

**BAKTERİYORODOPSİN ÜRETME POTANSİYELİNE  
SAHİP HALOFİLİK ARKE *Halobacterium salinarum*'UN  
İZOLASYONU VE NANOBİYOMOLEKÜL OLARAK  
KULLANILABİLECEK BAKTERİYORODOPSİN'İN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Neslihan HİDİROĞLU**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Nano Bilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı**

**Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı**

**Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE**

**2015**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAKTERİYORODOPSİN ÜRETME POTANSİYELİNE SAHİP  
HALOFİLİK ARKE *Halobacterium salinarum*'UN İZOLASYONU VE  
NANOBİYOMOLEKÜL OLARAK KULLANILABİLECEK  
BAKTERİYORODOPSİN'İN SAFLAŞTIRILMASI VE  
KARAKTERİZASYONU

Neslihan HİDİROĞLU

NANOBİLİM ve NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM

2015

Her Hakkı Saklıdır



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAKTERİYORODOPSİN ÜRETME POTANSİYELİNE SAHİP HALOFİLİK  
ARKE *Halobacterium salinarum*'UN İZOLASYONU VE NANOBİYOMOLEKÜL  
OLARAK KULLANILABİLECEK BAKTERİYORODOPSİNİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE danışmanlığında, Neslihan HİDİROĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma 02 / 01 / 2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nano Bilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı – Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

İmza :

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza :

Üye : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu ..08../01/2015 tarih ve ..01../.../19..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

**Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU**  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **BAKTERİYORODOPSİN ÜRETME POTANSİYELİNE SAHİP HALOFİLİK ARKE *Halobacterium salinarum* 'UN İZOLASYONU VE NANOBİYOMOLEKÜL OLARAK KULLANILABİLECEK BAKTERİYORODOPSİN'İN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Neslihan HİDİROĞLU

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Nano Bilim ve Nano Mühendislik Anabilim Dalı  
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

*Halobacterium salinarum* doğada yüksek tuz yoğunluğunun olduğu ekstrem şartlarda yaşayan halofilik arkelerin bir üyesidir. Normal şartlarda aerobik olan bu canlı oksidatif şartlar bittiğinde, anaerobik olarak yaşam sürer. Bu noktada Bakteriyorodopsin (BR) *H. salinarum* tarafından gereken enerjiyi sağlamak için sentezlenir. BR yapısında 7 alfa sarmalı içinde düzenlenmiş 248 aminoasiti olan, G sarmalına protonlu Schiff bazıyla bağlı lys216 bulunan bir proton pompasıdır. Işık enerjisini sensör rodopsinler yardımıyla kimyasal enerjiye dönüştürür. Çalışmamızda BR'nin izolasyonu ve karakterizasyonu amacıyla; Konya, Tuz Gölü'nden alınan, N olarak adlandırılan örneklerin katı ve sıvı besiyerlerine ekimleri yapılmış, 37°C, 150 rpm'de, 40 W aydınlatma altında, çalkamalı olarak 9-15 gün inkübasyona bırakılmıştır. Pembe-kırmızı renkte halofilik arke gelişimi gözlemlenen N<sub>1</sub> ve N<sub>2</sub> sıvı kültürlerinden sulu iki fazlı sistem ve CHAPS kullanılarak BR izolasyonu ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. BR'nin moleküler ağırlığı SDS-Page analizi ile absorbans spektrumu UV-visible spektrofotometre ile yüzey ve boyut analizi AFM (atomic force microscopy) ile belirlenmiştir.

**2014, 69 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyorodopsin, halofilik arke, nanobiyomolekül

## ABSTRACT

Master Thesis

### ISOLATION OF BR PRODUCING HALOFILIC ARCHEAE *Halobacterium salinarum* OF BACTERIORHODOPSIN THAT CAN BE USED AS NANOBIOENGINE

Neslihan HIDIROĞLU

Ataturk University  
Institute of Life Sciences  
Department of Nanoscience And Nanoengineering  
Department of Nanobiotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

*Halobacterium salinarum* is a member of Halophilic archaeae that lives under extreme conditions, especially high-salt density. This normal aerobic microorganism, might convert themselves into anaerobic, when oxydative sources come to an end, or highly decreased. At this point Bacteriorhodopsin (BR) synthesized by *H.salinarum* to provide the energy for living. BR is a proton pump that has 248 amino acides arranged in 7 alfa helices protonated Schiff base linked lys216 to G helix in its structure, and works with energy of light within the cooperation with SR (sensor rhodopsins). We have studied to isolate and delipidate the BR protein from the samples taken from Tuz Gölü, Konya, and labeled as N with numbers. The samples at 37 °C, 150 rpm shaking was allowed to 9-15 days of incubation under 40 W illumination. We observed growing at N<sub>1</sub>,N<sub>2</sub> samples with their pink-red color. By using aqueous two phase system (ATPS), CHAPS delipidation process, those purified and isolated the BR. Molecular weight of BR identified by SDS-Page method. The absorbance spectrum observed by using UV-Visible. And at last; surface and size analysis performed with Atomic Force Microscopy (AFM).

**2014, 69 pages**

**Keywords:** Bacteriorhodopsin, Halophilic archaea, nanobiomolecule

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde büyük emeği geçen, yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL'a laboratuvar çalışmalarında, hazırlanma ve değerlendirilme sürecinde yardım ve fikirlerinden istifade ettiğim, büyük emeği geçen Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, yazılma ve değerlendirme sürecinde destek veren Sayın Yrd. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a ve son olarak desteklerinden ötürü Sayın Prof. Dr. Güleray AĞAR'a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Labaoratuvar çalışmalarında zaman ayırıp yardım eden değerli arkadaşlarım Sayın Uz. Ceyda BOZOĞLU'na, Sayın YLÖ. Nisa Selin HÜNDÜR'e, Sayın Arş. Gör. Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Uzm. Halime GENÇ'e YLÖ Sayın Mesut ŞAHİN'e, Sayın Uzm. Burak ALAYLAR'a, Sayın YLÖ Taha Yasin KOÇ'a, Sayın YLÖ A.Samed Yasin DEMİR'e, YLÖ İlkül AKMAYAN'a ve tüm moleküler biyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tuz gölü'nden örneklerin toplanmasında yanımda olan yeğenlerim M. Arif YEĞİN ve Feyzanur YEĞİN'e teşekkür ederim.

Tez sürecinde maddi ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan hayat arkadaşım Ahmet Emin İSPİRLİ'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca manevi desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan annem Sevim HIDIROĞLU'nun elerinden öper ve teşekkürlerimi sunarım.

**Neslihan HIDIROĞLU**

**Aralık, 2014**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. Nanoteknoloji Tanımı.....	5
2.1.1. Nanoteknoloji kullanım alanları.....	6
2.2. Nanobiyoteknoloji.....	6
2.2.1. Nanobiyoteknoloji çalışma alanları.....	8
2.2.2. Biyomoleküller.....	10
2.3. Membran Proteinleri Özellikleri.....	11
2.3.1. Kromizm.....	11
2.4. Bakteriyorodopsin.....	13
2.4.1. Mor membran yapısı ve özellikleri.....	13
2.4.2. Bakteriyorodopsin'in yapısı ve özellikleri.....	15
2.4.3. Bakteriyorodopsin'in fotodöngüsü.....	18
2.4.4. Bakteriyorodopsin'in fonksiyonları.....	20
2.4.5. Bakteriyorodopsin'in kullanılma alanları.....	20
2.4.5.a. Bakteriyorodopsin'in kullanıldığı nano araçlar ve uygulamaları.....	21
2.5. Bakteriyorodopsin üreten Halofilik Arkeler.....	24
2.5.1. Ekstrem halofillerin buldukları ortamlar.....	26
2.5.4. Mikroorganizma sistematğinde kullanılan moleküler yöntemler.....	28
2.5.4.a. Mikroorganizma sisitematiğinde genotipik materyallerin kullanımı.....	29
2.5.4.b. DNA baz içeriğinin belirlenmesi.....	29
2.4.5.c. 16s rDNA dizisinin belirlenmesi.....	30

2.4.5.d. Ekstra kromozomal elementlerin mikroorganizma sistematiginde kullanılması .....	30
2.4.5.e. DNA hibridizasyonu .....	31
2.4.5.f. Mikroorganizma sistematiginde genomik DNA parmak izi analizlerinin kullanılması .....	31
2.6. Nanoteknolojik Görüntüleme ve Karakterizasyon Teknikleri .....	32
2.6.1. Optik mikroskop teknikleri .....	32
2.6.2. TEM görüntüleme tekniği .....	33
2.6.3. SEM görüntüleme tekniği .....	33
2.6.4. AFM ile görüntüleme özellikleri .....	33
2.7. Sulu İki Fazlı Sistem (ATPS) .....	34
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>35</b>
3.1. Materyal .....	35
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar .....	37
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı .....	38
3.2. Yöntem .....	41
3.2.1. Halofilik arke izolasyonu ve kültürü .....	41
3.2.2. Halofilik arkenin moleküler karakterizasyonu .....	42
3.2.2.a. Halofilik arke genomik DNA'sının izolasyonu .....	42
3.2.2.b. DNA konsantrasyonunun ölçülmesi ve çalışma solüsyonunun hazırlanması .....	43
3.2.2.c. DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ...	43
3.2.2.d. Arke izolatının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu .....	44
3.2.2.e. Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması .....	44
3.2.2.f. PCR programı .....	44
3.2.2.g. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi .....	44
3.2.2.h. 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi ve gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması .....	45
3.2.3. Bakteriyodopsin izolasyonu .....	45
3.2.3.a. Hücre lizatının hazırlanışı .....	45
3.2.3.b. Mor membran izolasyonu .....	46
3.2.3.c. Bakteriyodopsin saflaştırılması .....	46



3.2.4. Bakteriyodopsin karakterizasyonu .....	47
3.2.4.a. Bakteriyodopsinin karakteristik absorbands bandının UV-Visible spektrofotometre ile belirlenmesi .....	47
3.2.4.b. Bakteriyodopsinin SDS-page analizi .....	47
3.2.4.c. Bakteriyodopsinin atomik force microscopy (AFM) ile görüntülenmesi ..	48
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>50</b>
4.1. Halofilik Arke İzolasyonu ve Kültürü Sonuçları .....	50
4.2. Halofilik Arke İzolatının Moleküler Karakterizasyon Sonuçları .....	52
4.2.1. Halofilik arke izolatının 16S rRNA amplifikasyon sonucu .....	52
4.2.2. Halofilik arke İzolatının 16S rRNA gen bölgesinin sekans analiz sonuçları ...	52
4.3. Bakteriyodopsin İzolasyonu Sonuçları .....	53
4.3.1. Hücre lizat sonucu .....	53
4.3.2. Mor membran izolasyon sonucu .....	53
4.3.3. Bakteriyodopsin izolasyon sonucu.....	54
4.4. Bakteriyodopsinin karakterizasyon sonuçları .....	55
4.4.1. Bakteriyodopsinin karakteristik absorbands bandının UV visible spektrofotometre ile elde edilen sonuçları .....	55
4.4.2. Bakteriyodopsinin SDS-Page analizi sonuçları .....	56
4.4.3. Bakteriyodopsinin atomik force microscopy (AFM) ile görüntülenmesi .....	58
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>59</b>
KAYNAKLAR .....	64
EKLER.....	69
EK 1.....	69
ÖZGEÇMİŞ .....	70

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BR	Bakteriyorodopsin
CTAB	Hekzadesil trimetil-amonyum bromit
dNTP	Deoksinükleotittrifosfat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
rRNA	Ribozomal
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
CHAPS	3-[(cholamidopropyl) (dimethylammonio) propane sulfonate]
M	Molar
nm	Nanometre ( $10^{-9}$ )
Nm	Newtonmetre
mL	Mililitre ( $10^{-3}$ )
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ L	Mikrolitre ( $10^{-6}$ )
pN	Piconewton
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforez
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
STM	Taramalı tünelleme mikroskobu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
W	Watt

