry3Aa</i> genleri ile DNA sıralarının karşılaştırılması ...	44
Ek Tablo 2. Yeni sınıflandırma sistemine göre Cry toksinlerinin listesi.....	52

## SEMBOLLER DİZİNİ

Cry	: Kristal
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ICP	: İnsektisidal Kristal Protein
IPTG	: İzopropil $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranosit
kDa	: Kilo dalton
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil $\beta$ -D-galaktopiranosid

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

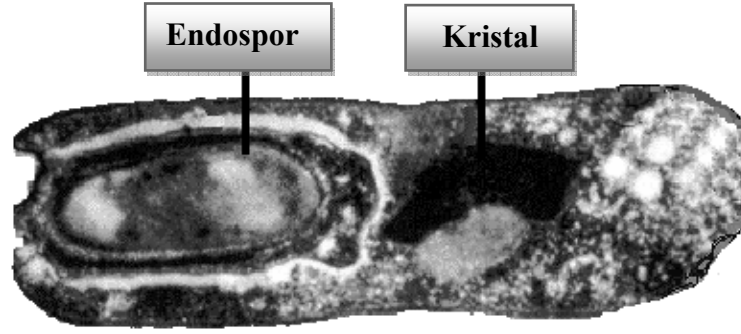
Doğada yararlı ve zararlı olarak tanımlanan çeşitli böcek türleri bulunmaktadır. Doğaya ve insana zararlı olan çok az sayıda böcek türü bulunmasına rağmen özellikle bu zararlı böcek türleri tarım alanlarında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hızlı nüfus artışı ile birlikte tarım alanlarında meydana gelen ürün kayıpları ülkemizi her geçen gün dışa bağımlı hale getirmektedir. Zararlı böcek türlerinin oluşturduğu zarar nedeniyle Türkiye birçok ülkeden tarım ürünleri ithal etmektedir.

Zararlı böceklerle mücadelede yaygın olarak kimyasal insektisitler kullanılmaktadır. Kimyasal insektisitlerin kullanımı tarımsal üretimin artırılmasında önemli rol oynamaktadır. Fakat kimyasal insektisitlerin uzun süreli ve sık kullanımı insan sağlığını olumsuz etkilemekte ayrıca hedef dışı canlılara etkisi sonucu doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Kimyasal insektisitler hava, toprak ve su kirliliğinin oluşmasında da etkilidir. Kimyasal ilaçların tarım zararlılarına karşı yüksek dozda ve bilinçsiz kullanımları, bunların kimyasallara karşı direnç kazanmalarına neden olmaktadır.

Kimyasalların kullanımı ile gerçekleştirilen zararlı böcek kontrolüne alternatif bir yöntem de biyolojik mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadele, zararlı böceklerin yapmış olduğu zararları en aza indirmek için bu böceklerin doğal düşmanlarını onlara karşı kullanma olarak tanımlanabilir. Biyolojik mücadelede rol oynayan ajanlar genel olarak virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve nematodlardır.

Entomopatojen bakteriler, günümüzde zararlı böceklere karşı en fazla kullanılan mikroorganizmalardır. Spor oluşturanlar ve spor oluşturmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Böceklere önemli zararlar veren bakteriler, daha çok spor meydana getiren gruptandır. Yapılan araştırmalar, bunların sporlarının kuraklık ve yüksek sıcaklığa karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Buna rağmen spor oluşturmayan bakteriler olağanüstü şartlar karşısında oldukça dayanıksız ve hassas yapıdadırlar. Buna göre, böceklere karşı yapılacak mücadelede, spor oluşturan ve fakültatif bakterilerin kristal taşıyanlarının kullanılması tavsiye edilmektedir (Oğurlu, 2000).

En yaygın olarak kullanılan biyolojik mücadele ajanı *Bacillus thuringiensis* bakterisidir. *Bacillus thuringiensis* Bacillaceae familyası içerisinde yer alan Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera grubundaki böceklere karşı insektisidal özelliğe sahip kristal yapıda toksin bir protein üreten, spor oluşturan, gram-olumlu ve aerobik bir toprak bakterisidir (Beegle ve Yamamoto, 1992) (Şekil 1). Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera ve Mallophaga böcek grupları üzerinde ve ayrıca nematodlar, keneler ve protozoalar üzerinde de aktiviteleri tespit edilmiştir (Feitelson, 1992; Feitelson vd.,1993). *Bacillus thuringiensis*'in spor ve kristalleri piyasada toz, ıslanabilir toz veya sulu karışım halinde bulunmaktadır.



Şekil 1. *Bacillus thuringiensis* bakterisinin elektron mikroskop görüntüsü (Waheed ve Kogan, 2003).

*B.thuringiensis* suşları kristal (Cry) proteinlerinin dışında (Cyt) sitolitik proteinler ve vejetatif büyüme süresince  $\beta$ -ekzotoksin, fosfolipaz, proteazlar, kitinazlar, vejetatif insektisidal proteinler (VİP) ve antifungal bileşikler de oluştururlar (Porcar ve Juarez-Perez, 2003).

## 1.2. *Bacillus thuringiensis*'lerin Tarihi

*B. thuringiensis* ilk kez 1901 yılında Japon bakteriyoloğu Ishiwata (1901) tarafından hastalıklı ipek böceği larvalarından izole edilmiştir. Aoki ve Chigasaki (1915) adlı araştırmacılar bakteriyi tanımlamışlardır. Spor bulunan hücrelerde inklüzyon yapılarının (kristal protein) varlığını Berliner (1911; 1915) ve Mattes (1927) rapor etmişlerdir. Hannay (1953) *B. thuringiensis*'in spor morfolojisini ve parasporal yapı olarak adlandırılan

inklüzyon yapılarını açıkladı ve 1955’de bu yapının protein yapıda olduğunu belirledi. Angus (1954), ipek böceği larvalarının orta bağırsaklarındaki *B. thuringiensis*’in spor oluşmuş hücrelerinde toksik bir maddenin oluştuğunu buldu. Daha sonra aynı araştırmacı (Angus, 1956) toksik maddenin parasporal yapı içinde olduğunu keşfetti.

### 1.3. *Bacillus thuringiensis*’lerin Plazmitleri

*B. thuringiensis* suşları yaklaşık 2,4 ile 5,7 milyon baz çifti uzunluğunda bir genoma sahiptirler (Carlson, 1994). *B. thuringiensis* 2-11 arası plazmit içermektedir (Gonzalez, 1981). Bu plazmitlerin büyüklükleri 2 ile 272 kb arasında değişmektedir (Lereclus, 1993). İnsektisidal proteini kodlayan genler plazmitler üzerinde yer almaktadır (Carlton, 1988). Bu plazmitler konjugasyon benzeri mekanizmalar ile bir *B. thuringiensis*’den diğerine kendiliğinden transfer yeteneğine sahiptir.

### 1.4. *Bacillus thuringiensis*’lerin Alt Türlerinin Sınıflandırılması

*B. thuringiensis*’in ayırt edilmesinde konak seçiciliği, alt türleri belirleyen H-serovarları ve *cry* genleri kullanılmaktadır. Son yıllarda alt türleri karakterize etmek için DNA parmak izi yöntemi de kullanılmaktadır (Hansen vd., 1998).

Kullanılan fenotipik yöntemlerden birisi olan H-serotiplenme, *B. thuringiensis* izolatlarının sınıflandırılmasında önemli bir yöntemdir. Bu yöntem Barjac ve Bonnefoi (1962) tarafından geliştirilmiş ve o zamandan beri kullanılmaktadır (de Barjac ve Frachon 1990).

2004 verilerine göre flagella H-serovarlarına bakılarak yapılan sınıflandırmada 80’den fazla *B. thuringiensis* alttürü tanımlanmıştır (Tablo 1). Serovarların mevcut listesi Paris’deki Pasteur Enstitüsü’nden (Unite des Bacteries Entomopathogenes, Institut Pasteur, Paris, France) elde edilebilmektedir.

Tablo 1. Mevcut *B. thuringiensis*'lerin flagella (H) antijenlerine bakılarak sınıflandırılması

Flagella antijenleri	<i>B.thuringiensis</i> subsp.	Flagella antijenleri	<i>B.thuringiensis</i> subsp.
1	<i>thuringiensis</i>	29	<i>amagiensis</i>
2	<i>finitimus</i>	30	<i>medellin</i>
3a, 3c	<i>alesti</i>	31	<i>toguchini</i>
3a, 3b, 3c	<i>kurstaki</i>	32	<i>cameroun</i>
3a, 3d	<i>sumiyoshiensis</i>	33	<i>leesis</i>
3a, 3d, 3e	<i>fukuokaensis</i>	34	<i>konkukian</i>
4a, 4b	<i>sotto</i>	35	<i>seoulensis</i>
4a, 4c	<i>kenyae</i>	36	<i>malaysiensis</i>
5a, 5c	<i>galleriae</i>	37	<i>anadalousiensis</i>
5a, 5c	<i>canadensis</i>	38	<i>oswaldocruzi</i>
6	<i>entomocidus</i>	39	<i>brasiliensis</i>
7	<i>aizawai</i>	40	<i>huazhongensis</i>
8a, 8b	<i>morrisoni</i>	41	<i>sooncheon</i>
8a, 8c	<i>ostrinae</i>	42	<i>jinghongiensis</i>
8b, 8d	<i>nigeriensis</i>	43	<i>guiyanguebsus</i>
9	<i>tolworthi</i>	44	<i>higo</i>
10a, 10b	<i>darmstadiensis</i>	45	<i>roskildiensis</i>
10a, 10c	<i>londrina</i>	46	<i>chanpaisis</i>
11a, 11b	<i>toumanoffi</i>	47	<i>wratislaviensis</i>
11a, 11c	<i>kyushuensis</i>	48	<i>balearica</i>
12	<i>thompsoni</i>	49	<i>muju</i>
13	<i>pakistani</i>	50	<i>navarrensis</i>
14	<i>israelensis</i>	51	<i>xiaguangiensis</i>
15	<i>dakota</i>	52	<i>kim</i>
16	<i>indiana</i>	53	<i>asturiensis</i>
17	<i>tohokuensis</i>	54	<i>poloniensis</i>
18a, 18b	<i>kumamotoensis</i>	55	<i>palmanyolensis</i>
18a, 18c	<i>yosoo</i>	56	<i>rongseni</i>
19	<i>tochigiensis</i>	57	<i>pirenaica</i>
20a, 20b	<i>yunnanensis</i>	58	<i>argentinensis</i>
20a, 20c	<i>pondicheriensis</i>	59	<i>iberica</i>
21	<i>colmeri</i>	60	<i>pingluonsis</i>
22	<i>shandongiensis</i>	61	<i>sylvestriensis</i>
23	<i>japonensis</i>	62	<i>zhaodongensis</i>
24a, 24b	<i>neoleonensis</i>	63	<i>bolivia</i>
24a, 24c	<i>novosibirsk</i>	64	<i>azorensis</i>
25	<i>coreanensis</i>	65	<i>pulsiensis</i>
26	<i>silo</i>	66	<i>gracioensis</i>
27	<i>mexicanensis</i>	67	<i>vazensis</i>
28a, 28b	<i>monterrey</i>	68	<i>thailandensis</i>
28a, 28c	<i>jegathesan</i>	69	<i>pahangi</i>
		70	<i>sinensis</i>

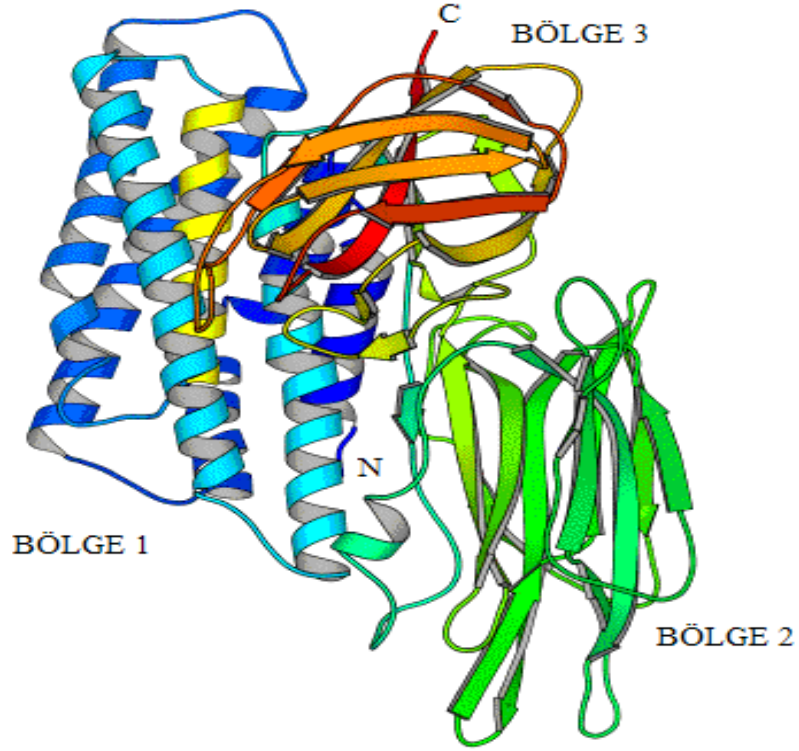
### 1.5. *Bacillus thuringiensis*'lerin Habitatları

*B. thuringiensis* suşları genellikle topraktan (Carozzi vd., 1991; DeLucca vd., 1979; Hastowo vd., 1992; Martin ve Travers, 1989; Smith ve Couche, 1991), böceklerden (Carozzi vd., 1991), depolanmış ürünlerden (Burges ve Hurst, 1977; Chaufaux vd., 1997; DeLucca vd., 1984; Meadows vd., 1992) ve kozalaklı ağaçların yapraklarından (Kaelin vd., 1994; Smith ve Couche, 1991) izole edilmiştir.

Çok sayıdaki *B. thuringiensis* ölü böceklerden izole edilmiştir ve çoğu durumlarda izolat izole edildiği böceğe karşı toksik aktivite göstermiştir (Goldberg ve Margalit, 1977; de Barjac, 1981; Hansen vd., 1996). Bu organizmalar Coleoptera, Diptera ve Lepidoptera gruplarında dar bir konak hassasiyetine sahiptirler ve konak böceklerin vücutları içinde çoğalırlar. Enfekte olan böcek larvası öldüğünde, ölü böcek vücutları kristal ve spor içerirler (Prasertphon vd., 1973; Grassi ve Deseö, 1984; Aly, 1985; Aly vd., 1985).

### 1.6. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Yapısı

*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*'in  $\delta$ -endotoksininin aktif kısmının kristal yapısı X-ışını kristalografisi ile belirlenmiştir (Li vd., 1991). Aktif toksin üç ayrı etkin bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2) (Höfte ve Whiteley, 1989; Li vd., 1991; Grochulski vd., 1995). Bölge I, böcek bağırsağına tutunma ve delik oluşumundan sorumludur. Bölge II'nin böcek bağırsağındaki epitel hücrelerindeki reseptörlere bağlanma ile ilgili görevi vardır (Li vd., 1991). Bölge III'ün fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir. Ancak bir görüşe göre Cry toksinin bağırsak proteazları tarafından parçalanmasını önler (Li vd., 1991). Bir görüşe göre de iyon kanallarının oluşumundan, reseptör bağlanmasından ve böcek özgünlüğünden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Rajamohan vd., 1998).



Şekil 2. *B. thuringiensis* suşlarına ait Cry proteinlerinin yapısı (URL-1, 2002).

Proteinler aktivitelerine bakılarak gruplandırılabilirler. Bu şekilde sınıflandırılmış kristal proteinler etki ettikleri böcek türlerine göre farklı sınıflara ayrılırlar (Tablo 2).

Tablo 2. Etkili oldukları hedef böcek türlerine göre kristal proteinler ve bu böcek türlerinin ait oldukları böcek grupları

Böcek Grubu	Hedef Böcek Türleri	Kristal Protein
Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Diabrotica undecimpunctata</i> <i>Melolontha melolontha</i> <i>Agelastica alni</i> <i>Pyrrhalta luteola</i> <i>Lasioderma serricorne</i> <i>Anomala cuprea</i>	Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry 34, Cry 35, Cry 36, Cry 38
Diptera	<i>Psychoda alternata</i> <i>Dixa spp.</i> <i>Tipula paludosa</i> <i>Chironomus plumosus</i>	Cry4, Cry10, Cry 11, Cry 16, Cry 19, Cry 20, Cry 24, Cry 25, Cry 27, Cry 29, Cry 30, Cry 39, Cry 40



Tablo 2'nin devamı

Lepidoptera	<i>Plutella xylostella</i> <i>Spodoptera exigua</i> <i>Malocosoma disstria</i> <i>Bombyx mori</i>	Cry1, Cry9, Cry15
Lepidoptera ve Diptera	<i>Heliothis virescens</i> <i>Trichoplusia ni</i> <i>Manduca sexta</i>	Cry2
Hymenoptera	<i>Monomorium pharaonis</i>	Cry22
Nematot	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Cry5, Cry6, Cry12, Cry13, Cry21

*Bacillus thuringiensis* alttürlerinin insektisidal aktiviteleri, bakteriyel sporulasyon esnasında sentezlenen, çok geniş bir yapıya sahip olan ve parasporal kristal yapıları sayesinde sağlanır. Parasporal kristalin kuru ağırlığı spor oluşturmuş olan kültürün yaklaşık %20-30'u olup genellikle bununda %95'i protein geri kalan %5'lik kısmı ise karbonhidrat'tır. Bu kristal, bir protein kümesidir ve hafif alkali muamelesi ile protoksin denilen alt ünitelere ayrılabilir. Bu alt birimler ise daha da küçük alt birimlerine kadar ayrıştırılabilirler (Schnepf vd., 1998). Parasporal kristal yapılar böcek vücudundaki etki mekanizması sırasında böceğin alkali bağırsak ortamında çözünerek protoksine dönüşürler.

Protoksinler bağırsak enzimleri tarafından parçalanarak böcek bağırsağında tahribat oluşturacak form olan aktif toksinlere dönüştürülür. Protoksinlerin; multijenik yapısı, moleküler büyüklüğü ve konak özgünlüğü Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. Protoksinlerin ve toksinlerin moleküler büyüklükleri, multijenik yapısı ve etkilediği böcek grupları (Rukmini vd., 2000).

Gen	Alt Sınıf	Etkilediği Böcek Grupları	Protoksin (kDa)	Toksin (kDa)
cryI	IA(a)	Lepidoptera	130–160	60
	IA(b)	Lepidoptera/Diptera	130–160	60
	IA(c)	Lepidoptera	130–160	60
	IB	Lepidoptera	130–160	60
	IC	Lepidoptera	130–160	60
	ID	Lepidoptera	130–160	60
	IE	Lepidoptera	130–160	60
	IF	Lepidoptera	130–160	60
cryII	IIA	Lepidoptera/Diptera	70–71	65
	IIB	Lepidoptera	70–71	65
	IIC	Lepidoptera	70–71	65
cryIII	IIIA	Coleoptera	73	55
	IIIB	Coleoptera	73	55
	IIIC	Coleoptera	73	55
	IIID	Coleoptera	73	55
cryIV	IVA	Diptera	134	46–48
	IVB	Sivrisinek	128	46–48
	IVC	Karasinek	58	?
	IVD	Nematot	72	30
cryV	V	Lepidoptera	81.2	?
		Coleoptera		

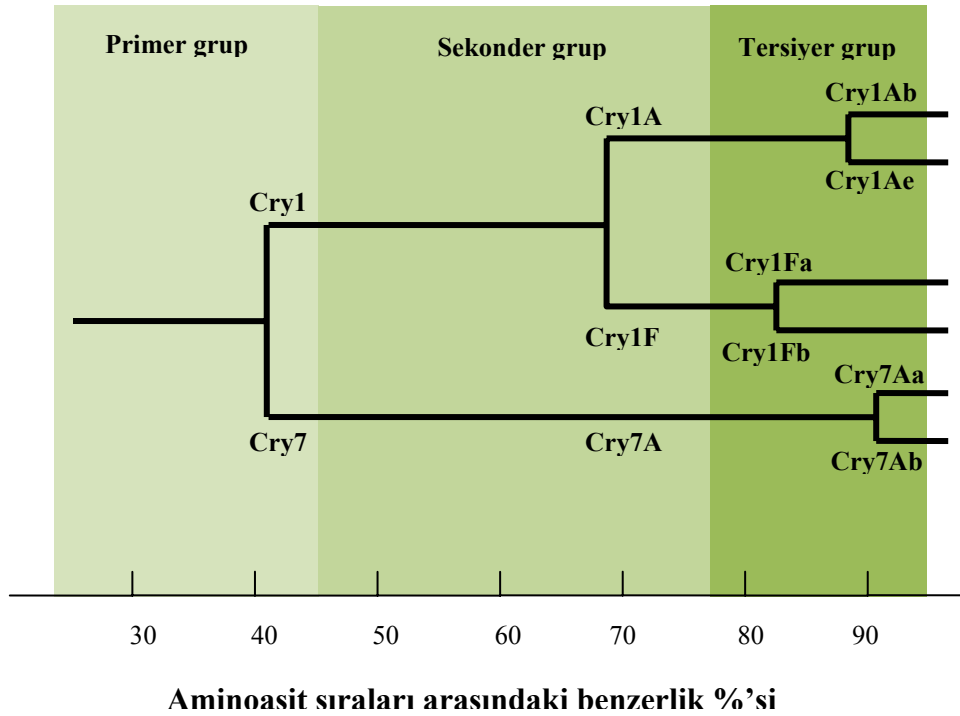
### 1.7. İnsektisidal Kristal Proteinlerin Sınıflandırılması

*Bacillus thuringiensis*'in insektisidal aktivitesi insektisidal kristal proteinleri (ICP) sayesinde gerçekleşmektedir. İnsektisidal kristal proteinleri sırasıyla *cry* (kristal) ve *cyt* (sitolitik) genleri tarafından kodlanan kristal ve sitolitik proteinleri içerir.

1989 yılında Hofte ve Whiteley kristal proteinleri, insektisidal aktivitesine ve moleküler ilişkilerine göre 5 büyük sınıfa ayırmıştır (CryI, CryII, CryIII, CryIV and CryV). Ayrı bir sınıflandırma da, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ICP'de ve bazı diğer *B. thuringiensis* alttürlerinde bulunan özgün olmayan sitolitik bir faktörü kodlayan sitolitik (*cyt*) genler için kullanılmaktadır. İki veya üç böcek grubunu kapsayan bir aktivite spektrumuna sahip olan yeni türlerin keşfi ile beraber bilim adamları aminoasit sıra homolojisine dayanan yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmişlerdir (Schnepf vd., 1998).

Yeni sınıflandırma sistemi tablo 4’te verilmektedir. Bu sınıflandırmada Romen rakamları yerine Arabik rakamları kullanılmıştır.

Yeni sınıflandırma planını anlatan bu şema Cry proteinlerinin aminoasit sırasına dayandırılarak filogenetik bir ağacın oluşturulmasıyla gösterilmiştir (Şekil 3). Böylece belirli bir dizi protein sekansı arasındaki akrabalık belirlenebilir ve ayrı bir grup olarak bu şemada temsil edilebilir. Bu filogenetik ağacın dallanma noktaları proteinlerin benzerlik olarak birbirinden uzaklaştığı noktaları temsil eder. %95, %78 ve %45 oranındaki benzerlikler farklı sınıfları tanımlayan sınırları gösterir (Crickmore, 1998).



Şekil 3. *Bacillus thuringiensis*’in Cry proteinlerinin filogenetik ağacının kısmi şematik görünüşü. Farklı arka plan renkleri farklı sınıflandırma kısımlarını belirtir. Cry1 ve Cry7 %45’den daha az benzerlik içerir, Cry1A ve Cry1F arasındaki benzerlik %45 ile %78 arasındadır ve Cry1Ab ve Cry1Ae arasındaki benzerlik %78 ile %95 arasındadır.

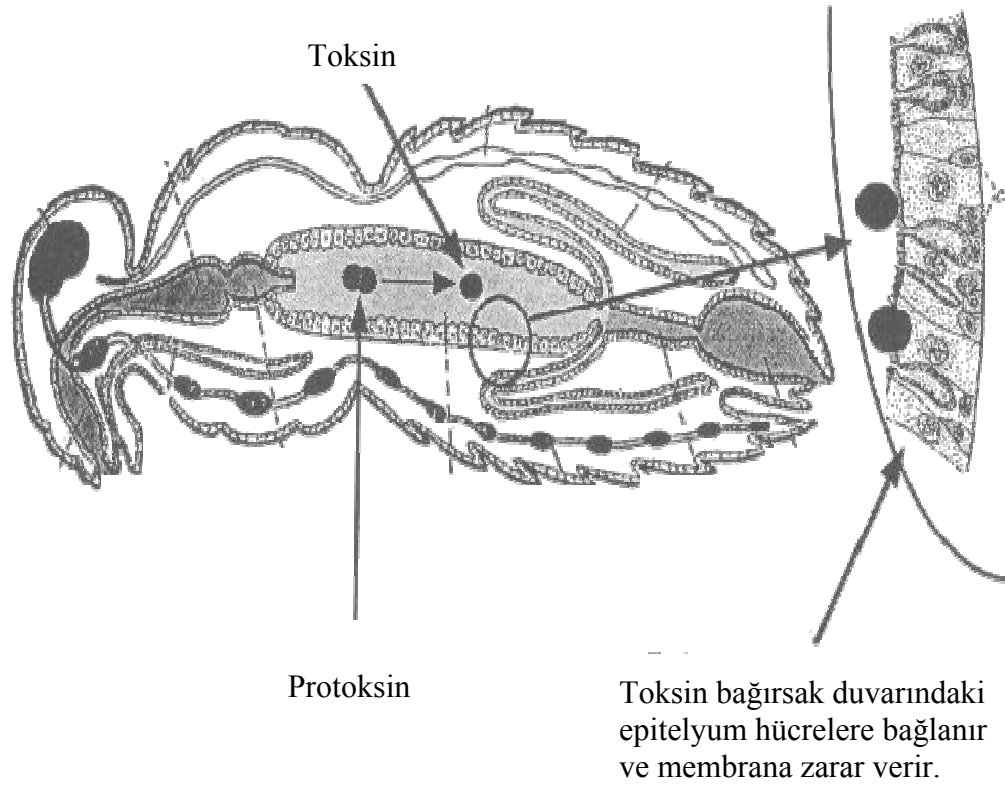
Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda 400 *cry* geni bulunmuş ve amino asit sırası benzerlik derecesine göre *cry1*'den *cry55*'e kadar sınıflandırılmıştır (Ek Tablo 2).

Yeni sınıflandırma sistemine göre Cry toksinlerinin listesi Ek Tablo 2'te verilmiştir.

### 1.8. İnsektisidal Kristal Proteinin Hedef Böceklerdeki Mekanizması

ICP'ler normal koşullar altında çözünmeden bulunurlar, bu yüzden insanlar ve diğer yüksek organizma grupları için bir risk oluşturmazlar. Buna karşılık pH 9,5'de çözünebilir özellik taşımaları kristal proteinlerine yoğun bir insektisit özelliği kazandırmaktadır.  $\delta$ -endotoksinler bağırsakta çözünerek protoksine dönüşürler. Daha sonra bağırsak enzimleri tarafından protoksinler parçalanarak aktif toksinler elde edilir. Aktif toksinler bağırsak epitel hücrelerinin reseptörlerine tutunarak böceğin bağırsak duvarını felce uğratar ve burayı tahrip ederek gözenekler oluştururlar. Böylece bağırsakta bulunan besin artıkları böcek vücuduna ve kana karışır. Zehirlenen böcek, toksin aktivitesi sebebiyle hemen ölebileceği gibi 2-3 gün içerisinde kan zehirlenmesi sonucu da ölebilir. *B. thuringiensis*'in larvalar üzerinde sebep olduğu belirtiler; yavaş hareket etme, beslenmeyi bırakma, sıvı halde dışkı çıkarma, kusma ve vücut içeriklerinin kahverengiden siyaha dönüşmesi olarak sayılabilir (Knowles, 1994).

*B. thuringiensis*'in hedef böcek üzerindeki mekanizması Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından özetlenmiştir. Bu mekanizma maddeler halinde şu şekilde ifade edilebilir; 1) spor ve ICP oluşturmuş *B. thuringiensis*'in larva tarafından sindirilmesi; 2) orta bağırsakta kristal şeklindeki ICP'nin çözünmesi; 3) proteazlar ile ICP'nin aktifleştirilmesi; 4) orta bağırsak hücre membranındaki özgün reseptörlere aktif ICP'nin bağlanması; 5) hücre membranına toksinin eklenmesi ve bağırsak hücre membranında kanallar ve deliklerin oluşumu, ve bunun sonucunda da epitel hücrelerinin parçalanması (Cooksey, 1971; Norris, 1971; Fast, 1981; Huber ve Lüthy, 1981; Lüthy ve Ebersold, 1981; Smedley ve Ellar, 1996); 6) larvada fazla miktarda *B. thuringiensis*'in çoğalması ve oluşan kan zehirlenmesinin ölümü artırması (Şekil 4).



Şekil 4. *Bacillus thuringiensis*'in hedef böceklerdeki etki mekanizması (Gatehouse vd., 2000).

### 1.9. Böcek Populasyonlarının *Bacillus thuringiensis*'e Dirençliliği

Laboratuvar şartlarında farklı böcek türlerinde *B. thuringiensis*'e karşı dirençlilik tespit edilmiştir (Schnepf vd., 1998). Dirençlilik tespit edilen böcek türleri *Plodia interpunctella*, *Cadra cautella*, *Leptonatarsa decemlineata*, *Chrysomela scripta*, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* ve *Culex quinquefasciatus* türleridir (Schnepf vd., 1998). Direnç oluşturan *B. thuringiensis* suşları; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ve diğer *B. thuringiensis* alt türleridir.

Bir çeşit güve olan *Plutella xylostella*'nın *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ve *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*'ya karşı direnç geliştirdiği Hawaii, Filipinler, Endonezya, Malezya, Orta Amerika ve bazı Amerika şehirlerinde görülmüştür (Schnepf vd., 1998).

*B. thuringiensis*'lerin direnç mekanizması Schnepf ve arkadaşları (1998) tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir.

### 1.10. *Bacillus thuringiensis* Suşlarının Biyoteknolojisi

*B. thuringiensis* suşları zararlı kontrol ajanı olarak günümüzde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. *B. thuringiensis* ürünleri biyopestisit pazarının %95'ini oluşturmaktadır. Bu ürünlerin çoğu 33 yıl önce izole edilen *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 izolat orijinlidir (Dulmage, 1970). *B. thuringiensis*'in oluşturduğu  $\beta$ -ekzotoksin ve  $\delta$ -endotoksinler tarım zararlılarına karşı kullanılmaktadır. En fazla kullanılan  $\delta$ -endotoksin; Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera gruplarındaki larvalara karşı etkilidir.

Tablo 4. Ticari olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis*'ler

Ticari Adı	Firmanın Adı	<i>B. thuringiensis</i> suşları
Bactospeine	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Biobit	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Dipel	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
Florbac	Abbott	aizawai
Foray	Abbott	<i>kurstaki</i> HD-1
XenTari	Abbott	aizawai
Cordalene	Agrichem	<i>kurstaki</i> HD-1
BMP 123	Becker	<i>kurstaki</i> HD263
Biobest-Bt	Biobest	<i>kurstaki</i> HD-1
Bactimos	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Gnatrol	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
Skeetal	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>
VectoBac	Abbott	<i>B.t. israelensis</i>

Tablo 4'in devamı

Acrobe	American Cyanamide	<i>B.t. israelensis</i>
Aquabac	Becker Microbiol	<i>B.t. israelensis</i>
Ditera	Abbott	<i>B.t. tenebrionis</i>
Novodor	Abbott	<i>B.t. tenebrionis</i>
Raven	Ecogen	<i>B.t. kurstaki</i> (EG2424)

Copping (1998), CPCR (1998), CDMS (1998), CEPA/DPR (1998)

### 1.11. Çalışmanın Amacı

Biyolojik mücadele amacıyla bakterilerin kullanımı yaygın olarak tercih edilmektedir. Özellikle bu amaç için *Bacillus thuringiensis* suşları tarafından üretilen *cry* genleri kullanılmaktadır. *cry* gen ürünleri zararlı böcekler üzerinde insektisidal etkiye sahiptir. *Bacillus thuringiensis* bakterisi zararlı böcekleri ortadan kaldırması açısından ekonomik ve ekolojik olarak önemlidir. Dolayısıyla *cry* genlerinin yapısının aydınlatılması ve insektisidal ajan olarak kullanılabilmesi kaçınılmaz olmuştur. Bu çalışmadaki amacımız *Xyleborus dispar*'dan izole edilen *Bacillus thuringiensis* izolatındaki *cry3Aa* genini tanımlamak ve farklı bir sistemdeki aktivitesini belirlemektir. *E.coli*'de ekspres edilen proteinin bir Coleoptera larvası olan *Alphitobius diaperinus* üzerinde insektisidal aktivite testi gerçekleştirildi. Bu çalışma neticesinde daha önce tanımlanan bu bakterinin içerdiği toksin geninin detaylı identifikasyonu yapıldı. *cry3Aa* geninin insektisidal aktiviteye sahip olması nedeniyle ekonomik bir önemi bulunmakta olup yapısının aydınlatılması biyolojik mücadele açısından önemli bir katkı sağlayacaktır.



## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. *Bacillus thuringiensis* Xd3 Bakterisi ve Büyüme Şartları

Bu çalışmada kullanılan ve bir tarım zararlısı olan *Xyleborus dispar*'dan izole edilen *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisi (Sezen vd., 2008) Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür stoğundan temin edilmiştir.

*Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisi nutrient agar (NA;Merck) ve Luria Bertani besiyerlerinde (LB;1 litre LB için; 10 g Triptone, 5 g NaCl, 5 g Maya özü) 30 °C'de büyütüldü.