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> 100K Living Chip™ levhası (solda), 50-nl sıvıyla dolu kuyucukların detaylı görüntüsü (sağda) .....	8
<b>Şekil 2.2.</b> Soldaki: Tek protein porunun stabil hale getirilmesi. Sağdaki: nükleik asit ayırtmak için yapılan kapil şeklinde elektroforez çipi. ....	9
<b>Şekil 2.3.</b> Nanoteknolojik uygulamalarda kullanılabilen biyomoleküler motorlar.....	9
<b>Şekil 2.4.</b> <i>Halobacterium salinarum</i> üzerinde BR içeren mor membran yapısı ve reaksiyon şeması .....	14
<b>Şekil 2.5.</b> AFM' de oda sıcaklığında mica üzerinde gözlemlenen izole mor membran yamaların contact mod ile alınan görüntüsü (solda). Non-contact modda (HRF topometrik) alınan görüntüsü (sağda).....	15
<b>Şekil 2.6.</b> Retinal kromofor.....	16
<b>Şekil 2.7.</b> Bakteriyorodopsinin A,B,C,D,E,F,G şeklinde kodlanan yedi alfa sarmalı, retinal kromofor ve proton pompalanırken Bakteriyorodopsinin moleküler mekanizması. ....	17
<b>Şekil 2.8.</b> Bakteriyorodopsinin foto döngü şeması .....	19
<b>Şekil 2.9.</b> Halofilik arkelerin hücre membranında bulunan 4 retinal pigment.....	25
<b>Şekil 2.10.</b> Konya Şereflikoçhisar yakınlarında çalışma için numune alınırken çekilen pembemsi tuz gölü fotoğraf .....	27
<b>Şekil 3.1.</b> Tuz gölünden farklı koordinatlardan numune alınırken çekilen fotoğraflar ..	35
<b>Şekil 3.2.</b> Tuz gölünden numune alınan noktaların yüzey görünümü ve rengi .....	36
<b>Şekil 4.1.</b> Halofilik arke izolasyonu için Tuz Gölü'nden beş ayrı noktadan alınan N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub> , N <sub>3</sub> , N <sub>4</sub> , N <sub>5</sub> kodlu örneklerin sıvı kültürleri ve 37°C'de, 40 W gün ışığı aydınlatması altında, 150 rpm'de çalkalamalı olarak inkübasyonun yaklaşık 4. gününden itibaren sıvı kültürlerde gözlemlenen halofilik arke gelişimleri fotoğrafı.....	50
<b>Şekil 4.2.</b> Halofilik arke gelişimi gözlenen N <sub>1</sub> ve N <sub>2</sub> kodlu sıvı kültürlerde, 37°C'de, 40 W gün ışığı aydınlatması altında, 150 rpm'de çalkalamalı olarak yaklaşık 9-15 gün inkübasyonun sonunda gözlemlenen pembe-kırmızı renklenme fotoğrafı .....	51

<b>Şekil 4.3.</b> Halofilik arke izolasyonu için ekim yapılan N <sub>1</sub> kodlu katı kültürde 37°C’de, 40 W gün ışığı aydınlatma altında,15 gün inkübasyon sonunda gelişimi gözlemlenen arke izolatının pempe-kırmızı renkte koloni morfolojisi fotoğrafı.....	51
<b>Şekil 4.4.</b> Halofilik arke gelişimi gözlenen N <sub>1</sub> kodlu sıvı kültürden yapılan 16S rRNA PCR amplifikasyonu sonunda elde edilen arke izolatının tek bant PCR görüntüsü .....	52
<b>Şekil 4.5.</b> Halofilik arke gelişimi gözlenen, N <sub>1</sub> ve N <sub>2</sub> kodlu 150 ml’lik sıvı kültürlerin 8000 rpm, 15°C’de santrifüjü sonrası elde edilen hücre lizatı fotoğrafı.....	53
<b>Şekil 4.6.</b> N <sub>1</sub> ve N <sub>2</sub> kodlu sıvı kültürlerden elde edilen hücre lizatının, potasyum fosfat ve PEG solüsyonları ile hazırlanan sulu iki fazlı sistem ile, 8000 rpm’de 15 dk 4°C’de santrifüj sonrası PEG zengini üst faz ile fosfat zengini alt faz arasında oluşan ince tabaka halinde mor membran bandı görüntüsü.....	54
<b>Şekil 4.7.</b> 1) Sulu iki fazlı sistem ile ayrıştırılıp toplanan mor membranların, 24000 rpm, 30 dk 4°C’de santrifüj sonrası elde edilen mor renkte çökelti ve 30 mL’lik deiyonize su ile süspanse edilmesi. 2) Süspanسیونların 2 ml’lik tüplerde 18000 rpm’de 30 dk 4°C’de santrifüj ile yapılan yıkama işlemi sonrası elde edilen mor renkli çökelti görüntüsü.....	54
<b>Şekil 4.8.</b> Lipitlerden arındırmak için CHAPS ile yıkanan mor renkli çökeltilerin, 15000 rpm, 30 dk, 4°C’de santrifüj sonrası elde edilen şeffaf, mor renkli bakteriyorodopsin pelet görüntüsü.....	55
<b>Şekil 4.9.</b> UV visible spektrofotometre ile Bakteriyorodopsinin karakteristik maksimum absorbans değerinin grafikte gösterimi. ....	55
<b>Şekil 4.10.</b> Bakteriyorodopsin solüsyonunun 450-650 nm dalga boyu aralığında UV-visible spektrofotometre ile taraması sonucu elde edilen absorbans grafiği. ....	56
<b>Şekil 4.11.</b> Bakteriyorodopsinin SDS-Page profili .....	57
<b>Şekil 4.12.</b> Atomik kuvvet mikroskobu ile alınan Bakteriyorodopsin trimerlerinin oluşturduğu hexagonal kafes, yüzey morfolojisi, boyut görüntüsü .....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. İzolatların 16S rRNA BLAST sonuçları.....	53
--	----

## 1. GİRİŞ

Nano kelimesi, köken olarak Yunanca ‘*nannos*’ kelimesinden gelmektedir. Cüce veya bodur manasına gelen bu kelime, metrik sistem içinde metrenin milyarda birine ( $10^{-9}$ ) denk gelen ölçüyü belirtmek için kullanılmaktadır (Manjasetty *et al.* 2008; Kayır ve Baççıl 2010; Yalçın 2010; Karakoç 2013). Aynı zamanda nanometre maddenin temel taşları olan atomik, moleküler, supra-moleküler birimlerin karakteristik ölçü birimidir (Ramsden 2005).

Nanoteknoloji; sub-mikron, özellikle 1-100 nm arasında değişen boyutlara sahip objelerin üretimi, değiştirilmesi ve faydalı hale getirilmesi manasına gelmektedir (Villaverde 2010). Nanoteknoloji maddeyi saç teli kalınlığından yüz bin kat, alyuvarlardan 1000 kat küçük boyuta denk gelen nano boyutta inceleyen, aynı zamanda kontrol ve manipüle ederek, özgün özellik ve fonksiyonlara sahip yeni yapılar, araçlar ve sistemler oluşturulması ve kullanılmasını amaçlamaktadır (Morris and Willis 2007; Yalçın 2010).

29 Aralık 1959 yılında, Amerikalı ünlü fizikçi Richard Feynman, “There is Plenty of Room at the Bottom” isimli konferansında; maddenin moleküler boyutta kontrolünün sağlanmasıyla, sentetik kimya alanında yeni ve daha etkin buluşların mümkün olduğunu söylemiştir (Drexler 2006). Bu konferans; nanoteknolojinin zeminini oluşturacak kavramları içermektedir. Nanoteknoloji terim olarak ilk defa Norio Taniguchi tarafından 1974 yılında, materyallerin nano boyutta düzenlenebilme ihtimali olduğunu belirtmek için kullanılmıştır (Ramsden 2005). Terimin bilinirliği, 1986 yılında K. Eric Drexler’in “Engines of Creation 2.0: The Coming Era of Nanotechnology” isimli kitabı yazması ile artmıştır. Ayrıca aynı yıl içerisinde The Foresight Institute, nanoteknoloji hakkında toplumun daha bilgili bir hale gelmesi için kurulmuştur. Bu tarihlerden birkaç yıl önce 1982’de Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer; Taramalı Tünelleme Mikroskopunu (STM) bulmuşlardır. Bu buluş nanoteknolojinin gelişmesini sağlayacak olan; moleküllerin görüntülenmesi ve kontrolünü gerçekleştirmiştir (Barnett 2009).

Taniguchi nanoteknoloji terimini kullanırken sadece materyallerin tasarımı, karakterizasyonu ve uygulamalarını kastetmiş olmasına rağmen, nanoteknoloji materyallerin yanında sistem ve araçları da araştırmak üzere gelişmiştir (Ramsden 2005).

Nanobiyoteknoloji; biyoloji ve biyokimya alanlarında yapılan çalışmalarla, araç ve gereçlerin araştırılması ve geliştirilmesini hedefleyen, aynı zamanda geliştirilen teknikler ile yeni üretimlerin gerçekleştirilmesi için çalışan biyoteknoloji ile nanoteknolojinin kesiştiği noktadadır. Maddenin elementlerini kontrol ederek daha verimli çalışmalar sunan, nanoteknolojinin tesiriyle biyolojik nano materyaller yani; proteinler, lipitler, enzimlerin araştırılması ve teknolojik çalışmalarda kullanımı için geliştirilen teknikler, nanobiyoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Gazit 2007). Materyallerin modifikasyonları ile biyolojik ve elektronik ya da inorganik sistemlerin entegrasyonu ve oryantasyonu mümkün olabilmektedir (West and Halas 2000).

Dayanıklı minyatür sistemlerin teknolojik gelişmeler için sunduğu avantajlar ve bunlara duyulan ihtiyaç, onların hâlihazırda kullanılmakta olan litografik metodlara alternatif olmasını sağlamıştır. Biyomoleküllerin teknik açıdan yeniden gözden geçirilmesi ile bazı teknolojik seviyelere ulaşmak mümkün bir hal almıştır. Biyomoleküler elektronik sistemlerin, konvansiyonel sistemlerin teknik açıdan aşamayacağı problemleri çözebilecek kapasitede oldukları düşünülmektedir. Biyomoleküller; self-assembly gibi avantajları sayesinde, yarı-iletken sistemlerin zor ulaşabileceği bir noktada bulunmaktadır (Rinaldi *et al.* 2006).

Son gelişmelerde; biyomoleküler motorların çalışma şeklinin, onların nanomakineler olarak kullanılma olasılığını arttırdığı gözlemlenmektedir. Biyomoleküller molekül boyutlu robotlar olarak kullanılabilir. Ayrıca, biyomoleküller, enzimler, antikorlar ve hormonlar; yemek, temizlik, ilaç vs. endüstrileri için vazgeçilmez teknolojik çözümler sunmaktadır. Ancak biyomoleküller ve elektronik sistemler arasında geliştirilmesi gereken arayüz yapımının zorluğu ve buna ek olarak biyomateryallerin stabiliteilerinin organik veya inorganik elektronik devrelere göre düşük olması, bu materyallerin

günümüz teknolojisi ile kullanımını kısıtlamaktadır. Bu noktada doğada bulunan eşsiz kristal yapı ve stabiliteye sahip, nano boyutlu bir biyomolekül olarak karşımıza çıkan Bakteriyorodopsinin bazı ilginç teknik fonksiyonları BR'yi günümüz teknik çalışmaları ve uygulamaları için model bir membran proteini haline getirmektedir (Hampp and Oesterhelt 2004; Schranz *et al.* 2010).

Bakteriyorodopsin (BR), 26 kDA moleküler ağırlığı olan ve yapısında 7 alfa sarmalı, buna Schiff bazıyla bağlı lys216 retinali ve lipidler bulunan iki boyutlu kristalin bir membran proteindir (Subramaniam and Henderson 2000; Baudry *et al.* 2001; Choi and Montemagna 2007). Doğada Archea domainine bağlı Euryarchaeota filumuna ait Halobacteriales ordosu içerisinde toplanan halobakterilerin hücre çeperlerinde bulunan bakteriyorodopsin, bu arkelerin düşük havalandırma şartlarına maruz kaldıkları zamanlarda sentezlenerek hücre çeperine eklenmektedir (Madigan and Martinko 2005). Kristalin hali onu kimyasal ve termal değişimlerde stabil hale getirmektedir. Hücre membranının hemen üstünde bulunan BR yamasının yüksekliği, AFM ile yüzey analiz ölçümleri yapılarak tahmin edilmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda, yükselti yaklaşık 5 nm olarak bulunmuştur (Hampp 2000).

Üzerinde en çok araştırma yapılan entegre membran proteinlerinden olan BR'nin önemi, onun stabil ve güçlü yapısından dolayıdır. Mor membranın nano ölçüdeki düzeni ve BR'nin ışıkla uyarılan yapısı onu ilgi çekici hale getirmektedir (Curnow 2009). Keşfedildiği günden bu yana örnek teşkil eden basitliği ve deneysel avantajları, onun yeni teknolojik çalışmalarda ve özellikle transport mekanizması araştırmalarında önemli olmasını sağlamaktadır (Pandey 2006).

İsminde bulunan 'rodopsin' kelimesinden anlaşılacağı üzere yapısında retinal karotenoid benzeri pigment bulunan bu biyomolekül, ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürür. Aynı zamanda renginide bu pigmentten alan BR, *Halobacterium salinarum* tarafından sentezlenerek membranın dış yüzeyine eklenir. Bu kırmızımsı-mor renk; BR'nin ışığın 570 nm frekansındaki dalgayı absorbe etmesinden kaynaklanır. Absorbsiyonun ardından uyarılan BR, bir dize tepkime ile enerjiyi dönüştürür (Madigan



and Martinko 2005). Bu özelliğinden dolayı BR geleceğın enerji kaynakları arasında görölebilir. Çalışmamızda amaçlanan, halofilik arkelerde mevcut olan, özellikle *Halobacterium salinarum*'dan elde edilen fotokromik bir biyomolekül olan bakteriyorodopsin'in saflaştırılması ve karakterizasyonudur.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Nanoteknoloji Tanımı

Nanoteknoloji 20. yy. sonlarında gelişmeye başlayan, maddenin nano boyuttaki kontrolünün sağlanması amacıyla geliştirilmiş bir bilim dalıdır (Ramsden 2005; Carpenter 2006; Manjasetty *et al.* 2008). Nanoteknoloji; boyutları 1-100 nm arasında olan madde içeriklerini inceleyen, maddenin daha etkin kullanılmasını amaçlayan disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Nanoteknolojinin moleküler boyutta çalışmaları; organik ve inorganik materyallerin, kütleli hallerine oranla daha gelişmiş fiziksel ve kimyasal özellikleri olduğunu gün yüzüne çıkarmıştır (Morris and Willis 2007; Curnow 2009; Yalçın 2010).