### 2.2. *B.thuringiensis* Xd3 Bakterisinden DNA İzolasyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, Sambrook ve arkadaşları (1989) tarafından açıklanan yöntemle yapıldı. Çalışmada kullanılan *B. thuringiensis* Xd3 Bakterisi, LB besiyerinde 30 °C'de bir gece inkübe edilerek üretildi. Elde edilen sıvı kültür iki kez oda sıcaklığında 13,000×g'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısmı dökülerek pellet kısımları saklandı. Pelletin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) ilave edilerek pellet çözüldü. Daha sonra her bir tüpe 10 µg lizozim ilave edilerek vortekslendi ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Hücrelerdeki proteinlerin parçalanması için, 50 µl %10'luk SDS eklenerek 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Bu süre sonunda, tüpe 3 M'lık 0,1 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65 °C'de 10-30 dakika alt üst edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Üzerine 500 µl fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edildi, tekrar alt-üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13000×g' de santrifüj edildi. Tüpün üst kısmındaki sıvı alınıp temiz tüpe bırakıldı, pellet kısmı ise atıldı. Bu tüpe tekrar 500 µl kloroform eklendi ve alt-üst edilerek 13000×g' de tekrar 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandıktan sonra, üzerlerindeki sıvı kısım alındı. Bu sıvı kısma 0,1 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96'lık etanol ilave edildi ve -20 °C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13,000×g'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı boşaltıldı. Kalan pelletin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edilerek tekrar 13,000×g'de 2 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki sıvı dökülerek pellet açık

havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 100 µl ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü ve -20 °C'de muhafaza edildi.

### 2.3. *cry3Aa* Geninin PCR Aracılığıyla Çoğaltılması

*Bacillus thuringiensis* Xd3 bakteri DNA'sı daha önce yapılan çalışmalarda *cry3* genel primeri ile çoğaltıldı. Buna göre *cry3* geninin *Bt* Xd3 bakterisinde varlığı tespit edildi.

*cry3Aa* geninin çoğaltılması için öncelikle uygun primerler dizayn edildi. Aminoasit ve nükleotid sırası önceden belirlenmiş ve gen bankasındaki yerini almış olan *cry3Aa* genleri Clustal W Multiple Sequence Alignment programı yardımıyla aminoasit ve nükleotid sırası bakımından karşılaştırıldı.

Aminoasit ve nükleotid dizilimi açısından korunmuş olan bölgeler tespit edilerek 1 adet ileri ve 1 adet geri primer dizayn edildi. *cry3Aa* ileri primer sırası, 5'-GGCCATGGGCATGAATCCGAACAATCGAAGTGAAC-3'; geri primer sırası ise, 5'-GGATCCTCATTAATTCACTGGAATAAATTC-3' olarak belirlendi. İleri primerdeki altı çizili kısım *NcoI* ve geri primerdeki altı çizili kısım da *Bam*HI restriksiyon enzimi kesim bölgeleridir.

PCR reaksiyonu, bu primerler kullanılarak 50 µl'lik son hacimde gerçekleştirildi. Her bir tüpe 2,5 ünite Go Taq DNA polimeraz (Promega), 5 µl 5x PCR tamponu( 10mM Tris-HCl, pH 8,3), 3 µl 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl 1mM ileri primeri, 1,5 µl 1mM geri primeri, 1 µl 10 mM dNTP'den ve 2 µl genomik DNA bırakılarak steril ddH<sub>2</sub>O ile 50 µl'ye tamamlandı.

PCR şartları 94°C'de 3 dakikalık denatürasyondan sonra 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika, 50°C'de 1 dakika ve 72°C'de 3 dakika ve son olarak da 72°C'de 10 dakika olacak şekilde son uzamaya tabi tutularak gerçekleştirildi. PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden %1'lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme sistemi (Gel Logic;Kodak) ile görüntülendi.

#### 2.4. *Bacillus thuringiensis* Xd3 Bakterisine Ait *cry3Aa* Geninin pGEMT-Easy Vektöre Klonlanması

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan *cry3Aa* geni agaroz jelden kesilerek Nucleospin Extract DNA Purification (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi. Jelden temizlenen DNA fragmentleri, pGEM-T Easy vektöre (Promega) 3 DNA fragmenti 1 vektör oranında (0,3 µg DNA fragmenti ve 0,1 µg PGEMT-Easy) klonlandı. Reaksiyon 1µl pGEMT-Easy vektörü, 7,5 µl 2x ligasyon tamponu, 1 µl T4 DNA ligaz ve 5,5 µl DNA fragmenti bir araya getirilerek 15 µl'lik hacim içinde gerçekleştirildi. Karışım 16°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

#### 2.5. *cry3Aa* Geninin Elektrokompotent *E.coli* DH10β'ya Aktarımı

Petriye ekilmiş *E.coli* DH10β hücrelerinden tek bir koloni alınıp NaCl ihtiva etmeyen Luria Bertani (LB) Broth besiyerine aşılandı ve 37°C'de gece boyunca büyütüldü. Bu taze kültürden fazla miktarda LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda 0,6-0,9 olacak şekilde büyütüldü. Bakteri konsantrasyonu istenilen yoğunluğa ulaşıncaya, hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 4 °C'de 4.000×rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve çökelti iki kez soğuk su ile yıkanarak aynı hız ve zamanda santrifüj edildi. Çökelti %10'luk soğuk gliserolde çözüldü ve 5.000×rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst kısım döküldü ve çökelti az miktarda %10'luk gliserol içinde süspansiyon haline getirildi. Elde edilen kompotent hücreler mikrosantrifüj tüplerine bölündü (50 µl'lik hacimlerde) ve -80 °C'de saklandı.

Yukarıdaki işleme göre hazırlanan elektrokompotent *E.coli* DH10β hücrelerinden 2 tüp alınarak buza yerleştirildi. Tüplerin birine 3 µl ligasyon ürünü bırakılırken, diğerine hiçbir şey eklenmeyerek kontrol olarak kullanıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve tekrar 1 dakika buzda bekletildi. Tüplerdeki karışımlar, elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı ve elektroporasyon cihazı (BioRad Micro Pulser)'nın elektriksel tetik kısmına yerleştirilerek elektrik uygulandı. Kuvvetler cihazdan alınarak içlerine 1 ml LB besiyeri eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra tüm karışım steril bir cam tüpe bırakılarak 37°C'de 200 rpm'de 1 saat boyunca büyümeye bırakıldı. İnkübasyondan sonra büyüyen kültürler ependorf tüplere aktararak 6000 g'de 3 dakika santrifüj yapıldı. Ependorfta 100 µl kalacak şekilde süpernatant döküldü ve kalan süpernatant içinde pellet çözüldükten sonra 50 µg/ml

ampisilin içeren LB agar petrilere (üzerine 100mg/ml IPTG çözeltisinden 40 µl ve 20 mg/ml X-gal çözeltisinden 40 µl sürülmüş petriyer) yayıldı. Gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda içerisine plazmid alan hücrelerin beyaz koloni oluşturmasından yararlanılarak klonlar seçildi.

## **2.6. Rekombinant Plazmidlerin İzolasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlar ile Muamelesi**

Mavi/ beyaz koloni morfolojisine göre ayırım yapılarak seçilen beyaz kolonilerden içerdikleri plazmid DNA'larını izole etmek için 50 µg/ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Plazmit DNA'larının izolasyonu için hızlı miniprep metodu kullanıldı. Gece kültürleri 14.000×g'de 2 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücrelerin üzerindeki süpernatant geride 50 µl kalacak şekilde döküldü ve çökelti bunun içinde vortekslenerek çözüldü. Üzerine 300 µl TENS tamponu (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, % 0,5 SDS) ilave edilerek karıştırıldı. Bunu takiben üzerine 150 µl 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ilave edildi ve tekrar 5-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 14.000×g'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve üzerine 900 µl %100'lük etanol ilave edilerek 14.000×g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Çökelti %70'lik etanol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü.

İzole edilen plazmit DNA'ların DNA fragmentlerini içerip içermediğini tespit etmek için bu plazmit DNA'ları *EcoRI* restriksiyon enzimi ile muamele edildi. 10 µl DNA, 0,5 µl *EcoRI* (promega), 2 µl enzime ait 10× reaksiyon tamponu ve 7,5 µl H<sub>2</sub>O olacak şekilde 20 µl'lik hacimlerde reaksiyonlar hazırlandı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından %1'lik jelde elektroforez yapıldı. Klonlanan DNA fragmentlerini içeren klonlar belirlendi.

## **2.7. Klonların İçerdiği DNA Parçalarının Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi**

Elde edilen klonlardan seçilen 3 tanesinin 5 ml ampisilinli LB besiyerine ekimi yapıldı ve 37° C'de 200 rpm'de gece boyu inkübe edildi. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültürler, 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra "Wizard Plus SV

Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA) kiti kullanılarak izole edildi. Plazmid DNA konsantrasyonları OD<sub>260</sub>'da belirlendi. Tüm DNA'lardan 20 µl'lik hacim içinde 200 ng/µl konsantrasyonlarında hazırlandı. Üzerleri dikkatli bir şekilde etiketlenerek Macrogen Firmasına (Güney Kore) DNA bazlarının otomatik analiz edilmesi için gönderildi.

## 2.8. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin İncelenmesi

Sekans sonucunda elde edilen *cry3Aa* geninin baz ve aminoasit dizilimi gen bankasında bulunan diğer *cry3* genleri ile Clustal W Multiple Sequence Alignment programı vasıtasıyla karşılaştırıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

## 2.9. *cry3Aa* Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)'yı içeren *E.coli* BL21 bakterisine ait bir koloniden 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de gece boyu büyütüldü. 14-16 saatlik büyüme sonucu elde edilen kültür 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmid DNA izolasyonu, “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

### 2.9.1. pET-28a(+) Ekspresyon Vektörünün *NcoI/BamHI* Restriksiyon Enzimleri ile Kesilmesi

İzole edilen plazmid DNA'sından 500 ng alınarak *NcoI* ve *BamHI* enzimleri ile kesildi. Reaksiyon, 10 µl plazmid DNA 3 µl 10X TA tamponu, 1,5 µl *NcoI*, 1,5 µl *BamHI* ve 14 µl steril ddH<sub>2</sub>O bir araya getirilerek son hacim 30 µl olacak şekilde hazırlandı ve 37°C'de 3 saat boyunca inkübe edildi. İnkübe edilen ürün %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Restriksiyon endonükleazlarla lineer hale gelmiş ve 5369 bp büyüklüğündeki pET-28a(+) vektörü, DNA temizleme (Macherey-Nagel) kiti kullanılarak jelden temizlendi.

### 2.9.2. *cry3Aa* Geninin pGEMT-Easy Klonlama Vektöründen Kesilerek Çıkarılması

Rekombinant plazmid içeren *E.coli* DH10 $\beta$  bakterisine ait bir koloni 50  $\mu$ g/ml amfifilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de gece boyunca büyütüldü. Elde edilen kültür, 14.000 rpm'de 2 dakika boyunca çöktürüldükten sonra plazmid DNA izolasyonu kiti (Promega, USA) kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen rekombinant plazmid DNA'dan 200 ng alınarak, 3  $\mu$ l 10X TA tamponu, 1'er  $\mu$ l *Nco*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimi ile toplam 30  $\mu$ l son hacimde 37°C'de 3 saat boyunca kesildi. Kesim ürünü DNA standardı olarak 1kb DNA Ladder (Promega) ile birlikte %1'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. pGEMT-Easy vektöründen *Nco*I ve *Bam*HI restriksiyon enzimleri ile kesilerek ayrılmış *cry3Aa* geni, agaroz jelden kesilerek alındı ve DNA temizleme kiti kullanılarak temizlendi.

### 2.9.3. *cry3Aa* Geninin pET-28a(+) Vektörüne Aktarımı

Jelden temizlenen *cry3Aa* geni ve pET-28a(+) vektörü 3 vektör ve 1 DNA olacak şekilde birbirlerine yapıştırıldılar. Buna göre reaksiyon; 2  $\mu$ l 10X T4 DNA ligaz tamponu (Promega), 1  $\mu$ l T4 DNA ligaz enzimi (Promega), 2  $\mu$ l pET-28a(+) vektörü, 6  $\mu$ l insert DNA (*cry3Aa* geni) ve 9  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O olacak şekilde hazırlandı ve reaksiyon 16°C'de gece boyu bekletildi.

### 2.10. pET-28a(+)’ya Klonlanan *cry3Aa* Geninin *E.coli* BL21(DE3) Hücrelerine Aktarımı

Rekombinant plazmit *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmadan önce *E.coli* DH10 $\beta$  elektrokompotent hücrelerine aktarıldı. Kesim yapılarak genin varlığı doğrulandı. Daha sonra kullanılacak olan *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine ait bir koloni 3 ml LB besiyerine aşılandı ve elde edilen kültür 37 °C'de 200 rpm'de gece boyunca inkübe edildi. Bu kültürden, CaCl<sub>2</sub>'lü metoda göre kompotent hale getirilmiş *E.coli* BL21(DE3) hücreleri elde edildi. Kompotent hücrelere DNA aktarımı için rekombinant plazmit DNA'sından 3  $\mu$ l alındı ve 200  $\mu$ l hücre eklendi. Karışım 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 2 dakika 45 °C'de bekletildi. Daha sonra reaksiyon karışımı, içerisinde 1 ml LB besiyeri olan cam tüpe bırakıldı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda ependorf tüpe alınan

kültür  $6000\times g$ 'de 3 dakika santrifüj edildi. Pellet halindeki hücrelerin üzerinde 100  $\mu$ l besiyeri kalacak şekilde fazla besiyeri döküldü. Daha sonra 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren LB agar petrilere yayıldı ve gece boyunca  $37^{\circ}C$ 'de inkübe edildi. Aynı yöntemle pET-28a(+) vektörünün kendisi de *E.coli* BL21(DE3) hücresine aktarıldı.

### **2.11. *Bacillus thuringiensis* Xd3 Bakterisine Ait Spor ve Kristal Süspansiyonunun Hazırlanması**

SDS-PAGE analizi ve insektisidal aktivite çalışmalarında kullanmak amacıyla spor-kristal karışımı hazırlandı. Bunun için *B. thuringiensis* Xd3 bakterisi petri içerisinde bulunan nutrient agar besiyerinde beş gün süreyle büyütüldü. Besiyerinden toplanan spor-kristal karışımı soğuk 1M'lık NaCl'de süspansiyon edildi. Daha sonra bu karışım  $13000\times g$ ' de  $4^{\circ}C$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet steril 1 ml ddH<sub>2</sub>O'da çözüldü. Kullanılincaya kadar  $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi.

### **2.12. Protein Ekspresyonu ve İzolasyonu**

İlgili proteini ekspres etmek için *cry3Aa* genini ihtiva eden pET-28a(+) vektörü, *E.coli* BL21(DE3) konak hücresine aktarıldı. Aktarım sonucu oluşan kolonilerden 1 tanesi 50  $\mu$ g/ml kanamisin içeren 3 ml LB besiyerine kürdan yardımıyla bırakıldı. Bu tüp 200 rpm'de  $37^{\circ}C$ 'de bir gece boyunca inkübe edildi. Elde edilen gece kültürü, 100 ml kanamisinli besiyerine eklendi.  $OD_{600}=0,5-1$  olduğunda gen ekspresyonunu indüklemek için 100  $\mu$ l IPTG (Stok konsantrasyonu 240mg/ml) besiyerine ilave edilerek tekrar büyümeye bırakıldı. Yaklaşık 4 saat sonra kültür alınarak 50 ml'lik propilen (Nalgene, Sigma-Aldrich) tüplere aktarıldı.  $4^{\circ}C$ 'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 12 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5'da çözüldü ve tekrar aynı şekilde santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek pelletin üzerine 5 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponu eklenerek hücreler karıştırıldı. Daha sonra 50  $\mu$ l lizozim (10mg/ml) eklenerek  $30^{\circ}C$ 'de 15 dakika inkübe edildi ve bu süre sonunda hücreler 1 dakika boyunca sonikatörde parçalandı. Son olarak,  $4^{\circ}C$ 'de 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Kalan pellet 2 ml 20 mM Tris-Cl pH=7,5 tamponunda çözüldü ve  $-80^{\circ}C$ 'de muhafaza edildi. *E.coli* BL21(DE3)'e aktarılan pET-28a(+) ve *E.coli* BL21(DE3)'in kendisinden de aynı yöntemle protein izolasyonu gerçekleştirildi.

### 2.13. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarının tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler ddH<sub>2</sub>O ile 250 µl' ye tamamlandı. Ardından zerine 250'şer µl hazır boya çözeltisinden (Protein Reagent, Sigma) ilave edildi ve vortekslendi. Hazırlanan standart ve örnekler 96 gzlu mikropate üzerine aktarıldı ve Bio-rad UV-visible Spektroskopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı.

### 2.14. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein ekspresyonunun gözlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapıldı. SDS poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile her bir örnekten 80 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir örnek üzerine muamele tamponu (60mM Tris-HCl (pH 6,8), %25 Gliserol, %2 SDS, %5 β-merkaptetanol, %0,1 bromofenol blue) ilave edildikten sonra numuneler kaynayan su içerisinde 10 dakika bekletildi. Daha sonra Laemmli (1970) tarafından tanımlanan %10'luk SDS-PAGE'e yüklendi. Jele 30 mA akım uygulanarak ayrılma işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 1 saat boyandı ve hemen ardından yıkama çözeltisinde (%36 Metanol, %9 Asetik Asit) 1-2 saat yıkandı. Jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

### 2.15. İnektisidal Etkilerin Belirlenmesi

Cry3Aa proteininin inektisidal aktivitelerini test etmek için çalışmalar yapıldı. İnektisidal aktivite çalışmalarında *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisine ait spor-kristal karışımı, *E.coli* BL21(DE3) bakterisinde ekspreslenen Cry3Aa proteini, pET-28a(+) vektörünü ihtiva eden *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden izole edilmiş protein ve *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden izole edilmiş proteinler kullanıldı. Bu proteinler Coleoptera

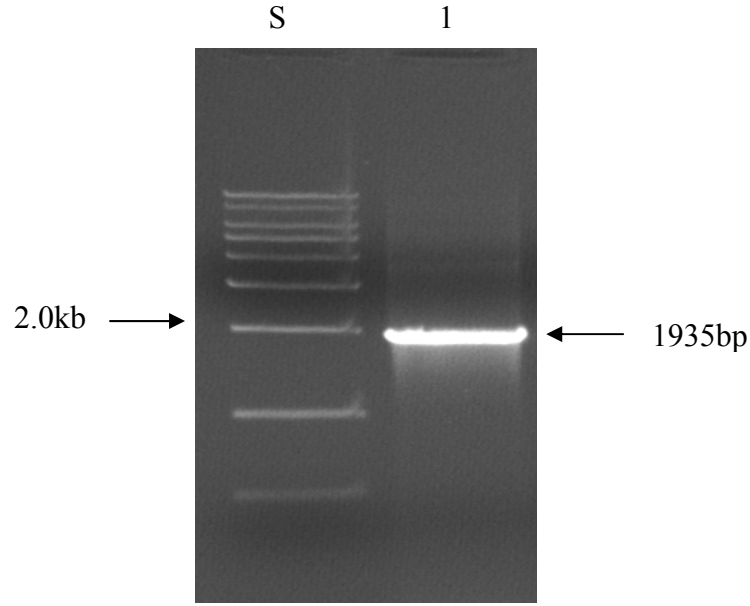


grubuna ait *Alphitobius diaperinus* (Tenebrionidae, çöp böceği) larvaları ve deneme amaçlı olarak Lepidoptera grubundan *Galleria mellonella* (Galleridae, büyük balmumu güvesi) larvaları üzerinde test edildi. Spor-kristal karışımı  $10^9$  spor-kristal/ml olacak şekilde hazırlandı. Test edilecek diğer numuneler ise *Galleria mellonella* larvaları için 20 ve 40 µg/ml, *Alphitobius diaperinus* larvaları için 100 µg/ml olacak şekilde hazırlandı. Her numune için 10 tane larva test kaplarına yerleştirildi. *Alphitobius diaperinus* larvaları için besin olarak küspe kullanıldı. *Galleria mellonella* larvaları için de suni besiyeri hazırlandı. Bu yiyeceklerin üzerine test edilecek numuneler ilave edildi. İnsektisidal aktivite testleri oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Meydana gelen ölümler kaydedildi. Deneyler üç tekrarlı yapıldı. İnsektisidal aktivite test sonuçları Abbott formülüne göre hesaplandı (Abbott, 1925).

### 3. BULGULAR

#### 3.1. *cry3Aa* Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) Analizi

*cry3Aa* geni dizayn edilen uygun primerler ile PCR'da çoğaltıldı. Beklenen 1935 bp civarındaki bant agaroz jelde görüntüledi.



Şekil 5. PCR ile çoğaltılmış *cry3Aa* geninin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. S: 1 kb DNA Ladder (Promega), 1: *cry3Aa* geni

#### 3.2. *Bacillus thuringiensis* Xd3 Bakterisinin *cry3Aa* Geninin Klonlanması ve Baz Dizilimlerinin Belirlenmesi

*cry3Aa* geni PCR ile çoğaltıldıktan sonra pGEMT-Easy klonlama vektörüne aktarıldı. Nükleotid sırasının belirlenmesi için dizin analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Dizin analizi işlemi genin her iki tarafından gerçekleştirildi. Analiz sonucuna göre toplam 1711 nükleotid uzunluğunda bir sıra elde edildi. Genin tamamı 1935 bp olduğundan dolayı aradaki eksik olan bölgenin belirlenmesi için okunmuş sıralardan yararlanarak yeni bir primer (*cry3Aa*-3Rv; 5'-CACCTGAATATACAGCGGACGG-3') dizayn edildi. Ara bölgenin DNA diziliminin belirlenmesi için dizin analizine tekrar gönderildi. Böylece ara bölgenin de sırası belirlenerek DNA dizin analizi tam olarak

gerçekleştirildi (Şekil 6). DNA dizini analizi gerçekleştirilen genin aminoasit sırası da belirlendi (Şekil 7).

**atg** aat ccg aac aat cga agt gaa cat gat aca ata aaa act act gaa aat aat gag gtg cca act aac cat gtt caa tat cct tta gcg gaa act cca aat cca aca cta gaa gat tta aat tat aaa gag ttt tta aga atg act gca gat aat aat acg gaa gca cta gat agc tct aca aca aaa gat gtc att caa aaa ggc att tcc gta gta ggt gat ctc cta ggc gta gta ggt ttc ccg ttt ggt gga gcg ctt gtt tgg ttt tat aca aac ttt tta aat act att tgg cca agt gaa gac ccg tgg aag gct ttt atg gaa caa gta gaa gca ttg atg gat cag aaa ata gct gat tat gca aaa aat aaa gct ctt gca gag tta cag ggc ctt caa aat aat gtc gaa gat tat gtg agt gca ttg agt tca tgg caa aaa aat cct gtg agt tca cga aat cca cat agc cag ggg cgg ata aga gag ctg ttt tct caa gca gaa agt cat ttt cgt aat tca atg cct tgg ttt gca att tct gga tac gag gtt cta ttt cta aca aca tat gca caa gct gcc aac aca cat tta ttt tta cta aaa gac gct caa att tat gga gaa gaa tgg gga tac gaa aaa gaa gat att gct gaa ttt tat aaa aga caa cta aaa ctt acg caa gaa tat act gac cat tgt gtc aaa tgg tat aat gtt gga tta gat aaa tta aga ggt tca tct tat gaa tct tgg gta aac ttt aac cgt tat cgc aga gag atg aca tta aca gta tta gat tta att gca cta ttt cca ttg tat gat gtt cgg cta tac cca aaa gaa gtt aaa acc gaa tta aca aga gac gtt tta aca gat cca att gtc gga gtc aac aac ctt agg ggc tat gga aca acc ttc tct aat ata gaa aat tat att cga aaa cca cat cta ttt gac tat ctg cat aga att caa ttt cac acg cgg ttc caa cca gga tat tat gga aat gac tct ttc aat tat tgg tcc ggt aat tat gtt tca act aga cca agc ata gga tca aat gat ata atc aca tct cca ttc tat gga aat aaa tcc agt gaa cct gta caa aat tta gaa ttt aat gga gaa aaa gtc tat aga gcc gta gca aat aca aat ctt gcg gtc tgg ccg tcc gct gta tat tca ggt gtt aca aaa gtg gaa ttt agc caa tat aat gat caa aca gat gaa gca agt aca caa acg tac gac tca aaa aga aat gtt ggc gcg gtc agc tgg gat tct atc gat caa ttg cct cca gaa aca aca gat gaa cct cta gaa aag gga tat agc cat caa ctc aat tat gta atg tgc ttt tta atg cag ggt agt aga gga aca atc cca gtg tta act tgg aca cat aaa agt gta gac ttt ttt aac atg att gat tgg aaa aaa att aca caa ctt ccg tta gta aag gca tat aag tta caa tct ggt gct tcc gtt gtc gca ggt cct agg ttt aca gga gga gat atc att caa tgc aca gaa aat gga agt gcg gca act att tac gtt aca ccg gat gtg tgg tac tct caa aaa tat cga gct aga att cat tat gct tct aca tct cag ata aca ttt aca ctc agt tta gac ggg gca cca ttt aat caa tac tat ttc gat aaa acg ata aat aaa gga gac aca tta acg tat aat tca ttt aat tta gca agt ttc agc aca cca ttc gaa tta tca ggg aat aac tta caa ata ggc gtc aca gga tta agt gct gga gat aaa gtt tat ata gac aaa att gaa ttt att cca gtg aat **taa**

Şekil 6. *cry3Aa* geninin DNA sırası (1935bp)

```

MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTA
DNNTEALDSSSTTKDVIQKGISVVGDLLGVVGFPGGALVSFYTNFLNTIWP
SEDPWKAFMEQVEALMDQKIADYAKNKALAEQGLQNNVEDYVSALSS
WQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQAESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYAQA
ANTHLFLLKDAQIYGEEWGYEKEDIAEFYKRQLKLTQEYTDHCVKWYNV
GLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYPKEVKTELT
RDVLTDPVIGVNNLRGYGTTFSNIENYIRKPHLFDYLDHRIQFHTRFQPGYYG
NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPQONLEFNKEKVYRAVA
NTNLAVWPSAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSID
QLPPETTDEPLEKGYSHQLNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFFNMID
SKKITQLPLVKAYKLQSGASVVAGPRFTGGDIIQCTENGSAATIYVTPDVSY
SQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYYFDKTINKGDTLTYNLASF
STPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN

```

Şekil 7. *cry3Aa* geninin aa sırası (644aa)

Elde edilen protein sırasının NCBI web adresindeki blast programı kullanılarak gen bankasındaki mevcut kristal proteinler ile karşılaştırması yapıldı. Karşılaştırma sonucuna göre gen bankasında mevcut *cry3Aa2*, *cry3Aa3*, *cry3Aa5*, *cry3Aa6* kristal genleri ile %100 benzerlik gösterdiği belirlendi. Baz dizilimlerine ait Clustal W analiz sonuçları Ek Tablo 1’de, aminoasit dizilimlerine ait sonuçlar ise Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. *Bt* Xd3’ten elde edilen Cry3Aa proteinine ait aa diziliminin diğer Cry3Aa proteinleri ile karşılaştırılması

SeqA	Adı	Büyüklüğü(aa)	SeqB	Adı	Büyüklüğü(aa)	Benzerlik %
1	Cry3Aa	644	2	Cry3Aa1	439	37
1	Cry3Aa	644	3	Cry3Aa2	644	100
1	Cry3Aa	644	4	Cry3Aa3	644	100
1	Cry3Aa	644	5	Cry3Aa4	432	37
1	Cry3Aa	644	6	Cry3Aa5	432	100
1	Cry3Aa	644	7	Cry3Aa6	644	100
1	Cry3Aa	644	8	Cry3Aa7	652	100
1	Cry3Aa	644	9	Cry3Aa8	652	99
1	Cry3Aa	644	10	Cry3Aa9	431	33
1	Cry3Aa	644	11	Cry3Aa10	652	99
1	Cry3Aa	644	12	Cry3Aa11	644	99

Cry3Aa8 MIRKGGKMPNPNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 60  
 Cry3Aa10 MIRKGGKMPNPNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 60  
 Cry3Aa7 MIRKGGKMPNPNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 60  
 Cry3Aa1 MIRKGGKMPNPNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 60  
 Cry3Aa -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa11 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa3 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa2 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa6 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa5 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa4 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 Cry3Aa9 -----MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADN 52  
 \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 120  
 Cry3Aa10 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 120  
 Cry3Aa7 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 120  
 Cry3Aa1 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 120  
 Cry3Aa NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa11 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa3 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa2 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa6 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa5 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa4 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 Cry3Aa9 NTEALDSSTTKDVIQKGISVVGDLGVLGVPFPGGALVSFYTNFLNTIWPSEDPWKAFFMEQ 112  
 \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 180  
 Cry3Aa10 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 180  
 Cry3Aa7 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 180  
 Cry3Aa1 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 180  
 Cry3Aa VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa11 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa3 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa2 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa6 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa5 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa4 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 Cry3Aa9 VEALMDQK IADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQ 172  
 \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 240  
 Cry3Aa10 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 240  
 Cry3Aa7 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 240  
 Cry3Aa1 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 240  
 Cry3Aa AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa11 AESYFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa3 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa2 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa6 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa5 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa4 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 Cry3Aa9 AESHFRNSMPSFAISGYEVLFLTTYQAANTHLFLLKDAQIYGEWGYEKEDIAEFYKRQ 232  
 \*\*\*:\*\*\*\*\*

Cry3Aa8 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 300  
 Cry3Aa10 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 300  
 Cry3Aa7 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 300  
 Cry3Aa1 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 300  
 Cry3Aa LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa11 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa3 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa2 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa6 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa5 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa4 LKLTQEYTDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 Cry3Aa9 LKLTQEYTDHFVQWYVGLDKIRGSFYESWVNFNRYRREMTLTVLDLIALFPLYDVRLYP 292  
 \*\*\*\*\* \*:\* \*\*\*\*\*:\*\*\* \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 360  
 Cry3Aa10 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 360  
 Cry3Aa7 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 360  
 Cry3Aa1 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 360  
 Cry3Aa KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa11 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFNLRRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa3 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa2 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa6 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa5 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa4 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 Cry3Aa9 KEVKTELTRDVLTDPIVGVNRLRGYGTTFNSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYG 352  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

Cry3Aa8 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 420  
 Cry3Aa10 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 420  
 Cry3Aa7 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 420  
 Cry3Aa1 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 420  
 Cry3Aa NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa11 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa3 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa2 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa6 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa5 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa4 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 Cry3Aa9 NDSFNYWSGNYVSTRPSIGSNDIITSPFYGNKSSEPVQNLGFNGEKVYRAVANTNLAVWP 412  
 \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 480  
 Cry3Aa10 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 480  
 Cry3Aa7 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 480  
 Cry3Aa1 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 480  
 Cry3Aa SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa11 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa3 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa2 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa6 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa5 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa4 SAVYSGVTKVEFSQYNDQTDEASTQTYDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 Cry3Aa9 SAVYSGVTKVFKFSQYNDQTDEASTQTSDSKRNVGAVSWDSIDQLPPEATTDEPLEKGYSHQ 472  
 \*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\* \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 540  
 Cry3Aa10 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 540  
 Cry3Aa7 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 540  
 Cry3Aa1 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 540  
 Cry3Aa LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa11 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa3 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa2 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa6 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa5 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa4 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 Cry3Aa9 LNYVMCFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFNMIDSKKIQPLVVKAYKQLQSGASVVGPRF 532  
 \*\*\*\*\*

Cry3Aa8 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 600  
 Cry3Aa10 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 600  
 Cry3Aa7 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 600  
 Cry3Aa1 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 600  
 Cry3Aa TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa11 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa3 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa2 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa6 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa5 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa4 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 Cry3Aa9 TGGDIIQCTENGSAATIIYVTPDVSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFFDKT 592  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

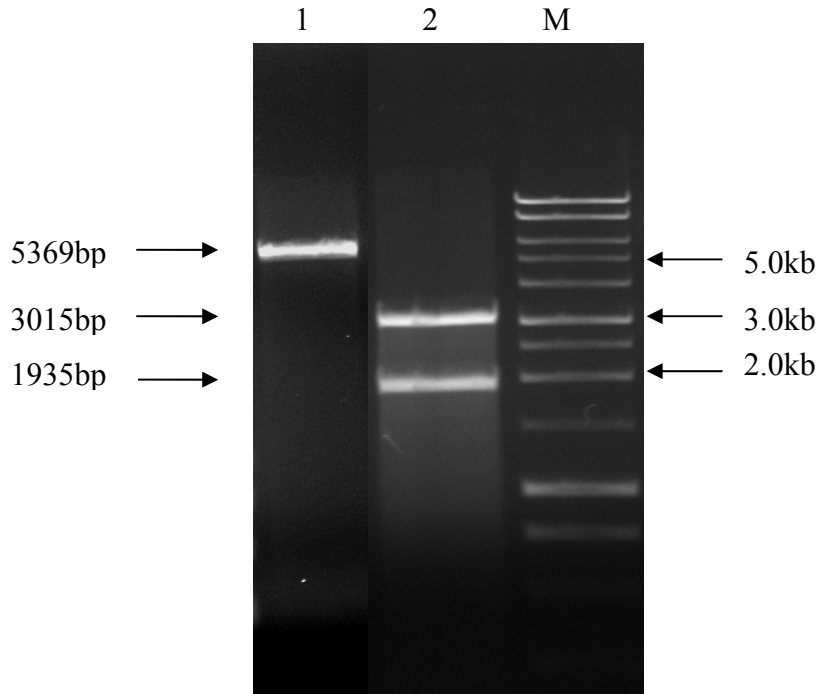
```

Cry3Aa8      INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 652
Cry3Aa10    INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 652
Cry3Aa7     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 652
Cry3Aa1     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 652
Cry3Aa      INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa11    INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa3     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa2     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa6     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa5     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa4     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
Cry3Aa9     INKGDTLTYNSFNLSASFSTPFELSGNNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN 644
*****

```

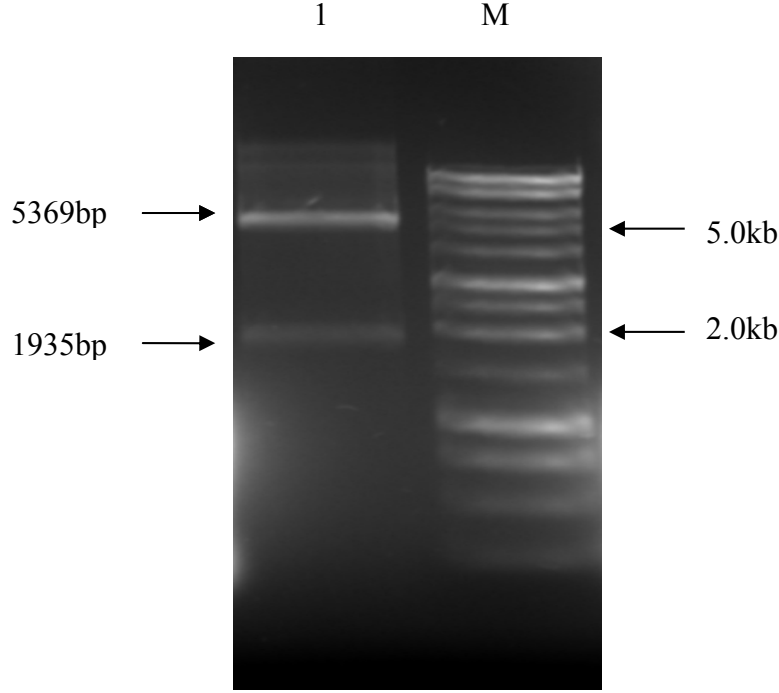
### 3.3. *cry3Aa* Geninin Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Sekansı elde edilen klonların bir tanesinden kit kullanılarak plazmid DNA izolasyonu yapıldı. pGEMT-Easy vektörüne klonlanmış *cry3Aa* geni ekspresyon vektörüne aktarılmak üzere *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 8). Bu arada pET-28a(+) ekspresyon vektörü de aynı enzimlerle kesildi. *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör ve *cry3Aa* geni birbirine yapıştırıldı.