Organik ya da inorganik materyallerin üretilmesinde, nanoteknolojide Bottom-Up (Aşağıdan yukarıya) ve Top-Down (yukarıdan aşağıya) olmak üzere iki ana yaklaşım bulunmaktadır. Top-down yaklaşımı nanoyapıların, nanomalzemelerin, nanopartiküllerin; yukarıdan aşağıya doğru makineler, asitler ve benzeri mekanik ve kimyasal yöntemlerle oluşturulması ve üretilmesini kapsamaktadır. Malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilerek, nano boyutlarda küçük parçalara kadar ayrılması sağlanır. Mekanik öğütme bu yaklaşıma örnek verilebilir. Bottom up yaklaşımı ise; maddenin oluşumunda maddeyi oluşturan temel en küçük birim olan atomlardan başlanıp, atom-atom ya da molekül-molekül aşağıdan yukarıya doğru inşa edilerek, moleküler nanoteknolojinin temel organik ya da inorganik yapılarının oluşturulması yaklaşımıdır. Bu yaklaşım; atomik veya moleküler boyuttaki yapıların, kimyasal reaksiyonlar ile büyümesi sağlanarak, partiküllerin elde edilmesini ele alır. Nanokristalin metal ve alaşımlarının üretiminde kullanılan ilk yöntem olan gaz yoğunlaştırma tekniği aşağıdan yukarıya yaklaşımıyla çalışmaktadır. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprey piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleridir (Karakoç 2013).

Nanoteknoloji kavramının ortaya çıkmasıyla ön plana çıkan nano ölçekli malzemelerin, yapıların, elemanların üretiminde de kullanılan Bottom-up yaklaşımı sayesinde; özellikle belli başlı biyolojik fabrikasyon yöntemleri olan; protein sentezi, nükleik asit sentezi, membran sentezi ve biyomoleküller gibi birçok biyolojik işlem gerçekleştirilmektedir. Oluşumları bu yaklaşım içinde ele alınan biyolojideki nano ölçekli nanobiyomoleküllere; ATP sentaz enzimi; molekülleri birbirine bağlayan bir nanorobot olarak, *myosin*; liflerin birbirine geçişini sağlayan moleküler bir nanomakine olarak, DNA; bir veri depolama sistemi olarak örnek verilebilir (Diez *et al.* 2004).

### **2.1.1. Nanoteknoloji kullanım alanları**

Elektronik, bilgisayar teknolojileri, çevre, tekstil, tarım, havacılık, enerji ve biyoteknoloji gibi birçok sektör ve araştırma dallarında nanoteknoloji, yeni keşiflerin ve geliştirmelerin gerçekleştirilmesi için çalışmaktadır. Nanoteknoloji: Malzeme ve İmalat sektöründe; Materyallerin moleküler boyutlarda inşa edilerek verim artmaktadır. Bilgisayar ve Elektronik sektöründe; daha hızlı ve kapasiteli sistemlerin geliştirilmesi gerçekleşmiştir. Tıp ve Sağlık sektöründe; nano boyutta araçlar geliştirilerek tedavi ve teşhis için kullanımı amaçlanmaktadır. Havacılık ve Uzay sektöründe; materyal kullanımı aza indirgenerek maliyetler düşürülmektedir. Çevre ve Enerji sektöründe; yakıt verimlilikleri artırılarak çevre dostu sistemler geliştirilmektedir. Biyoteknoloji ve Tarım sektöründe; yeni ve daha etkili ilaçlar ve hastalığa daha dirençli bitki ve hayvanlar üzerine bir çok çalışma yapılmaktadır. Savunma sektöründe; biyolojik ve kimyasal tehditlere karşı ön tanı sistemleri oluşturmak için geliştirilen sistemler bulunmaktadır (Celep 2007).

### **2.2. Nanobiyoteknoloji**

Nanobiyoteknoloji; materyal ve ekipmanların fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmek ve geliştirmek amacıyla gelişen kendine özgü bir bilim dalı olan Nanoteknoloji ve moleküler, hücresel ve genetik özelliklerin manipüle edilmesiyle tıptan tarıma birçok alan için ürün ve hizmetler geliştiren biyoteknoloji bilim dallarının

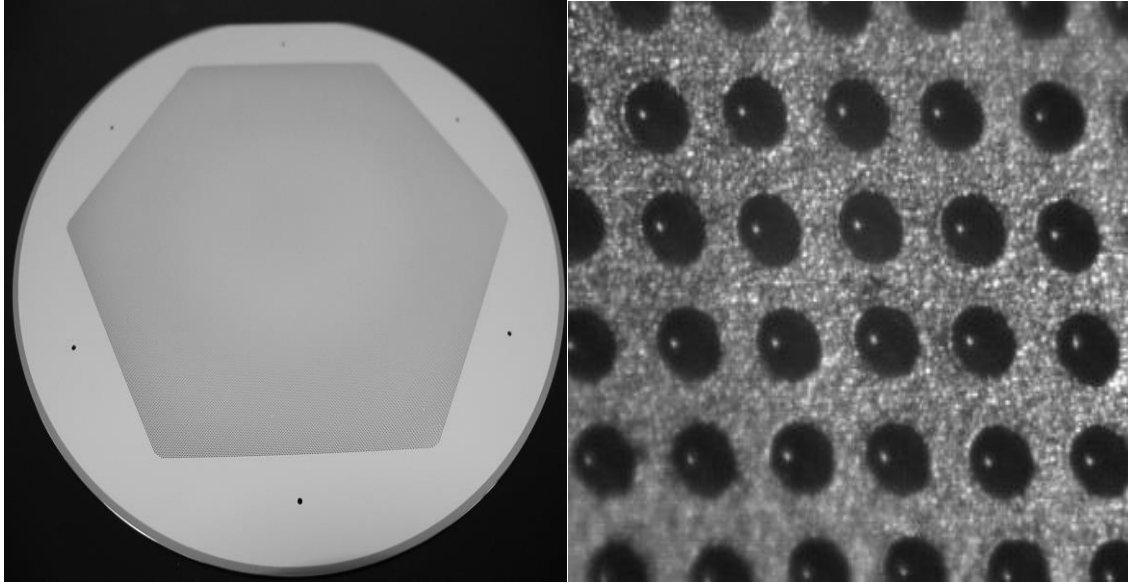
birleşmesi ile oluşan, biyolojik sistemleri taklit etmek ya da bu sistemlerin elektronik sistemlerle uyumlu çalışmasını sağlamak için çalışmalar üreten bir bilim dalıdır. (Fakruddin *et al.* 2012). Bir diğer kaynağa göre (Ramsden 2009) Nanobiyoteknoloji; biyolojik materyallerin, biyomimetik ya da biyolojiden ilham alınan, inorganik, organik moleküllerin nanoteknolojik araçlarda biyolojik işlemleri kontrol ve görüntüleme amacıyla kullanılması demektir. Biyolojik yapıların makro ve supra moleküler boyuttaki kendinden yapılanmalı (self-assemble) prensipleri, nanoteknoloji bilim adamları tarafından araştırılan konular arasındadır. Ve bu yapılar genelde protein bazlı, olağan üstü güçlü ve hafif, ayrıca bazen minyatür kompleks mekanizmalar halindedirler.

Nanobiyoteknoloji; minyatür, ortak çalışan bilişsel ve kavramsal kapasiteleri olan biyolojik komponentleri bir araya getirerek, yeni ve özgün araçlar yapmayı mümkün kılmıştır. Nanopartiküllerin ve biyomateryallerin birlikte kullanılma fikri, yeni çalışmalar yapılmasına neden olmuş ve nanobiyoteknoloji alanına yeni boyutlar kazandırmıştır. Bu açıdan; biyomoleküller, enzimler, proteazlar gibi biyolojik sistemlerin detaylı bir şekilde araştırılması ile daha verimli ve gelişmiş çok yönlü, çok amaçlı araçlar, sistemler ve mimariler tasarlanabilmektedir (Katz and Willner 2004; Morris and Willis 2007).

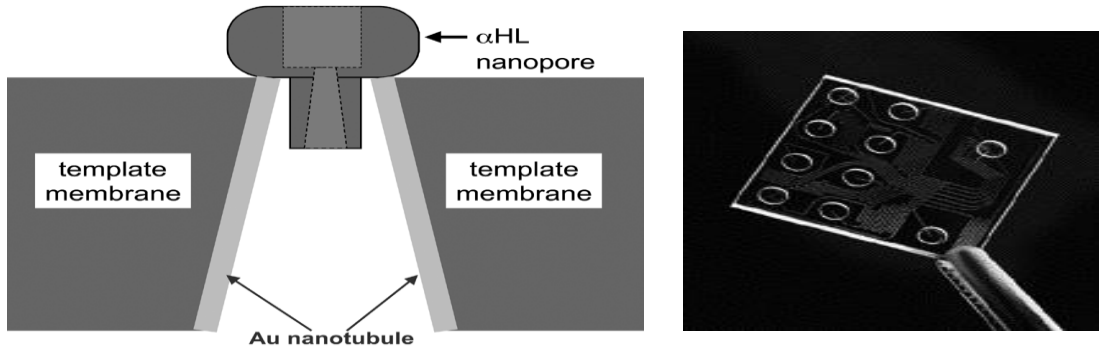
Geçtiğimiz otuz yılda elektronik çipleri daha hızlı ve yüksek çözünürlüklü hale getirmek için boyutlarını küçültmek için çalışan mühendisler; derin UV litografisi kullanılarak bu çiplerin boyutları 20 nm'ye kadar düşürülebilmektedir. Bunun yanısıra moleküler biyologlar, DNA molekülleri ve virüsler gibi nanoboyutta sistemleri incelemişlerdir. Bu iki bilim dalının birleşmesi ile biyolojik ve kimyasal analizler için; yüksek duyarlılık, spesifik ve yüksek tanılama özellikleri olan yeni multifonksiyonel araçlar ve sistemler geliştirilmeye başlanmıştır. Nanobiyoteknoloji daha ilk evrelerinde olmasına rağmen, gelişimi hızlı ve çok yönlü olmuştur. Üniversiteler her geçen gün yeni nanoteknoloji merkezleri açmakta olup, bu alandaki patent uygulamalarında hızlı bir artış gözlemlenmiştir. Nanobazlı uygulamaların, kompleks yapılarından dolayı gelişimleri hala devam etmektedir. Ancak yinede bu gelişmeler bilim dünyası için önemli kazanımlardır (Fortina *et al.* 2005).

### 2.2.1. Nanobiyoteknoloji çalışma alanları

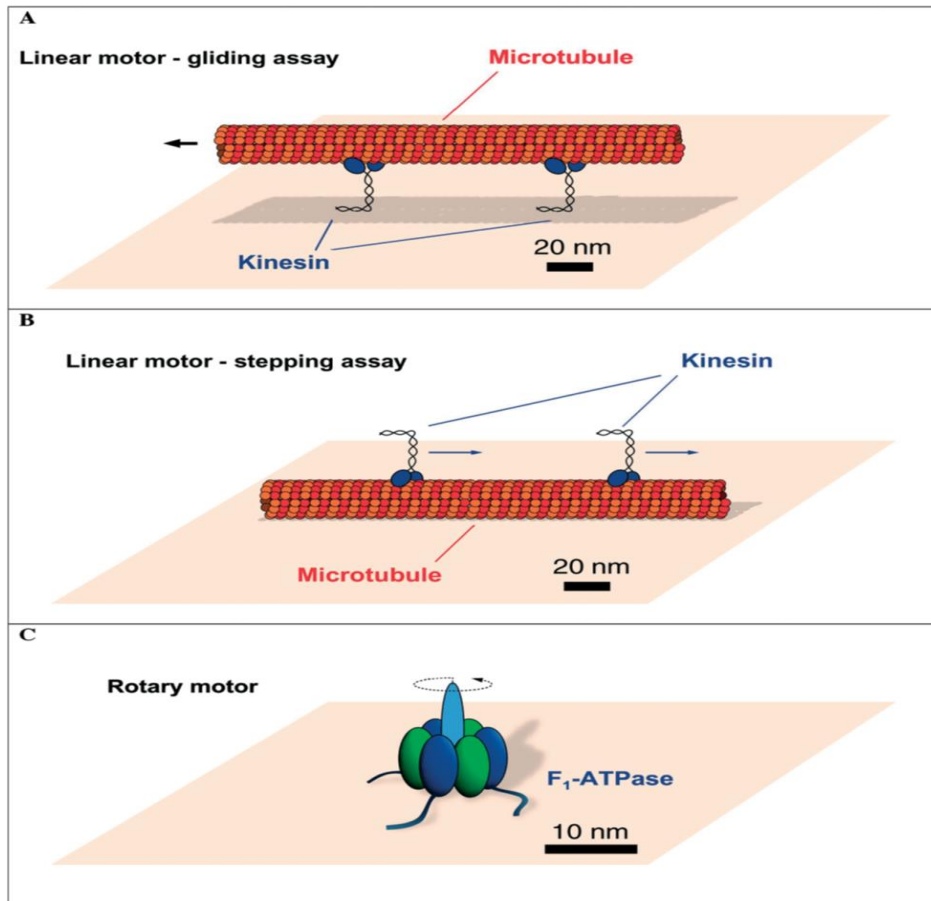
- Karbon nanotüplerin; biyomoleküler komponentleri, hücre içine veya akıllı biyohibrid materyallere iletilmesi için kullanılması.
- Floresan nanokristallerin (quantum dots), cam kapiller içinde DNA ve protein gibi moleküllere enjekte edilmesi.
- Nöron hücre ağlarının *in vitro* tanımlanması
- ‘Lab on a chip’ler (Şekil 2.1)
- Nanopor mühendisliği (Şekil 2.2)
- Çekirdekler
- Biyomoleküler motorlar (Şekil 2.3) (Bartos *et al.* 2004; Bayley *et al.* 2004; Diez *et al.* 2004; Delamarche 2004; Manjasetty 2008; Offenhauser and Vogt 2004; Sawitowski 2004; Sleytr *et al.* 2004).