Şekil 8. *NcoI*/ *BamHI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pET-28a(+) ve *cry3Aa*'nın %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (1: pET-28a(+)'nın *NcoI* ve *BamHI* kesim sonucu, 2: pGEM-T+*cry3Aa*'nın *NcoI* ve *BamHI* kesim sonucu , M: 1kb DNA Ladder)

*cry3Aa* genini yapıştırdığımız pET-28a(+) plazmidi elektrokompotent *E.coli* DH10 $\beta$  konak hücrelerine aktarıldı. Elde edilen kolonilerden plazmid DNA'lar izole edildi. Bu plazmidlerin *cry3Aa* genini içerip içermediği *NcoI* ve *BamHI* enzimleri ile kesilerek bakıldı. *cry3Aa* genini içeren bir plazmid seçildi ve sonraki çalışmalarda kullanıldı (Şekil 9).



Şekil 9. *cry3Aa*'nın klonlandığı pET-28a(+) vektörünün *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu, M: 1kb DNA Ladder

### 3.4. Protein Ekspresyonu ve SDS- PAGE Analizi

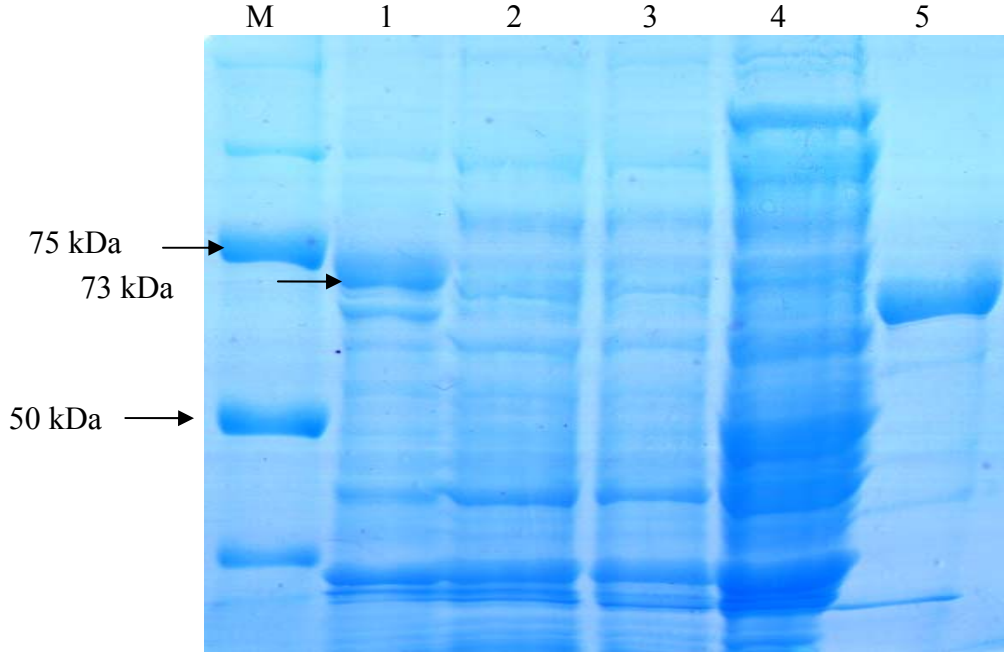
Protein ekspresyonu için *cry3Aa*'nın klonlandığı pET-28a(+) vektörü, *E.coli* BL21(DE3) konak hücrelerine aktarıldı. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere *cry3Aa* genini içermeyen pET-28a(+) vektörü de *E.coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarıldı.

*cry3Aa* genini yapıştırdığımız pET-28a(+) vektörünün transform edildiği *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden, sadece pET-28a(+)’nın transfer edildiği *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden ve içerisinde plazmid bulunmayan *E.coli* BL21(DE3) hücrelerinden protein ekspreslenerek SDS-PAGE’de kullanılmak üzere izole edildi.

Protein ekspresyonu 1mM IPTG ile indüklenerek yapıldı ve ekspresyon 4 saat süreyle gerçekleştirildi. Hazırlanan proteinler %10'luk SDS-PAGE’de analiz edildi (Şekil



10). SDS-PAGE analizi sonucunda, *E.coli* BL21(DE3) hücresinde ekspreslenmiş olan Cry3Aa için yaklaşık 73kDa'lık bir protein bandı tespit edildi.



Şekil 10. *E.coli* BL21(DE3)'de üretilen Cry3Aa proteininin SDS-PAGE analizi. (M: Protein Markırı (Bio-Rad), 1: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+)-cry3Aa, 2: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmemiş pET-28a(+)-cry3Aa, 3: *E.coli* BL21(DE3)'de IPTG ile indüklenmiş pET-28a(+), 4: *E.coli* BL21(DE3) hücre proteinleri, 5: *B.thuringiensis* Xd3'e ait spor-kristal karışımı.

### 3.5. İnsektisidal Etkilerin Belirlenmesi

Lepidoptera grubuna ait olan *Galleria mellonella* larvaları bu çalışmada test organizması olarak kullanıldı ve hedef dışı grup olduğu için proteinler larvalar üzerinde etkili olmamıştır.

Coleoptera grubundan olan *Alphitobius diaperinus* larvaları ile yapılan biyotest sonucunda ekspreslenmiş Cry3Aa ve bakteriye ait spor-kristal karışımının yüksek oranda öldürücü aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

Ayrıca *E.coli* BL21(DE3)'de ekspreslenen Cry3Aa'nın, *Alphitobius diaperinus* larvaları üzerinde *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisine ait spor-kristal karışımından daha düşük bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

Tablo 6. Ekspreslenmiş olan Cry3Aa'nın (100µg) *Alphitobius diaperinus* larvaları üzerindeki insektisidal etkisi

	Ölüm Oranları(%)
<i>E.coli</i> BL21/pET-28a(+)- <i>cry3Aa</i> (100µg)	% 86,6
<i>E.coli</i> BL21/pET-28a(+) (100µg)	% 3.3
<i>E.coli</i> BL21 (100µg)	% 10
Xd3(10 <sup>9</sup> spor-kristal/ml)	% 93,3
Negatif kontrol <sup>a</sup>	-
-: İsektisidal bir etki tespit edilemedi.	
<sup>a</sup> : Steril PBS	

#### 4.TARTIŞMA

*Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisi Doğu Karadeniz Bölgesinde bir fındık zararlısı olan *Xyleborus dispar*'dan izole edilmiş ve *cry3* genel primerleri ile *Bt* Xd3 bakteri DNA'sından *cry3* geni çoğaltılmıştır (Sezen vd., 2008).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen insektisitler hedef böcek türü için oldukça spesifik olmaları, bakteriler sayesinde ayrıştırılabilir olmaları ve zararlı böceklerde bu bileşiklere karşı direnç gelişiminin yavaş olması bakımından oldukça avantajlıdır. Fakat düşük tesirli olmaları ve yüksek üretim maliyetleri nedeniyle kullanımları kısıtlanmaktadır. Bunun üstesinden gelmek için rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Özellikle *Bacillus thuringiensis* kullanılarak oluşturulan insektisitler etkili, güvenli ve spesifiktir.

Mikrobiyal insektisitlerin satışları son yıllarda büyük artış göstermiştir. Ancak bu miktar toplam ürün koruma satışlarının %1-1,5'lik kısmını teşkil etmektedir. Bu miktarın çok büyük bir kısmını (%95) *Bacillus thuringiensis* kökenli insektisitler oluşturmaktadır (Gaugler, 1997; Georgis, 1997).

Bu nedenle, entomopatojenik bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisinin içerdiği *cry3* geninin alt grubunun tespit edilebilmesi için primer dizayn edilerek PCR ile gen çoğaltılmış ve pGEMT easy vektöre klonlanmıştır. Elde edilen doğru klonlar DNA dizin analizine gönderilerek gelen sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda genin tam sırası belirlenmiş ve *cry3Aa* grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Bu sıra literatürde bulunan diğer *cry3Aa* genleri ile karşılaştırılmıştır. Alt grubunu tespit ettiğimiz genin literatürdeki *cry3Aa2*, *cry3Aa3*, *cry3Aa5* ve *cry3Aa6* ile %100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. *Bt* Xd3 *cry3Aa* gen sırası *cry3Aa12* numarası ile gen bankasında yerini almaktadır.

Karakterizasyonu gerçekleştirilen *cry3Aa* geninin *cry3Aa12* olarak sınıflandırılmasının sebebi, *cry* genlerinin sınıflandırılmasında önemli rolü olan bilim adamı Neil Crickmore tarafından farklı bir izolattan elde edilmesi nedeniyle mutlaka bir farklılığın olabileceğini düşünmesidir.

Şu ana kadar, farklı *cry* genleri, *E.coli* (Jahn vd., 1989; Gomez vd., 2000), *Bt* (Lereclus vd., 1989), *Pseudomonas cerea* (Stock vd., 1990), *Cyanobacteria* (Murphy ve Stevens,1992), *Rhizobium* (Skot vd., 1990) , *B.subtilis* ve *B.licheniformis* (Theoduloz vd., 2003) gibi çeşitli konaklarda klonlanmış ve ekspreslenmiştir.

Kolay çalışılabilir olması ve rahat elde edilebilmesi nedeniyle bu çalışmada klonlama ve ekspresyon için konak olarak *E.coli* kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisinin *cry3Aa* geni tam olarak elde edildikten sonra genin ekspresyonu için indüklenabilir T7 RNA polimeraz promotörü içeren pET-28a(+)’ya klonlanarak *Escherichia coli* BL21(DE3) konak hücresinde ekspres edilmiştir. Ekspres edilen proteinin büyüklüğü yaklaşık 73 kDa civarında olduğu SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir.

İlk yapılan DNA sıra analizlerinden sonra ilgilenilen geni taşıyan pGEM-T plazmidi ele alınarak genin sırası elde edilmeye çalışılmıştır. Başlangıçta, Macrogen (Güney Kore) firmasına yaptırılan DNA dizin analizi sonucunda 5’ yönünden 854 baz , 3’ yönünden itibaren ise 857 bazlık kısmı tespit edildi. Genin tamamı 1935 bp uzunlukta olduğundan eksik olan bölgenin belirlenmesi için bir primer dizayn edilmiştir. Yapılan bu dizin analizi sonucunda elde edilen veriler ile ilk sonuçlar karşılaştırılarak *cry3Aa* geninin tam sırası ortaya konmuştur. *cry3Aa* geni, 1935 bp büyüklüğünde olup 644 aminoasit sahiptir.

Proteinin ağırlığı Dnastar programı aracılığıyla 73107 Da olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç yapılan SDS-PAGE analizi ile desteklenmiştir. Cry3Aa proteinine ait aa diziliminin diğer Cry3Aa proteinleri ile Clustal W programı aracılığıyla karşılaştırılması sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 6’da verilmiştir. Karşılaştırma sonucunda Cry3Aa proteininin literatürdeki *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis (morrisoni)*’in sahip olduğu Cry3Aa2, Cry3Aa3, Cry3Aa5 ve Cry3Aa6 ile %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisi için yapılan tüm biyokimyasal, moleküler çalışmalar ve özellikle H-serotiplendirme sonucu bakterinin *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis (morrisoni)* olduğu tespit edilmiştir (Sezen vd., 2008).

Ekspreslenmiş Cry3Aa’nın insektisidal aktivitesini belirlemek amacıyla testler yapılmıştır. İnsektisidal aktivite testi çalışmaları Coleoptera grubuna ait *Alphitobius diaperinus* larvaları ve test amaçlı olarak Lepidoptera grubuna ait *Galleria mellonella* larvaları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için ekspreslenmiş olan Cry3Aa’nın yanı sıra sadece pET-28a(+)’yı içeren *E.coli* BL21(DE3) , *E.coli* BL21(DE3)’in kendi proteinleri ve *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisine ait spor-kristal karışımı da kullanılmıştır.

Coleoptera grubuna ait *Alphitobius diaperinus* larvaları üzerinde 100 µg konsantrasyonda olan Cry3Aa % 86,6 oranında öldürücü etki göstermiştir. Aynı

konsantrasyonda *E.coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) %3,3 , *E.coli* BL21(DE3) % 10 ve spor-kristal karışımı da %93,3'lük bir etki göstermiştir.

*Alphitobius diaperinus* larvaları üzerinde *E.coli* BL21(DE3) hücresinde ekspreslenen Cry3Aa'nın *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisine ait spor-kristal karışımına göre daha düşük bir insektisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Larvalar tarafından yenen *B. thuringiensis* sporlarının rolünün bakterinin yoğunluğuna, tipine, Cry toksinlerinin konsantrasyonuna, farklı kombinasyonlarına ve türüne bağlı olarak büyük oranda değişebileceği sonucuna varılması gerekir. Ayrıca böcek türlerine ve böceğin bağırsağında bulunan diğer mikroorganizmalara bağlı olabilir (Hansen ve Salamitou, 2000).

Sadece *Alphitobius diaperinus* larvaları üzerinde insektisidal aktivite testi çalışması yapıldı ancak başka böcek türleri üzerinde de insektisidal aktivite çalışmasının yapılması elde edilen sonucu doğrulamak açısından önemlidir Fakat böcek bulma imkânının ve zamanın kısıtlı olması nedeniyle gerçekleştirilememiştir.

Sonuç olarak *Bt* Xd3'e ait spor-kristal karışımının *E.coli*'de ekspreslenmiş olan Cry3Aa proteinine göre daha etkili olmasının sebebi spor içermesi ve spor-kristal karışımı içerisinde farklı *cry* genlerinin bulunma ihtimali olabilir. Ayrıca başka faktörlerde bulunabilir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışma sonucunda, *Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisine ait *cry3Aa* geninin klonlanması, karakterizasyonu, ekspresyonu ve insektisidal aktivitesi belirlenmiştir.

*Bacillus thuringiensis* Xd3 bakterisine ait *cry3Aa* geni dizayn edilen primerler yardımıyla çoğaltıldı ve pGEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. *cry3Aa* geni, 1935 bp büyüklüğünde olup 644 aa içermektedir.

Protein sırasının mevcut genler ve proteinlerle karşılaştırılması sonucunda Cry3Aa proteininin literatürdeki *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis (morrisoni)*'in sahip olduğu Cry3Aa2, Cry3Aa3, Cry3Aa5 ve Cry3Aa6 ile %100 benzer olduğu belirlendi. *Bt* Xd3 *cry3Aa* gen sırası gen bankasına *cry3Aa12* olarak yerleştirildi.

Genin ekspresyonunu sağlamak için öncelikle bir ekspresyon vektörü olan pET-28a(+)’ya klonlandı ve *E.coli* BL21(DE3) hücresinde protein üretimi gerçekleştirildi. Daha sonra SDS-PAGE analizi yapılarak proteinin büyüklüğünün yaklaşık 73 kDa olduğu gözlemlendi.

Bu proteinin böcekler üzerindeki insektisidal aktivitesini görmek amacıyla Coleoptera grubuna ait *Alphitobius diaperinus* larvaları kullanıldı. Lepidoptera grubuna ait *Galleria mellonella* larvaları ise bu çalışmada test organizması olarak kullanılmıştır. *E.coli*'de ekspreslenmiş olan Cry3Aa proteini *Alphitobius diaperinus* larvalarına karşı *B.thuringiensis* Xd3 bakterisine ait spor-kristal karışımına göre daha düşük aktivite göstermiştir.

## 6. ÖNERİLER

Zararlı böceklerle mücadelede kimyasal insektisitlere en iyi alternatif biyoinsektisitlerdir. Bu anlamda biyolojik mücadele için en çok kullanılan mikroorganizmalar bakterilerdir.

Yıllardan beri entomopatojenik bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış ve hala daha yapılmaktadır. Böylece tarım alanlarında ve ormanlarda zarara yol açan böcekler etkisiz hale getirilebilmektedir. *Bacillus thuringiensis*'e ait çok sayıda ürün piyasada bulunmaktadır. Bu anlamda *B.thuringiensis* bakterisinin ve bakteride bulunan kristal yapıda toksin üreten *cry* genlerinin moleküler düzeyde aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada moleküler özellikleri belirlenen *cry3Aa* geni, böcekler üzerindeki etkileri artırmak amacıyla yine böcekler üzerinde etkili olan farklı genlerle (Diğer *cry* genleri, *cyt* genleri ve kitinaz gibi) bir araya getirilerek füzyon protein oluşturulabilir. Literatürde benzer çalışmalar bulunmakta olup bu şekilde böcekler üzerindeki insektisidal aktiviteyi arttırmak ve böceklerin toksinlere olan dirençliliğini önlemek amaçlanmaktadır. (Khasdan vd., 2007).

Elde edilen *Cry3Aa* proteininin insektisidal aktivitesini tam olarak belirleyebilmek için farklı böcek türleri üzerinde de insektisidal aktivite çalışmaları yapılması uygun olacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

- Abbott, W.S., 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide, J. Econ. Entomol., 18, 265-267.
- Aly, C., 1985. Germination of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Spores in the Gut of *Aedes* larvae (Diptera: Culicidae), J. Invertebr. Pathol., 45, 1-8.
- Aly, C., Mulla, M.S. ve Federici B.A., 1985. Sporulation and Toxin Production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in Cadavers of Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae), J. Invertebr. Pathol., 46, 251-258.
- Angus, T.A., 1954. A Bacterial Toxin Paralysing Silkworm Larvae, Nature (Lond), 173, 545-546.
- Angus, T.A., 1956. Association of Toxicity with Protein Crystalline Inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata, Can. J. Microbiol., 2, 122-131.
- Aoki, K. ve Chigasaki, Y., 1915. Ueber die Pathogenitat der Sog Sotto Bacillen (Ishawata) bei Seidenraupen. Mitt. Med. Fak Kais, Univ., Tokyo. 13, 419-440.
- Beegle, C.C., ve Yamamoto, T., 1992. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and Development, Can. Entomol., 124, 587-616.
- Berliner, E., 1911. Uber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe, Z. Gesamte, Getreidewes., 3, 63-70.
- Berliner, E., 1915. About the Sleep Sickness of the *Ephestia kuhniella* Zell and Its Vector *Bacillus thuringiensis*, Z. Angew. Entomol., 2, 29-56.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Burges, H.D. ve Hurst, J.A., 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in Stroge Moths, J. Invertebr. Pathol., 30, 131-139.
- Carlson, C.R., Caugant, D.A. ve Kolsto, A.B., 1994. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1719-1725.



- Carlton, B., 1988. Development of Genetically Improved Strains of *Bacillus thuringiensis*. IN: Biotechnology for Crop Protection, Hadin, P., Mann, J., Hollingworth, R., (eds.). American Chemical Society, Washington, D.C., 260-279.
- Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S. ve Koziel, M.G., 1991. Prediction of Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains by Polymerase Chain Reaction Product Profiles, Appl. Environ. Microbiol., 57, 3057-3061.
- CDMS., 1998. "Crop Data Management Systems." <http://www.cdms.net/manuf/manuf.asp>, 12/10/1998.
- CEPA/DPR., 1998. "USEPA/OPP Pesticide Products Database." <http://www.cdpr.ca.gov/docs/epa/m2.htm>, 12/10/1998.
- Chaufaux, J., Marchal, M., Gilois, N., Jehanno, I. ve Buisson, C., 1997. Investigation of Natural Strains of *Bacillus thuringiensis* in Different Biotopes throughout the World, Can. J. Microbiol., 43, 337-343.
- Copping, L.G. (ed.), 1998. The Biopesticide Manual, British Crop Protection Council, Franham, Surrey, U.K.
- Cooksey, K.E., 1971. The Protein Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and Mode of Action. In: Burges, H.D., Hussey, N.W. (ed.), Microbial Control of Insects and Mites. New York, London, Academic Press Inc., 247-274 pp.
- CPCR., 1998. "Crop Protection Chemicals Reference." <http://www.greenbook.net/welcome.htm>, 12/10/1998.
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. ve D.H. Dean., 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 807-813
- de Barjac, H. ve Bonnefoi, A., 1962. Essai de Classification Biochimique et Sérologique de 24 Souches de *Bacillus* de Type *thuringiensis*, Entomophaga, 7, 5-31.
- de Barjac, H., 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. New York, London, Academic Press Inc., 35-43 pp.
- de Barjac, H. ve Frachon, E., 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* Strains, Entomophaga, 35, 233-240.

- DeLuca, A.J. II, Simonson, J.G. ve Larson, A.D., 1979. Two New Serovars of *Bacillus thuringiensis*: serovars *dakota* and *indiana* (serovars 15 and 16), J. Invertebr. Pathol., 34, 323-324.
- DeLuca, A.J. II, Palmgren, M.S. ve de Barjac, H., 1984. A New Serovar of *Bacillus thuringiensis* from Grain Dust: *Bacillus thuringiensis* serovar *colmeri* (serovar 21), J. Invertebr. Pathol., 43, 437-438.
- Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal Activity of HD-1, a New Isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*, J. Invertebr. Pathol., 15, 232-239.
- Fast, P.G., 1981. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: Burges, H.D. (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. New York, London, Academic Press Inc., 223-248 pp.
- Feitelson, J.S., Payne, J. ve Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond, Bio/Technology, 10, 271-275.
- Feitelson, J.S., 1993. The *Bacillus thuringiensis* Family Tree, p. 63-71. In Kim, L. (ed.), Advanced Engineered Pesticides. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y.
- Gaugler, R., 1997. Alternative Paradigms for Commercializing Biopesticides, Phytoparasitica, 25, 179-182.
- Gatehouse, A.J. ve Gatehouse, A.M.R., 2000. Genetic Engineering of Plants for Insect Resistance, In: Biological and Biotechnological Control of Insect Pests, Gatehouse, A.J. (Ed.), pp. 211-241. CRC Press LLC.
- Georgis, R., 1997. Commercial Prospects of Microbial Insecticides in Agriculture, In: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity? (Evans, H. F., Chair), Proc. Br. Crop. Prot. Council Symp., 68, 243-252.
- Goldberg, L.J. ve Margalit, J., 1977. A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*., Mosq. News, 37, 355-358.
- Gomez, S., Mateus, A.C., Hernandez, J. ve Zimmermann, B.H., 2000. Recombinant Cry3Aa has Insecticidal Activity Against The Andean Potato Weevil, *Premnotypes vorax*, Biochem. Biophys. Res. Co., 279, 653-656.
- Gonzales, J.M. Jr., Dulmage, H.T. ve Carlton, B.C., 1981. Correlation between Specific Plasmids and  $\delta$ -endotoxin Production in *Bacillus thuringiensis*, Plasmid, 5, 351-365.

- Grassi, S. ve Deseö, K.V., 1984. [The Natural Occurrence of *Bacillus thuringiensis* Berl. and Its Importance in the Plant Protection.] In: [Proceedings of Seminar on Phytopathology, Sorrento, Italy, 26-29 March 1984.] Bologna, Italy, Clueb Publishing Co., 2, 424-433.
- Grochulski, P., Masson, L., Borisova, S., Pusztai-Carey, M., Schwartz, J.L., Brousseau, R. ve Cygler, M., 1995. *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation, J. Mol. Biol., 254, 447-464.
- Hannay, C.L., 1953. Crystalline Inclusions in Aerobic Sporeforming Bacteria, Nature, 172, 1004.
- Hannay, C.L. ve Fitz-James, P.C., 1955. The Protein Crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner, Can. J. Microbiol., 1, 694.
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., 1996. *Bacillus thuringiensis* Ecology and Environmental Effects of its Use for Microbial Pest Control (Environmental Project No. 316). Copenhagen, Denmark, Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency.
- Hansen, B.M., Damgaard, P.H., Eilenberg, J. ve Pedersen, J.C., 1998. Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Leaves and Insects, J. Invertebr. Pathol., 71, 106-114.
- Hansen, B.M. ve Salamitou, S., 2000. Virulence of *Bacillus thuringiensis*, In: Entomopathogenic bacteria : from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, London Eds J-F Charles, A Delecluse and C Nelson-LeRoux, 65-79 pp.
- Hastowo, S., Lay, B. W. ve Ohba, M., 1992. Naturally Occuring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia, J. Appl. Bacteriol., 73, 108-113.
- Höfte, H. ve Whiteley HR., 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiol. Rev., 53, 242-255.
- Huber, H.E. ve Lüthy, P., 1981. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: Composition and Activation. In: Davidson, E.W. (ed.), Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Totowa, New Jersey, Allanheld-Osmun Publishers, 209-234 pp.
- Ishiwata, S., 1901. On a Kind of Severe Flacherie (sotto disease), Dainihon Sanshi Kaiho, 114, 1-5.

- Jahn, N., Schnetter, W. ve Geider, K., 1987. Cloning of an Insecticidal Toxin Gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and Its Expression in *Escherichia coli* Cells, FEMS. Microbiol. Lett., 48, 311-315.
- Kaelin, P., Morel, P. ve Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.), Appl. Environ. Microbiol., 60, 19-25.
- Khasdan, V., Sapojnik, M., Zaritsky, A., Horowitz, A.R., Boussiba, S., Rippa, M., Manasherob, R. ve Ben-Dov, E., 2007. Larvicidal Activities Against Agricultural Pests of Transgenic *Escherichia coli* Expressing Combinations of Four Genes from *Bacillus thuringiensis*, Arch Microbiol., 188,6, 643-653.
- Knowles, B. H., 1994. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal  $\delta$ -endotoxin, In Advances in Insect Physiology, Volume 24. Evans, P.D. (ed.), pp. 275-308. Academic Press, London.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.
- Lereclus, D. Arantes, O., Chaufaux, J. ve Lecadet, M.M., 1989. Transformation and Expression of a Cloned  $\delta$ -endotoxin Gene in *Bacillus thuringiensis*. FEMS. Microbiol. Lett., 60, 211-218.
- Lereclus, D., Delecluse, A. ve Lecadet, M-M., 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J., Higgs, S. (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practise. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 37-70 pp.
- Li, J., Carroll, J. ve Ellar, D.J., 1991. Crystal Structure of the Insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution, Nature, 353, 815–821.
- Lüthy, P. ve Ebersold, H.R., 1981. The Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis*, Pharmacol. Ther., 13, 257-283.
- Martin, P.A.W. ve Travers, R.S., 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates, Appl. Environ. Microbiol., 55, 2437-2442.
- Mattes, O., 1927. Parasitare Krankheiten der Mehmotten Larven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als Biologisches Bekämpfungsmittel. Gesell. F. Beford., Ges. Naturw. Sitzber., Marburg, 62, 381-417.

- Murphy, R.C. ve Stevens, S.E., 1992. Cloning and Expression of The *cryIVD* Gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in The Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 and Its Resulting Larvicidal Activity, Appl. Environ. Microbiol., 58, 1650-1655.
- Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P. ve Burges, H.D., 1992. Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill, Appl. Environ. Microbiol., 58, 1344-1350.
- Norris, J.R., 1971. The Protein Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biosynthesis and Physical Structure. In: Burges, H.D., Mussey, N.W. (ed.), *Microbial Control of Insects and Mites*. New York, London, Academic Press Inc, 229-246 pp.
- Oğurlu, İ., 2000. Biyolojik Mücadele, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, No:8 (1. Baskı) Isparta, 98-101s.
- Prasertphon, S., Areekul, P. ve Tanada, Y., 1973. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in Host Cadavers, J. Invertebr. Pathol., 21, 205-207.
- Porcar, M. ve Juarez-Perez, V., 2003. PCR-Based Identification of *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Genes, FEMS Microbiol. Rev., 26, 419-432.
- Rajamohan, F., Lee, M.K. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins: Molecular Mode of Action. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 60. Academic Press, New York, N.Y.
- Rukmini, V., Reddy, C. Y. ve Venkateswerlu, G., 2000. *Bacillus thuringiensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin, Biochimie, 82, 109-116.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. ve Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 775-806.
- Sezen, K., Muratoğlu, H., Katı, H., Nalçacıoğlu, R., Mert, D. ve Demirbağ, Z., 2008. A Highly Pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* from European Shot-hole Borer, *Xyleborus dispar* Fabricius (Coleoptera: Scolytidae), The Royal Society of New Zealand, 36, 77-84.
- Skot, L.S., Harrison, P., Nath, A., Mytton, R. ve Clifford, B.C., 1990. Expression of Insecticidal Activity in Rhizobium Containing The  $\delta$ -endotoxin Gene Cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, Plant Soil, 127, 285-295.

- Smedley, D.P. ve Ellar, D.J., 1996. Mutagenesis of 3 Surface-Exposed Loops of a *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Toxin Reveals Residues Important for Toxicity, Recognition and Possibly Membrane Insertion, Microbiology, 142, 1617-1624.
- Smith, R.A. ve Couche, G.A., 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants, Appl. Environ. Microbiol., 57, 311-315.
- Stock, C.A., McLoughlin, T.J., Klein, J.A. ve Adang, M.J., 1990. Expression of a *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins Gene in *Pseudomonas cepacia* 526, Can. J. Microb.,36, 879-884.
- Theoduloz, C., Vega, A., Salazar, M., Gonzalez, E. ve Meza-Basso, L., 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin *cry1Ab* Gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* Strains that Naturally Colonize The Phylloplane of Tomato Plants( *Lycopersicon esculentum*, Mills), J. Appl. Microb, 94, 375-381.
- URL-1, [www.bioc.cam.ac.uk/UTOs/Ellar.html](http://www.bioc.cam.ac.uk/UTOs/Ellar.html), Prof. David J. Ellar, 09 Mayıs 2002.
- URL-2, [www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/),  $\delta$ -endotoksinlerin Tam Listesi, 12 Mart 2008.
- Waheed, I.B. ve Kogan, M., 2003. Integrated Plant Protection Center (IPPC) Oregon State University, Corvallis. *Bacillus thuringiensis*-Based Biological Control of Insect Pests. <http://www.ippc.orst.edu/dir/microbial/bt>, 20/08/2003.

## EKLER

Ek Tablo 1. *cry3Aa* geninin diğer *cry3Aa* genleri ile DNA sıralarının karşılaştırılması

SeqA	Adı	Uzunluğu	SeqB	Adı	Uzunluğu	Benzerlik %
1	<i>cry3Aa</i>	1935	2	<i>cry3Aa1</i>	1956	99
1	<i>cry3Aa</i>	1935	3	<i>cry3Aa2</i>	1935	100
1	<i>cry3Aa</i>	1935	4	<i>cry3Aa3</i>	1935	100
1	<i>cry3Aa</i>	1935	5	<i>cry3Aa4</i>	1935	99
1	<i>cry3Aa</i>	1935	6	<i>cry3Aa5</i>	1935	100
1	<i>cry3Aa</i>	1935	7	<i>cry3Aa6</i>	1935	100
1	<i>cry3Aa</i>	1935	8	<i>cry3Aa7</i>	1959	100
1	<i>cry3Aa</i>	1935	9	<i>cry3Aa8</i>	1959	3
1	<i>cry3Aa</i>	1935	10	<i>cry3Aa10</i>	1959	99
1	<i>cry3Aa</i>	1935	11	<i>cry3Aa11</i>	1935	99
<i>cry3Aa1</i>				ATGATAAGAAAGGGAGGAAGAAAAATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		59
<i>cry3Aa7</i>				ATGATAAGAAAGGGAGGAAGAAAAATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		59
<i>cry3Aa5</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa6</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa3</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa2</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa4</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa10</i>				ATGATAAGAAAGGGAGGAAGAAAAATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		59
<i>cry3Aa11</i>				-----ATGAATCCGAACAATCGAAGTGAACATGATACA-AT		35
<i>cry3Aa8</i>				-----TTAATTCACCTGGAATAAATTCATTTTGTCTATAT		35
				* * * * *		
<i>cry3Aa1</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		119
<i>cry3Aa7</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		119
<i>cry3Aa5</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa6</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa3</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa2</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa4</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa10</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		119
<i>cry3Aa11</i>				AAAACTACTGAAAATAATGAGGTGCCAACTAACCATGTTCAATATCCTTTAGCGGAAAC		95
<i>cry3Aa8</i>				AACTTTATCTCCAGCACTTAA--TCCTGTGACGCCTATTTGTAAGTTATTCCCTGATAA		93
				*** ** * * * * * * * * * * * * * * * *		
<i>cry3Aa1</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		178
<i>cry3Aa7</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		178
<i>cry3Aa5</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa6</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa3</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa2</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa4</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa10</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		178
<i>cry3Aa11</i>				TCCAAATCCAACACTAGAAGAT-TTAAATTATAAAGAGTTTTTAAGAATGACTGCAGATA		154
<i>cry3Aa8</i>				TTCGAATGGTGTGCTGAAACTTGCTAAATTAATGAATTATACGTTAATGTGTCTCCTTT		153
				* * * * * * * * * * * * * * * *		