**Şekil 2.1.** 100K Living Chip™ levhası (solda), 50-nl sıvıyla dolu kuyucukların detaylı görüntüsü (sağda) (Courtesy BioTrove, Inc.)



**Şekil 2.2.** Soldaki: Tek protein porunun stabil hale getirilmesi. Nanopor (burada kullanılan  $\alpha$ HL poru) mekanik olarak stabil olan başka por içine yerleştirilmiş (burada kullanılan Au nanotübülü).  $\alpha$ HL poru ve Au porunun yüzeyleri uyumluluk için işlenmiştir. (C. R. Martin, University of Florida.) Sağdaki: nükleik asit ayrıştırma için yapılan kapil şeklinde elektrozde çipi. (Courtesy Caliper Technologies, Inc.)



**Şekil 2.3.** Nanoteknolojik uygulamalarda kullanılabilen biyomoleküler motorlar (A) Yatay yüzeye bağlı motor molekülleri ile filaman taşınımı (akış ayarlı). (B) Motor proteinlerinin filaman boyunca lineer hareketi (duruş ayarlı). (C) Rotasyon oluşturan Rotary motoru

### 2.2.2. Biyomoleküller

Biyomoleküller; nano sistem ve araçların self-assemble işlemlerinde, gen iletim sistemlerinde ve fonksiyonel moleküler görüntüleme için kullanılacak multifonksiyonel nanomateryallerdir. DNA, peptidler ve proteinleri içeren biyomoleküller ve onların etkileşimleri biyolojik sistemlerin kontrol, fonksiyon ve diğer özelliklerinde ana unsur konumundadır. Biyomoleküllerin kontrolü ve onları anlamak aynı zamanda, biyolojik işlemlerini de kontrol edilmesi ve anlaşılması anlamına gelmektedir. İnsan yapımı nano yapıların ve biyomolekülleri de içine alan biyolojik yapıların entegrasyonu ile biyomoleküler işlemlerin optik ve elektriksel karakterizasyonu ve kontrolü mümkün bir hal almıştır (Stroschio and Dutta 2005).

Nanobiyoteknolojinin ana çalışma unsurlarından olan biyomoleküller, hücrelerin mimari yapısını oluşturan C-H-O elementlerini içeren temel yapı taşlarıdır. Biyomoleküllerin bilgi depolama ve iletimi, hücre içi düzenleyici görevleri, enerji üretimi ya da dönüşümü ve aktarımı, moleküler transportasyon görevleri ve ucuz olmaları onların konvansiyonel inorganik materyallere alternatif olmasını sağlamıştır. Biyomoleküllerin bu avantajları, onları ilaç, gıda, temizlik gibi endüstrilerde kullanılmasını kaçınılmaz kılmıştır. Metal ya da yarı iletken nanopartikül veya nanorod gibi nanomateryaller, enzim, antijen, antibiyotik ya da DNA gibi biyomoleküllerle benzer boyutlardadır. Eşsiz elektronik fotonik ve katalitik özellikleri bulunan nanopartiküllerin, teşhis ve inhibisyon gibi özellikler sunan biyomateryallerle entegrasyonu özgün sinerjetik fonksiyon ve özelliklere sahip hibrid nanobiyomateryalleri ortaya çıkarmıştır (Katz and Wilner 2004). Ayrıca biyomoleküllerin enerji konversiyon özellikleri sayesinde, standart elektronik devreler yerine kullanılması üzerine çalışmalar yapılması sağlanmıştır. Bu amaçla; halofilik arkeler tarafından kullanılan özel bir membran proteini (purple membran- mor membran) olan Bakteriyorodopsin (BR), özellikle fotokromik, fotoelektrik ve optik özellikleriyle nano-biyomolekül olarak nanobiyoteknoloji alanında birçok potansiyel uygulama alanlarına sahiptir (Hampp 2000).

### 2.3. Membran Proteinleri Özellikleri

Genomik sekans analizlerinin gösterdiği üzere; doğada proteinlerin %25-30 kadarı, integral membran proteinleridir. Bu protein sınıfı, en az bir transmembran domainine sahip, aminoasit sekansları çift lipid tabakalara bağlı ve dışa dönük, non-polar aktiviteleri hidrofobik çift tabakalı çekirdekleri ile gerçekleştiren proteinler olarak gözlemlenmiştir. Membran proteinleri, spesifik ve spesifik olmayan solidler ve iyonların taşınımı, fotokromik özellikleri sayesinde enerji üretimi, sinyal alınımı, ozmotik düzenleme gibi çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirirler. Bu fonksiyonların çoğu; çift lipid tabakası üstünde, bir bariyer gibi çalışmaları şeklinde, bilgi ya da materyallerin transferi şeklinde gerçekleşir. Membran proteinlerin hücre içinde bir kapıcı rolünde bulunması, onları nanobiyoteknolojinin ilham kaynağı haline getirmiştir. Çünkü onların iki ayrık ortam arasındaki bağlantıyı sağlamaları, onları çekici birer çalışma konusu olmasını sağlamaktadır (Curnow 2009).

Son zamanlarda biyoelektronik ve biyofotonik araştırmalarda self-assemble biyomonolayerlar ve protein bazlı biyofotonik araçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Biyoelektronik uygulamalar ve foton algılayan reaksiyon merkezleri için kullanmak üzere bazı proteinler keşfedilmiştir. Fotosensitif membran proteini olan BR, bu proteinler arasında en önemli olanıdır. BR'nin teknik uygulamaları hakkında birçok yayın ve patent çalışması yapılmıştır. BR'nin kullanıldığı çalışmaların hali hazırda bulunan teknolojilere karşı avantajları bu çalışmaların ana temasını oluşturmaktadır (Zaitsev *et al.* 2012).

#### 2.3.1. Kromizm

Her hangi materyalin dış etkenlerden kaynaklanan geri dönüşebilir şekilde fiziksel, kimyasal ve renk değişimi anlamına gelir. İnorganik ve organik birçok kromizm çeşidi keşfedilmiştir. Bunlar; mekanik parçalanmanın sebep olduğu piezokromizm, geri dönüşümü olmayan tribokromizm, yüksek iyon çözünürlüğünün yol açtığı iyonokromizm, asidik ve bazik yoğunluğun artması ile oluşan halokromizm, ısı farkının



neden olduğu termokromizm, elektromanyetik ışınların, bir kimyasal sistemin iki formu arasında absorpsiyonu ile oluşan tek veya çift yönlü tersinir renk değişimleri olan elektrokromizm ve özellikle rengin ışığa duyarlı değişimi olan fotokromizm olarak sıralanabilir. Fotokromizm aslında günlük hayatta birçok insan tarafından bilinen bir terimdir. Hayatımızda kullandığımız bazı materyaller fotokromik özellikler taşımaktadır(gün ışığında renk değiştiren gözlük camları vb) İnorganik fotokromik sistemler ilhamını doğadaki fotokromik doğal sistemlerden almaktadır (Bozkurt 2007; Karadeniz 2010). İnsanlar güneş ışığı altında koyulaşan ve gözü zararlı ışınlarla karşı koruyan, gölgede de (güneş ışığı etkisi kalkınca) normal, renksiz yapıya geri dönen fotokromik camlı gözlükleri günlük hayatlarında kullanmaktadırlar. İlk ticari camlar inorganik tuzlardan (özellikle gümüş) hazırlanmış cam lensler olmuştur. Son yıllarda organik fotokromik lensler dünya pazarlarında önemli bir paya sahip olmuştur (Karadeniz 2010).

Fotokromizm uygulamaları iki kategori altında toplanabilmektedir. Absorpsiyon ve emisyon spektrumlarının değişimiyle ilgili çalışmalar bunlardan birisidir. Bu çalışmalara örnek olarak; optik depolamalar, ve değişken optik materyaller verilebilir. İkinci kategorideki uygulamalar ise fiziksel ve kimyasal özellikleri değişimi üzerine dayalıdır. Elektrik iletkenliği, ara yüzey geçirgenliği, fotokromizm sergileyen boyar maddeler, lensler, güvenlik sistemleri, kartuş boyaları, veri depolama, silinebilir kompakt diskler, sahte imza belirlemede kullanılan boyaların üretiminde bu özellikler üzerine çalışılmaktadır (Bozkurt 2007; Karadeniz 2010).

Doğada nadir bulunan fotokromik proteinler, fotosentez ve görsel algının vazgeçilmez öğeleridir. Nadir bulunmalarına rağmen, birçok türü vardır. Onların bu vazgeçilmez önemi, üzerlerinde birçok çalışma yapılmasını sağlamıştır. Özellikle ışıkla olan etkileşimleri ve çalışma mekanizmaları, bilimsel çalışmaların odak noktası olmuştur. Bu çalışmalar ışığında, 70'li yıllarda keşfedilen Bakteriyorodopsin isminde, ekstrem şartlarda görev yapan bir fotokromik protein keşfedildi. Bakteriyorodopsin; kromofor(retinal) içeren tek bir polipeptit zincirinden oluşmuş, integral bir membran proteindir ve hücre dışına protonların ışığa bağlı translokasyonu ile transmembran

elektrokimyasal gradienti oluşturur ve ATP'nin sentezlenmesini sağlayarak, halobakterilerin fotosentetik kabiliyetlerinde kilit rol oynar (Choi and Montemagna 2007; Gonzalez *et al.* 2009). Proteinler genelde çözünür ya da çepere bağlı halde bulunur. Ancak BR'nin hücre membranında kristalin halde bulunması çok nâdir rastlanan bir durum olup ona fotokromik özellik kazandırır (Bozkurt 2007).

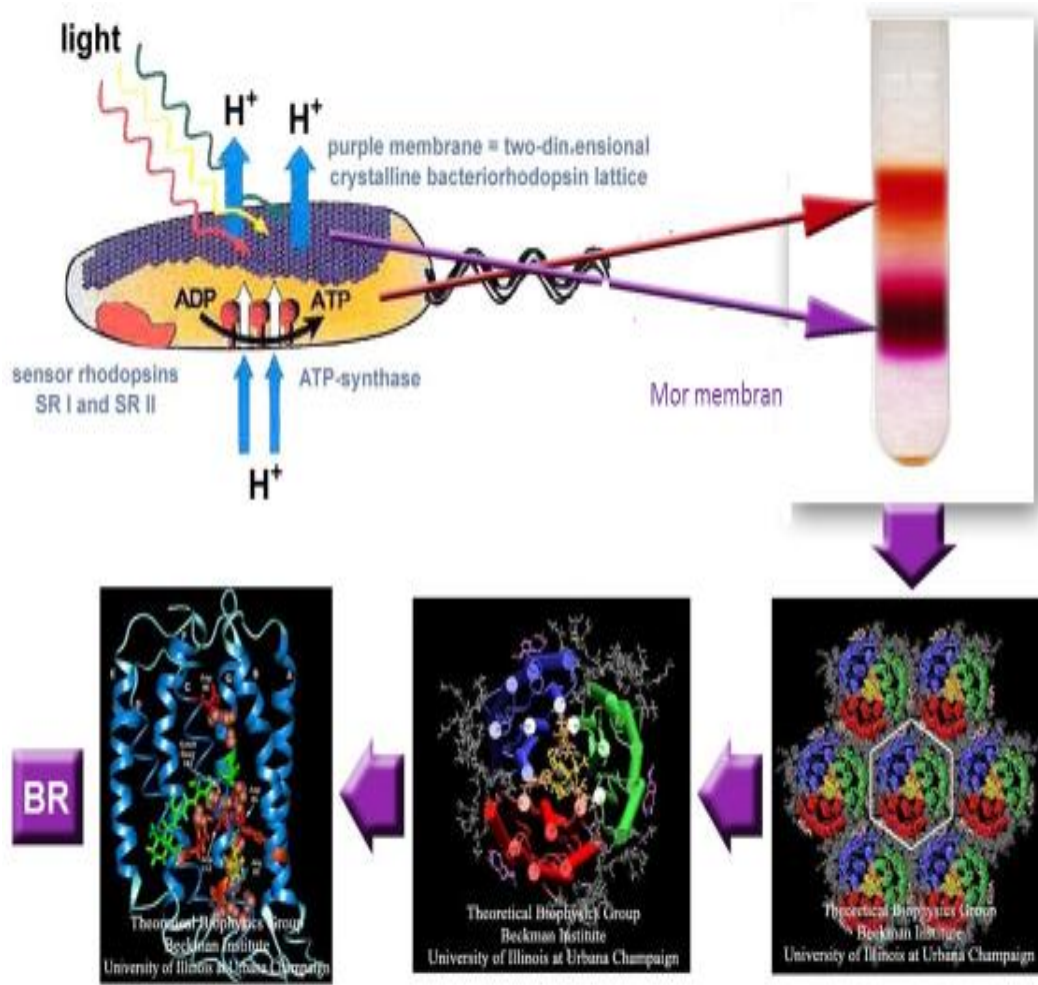
## 2.4. Bakteriyorodopsin

### 2.4.1. Mor membran yapısı ve özellikleri

*Halobacterium salinarum*'un hücre membranında integral bulunan iki boyutlu kristalin yapıda, hücre yüzeyinin %80'ini çevreleyen yamalar bulunur. Bu yamalara mor membran denir. 75/25 oranında protein ve lipit komponentlerinden oluşan mor membran, proton taşınımı için seçici geçirgen bir yapıya sahiptir. Mor membran yapısındaki iki boyutlu hexagonal kristalleri oluşturan trimerler, üç monomerik BR'den oluşur (Şekil 2.4., Şekil 2.5.) (Pandey 2006; Shibata *et al.* 2011; Shiu *et al.* 2014).