*cry3Aa1* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 525  
*cry3Aa7* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 525  
*cry3Aa5* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa6* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa3* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa2* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa4* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa10* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 525  
*cry3Aa11* -GTTTCATGGCAAAAAATCCTGTGAGTTCACGAAATCCACATAGCCAGGGGCGGATAAGA 501  
*cry3Aa8* TGTGTCCAAGTTAACTGGGATTTGTTCTCTACTACCCTGCATTAAAGACGATTACA 511  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 581  
*cry3Aa7* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 581  
*cry3Aa5* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa6* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa3* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa2* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa4* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa10* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 581  
*cry3Aa11* GAGCTGTTTTCTCAAGCAGAAAGTCATTTTCGTAATTCAA----TGCCTTCGTTTGCAAT 557  
*cry3Aa8* TAATTGAGTTGATGGCTATATCCCTTTCTAGAGGTTTCATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT 571  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 639  
*cry3Aa7* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 639  
*cry3Aa5* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa6* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa3* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa2* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa4* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa10* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACATTTA 639  
*cry3Aa11* TTCTGGATACGAGGTT--CTATTTCTAACAACATATGCACAAGCTGCCAACACACATTTA 615  
*cry3Aa8* TGATCGATAGAATCCAGCTGACCGCCCAACATTTCTTTTGGTACGTTTGTGTTA 631  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 696  
*cry3Aa7* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 696  
*cry3Aa5* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa6* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa3* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa2* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa4* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa10* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 696  
*cry3Aa11* TTTTACTAAAAGACGCTCAAATTTATGGAGAAGAATGGGGATACGAAAAA---GAAGAT 672  
*cry3Aa8* CTTGCTTCATCTGTTTGTGATCATTATATGGTAATTCACCTTTTGTAAACACCTGAATAT 691  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 749  
*cry3Aa7* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 749  
*cry3Aa5* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa6* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa3* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa2* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa4* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa10* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 749  
*cry3Aa11* ATTGCTGAATTTTATAAAAAGACAACCTAAAACCTTACG-----CAAGAATATACTGACCA 725  
*cry3Aa8* ACAGCGGACGGCCAGACCAAGATTGTATTGCTACGGCTCTATAGACTTTTTCTCCA 751  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 805  
*cry3Aa7* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 805  
*cry3Aa5* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa6* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa3* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa2* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa4* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa10* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 805  
*cry3Aa11* TTGTGTC--AAATGGTATAATGTTGGATTAGATAAAATTA--AGAGGTTTCATCTTATGAAT 781  
*cry3Aa8* TTAATTTCTAAATTTTGTACAGGTTACTGGATTTATTTCCATAGATAAGAGATGTGAT 811  
 \*\* \* \*\*\*\* \* \*\* \* \* \* \*\* \* \*\* \* \* \*\* \*

*cry3Aa1* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 864  
*cry3Aa7* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 864  
*cry3Aa5* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa6* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa3* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa2* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa4* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa10* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 864  
*cry3Aa11* CT-TGGGTAAACTTTAACCGTTATCGCAGAGAGATGCATTAACAGTATTAGATTTAAT 840  
*cry3Aa8* ATATCATTTGATCCTATGCTTGGTCTAGTTGAAACAATAATTACCGGACCAATAATTGAAA 871  
 \* \* \* \* \*\* \* \* \*\* \* \*\* \* \*\*\*\* \* \* \* \* \*

*cry3Aa1* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 924  
*cry3Aa7* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 924  
*cry3Aa5* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa6* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa3* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa2* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa4* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa10* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 924  
*cry3Aa11* GCACTATTTCCATTGTATGATGTTCCGGCTATACCCAAAAGAAGTTAAAACCGAATTAACA 900  
*cry3Aa8* GAGTCATTTCCATAATATCCTGTTTTCGAAT-----AACTGCGTGTGAAATTTCTAT 923  
 \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

*cry3Aa1* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 984  
*cry3Aa7* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 984  
*cry3Aa5* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa6* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa3* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa2* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa4* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa10* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 984  
*cry3Aa11* AGAGACGTTTTAACAGATCCAATTGTCCGGAGTCAACAACCTTAGGGGCTATGGAACAACC 960  
*cry3Aa8* GCAGATAGTCAAATAGATGTGGTTTTTCGAAT--ATAATTTTCTATATTAGAGAAGTTG 980  
 \*\*\* \* \*\* \*\*\*\* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

*cry3Aa1* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1041  
*cry3Aa7* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1041  
*cry3Aa5* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa6* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa3* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa2* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa4* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa10* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1041  
*cry3Aa11* TTCTCTAATATAGAAAATTATA---TTCGAAAACCACATCTATTTGACTATCTGCATAGA 1017  
*cry3Aa8* TTCCATAGCCCCAAGGTTGTTGACTCCGACAATTGGATCTGTTAAAACGTCTCTTTGTTA 1040  
 \*\*\* \*\* \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

```

cry3Aa1      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1093
cry3Aa7      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1093
cry3Aa5      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa6      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa3      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa2      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa4      ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa10     ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCGACCAGGATACTATGGAAATGACTCTTTCA 1093
cry3Aa11     ATTC AATTT CACACGCGGTT-----CCAACCAGGATATTATGGAAATGACTCTTTCA 1069
cry3Aa8      ATTCGTTTAACTTCTTTTGGGTATAGCCGAACATCATACAATGGAAATAGTGCAATTA 1100
          ****  *** *      * **          ** * ** *** ***** * * *

cry3Aa1      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1146
cry3Aa7      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1146
cry3Aa5      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa6      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa3      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa2      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa4      ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa10     ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1146
cry3Aa11     ATTAT TGGTCCGGTAAT--TATGTTTCAACTAGACCAAGCATAGGAT---CAAA--TGAT 1122
cry3Aa8      AATCTAATACTGTTAATGTCTATCTCTGCGATAACCGTTAAAGTTTACCCAAGATTTCAT 1160
          * * *      * * ****  ** * ** * * * *      * ** *      *** * **

cry3Aa1      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1206
cry3Aa7      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1206
cry3Aa5      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa6      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa3      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa2      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa4      ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa10     ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1206
cry3Aa11     ATAATCACATCTCCATTTCTATGGAAATAAATCCAGTGAACCTGTACAAAATTTAGAATTT 1182
cry3Aa8      AAGATGAACCTCTTAAATTTATCTAATCCAACATTATACCATTTGACACAATGTTCAGTGT 1220
          * ** *      * * ****  ** * ** * * *      * ** * **      * * *

cry3Aa1      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1266
cry3Aa7      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1266
cry3Aa5      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa6      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa3      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa2      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa4      AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa10     AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1266
cry3Aa11     AATGGAGAAAAAGTCTATAGAGCCGTAGCAAATACAAATCTTGCGGTCTGGCCGTCCGCT 1242
cry3Aa8      ATTCTTGCGTAAGTTTT--AGTTGCTTTTATA-AAATTCAGCAATATCTTC-TTTTTTC 1275
          * *      * **** *      ** **          *** ***** ** * *      * *

cry3Aa1      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1326
cry3Aa7      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1326
cry3Aa5      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa6      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa3      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa2      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa4      GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa10     GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1326
cry3Aa11     GTATATTCAGGTGTTACAAAAGTGGAATTTAGCCAATATAATGATCAAACAGATGAAGCA 1302
cry3Aa8      GTATCCCATTCTTCCATAAATTTGAGCGTCTTTTAGTAAATAAATAAATGTGTGTGGC 1335
          ****  **      * * * *      * ** * *      *** **

```

*cry3Aa1* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1386  
*cry3Aa7* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1386  
*cry3Aa5* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa6* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa3* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa2* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa4* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa10* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1386  
*cry3Aa11* AGTACACAAACGTACGACTCAAAAAGAAATGTTGGCGCGGT CAGCTGGGATTCTATCGAT 1362  
*cry3Aa8* AGCTTGTGCATATGTTGTTAGAAATGAAACCTCGTATCCAGAAATTGCAAACGAAGGCAT 1395  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1445  
*cry3Aa7* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1445  
*cry3Aa5* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa6* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa3* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa2* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa4* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa10* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCCAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1445  
*cry3Aa11* CAATTGCCTCCAGAAACAACAGATGAACCTCTAGAAAAGGGATATAGCCATCAACTC-AA 1421  
*cry3Aa8* TGAAT---TACGAAAATGAC--TTTCTGCTTGAGAAAACAGCTCTCTTATCCGCCCTGG 1450  
\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1505  
*cry3Aa7* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1505  
*cry3Aa5* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa6* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa3* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa2* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa4* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa10* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1505  
*cry3Aa11* TTATGTAATGTGCTTTTAAATGCAGGGTAGTAGAGGAACAATCCCAGTGTAACTTGGAC 1481  
*cry3Aa8* CTATGTGGATTTTCGTAACCTCAGGATTTTTTTTGGCCATGAACTCAATGC--ACT----C 1504  
\*\*\*\*\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1563  
*cry3Aa7* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1563  
*cry3Aa5* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa6* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa3* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa2* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa4* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa10* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1563  
*cry3Aa11* ACATAAAAAGTGTAGACTTTTTTAAACATGATTG--ATTCGAAAAAAATTACACAACCTCCG 1539  
*cry3Aa8* ACATAAATCTTCGACATATATTTTGAAGCCCTGTAACCTGCAAGAGCTTTATTTTTTGTGA 1564  
\*\*\*\*\* \* \* \* \*

*cry3Aa1* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1617  
*cry3Aa7* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1617  
*cry3Aa5* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa6* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa3* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa2* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa4* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa10* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1617  
*cry3Aa11* TTAGTAAAGGCATATAAGTTA--CAAT----CTGGTGCTTCCGTTGTGCGAGGTCCCTAGG 1593  
*cry3Aa8* TAATCAGCTATTTCTGATCCATCAATGCTTCTACTTGTTCATAAAAAGCCTTCCACGGG 1624  
\* \* \* \* \*



<i>cry3Aa1</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAAT----	1956
<i>cry3Aa7</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1959
<i>cry3Aa5</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa6</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa3</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa2</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa4</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa10</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1959
<i>cry3Aa11</i>	ATAAAGTTTATATAGACAAAATTGAATTTATTCCAGTGAATTAA-	1935
<i>cry3Aa8</i>	ACTTCGATTGTTTCGGATTCATTTTCTTCCTCCCTTTCTTATCAT	1959
	* * * * *	

Ek Tablo 2. Yeni sınıflandırma sistemine göre Cry toksinlerinin listesi (URL-2, 2008).

Adı	Acc No.	Yazarlar	Yıl	Kaynak Suş
Cry1Aa1	M11250	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1
Cry1Aa2	M10917	Shibano et al	1985	Bt sotto
Cry1Aa3	D00348	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7
Cry1Aa4	X13535	Masson et al	1989	Bt entomocidus
Cry1Aa5	D17518	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7
Cry1Aa6	U43605	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12
Cry1Aa7	AF081790	Osman et al	1999	Bt C12
Cry1Aa8	I26149	Liu	1996	
Cry1Aa9	AB026261	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1
Cry1Aa10	AF154676	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02
Cry1Aa11	Y09663	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki
Cry1Aa12	AF384211	Yao et al	2001	Bt Ly30
Cry1Aa13	AF510713	Zhong et al	2002	Bt sotto
Cry1Aa14	AY197341	Yingbo et al	2002	unpublished
Cry1Aa15	DQ062690	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12
Cry1Ab1	M13898	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715
Cry1Ab2	M12661	Thorne et al	1986	Bt kurstaki
Cry1Ab3	M15271	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1
Cry1Ab4	D00117	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1
Cry1Ab5	X04698	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715
Cry1Ab6	M37263	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12
Cry1Ab7	X13233	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1
Cry1Ab8	M16463	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7
Cry1Ab9	X54939	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133
Cry1Ab10	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1
Cry1Ab11	I12419	Ely & Tippett	1995	Bt A20
Cry1Ab12	AF059670	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93
Cry1Ab13	AF254640	Tan et al	2002	Bt c005
Cry1Ab14	U94191	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt
Cry1Ab15	AF358861	Li, Zhang et al	2001	Bt B-Hm-16
Cry1Ab16	AF375608	Yu et al	2002	Bt AC-11
Cry1Ab17	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9
Cry1Ab18	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt
Cry1Ab19	AY847289	Zhong et al	2005	Bt X-2
Cry1Ab20	DQ241675	Liu et al	2006	BtC008
Cry1Ab21	EF683163	Swiecicka et al	2007	Bt IS5056
Cry1Ab22	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab
Cry1Ab-like	AF327924	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24
Cry1Ab-like	AF327925	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28
Cry1Ab-like	AF327926	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27
Cry1Ab-like	DQ781309	Lin and Fang	2006	Bt ly4a3
Cry1Ac1	M11068	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73
Cry1Ac2	M35524	Von Tersch et al	1991	Bt kenyae
Cry1Ac3	X54159	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A
Cry1Ac4	M73249	Payne et al	1991	Bt kurstaki PS85A1
Cry1Ac5	M73248	Payne et al	1992	Bt kurstaki PS81GG
Cry1Ac6	U43606	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12
Cry1Ac7	U87793	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73

Cry1Ac8	U87397	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73
Cry1Ac9	U89872	Gleave et al	1992	Bt DSIR732
Cry1Ac10	AJ002514	Sun and Yu	1997	Bt kurstaki YBT-1520
Cry1Ac11	AJ130970	Makhdoom & Riazuddin	1998	
Cry1Ac12	I12418	Ely & Tippett	1995	Bt A20
Cry1Ac13	AF148644	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1
Cry1Ac14	AF492767	Yao et al	2002	Bt Ly30
Cry1Ac15	AY122057	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan
Cry1Ac16	AY730621	Zhao et al	2005	Bt H3
Cry1Ac17	AY925090	Hire et al	2005	Bt kenyae HD549
Cry1Ac18	DQ023296	Kaur et al	2005	Bt
Cry1Ac19	DQ195217	Gao et al	2005	Bt C-33
Cry1Ac20	DQ285666	Tan et al	2005	
Cry1Ac21	DQ062689	Sauka et al	2005	INTA Mol-12
Cry1Ac22	EU282379	Fang et al	2007	Bt W015-1
Cry1Ad1	M73250	Payne & Sick	1993	Bt aizawai PS81I
Cry1Ad2	A27531		1995	Bt PS81RR1
Cry1Ae1	M65252	Lee & Aronson	1991	Bt alesti
Cry1Af1	U82003	Kang et al	1997	Bt NT0423
Cry1Ag1	AF081248	Mustafa	1999	
Cry1Ah1	AF281866	Tan et al	2000	
Cry1Ah2	DQ269474	Qi et al	2005	Bt alesti
Cry1Ai1	AY174873	Wang et al	2002	
Cry1A-like	AF327927	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3
Cry1Ba1	X06711	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2
Cry1Ba2	X95704	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110
Cry1Ba3	AF368257	Zhang et al	2001	
Cry1Ba4	AF363025	Mat Isa et al	2001	Bt entomocidus HD9
Cry1Ba5	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12
Cry1Ba6	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601
Cry1Bb1	L32020	Donovan et al	1994	Bt EG5847
Cry1Bc1	Z46442	Bishop et al	1994	Bt morrisoni
Cry1Bd1	U70726	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525
Cry1Bd2	AY138457	Isakova et al	2002	Bt 834
Cry1Be1	AF077326	Payne et al	1998	Bt PS158C2
Cry1Be2	AAQ52387	Baum et al	2003	
Cry1Bf1	AX189649	Arnaut et al	2001	
Cry1Bf2	AAQ52380	Baum et al	2003	
Cry1Bg1	AY176063	Wang et al	2002	
Cry1Ca1	X07518	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5
Cry1Ca2	X13620	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29
Cry1Ca3	M73251	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I
Cry1Ca4	A27642	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110
Cry1Ca5	X96682	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29
Cry1Ca6 [1]	AF215647	Yu et al	2000	Bt AF-2
Cry1Ca7	AY015492	Aixing et al	2000	
Cry1Ca8	AF362020	Chen et al	2001	
Cry1Ca9	AY078160	Kao et al	2003	Bt G10-01A
Cry1Ca10	AF540014	Lin et al	2003	Bt
Cry1Ca11	AY955268	Cai et al	2005	Bt C-33
Cry1Cb1	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29
Cry1Cb2	AY007686	Song et al	2000	



Cry1Cb-like	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1
Cry1Da1	X54160	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68
Cry1Da2	I76415	Payne & Sick	1997	
Cry1Db1	Z22511	Lambert	1993	Bt BTS00349A
Cry1Db2	AF358862	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
Cry1Dc1	EF059913	Lertwiriyawong et al	2006	
Cry1Ea1	X53985	Visser et al	1990	Bt kenyae 4F1
Cry1Ea2	X56144	Bosse et al	1990	Bt kenyae
Cry1Ea3	M73252	Payne & Sick	1991	Bt kenyae PS81F
Cry1Ea4	U94323	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyae LBIT-147
Cry1Ea5	A15535	Botterman et al	1994	
Cry1Ea6	AF202531	Sun et al	1999	
Cry1Ea7	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190
Cry1Ea8	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2
Cry1Eb1	M73253	Payne & Sick	1993	Bt aizawai PS81A2
Cry1Fa1	M63897	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346
Cry1Fa2	M73254	Payne & Sick	1993	Bt aizawai PS81I
Cry1Fb1	Z22512	Lambert	1993	Bt BTS00349A
Cry1Fb2	AB012288	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67
Cry1Fb3	AF062350	Song & Zhang	1998	Bt morrisoni
Cry1Fb4	I73895	Payne et al	1997	
Cry1Fb5	AF336114	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
Cry1Ga1	Z22510	Lambert	1993	Bt BTS0349A
Cry1Ga2	Y09326	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis
Cry1Gb1	U70725	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525
Cry1Gb2	AF288683	Li et al	2000	Bt B-Pr-88
Cry1Gc	AAQ52381	Baum et al	2003	
Cry1Ha1	Z22513	Lambert	1993	Bt BTS02069AA
Cry1Hb1	U35780	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190
Cry1H-like	AF182196	Srifah et al	1999	Bt JC291
Cry1Ia1	X62821	Tailor et al	1992	Bt kurstaki
Cry1Ia2	M98544	Gleave et al	1993	Bt kurstaki
Cry1Ia3	L36338	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1
Cry1Ia4	L49391	Kostichka et al	1996	Bt AB88
Cry1Ia5	Y08920	Selvapandiyan	1996	Bt 61
Cry1Ia6	AF076953	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101
Cry1Ia7	AF278797	Porcar	2000	Bt
Cry1Ia8	AF373207	Song et al	2001	
Cry1Ia9	AF521013	Yao et al	2002	Bt Ly30
Cry1Ia10	AY262167	Espindola	2003	Bt thuringiensis
Cry1Ia11	AJ315121	Tounsi	2003	Bt kurstaki BNS3
Cry1Ia12	AAV53390	Grossi de Sa	2005	Bt
Cry1Ia13	ABF83202	Martins et al	2006	Bt
Cry1Ib1	U07642	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465
Cry1Ib2	ABW88019	Guan et al	2007	Bt PP61
Cry1Ic1	AF056933	Osman et al	1998	Bt C18
Cry1Ic2	AAE71691	Osman et al	2001	
Cry1Id1	AF047579	Choi	2000	
Cry1Ie1	AF211190	Song et al	2000	Bt BTC007
Cry1If1	AAQ52382	Baum et al	2003	
Cry1I-like	I90732	Payne et al	1998	
Cry1I-like	DQ781310	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3

Cry1Ja1	L32019	Donovan et al	1994	Bt EG5847
Cry1Jb1	U31527	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092
Cry1Jc1	I90730	Payne et al	1998	
Cry1Jc2	AAQ52372	Baum et al	2003	
Cry1Jd1	AX189651	Arnaut et al	2001	
Cry1Ka1	U28801	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190
Cry1La1	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1
Cry1-like	I90729	Payne et al	1998	
Cry2Aa1	M31738	Donovan et al	1989	Bt kurstaki
Cry2Aa2	M23723	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
Cry2Aa3	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto
Cry2Aa4	AF047038	Misra et al	1998	Bt kenyae HD549
Cry2Aa5	AJ132464	Yu & Pang	1999	Bt SL39
Cry2Aa6	AJ132465	Yu & Pang	1999	Bt YZ71
Cry2Aa7	AJ132463	Yu & Pang	1999	Bt CY29
Cry2Aa8	AF252262	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66
Cry2Aa9	AF273218	Zhang et al	2000	
Cry2Aa10	AF433645	Yao et al	2001	
Cry2Aa11	AAQ52384	Baum et al	2003	
Cry2Aa12	DQ977646	Tan et al	2006	Bt Rpp39
Cry2Ab1	M23724	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
Cry2Ab2	X55416	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1
Cry2Ab3	AF164666	Chen et al	1999	Bt BTC002
Cry2Ab4	AF336115	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
Cry2Ab5	AF441855	Yao et al	2001	
Cry2Ab6	AY297091	Wang et al	2003	Bt WZ-7
Cry2Ab7	DQ119823	Varathajalu et al	2005	
Cry2Ab8	DQ361266	Huang et al	2006	Bt WB2
Cry2Ab9	DQ341378	Zhang et al	2005	
Cry2Ab10	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD
Cry2Ab11	AM691748	Saleem and Shakoori	2007	Bt CMBL-BT1
Cry2Ab12	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD
Cry2Ac1	X57252	Wu et al	1991	Bt shanghai S1
Cry2Ac2	AY007687	Song et al	2000	
Cry2Ac3	AAQ52385	Baum et al	2003	
Cry2Ac4	DQ361267	Huang et al	2006	Bt WB9
Cry2Ac5	DQ341379	Zhang et al	2005	
Cry2Ac6	DQ359137	Xia et al	2006	Bt wuhanensis
Cry2Ac7	AM292031	Saleem & Shakoori	2006	Bt SBSBT-1
Cry2Ac8	AM421903	Saleem & Shakoori	2007	Bt CMBL-BT1
Cry2Ac9	AM421904	Saleem & Shakoori	2007	Bt CMBL-BT2
Cry2Ac10	BI 877475	Bai et al	2007	Bt
Cry2Ac11	AM689531	Saleem & Shakoori	2007	Bt HD29
Cry2Ac12	AM689532	Saleem & Shakoori	2007	Bt CMBL-BT3
Cry2Ad1	AF200816	Choi et al	1999	Bt BR30
Cry2Ad2	DQ358053	Huang et al	2006	Bt WB10
Cry2Ad3	AM268418	Saleem et al	2006	
Cry2Ad4	AM490199	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
Cry2Ad5	AM765844	Saleem et al	2007	Bt HD29
Cry2Ae1	AAQ52362	Baum et al	2003	
Cry2Af1	EF439818	Beard et al	2007	Bt C81
Cry3Aa1	M22472	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego

Cry3Aa2	J02978	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis
Cry3Aa3	Y00420	Hofte et al	1987	
Cry3Aa4	M30503	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis
Cry3Aa5	M37207	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158
Cry3Aa6	U10985	Adams et al	1994	Bt tenebrionis
Cry3Aa7	AJ237900	Zhang et al	1999	Bt 22
Cry3Aa8	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03
Cry3Aa9	AAW05659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001
Cry3Aa10	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886
Cry3Aa11	AY882576	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2
Cry3Ba1	X17123	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F
Cry3Ba2	A07234	Peferoen et al	1990	Bt PGSI208
Cry3Bb1	M89794	Donovan et al	1992	Bt EG4961
Cry3Bb2	U31633	Donovan et al	1995	Bt EG5144
Cry3Bb3	I15475	Peferoen et al	1995	
Cry3Ca1	X59797	Lambert et al	1992	Bt kurstaki Btl109P
Cry4Aa1	Y00423	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis
Cry4Aa2	D00248	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522
Cry4Aa3	AL731825	Berry et al	2002	Bt israelensis
Cry4A-like	DQ078744	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9
Cry4Ba1	X07423	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72
Cry4Ba2	X07082	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis
Cry4Ba3	M20242	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis
Cry4Ba4	D00247	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522
Cry4Ba5	AL731825	Berry et al	2002	Bt israelensis
Cry4Ba-like	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9
Cry5Aa1	L07025	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17
Cry5Ab1	L07026	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis PS17
Cry5Ac1	I34543	Payne et al	1997	
Cry5Ad1	EF219060	Lenane et al	2007	Bt L355
Cry5Ba1	U19725	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3
Cry5Ba2	EU121522	Sun et al	2008	YBT 1518
Cry6Aa1	L07022	Narva et al	1993	Bt PS52A1
Cry6Aa2	AF499736	Bai et al	2001	YBT 1518
Cry6Aa3	DQ835612	Jia et al	2006	Bt 96418
Cry6Ba1	L07024	Narva et al	1991	Bt PS69D1
Cry7Aa1	M64478	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245
Cry7Ab1	U04367	Payne & Fu	1994	Bt dakota HD511
Cry7Ab2	U04368	Payne & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867
Cry7Ab3	BI 1015188	Song et al	2007	Bt WZ-9
Cry7Ab4	EU380678	Shu et al	2008	Bt
Cry7Ba1	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis
Cry7Ca1	EF486523	Gao et al	2007	Bt BTH-13
Cry8Aa1	U04364	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis
Cry8Ab1	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX
Cry8Ba1	U04365	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis
Cry8Bb1	AX543924	Abad et al	2002	
Cry8Bc1	AX543926	Abad et al	2002	
Cry8Ca1	U04366	Ogiwara et al.	1995	Bt japonensis Buibui
Cry8Ca2	AAR98783	Song et al	2004	Bt HBF-1
Cry8Da1	AB089299	Yamamoto & Asano	2002	Bt galleriae
Cry8Da2	BD133574	Asano et al	2002	Bt

Cry8Da3	BD133575	Asano et al	2002	Bt
Cry8Db1	AB303980	Yamaguchi and Asano	2007	Bt BBT2-5
Cry8Ea1	AY329081	Fuping et al	2003	Bt 185
Cry8Ea2	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL
Cry8Fa1	AY551093	Fuping et al	2004	Bt 185
Cry8Ga1	AY590188	Fuping et al	2004	Bt HBF-18
Cry8Ga2	DQ318860	Yan et al	2005	Bt 145
Cry8Ha1	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185
Cry8Ia1	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4
Cry8 like	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt
Cry9Aa1	X58120	Smulevitch et al	1991	Bt galleriae
Cry9Aa2	X58534	Gleave et al	1992	Bt DSIR517
Cry9Aa like	AAQ52376	Baum et al	2003	
Cry9Ba1	X75019	Shevelev et al	1993	Bt galleriae
Cry9Bb1	AY758316	Silva-Werneck et al	2004	Bt japonensis
Cry9Ca1	Z37527	Lambert et al	1996	Bt tolworthi
Cry9Ca2	AAQ52375	Baum et al	2003	
Cry9Da1	D85560	Asano et al	1997	Bt japonensis N141
Cry9Da2	AF042733	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis
Cry9Db1	AY971349	Flannagan et al	2005	Bt kurstaki DP1019
Cry9Ea1	AB011496	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10
Cry9Ea2	AF358863	Li et al	2001	Bt B-Hm-16
Cry9Ea3	EF157307	Lin et al	2006	
Cry9Eb1	AX189653	Arnaut et al	2001	
Cry9Ec1	AF093107	Wasano & Ohba	2003	Bt galleriae
Cry9Ed1	AY973867	Flannagan et al	2005	Bt kurstaki DP1019
Cry9 like	AF093107	Wasano et al	1998	Bt galleriae
Cry10Aa1	M12662	Thorne et al	1986	Bt israelensis
Cry10Aa2	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A
Cry10Aa3	AL731825	Berry et al	2002	Bt israelensis
Cry10A like	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9
Cry11Aa1	M31737	Donovan et al	1988	Bt israelensis
Cry11Aa2	M22860	Adams et al	1989	Bt israelensis
Cry11Aa3	AL731825	Berry et al	2002	Bt israelensis
Cry11Aa-like	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9
Cry11Ba1	X86902	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367
Cry11Bb1	AF017416	Orduz et al	1998	Bt medellin
Cry12Aa1	L07027	Narva et al	1991	Bt PS33F2
Cry13Aa1	L07023	Narva et al	1992	Bt PS63B
Cry14Aa1	U13955	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1
Cry15Aa1	M76442	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni
Cry16Aa1	X94146	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18
Cry17Aa1	X99478	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18
Cry18Aa1	X99049	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae
Cry18Ba1	AF169250	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae
Cry18Ca1	AF169251	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae
Cry19Aa1	Y07603	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367
Cry19Ba1	D88381	Hwang et al	1998	Bt higo
Cry20Aa1	U82518	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis
Cry21Aa1	I32932	Payne et al	1996	
Cry21Aa2	I66477	Feitelson	1997	
Cry21Ba1	AB088406	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis

Cry22Aa1	I34547	Payne et al	1997	
Cry22Aa2	AX472772	Isaac et al	2002	Bt
Cry22Ab1	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140
Cry22Ab2	AX472764	Isaac et al	2002	Bt
Cry22Ba1	AX472770	Isaac et al	2002	Bt
Cry23Aa1	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt
Cry24Aa1	U88188	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan
Cry24Ba1	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto
Cry24Ca1	AM158318	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41
Cry25Aa1	U88189	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan
Cry26Aa1	AF122897	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166
Cry27Aa1	AB023293	Saitoh	1999	Bt higo
Cry28Aa1	AF132928	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161
Cry28Aa2	AF285775	Moore and Debro	2000	Bt finitimus
Cry29Aa1	AJ251977	Delecluse et al	2000	
Cry30Aa1	AJ251978	Delecluse et al	2000	
Cry30Ba1	BAD00052	Ikeya et al	2003	Bt entomocidus
Cry30Ca1	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto
Cry30Da1	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41
Cry30Ea1	EU503140	Fang et al	2007	
Cry31Aa1	AB031065	Mizuki et al	2000	Bt 84-HS-1-11
Cry31Aa2	AY081052	Jung and Cote	2000	Bt
Cry31Aa3	AB250922	Uemori et al	2006	Bt B0195
Cry31Aa4	AB274826	Yasutake et al	2006	Bt 79-25
Cry31Aa5	AB274827	Yasutake et al	2006	Bt 92-10
Cry31Ab1	AB250923	Uemori et al	2006	Bt B0195
Cry31Ab2	AB274825	Yasutake et al	2006	Bt 31-5
Cry31Ac1	AB276125	Yasutake et al	2006	Bt 87-29
Cry32Aa1	AY008143	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis
Cry32Ba1	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt
Cry32Ca1	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt
Cry32Da1	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt
Cry33Aa1	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota
Cry34Aa1	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1
Cry34Aa2	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899
Cry34Aa3	AY536899	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q
Cry34Aa4	AY536897	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG
Cry34Ab1	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1
Cry34Ac1	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2
Cry34Ac2	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444
Cry34Ac3	AY536896	Schnepf et al	2004	Bt KR1369
Cry34Ba1	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851
Cry34Ba2	AY536900	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3
Cry34Ba3	AY536898	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2
Cry35Aa1	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1
Cry35Aa2	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899
Cry35Aa3	AY536895	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q
Cry35Aa4	AY536892	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG
Cry35Ab1	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1
Cry35Ab2	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444
Cry35Ab3	AY536891	Schnepf et al	2004	Bt KR1369
Cry35Ac1	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2

Cry35Ba1	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851
Cry35Ba2	AY536894	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3
Cry35Ba3	AY536893	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2
Cry36Aa1	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt
Cry37Aa1	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt
Cry38Aa1	AAK64559	Rupar et al	2000	Bt
Cry39Aa1	BAB72016	Ito et al	2001	Bt aizawai
Cry40Aa1	BAB72018	Ito et al	2001	Bt aizawai
Cry40Ba1	BAC77648	Ito et al	2003	Bun1-14
Cry40Ca1	EU381045	Shu et al	2008	Bt Y41
Cry41Aa1	AB116649	Yamashita et al	2003	Bt A1462
Cry41Ab1	AB116651	Yamashita et al	2003	Bt A1462
Cry42Aa1	AB116652	Yamashita et al	2003	Bt A1462
Cry43Aa1	AB115422	Yokoyama and Tanaka	2003	<i>P. lentimorbus</i> semadara
Cry43Aa2	AB176668	Nozawa	2004	<i>P. popilliae</i> <i>popilliae</i>
Cry43Ba1	AB115422	Yokoyama and Tanaka	2003	<i>P. lentimorbus</i> semadara
Cry43-like	AB115422	Yokoyama and Tanaka	2003	<i>P. lentimorbus</i> semadara
Cry44Aa	BAD08532	Ikeya et al	2004	Bt entomocidus INA288
Cry45Aa	BAD22577	Okumura and Saitoh	2004	Bt 89-T-34-22
Cry46Aa	BAC79010	Ito et al	2004	Bt dakota
Cry46Ab	BAD35170	Yamagiwa et al	2004	Bt
Cry47Aa	AY950229	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890
Cry48Aa	AJ841948	Jones and Berry	2005	Bs IAB59
Cry48Aa2	AM237205	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B
Cry48Aa3	AM237206	Jones and Berry	2006	Bs NHA15b
Cry48Ab	AM237207	Jones and Berry	2006	Bs LP1G
Cry48Ab2	AM237208	Jones and Berry	2006	Bs 2173
Cry49Aa	AJ841948	Jones and Berry	2005	Bs IAB59
Cry49Aa2	AM237201	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B
Cry49Aa3	AM237203	Jones and Berry	2006	BsNHA15b
Cry49Aa4	AM237204	Jones and Berry	2006	Bs 2173
Cry49Ab1	AM237202	Jones and Berry	2006	Bs LP1G
Cry50Aa1	AB253419	Ohgushi et al	2006	Bt sotto
Cry51Aa1	DQ836184	Meng et al	2006	Bt F14-1
Cry52Aa1	EF613489	Song et al	2007	Bt Y41
Cry53Aa1	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41
Cry54Aa1	EU339367	Tan et al	2007	Bt MC28
Cry55Aa1	EU121521	Sun et al	2008	YBT 1518
Cry55Aa2	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41

---

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Aydın'da doğdu. İlkokulu Afyon Serban ilkokulunda, Ortaokulu Nazilli Mehmet Akif Ersoy ortaokulunda, Lise öğrenimini Nazilli Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında Erciyes Üniversitesi Yozgat Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Lisans öğrenimine başladı. 2003 yılında bu bölümden biyolog ünvanı ile mezun oldu. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.