Her BR molekülü, ışıkla çalışan dışa dönük protein pompası olarak görev yapar. Fotonun BR tarafından absorbe edilmesiyle, stoplazmadan hücrenin dış tarafına doğru proton ( $H^+$ ) taşınımı gerçekleşir. Bu işlemle beraber, ışık enerjisi kimyasal enerjiye dönüştürülür. Ve hücre çeperinde bir proton gradyanı oluşturulur. Membrana bağlı olan ATPaz enzimi, proton akışıyla ADP'yi ATP'ye çevirir. Bu sayede hücrenin yaşamı için gereken enerji sağlanmış olur. Buna ek olarak mor membranda bulunan 2 adet sensör rodopsin (SR, phoborodopsin) BR'nin foto döngüsü için gereken dalga boylarını tespit eder (Dai *et al.* 2010).

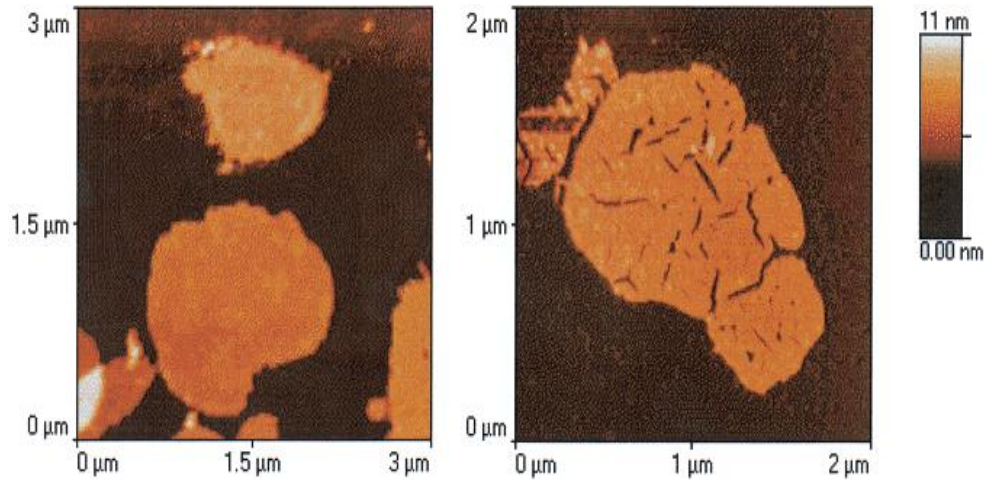
Yeşil ve sarı ışık, foto döngünün gerçekleşmesini sağlarken, mavi ışık engeller. Bundan dolayı, farklı dalga boyları SR'ler tarafından hissedilerek, flagelar motora sinyal gönderilir. Bu az gelişmiş görsel algı yeteneği, halobakteriyumun gereken ışık kaynağına yönelmesini sağlar (Hampp 2000).



**Şekil 2.4.** *Halobacterium salinarum* üzerinde BR içeren mor membran yapısı ve reaksiyon şeması (Hampp 2000; Çakıcı 2004)

Mor membranın genel özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Mor membran, 10:1 molar oranında lipit ve BR'den oluşur.
2. Üzerinde trimerler halinde BR bulunan iki boyutlu kristalin dizelerdir.
3. 1.18 g/cm<sup>3</sup> batmazlık yoğunluğuna sahiptir.
4. 1.45-1.55 nPM ışık kırılma endeksine sahiptir.
5. Kuru ortamlarda 140°C, sıvı ortamlarda 80°C'ye kadar stabildir.
6. Yüksek iyonik dayanıklılığa sahiptir (3 M NaCl).
7. Yüzey alanında boyutları yatay olarak 5 µm'ye kadar, incelikleri ise 5 nm'ye kadardır.



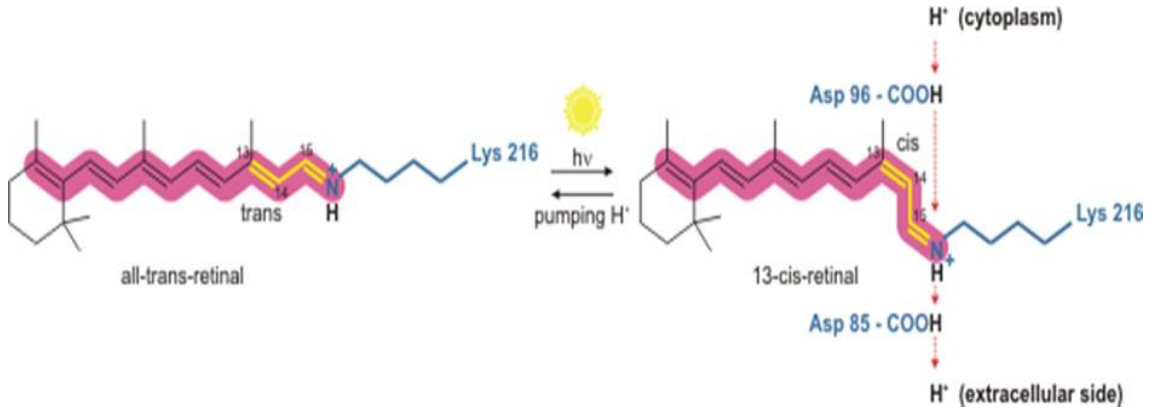
**Şekil 2.5.** AFM’ de oda sıcaklığında mica üzerinde gözlemlenen izole mor membran yamalarının contact mod ile 1.5 nN gücünde silicon nitrit standart tiple alınan görüntüsü (solda). Non-contact modda yüksek rezonans frekanslı tiple (HRF topometrik) alınan görüntüde kurumuş mor membranın tipik simetride çatladıkları gözlemlenmiştir. Bu çatlakların nedeni BR’nin altıgen yapısıdır (sağda).

#### 2.4.2. Bakteriyorodopsi’nin yapısı ve özellikleri

Bakteriyorodopsin (BR), insan gözündeki optik rodopsine benzeyen, ışığa duyarlı bir proteindir (Lobasso *et al.* 2012). Yapısında yedi (A,B,C,D,E,F,G)  $\alpha$  sarmalı bulunmaktadır. Bu sarmallara ilişik bulunan, Lys216 (lysine) amino asit grubuna protonlu Schiff bazıyla bağlı retinal kromofor (Şekil 2.6.), aynı zamanda BR’e mor renk veren moleküldür (He *et al.* 1999; Choi, Montemagna 2007; Gonzalez *et al.* 2009).  $\alpha$  sarmalları; lipid membranı içinde kafes formunda olup, iç kısımda bulunan bu retinali koruyan bir yapıya sahiptir (Hampp 2000). Bu retinal kromofor,  $\beta$  karotenden oluşup, G sarmalının merkezine yakın paralel bir halde bulunmaktadır. Proton pompalama mekanizmasında bu kromofor önemli bir rol oynar. BR, protonu hücrenin içinden dışına kromoforun aldığı ışık sayesinde gönderir (Çakıcı 2004).

BR, *in vitro* koşullarda monomerik, kristalize bir halde bulunur. Bakteriyorodopsin’in bu kristalize hali onu kimyasal ve termal değişimlerde stabil hale getirmektedir. Hücre membranının hemen üstünde bulunan BR’nin yaklaşık yüksekliği, AFM ile yüzey

analiz ölçümleri yapılarak tahmin edilmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda, yükselti yaklaşık 5 nm olarak bulunmuştur (Hampp 2000).

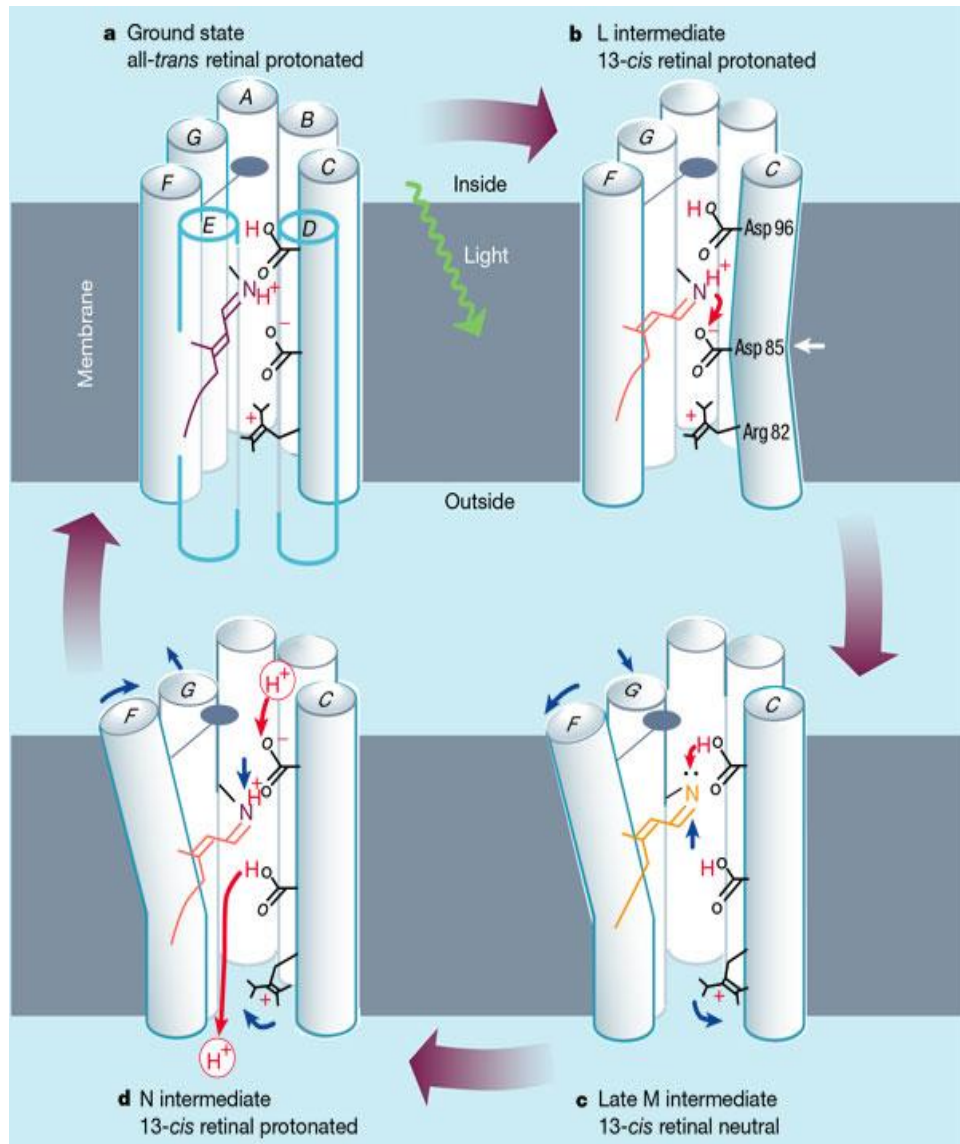


**Şekil 2.6.** Retinal kromofor (Anonymous 2014).

BR tarafından oluşturulan hücre membranının üstündeki mor membran yamalarının ortalama boyutları 500-1000 nm arasında değişmektedir. BR'nin kuru ve polimer filmler halindeki eşsiz biyokristalin yapısı, onun özelliklerinin yıllar boyunca kalıcı olmasını sağlar. BR'nin en önemli özelliği fotokimyasal döngü kabiliyetidir. BR molekülü bu döngü boyunca, ışığın absorpsiyonu ile birlikte farklı durumlardan geçerek, tekrar ilk haline geri dönmektedir (Adamov *et al.* 2008).

Absorpsiyon spektrumuna göre BR'nin yapısal şekil değişim durumları, farklı intermedyatlara olarak sınıflandırılmıştır (K,L,M,N,O). BR'nin ana fonksiyonu ışığa bağımlı proton transferidir. Bu işlem elektrokimyasal enerji oluşmasını sağlar. Proton'un ( $H^+$ ) hücre çeperinin dış tarafına gönderilmesi ve tekrar hücre içine alınması M-412 intermedyatını oluşturur. İlk faz olan BR-570'in maksimum absorpsiyon noktası 570 iken, ana intermedyat olan M-412'de ise maksimum absorpsiyon noktası 412 nm'dir. 412 nm dalga boyundaki ışık, molekülü ilk pozisyona getirecek etkidir. Foto döngü içindeki zaman parametreleri mikro saniyeler ile saniyeler arasında değişmektedir (Adamov *et al.* 2008).

BR'nin yapısal modeli Henderson ve ekibi tarafından yüksek çözünürlüklü kromyomikroskop kullanılarak çıkarılarak,  $\alpha$  sarmallarının retinal kromoforu çevrelediği bir yapı gözlemlenmiştir (Şekil 2.7.). Retina, stoplazmik yüzeyi, hücrenin dışından kanal şeklindeki yapısıyla ayırmaktadır. Retina ile Lys216'yı bağlayan Schiff bazı, bu kanalın merkezi konumunda bulunmaktadır (Pandey 2006).



**Şekil 2.7.** Bakteriyorodopsinin A,B,C,D,E,F,G şeklinde kodlanan yedi alfa sarmalı, retinal kromofor ve proton pompalanırken Bakteriyorodopsinin moleküler mekanizması (Çakıcı 2004).

Diğer bir ifadeyle; Schiff bazı, proton taşınımının gerçekleştirildiği kanalın ortasında bulunmaktadır. Vektörel proton transferinin gerçekleşmesi için Schiff bazının protonlanıp boşalma durumu, farklı hallerde oluşmak zorundadır. Böylece Schiff bazının Asp85 ve Asp96 'ya ulaşılabilir hali katalitik döngü boyunca değişmektedir (Şekil 2.7). Ayrıca Schiff bazının, çevresindeki aminoasitlerle hızlı elektrostatik etkileşimi ve kutuplanması hücrenin biyolojik fonksiyonlarını yerine getirmesi için gereken absorpsiyon maksimumunu değiştirmektedir (Pandey 2006).

Bakteriyorodopsinin genel özellikleri aşağıdaki gibi sıralanmıştır;

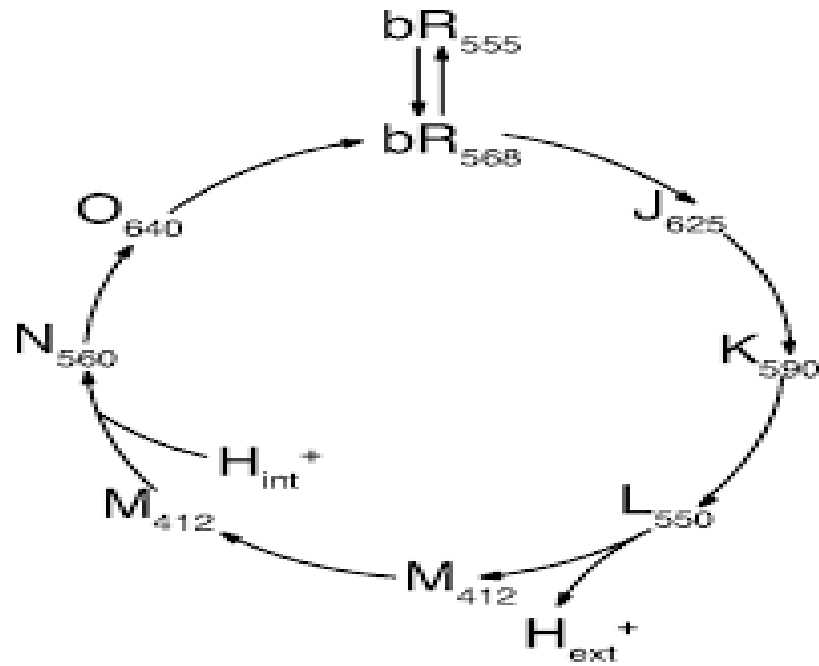
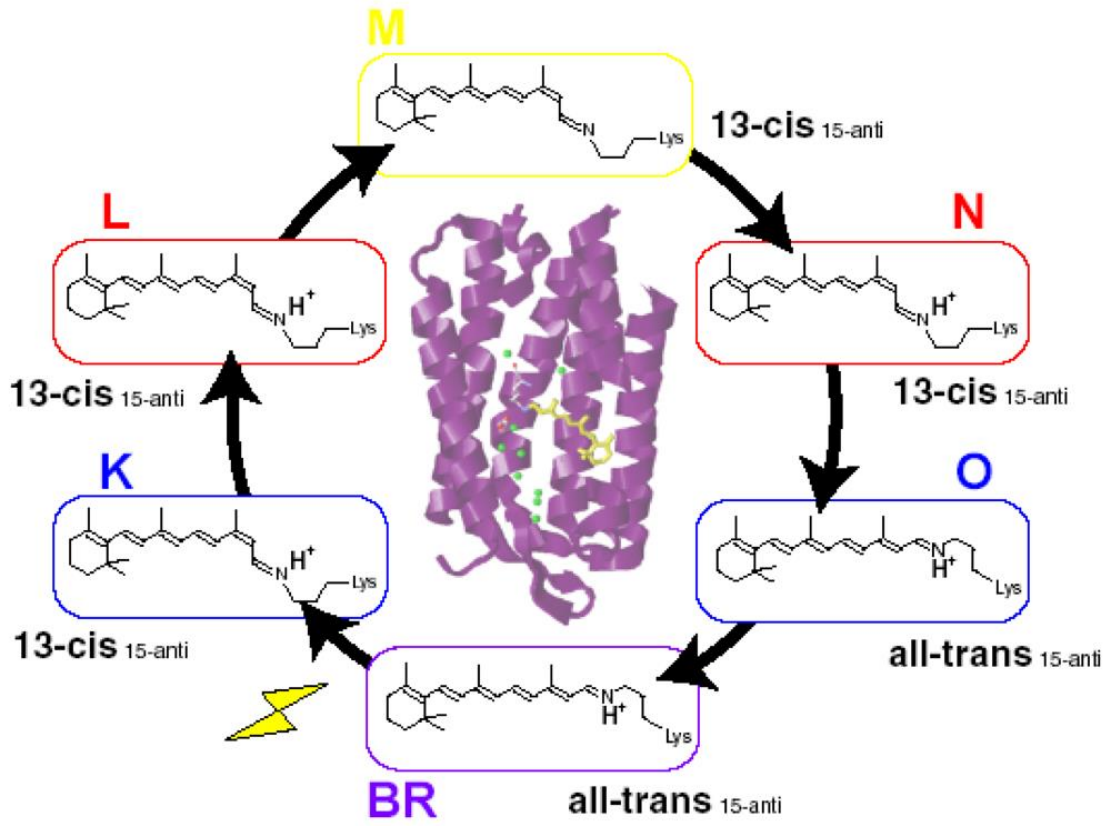
1. BR, 26.784 Da moleküler ağırlığa sahiptir.
2. BR'nin izoelektrik noktası (Molekülün pozitif ve negatif yükünün sıfır olduğu, elektrik alanında molekülün hareket etmediği pH derecesi) pH 4-5 civarındadır.
3. BR, kafes formunda olup, 20° dışa dönük retinilidin kalıntısı lys216'ya ekli durumdadır.  $\alpha$  sarmalları, yalnızca lipit bilayerların dışındaki proteazlara ulaşabilen ve enzimleri azaltıp modifiye edebilen bağlar tarafından bağlıdır.

### 2.4.3. Bakteriyorodopsi'nin fotodöngüsü

Önceki çalışmaların gösterdiği üzere fotodöngü spektral açıdan farklı fazlardan oluşur (K,L,M,N,O). J durumundan gelişen K durumunun başlamasından itibaren, reaksiyon döngüsünün geri kalanı diğer transport sistemlerine benzer bir termal reaksiyon döngüsünden ibarettir (Pandey 2006; Çakıcı 2004)(Şekil 2.8.).

Fotokimyasal uyarılmadan sonra BR'nin fotokromik grubunda; geri dönüşebilir all-trans ve 13-cis değişimi meydana gelir. itrojenin protona ulaşımı için yine geri dönüşebilir yapı değişimi gerçekleşir (Hampp 2000).

Fotodöngü adımlarının kinetikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;



Şekil 2.8. Bakteriyorodopsinin foto döngü şeması (Anonymous 2014)



- İlk reaksiyon
- K590'dan L550'ye geçiş
- İlk proton yer değiştirme adımı; L550'den M412'a geçiş
- Hücre dışının stoplazmaya ulaşılabilir olduğu açma reaksiyonu
- İkinci proton yer değiştirme adımı; M410'dan N560'a geçiş
- 13-cis retinalinin all-trans formuna, N560'dan O640'a geçiş
- İkinci stoplazmanın hücre dışına ulaşılabilir olduğu açma reaksiyonu; O640'dan
- BR570'e geçiş

Bu kademeli işlemler içinde all-trans retinali, 13-cis retinaline fotoizomerize olur (Pandey 2006; akıcı 2004)

#### **2.4.4. Bakteriyorodopsi'nin fonksiyonları**

Işık absorbe edildiğinde, retinal kromofor izomerizasyona maruz kalarak, hücrenin stoplazmik tarafından, dış tarafına doğru proton taşınımı olur. BR'nin kromoforik grubu, retinilidin kalıntısı ve iç kabukta ortak hareket eden amino asitler içerir. Bu aminoasitler retinilidin kalıntısının absorbe yeteneklerini etkileyerek fotokimyasal kanalları kontrol eder. Bu aminoasitlerin iç grubu enzim olarak düşünülebilir. ATP sentezinin en yüksek olduğu anı, ışık dalga boylarının 550-600 nm'de olduğu an olarak gözlemlenmiştir (Tortora *et al* 2004). Bu aynı zamanda BR'nin absorpsiyon spektrumunu göstermektedir. Absorpsiyon spektrumuna göre BR yapısındaki değişikler sayesinde, ana fonksiyonu olan proton transferi gerçekleşir. Bu işlem ışık enerjisinin elektrokimyasal enerjiye dönüşümünü sağlar (Adamov *et al.* 2008).

#### **2.4.5. Bakteriyorodopsi'nin kullanılma alanları**

Keşfedildiği günden bu yana üzerinde birçok teknik çalışmalar yapılan BR; teknolojik kullanım alanlarının belirlenmesi ve BR'yi diğer proteinlerden ve konvansiyonel inorganik ve organik fotokromik materyallerden ayıran özelliklerinin keşfedilmesi ile

önem kazanmaktadır. Ayrıca, BR daha büyük boyutlara modifiye edilerek, yeni materyal sınıfına temel oluşturabilme kapasitesine sahiptir. Bu gibi özellikleri onu yalnızca fotokromik biyomoleküller arasında öne çıkarmakla kalmayıp, aynı zamanda biyomoleküllerin, teknik alanlarda gelecekte nasıl kullanılacağı hakkında da bir strateji oluşturulmasını sağlamıştır (Hampp 2000).

Vektörel proton yer değişimi biyolojik hücrelerde enerji konversiyonunu oluşturur (Baudry 2001). BR'nin diğer proton pompaları ile karşılaştırıldığında basit yapısı, onu ideal bir model haline getirmektedir. BR'nin özellikleri sayesinde; güneş ışığından elektrik üretimi, deniz suyundan tuz giderimi, kimyasal ve biyosensörlerde kullanılması ve ultrahızda ışık saptanması gibi alanlarda da kullanılma potansiyeli vardır (Özcan 2004).

BR veya rodopsinin, insan sinir sisteminde restorasyon ve fonksiyonları iyileştirme amacıyla kullanılması için yapılan teknik çalışmalar; nöronları bağlantılamak, algılarını modifiye etmek için geliştirilen araçlar, nöronlar arasında köprüler ve köprü anahtarları oluşturmak, sensör arayüzlü entegre bağlantı devreleri oluşturmak ve enerji dönüştürücü olarak kullanılmak şeklinde sıralanabilir. BR bazlı kimyasal algılayıcı araçlar, BR'nin kolektif tepkisine ve mutantlarının çokluğuna dayanır. BR'deki tepki farklılıkları, çok hassas ve seçici bir kimyasal sensör teknolojisine zemin hazırlamaktadır. Bunlara ek olarak; optik ızgara, desen oluşturucu, ışın şekillendiricisi, veri depolama, dolandırıcılığa dayanıklı optik veri taşıyıcıları, güvenli mürekkep, optik anahtarlar, düşük eşikli lazerler, güneş pilleri, fotovolt hücreleri ve moleküler nanoelektronik devreler için patentlenen BR uygulamaları bulunmaktadır (Trivedi *et al.* 2011).

#### **2.4.5.a. Bakteriyorodopsin'nin kullanıldığı nano araçlar ve uygulamaları**

BR, uygulamalarının çoğunda mor membran (PM) formunda kullanılır. BR'nin mor membran halindeki kristalin paketinden ayrılması onun kimyasal ve termodinamik stabilitesini önemli ölçüde azaltır.

**Nano motorlar;** BR'nin proton transport sistemi, moleküler boyutta sitokrom oksidazıyla uyumlandırılarak elektromotiv güç oluşturmakta kullanılabilir (Pandey 2006). Moleküler seviyede fotoelektrik dönüşüm elemanı bakteriyorodopsinin nanobiyo malzeme olarak teknik uygulamalarda kullanımı ile aydınlatma altında, tek bir bakteriyorodopsin katman başına 250 mV bir fotovoltaj üretilir ve çeşitli uygulamalar için bir gösterge ve kontrol elemanı olarak da kullanılabilir (Hampp and Oesterhelt 2004).

**Moleküler transistörler;** Günümüz yarı iletken sistemleri, moleküler elektroniklerle geliştirilerek bilgisayarlar küçük hesap makinelerine dönüşecektir. Işık hızının elektron hızından yüksek olduğu an operasyon limiti 105 GHz'e kadar yükselen, fotonik kristallere dayalı analog diot ve transistörler oluşturulabilir. Nikolai Vsevolodov ve ekibi, Biochrom adını verdikleri mikروفilm ve görüntüleme cihazını biomateryaller kullanarak geliştirmiştir. Ana unsuru BR olan birçok görüntüleme ve depolama araçları geliştirilmekte olup bu konuda birçok çalışma yayınlanmıştır. Bu yayınların çoğu hali hazırda BR kullanarak 3D depolama araçları geliştiren Robert Birge'nin laboratuvarından çıkmıştır (Pandey 2006).

**Moleküler kapılar;** Fotonla harekete geçen BR 'nin rengi ışığa göre mordan sarıya değişir. Tekrar mora dönmesi işlemi onun elektronik devrelerdeki *on-off* düğmeleri ve bilgisayar sistemlerindeki 1-0 işlemleri türünde bir anahtar olarak kullanılma ihtimalinin olduğunu göstermektedir. BR'nin ışık enerjisi elektrik enerjisine çevrilebilir. Bu konuda birçok araştırma bulunmaktadır (Pandey 2006). BR foton ile uyarıldığında güneş enerjisini elektrik enerjisine dönüştürürken Film tabanlı fotovoltaiik cihazlara gerek kalmadan alınan fotoelektrik yanıtın saptanması için elektrokimyasal hücre temelli bir sensör ve detektör olarak kullanılabilir (Trivedi *et al* 2011).

**Yapay retina;** Protein molekülü üzerinde iki farklı dalga boyuna sahip lazer ışığı, BR'yi mor ve sarı formları arasında ileri geri değiştirebilmektedir. Bu davranış şekli BR'nin yapay retinalarda protein bazlı optik bilgisayarlarda hafıza veya işlem üniteleri olarak kullanılması açısından çalışmalar oluşturulmasının sağlamıştır. Uygun şartlarda

BR kullanılarak geliştirilen bu yapay retinalar, memelilerde bulunan retinaları taklit edebilmektedir. BR'nin kullanımı; hızlı refleksler sunan fotoelektriksel sinyal oluşturulmasına ve yüksek quantum verimliliğine oryante edilmiştir. Ayrıca BR'nin tepkileri yarı iletken devrelerle eşleştirilebilmektedir. BR'nin kimyasal ve genetik metotlarla değiştirilebilmesi oluşturulan sistemin tasarımında esneklik olmasını da sağlamaktadır. SnO<sub>2</sub> jel içeren model sensör ile bilgisayar destekli görüntü sistemlerinden çok daha hızlı, yaklaşık 100µs'de görüntü işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu işlemler ekstra devrelere ve dışarıdan güç kaynağına ihtiyaç duyulmadan gerçekleştirilmiştir. *Chilin* jelinin elektrolit olarak kullanılması ise BR'yi biyolojik çürümeden de koruyarak sensör özelliklerini yıllar boyunca taşımaya olanak sağlamıştır (Pandey 2006).

Yapay retina olarak BR'nin başka bir kullanımı, optik olarak uzaysal ışık modülatörleridir. Yapay retinalarla uzaysal ışık modülatörleri doğrudan kontrol edilebilir, uzaysal ışık modülatörleri ile ışık yoğunluğu ayarlanabilir ve ışık mikroskoplarında ve holografik görüntü teknolojisinin bir parçası olarak kullanılabilir (Hampp and Oesterhelt 2004).

Genel olarak BR'nin enerji aktarımı özelliği ile; reaktörlerde ATP üretimi, deniz suyunun arındırılması, gün ışığını elektrik enerjisine çevirme uygulamalarında, fotokromik özelliği ile veri depolama, 2D ve 3D boyutlu depolama, holografik depolama, çağrışımsal hafıza, uzaysal ışık modülatörleri, desen tanıma uygulamalarında, fotokimyasal, fotoelektrik temelli teknik uygulamalarda, uzaysal ışık modülatörleri, yapay retina, optik sinir ağı bilgisayarı ve 3 boyutlu optik bellek, holografik optik bilgi kayıtları, renkleri tanımaya yönelik BR temelli renk biosensörlerinde, fotokromik malzeme olarak (örneğin, optik anahtarlar) tüm-optik cihazlar, optik bilgisayarlar gibi sistemlerde, bioelement olarak bir görüntü sensörü, ya da bir biyobilgisayar uygulamalarında, BR temelli elektronik mürekkep üretiminde olmak üzere birçok nanoteknolojik uygulamaları bulunmaktadır (Hampp 2000).

## 2.5. BR Üreten Halofilik Arkeler

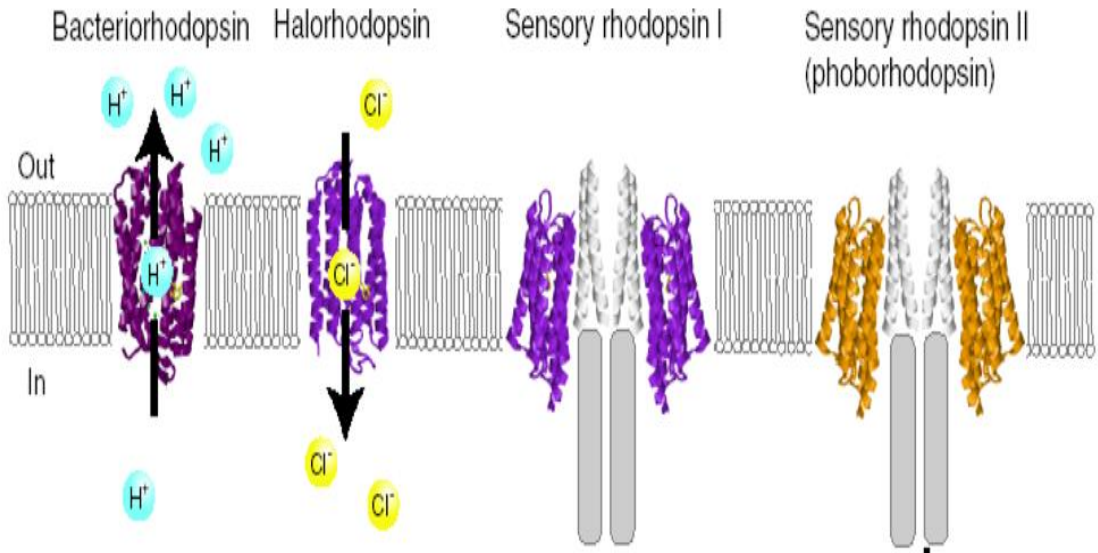
Yaşamın, mikrobiyal boyutta fiziksel ve kimyasal sınırlarının daha geniş olduğu yapılan araştırmalar sonucunda gözlemlenmiştir. Bazı organizmalar yüksek sıcaklık, yüksek tuz, yüksek basınç, düşük sıcaklık, asidik ve alkali pH gibi ekstrem şatlarda yaşamını sürdürebilmektedir. Bu canlılara ekstremofil ismi verilmiştir. Ekstremofiller arasında yüksek tuz doğunluğunda yaşayan mikroorganizmalar ise halofillerdir (Rainey, Oren 2006).

Hücrelerin moleküler boyutta incelenmeye başlanması ile birlikte, hücresel yaşamın gelişimi; arkeler, bakteriler, ökaryotlar olarak üç sınıf altında tanımlanmıştır. Böylece ekstrem şatlarda yaşayan halofilik arkelerin, prokaryotik olmalarına rağmen bakteri sınıfına girmediği belirlenmiştir. *Archaea* domaini altında *Euryarchaeata* filumunda *Halobacteriales* ordosuna ait ekstrem tuz yoğunluğunda yaşayan halofiller, aynı zamanda tuz gölleri, ve tuzlaların pembe görüntüsünde sebep olan canlılardır. Yaşamlarını sürdürmek için minimum 1,5 M NaCl gereken bu canlılar; üçgen, çubuk, kare gibi şekillerde doğada bulunur. Katalaz ve oksidaz işlemlerini gerçekleştiren, kemoorganotrofik karakterde olan canlılardır (Yıldız 2008).

Arkaik Çin eserlerinde denizden tuz üretimi için oluşturulan tuzlarda suyun kızardığına dair bilgiler yer almaktadır. Bu günümüzde bu kızarıklığa neden olduğunu bildiğimiz halofilik arkelere ait bilinen ilk bilgidir (Çakıcı 2004).

Tuz konsantrasyonu, tuzların iyonik özellikleri, halofilik arkelerin yaşam alanlarını belirleyen ana etmenlerdir. Dünya üzerinde halofilik arkeler; tuzlalar, yüksek tuzlu topraklar, deniz ve tuz gölleri gibi doğal ortamlarda yaşamaktadırlar. Halofilik arkelerin kitleler halinde üredikleri en asidik ortamın İsrail'deki Ölü Deniz olduğu ve pH'ı yaklaşık 6.0 civarında olduğu belirtilmiştir. Magadi gölü (Kenya), Wadi Naturn gölü (Mısır) gibi hiper tuzlu, yüksek pH değerlerine sahip dünyanın önemli tuzlu gölleri aşırı tuzlu ortamlara örnektir (Bayramoğlu ve Çivi 2012).

Bu habitatlarda yaşayabilen canlı çeşidi çok az olduğundan, ortamdaki besin kaynağı, *halobacterium* üremesi ve oksidatif şartlarda yaşam sürmesini sağlar. Besin kaynağı ve oksijen zamanla tükendiğinde, geriye kalan ana enerji kaynağı yalnızca güneştir. Normal yaşamlarını kemotrofik olarak sürdüren Halobakterilerin bu duruma adaptasyonu, gelişmiş fototrofik kapasitesi sayesinde gerçekleşir. 4 retinal pigment (Şekil 2.9.) içeren protein sayesinde fototrofik yaşam döngüsü oluşturulur. Bunlar; *bakteriyorodopsin* (ışıkla çalışan dış proton pompası), *halorodopsin* (ışıkla çalışan iç  $Cl^-$  pompası) ve 2 adet *sensör rodopsin* (ışığa duyarlı fototaksis olayına katılırlar) (Dai *et al.* 2009). Mor pigmentli BR, *Halobacterium salinarum* ve *Halorubrum sodomense*'de hücre membranında bulunur (Çakıcı 2004).



**Şekil 2.9.** Halofilik arkelerin hücre membranında bulunan 4 retinal pigment

\*1) Bakteriyorodopsin 2) Halorodopsin 3) Sensör rodopsinler (I – II)(Anonymous 2014)

*H. salinarum* normal şartlarda obligat aerobik bir canlı olmasına rağmen, oksijen azaldığında ya da bittiğinde, ışık altındayken; membran yapısında bulunan BR sayesinde, ışık enerjisinden faydalanarak, metabolik faaliyetleri için gerekli olan kimyasal enerjiyi (ATP) üretir. Ayrıca bulunduğu ortamda kırmızımsı-pembemsi renk oluşmasını sağlar (Şekil 2.10). Doğada tuz konsantrasyonunun yüksek olduğu ekolojilerde osmotik denge oldukça farklı özellikler taşımaktadır. Deniz suyu yaklaşık

%3 oranında NaCl ve diğere mineral ve elemntleri içerir. Denizde bulunan mikroorganizmalar ihtiyaç duydukları deniz suyu özelliklerinin yanında özel sodyum iyonlarına da gereksinim duyarlar. Halofillerin gelişimi için de, belli bir miktar NaCl'ye ihtiyaç vardır. Ancak halofillerin türlerine göre bu miktar farklılıklar göstermektedir. Örneği %1-6 zayıf, %7-15 orta düzeyde NaCl gereksinimi duyan sırasıyla zayıf halofil ve ılımlı halofil olarak adlandırılır. Ekstrem halofiller ise; %15-30 NaCl gereksinimi duyar (Madigan and Martinko 2005).

Düşük su aktivitelerinde yaşayan mikroorganizmaların çevresinden su sağlayabilmeleri için ihtiyaçları olan şey hücre içi çözünür konsantrasyonu artmasıdır. Hücre içi çözünür konsantrasyonun artmasının iki yolu vardır inorganik iyonların çevreden hücre içine pompalanması ya da organik çözünür sentezi veya bunların konsantre edilmesidir. Bu mekanizmalardan herhangi birini kullanan pek çok organizma vardır.

### **2.5.1. Ekstrem halofillerin buldukları ortamlar**

Ekstrem halofil terimi bu organizmaların yaşamaları için çok yüksek miktarda tuza ihtiyaç duyduklarını belirtmek için kullanılmaktadır. Hatta bazen bu organizmalar diğünluğa yakın miktarda tuza ihtiyaç duyabilirler. Ekstrem halofillerin üreyebilmeleri için en düşük tuz doğünluğu 1.5 M NaCl'dir bu rakam yaklaşık %9'a tekabül etmektedir (deniz tuz yoğunluğu %3). Optimum üreme 2-4 M NaCl doğünluğunda gerçekleşir. Ekstrem halofillerin tamamına yakını NaCl'in doğünluk sınırı olan 5,5 M'de üreyebilmektedir. Dünya üzerinde aşırı tuzlu Habitatlar oldukça yaygındır. Buna rağmen ekstrem aşırı tuzlu ortamlara az raslanmaktadır. Bu tür ortamlar dünyada genelde sıcak ve kuru bölgelerde bulunur. Tuz göllerin iyonik kompozisyonu gölün bulunduğu konumun genel iklimsel şartlarına topoğrafyasına ve jeolojisine bağlı bir şekilde değişir. Örneğin; deniz suyunun yoğun yoğunlaşmış hali olan Utah'da (ABD) bulunan Büyük Tuz Gölü'ndeki (Great Salt Lake) iyon konsantrasyonu çok yüksek olmakla birlikte, oransal olarak deniz suyu ile benzer miktardadır. Bu gölde; baskın anyon; klor, baskın katyon, sodyum buna ek olarak hafif alkali pH'da bile önemli miktarda sülfat bulunmaktadır. Ancak bunun yanında başka bir aşırı tuzlu ortam olan

ölü deniz ise çok düşük miktarda sodyum ve yüksek miktarda magnezyum içermektedir (Madigan and Martinko 2005; Yıldız 2008).

Bazı halofilik mikroorganizmalar sadece spesifik çevrelerde yaşarken bazıları farklı ekolojilere yaygın bir şekilde gelişim göstermektedir. Bununla birlikte tuz gölleri çok zor şartlara sahip olarak görünmesine rağmen üretken ekosistemlere sahiplerdir (yüksek miktardaki CO<sub>2</sub> fiksasyonu, ototrofi). Bu ekosistemlerde yaşayabilen tek mikroorganizmalar arkeler değildir. Aynı zamanda bazı alg çeşitleri ve bakterilerde bu sistemlerde yaşayabilmektedir.



**Şekil 2.10.** Konya Şereflikoçhisar yakınlarında çalışma için numune alırken çekilen pembemsi tuz gölü fotoğrafı



#### 2.5.4. Mikroorganizma sistematğinde kullanılan moleküler yöntemler

Halofilik prokaryotlar, yaklaşık %10'luk NaCl yoğunluğundan doygunluğa kadar, hatta bazıları tuz kristalleri üzerinde olmak üzere yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşarlar. Bu nedenle bu organizmaların kültürasyonu ya da moleküler markerlar kullanılarak tespit edilmesi için, standart tekniklere ek iyileştirmeler yapılması gerekmektedir. Birçok mikroorganizmanın kültürasyonuna dayanıklı olması, mikrobiyal toplulukların moleküler karakterizasyonunda ve bu mikropların dinamikleri ve kompleksitelerinin tahmin edilmesinde önemli bir etkidir. Moleküler tekniklerdeki; PCR ve RNA hibridizasyonu gibi son gelişmeler kültüre edilmemiş taksaların tanımlamasında ve bu canlıların anahtar fonksiyonel gen tanımlamalarının yapılmasını sağlamıştır. Bu metotlar, sekans polimorfizmine ya da bütün canlılarda farklı olan genomlara ve spesifik genlerin bulunduğu değişken bölümlerin amplifikasyonuna dayanır. Mikrobiyal toplulukların incelendiği süreç içerisinde, farklı uzunluklarda PCR ampliconlarının üretilmesi sağlanmıştır ve bu ampliconlar bazı teknikler ile ayırt edilir. Genelde PCR reaksiyon prosedürü, üniversal ya da spesifik primerleri olan 16 rRNA geninin farklı porsiyonlarının amplifikasyonundan oluşur. PCR ürünlerinin boyut analizi; gradyan jel elektroforezinin denatüre edilmesi (DGGE) fragman uzunluğunun terminal kısıtlanması (T-RFLP) ve uzunluk heterojenliği (LH) gibi birkaç yöntem ile yapılır. Tuzlarda yaşayan halofillerin ilk moleküler tanımı Benlloch *et al.* (1995) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bir diğer çalışmada; enzimlerin kısıtlanması yöntemi ile DNA kesimi yapılarak elde edilen sonuç elektroforez ile poliakrilamid jeller üzerinde ayrıştırılmıştır (Litchfield *et al.* 2006).

Halofilik arkelerin izolasyonu ve laboratuvar kültürasyonu bazı önemli teknik zorluklar içerir. Yüksek tuzluluk oranı ve inkübasyon sıcaklıkları örneklerin kristalize olmasına ve deney için gereken eklentilerin kullanımının sınırlandırılmasına neden olur. Ortamın kuruluşu minimum olmadığı takdirde, tuzluluk oranı inkübasyon periyodunu uzun sürecek şekilde değişecektir. Bu durum kendi optimum tuz konsantrasyonunda dahi yavaş gelişen bu organizmaların bu organizmaların gelişmesini iyice yavaşlatmaktadır. Yine de Haloarkelerin büyük bir kısmı hiper tuzlu sularda izole edilmiştir. Bunlar içinde

*Halobacteriae* familyasının 18 üyesinin neredeyse hepsi yer almaktadır. Bakteri domaininin halofilik üyeleri de bu ekolojilerin prokaryotik topluluğunun %25'e kadar olan kısmını oluşturmaktadırlar. Bu canlılara örnek olarak kamçılı yeşil alg *Dunaliella* örnek verilebilir (Burns and Dyal 2006).

Bakterilerin tanılmasında ve filogenetik akrabalıkların ortaya konulmasında, bakterilerin fenotipik özelliklerini gösteren klasik yöntemler, yaygın kullanımlarına rağmen tek başlarına yeterli değildir. Bu açıdan, nükleik asitleri ve mikroorganizmaları içeriksel açıdan araştıran moleküler yöntemlerin kullanılması tanılmanın kesin doğruluğu açısından önem teşkil etmektedir. Gelişen teknoloji ile beraber, yeni moleküler mikrobiyal tanı tekniklerinin geliştirilmesi hızlanmıştır. Moleküler yöntemler ile, karbohidratları, lipitleri, proteinleri ve DNA-RNA nükleik asit materyalleri araştırılmaktadır. Mikroorganizmaların daha spesifik ve sistematik şekilde tanımlarını yapmak bu yöntemler sayesinde mümkün olmaktadır. Ayrıca, güvenilir sonuçlar alınması, pratikliği, kısa zamanda ve tanı verimliliğinden dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Orhan 2013)

#### **2.5.4.a. Mikroorganizma sistematüğinde genotipik materyallerin kullanımı**

Mikroorganizma sistematüğinde moleküler yöntemler DNA ve RNA gibi nükleik asitleri kullanarak, araştırmalar yapılmaktadır. Diğer hücre içi moleküllerin veya hücre dışına salgılanan materyallerin kullanımından farklı olarak nükleik asitler hücrenin gelişiminden daha düşük etkilenme ihtimaline sahiptir. Bu nedenle DNA ve RNA molekülleri, sistematik oluşturulmasında daha net sonuçlar vermektedir. Mikroorganizma sistematüğinde kullanılan yöntemler aşağıdaki gibidir (Orhan 2013).

#### **2.5.4.b. DNA baz içeriğinin belirlenmesi**

Adenin, timin, guanin ve sitozin gibi DNA nükleotidlerinin diziliminin belirlenmesi sistematik çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA yapısı içinde adenin bazının, timin bazı ile guanin bazının, sitozin bazı ile eşli çift zincirli yapısından dolayı A/T ve G/C eşleri

her zaman 1 rakamına denk olarak kabul edilir. Fakat G+C/A+T oranı mikroorganizmalarda farklılık göstermektedir. Lee *et al.* tarafından (1956) sistematikte kullanılan ilk moleküler tabanlı teknik G+C yöntemine dayalıdır. Bu yöntem; fenotipik özellikleri aynı gözükten mikroorganizmaların dahi genotipik farklarını ortaya çıkarmaktadır. G+C içeriği prokaryotik mikroorganizmalar arasında %20-80 arasında değişmektedir. Bu değer baz alınarak, iki mikroorganizma arasında bu değerlerde görülen farklılıklar bu organizmaların filogenetik olarak farklı olduklarını göstermektedir (Orhan 2013).

#### **2.4.5.c. 16s rDNA dizisinin belirlenmesi**

Ribozomal RNA bilgisini taşıyan rDNA geni, son yıllarda mikroorganizmaların sınıflandırılmasında biyomarker olarak kullanılmaktadır. Araştırmacılar tarafından rDNA dizisinin sık tercih edilmesinde; Ribozomal RNA'ların tüm canlıların protein sentezinde önemli rol oynaması, bu genetik yapıların tüm canlılarda primer ve sekonder kopyalarının fonksiyonel olarak korunmuş olması ve PCR, sekans uygulamaları ile belirlenebiliyor olması gibi avantajları rol oynamaktadır. 16s evrensel primerleri kullanılarak mikroorganizmalar arasındaki filogenetik akrabalık dercesini belirlemek amacıyla 16s rDNA gen bölgesi, PCR cihazında çoğaltılıp, gen bankasındaki diğer sıralarla karşılaştırılarak analizleri yapılmaktadır. Bu gen yaklaşık 1500 nükleotidden oluşmaktadır ve her mikroorganizmanın belirli bir gen dizisi bulunmaktadır (Orhan 2013).

#### **2.4.5.d. Ekstra kromozomal elementlerin mikroorganizma sistematğinde kullanılması**

Halkasal yapıdaki genetik yapıtaşları plazmit olarak adlandırılmaktadır. Ekstra kromozomal elementler olan bu plazmitler mikroorganizmaların karşılaştığı radyasyon, kuraklık, antibiyotik gibi olumsuz şartlarda bu organizmalara avantaj sağlayan bazı özellikler sağlamaktadır. Aynı zamanda bu elementler transformasyon, transdüksiyon, konjugasyon gibi doğal süreçlerde mikroorganizmaya aktarılabilirler. Bu nedenden

ötürü mikroorganizma sistematüğinde ekstra kromozomal elementlerin tek başına kullanılması sağlıklı sonuçlar vermeyebilir. Ancak diğer test sistemleri ile kullanılması daha doğru sonuçların alınmasını sağlayabilir (Orhan 2013).

#### **2.4.5.e. DNA hibridizasyonu**

Nükleik asitlerin hibridize edilmesi ile mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişki gün yüzüne çıkarılabilmektedir. Bilinmeyen bir mikroorganizmanın gerçekleştirilen tüm fenotipik ve genotipik testlere rağmen tanımlaması mümkün değil veya elde edilen sonuçlar birbirini destekleyen bir durumda değilse bu yöntem daha kesin sonuçlara ulaşmak için uygulanmaktadır. Bir mikroorganizmanın DNA kompozisyonu yavaş bir şekilde ısıya maruz bırakıldığında bazıları bağlayan hidrojen molekülleri çözünür ve polinükleotid iplikçiğın ayrışmasına neden olur. Bu duruma DNA denatürasyonu denir. Bu işlemin ters olarak gerçekleştirilmesi işleme ise renatürasyon denir. Genomlar arasındaki DNA benzerliğine dayanan bu işlemin tüm aşamalarında 6-18 nükleotid uzunluğunda olan ve spesifik DNA baz çiftlerine bağlanan işaretli probler kullanılarak son aşamada bu işaretlerin bağlandığı hibridizasyon bölgeleri saptanır. İki mikroorganizma arasındaki akrabalık oranı DNA+DNA hibridizasyon oranıyla doğru orantılıdır (Orhan 2013).

#### **2.4.5.f. Mikroorganizma sistematüğinde genomik DNA parmak izi analizlerinin kullanılması**

Genomik DNA parmak izi analizleri genom çalışma materyallerinin hepsi kullanılarak yapılır. Bu yöntem sayesinde referans alınan mikroorganizma üzerinde çalışılan mikroorganizmayla parmak izi eşleşmesi sağlanması halinde mikroorganizmanın türü ve tür içindeki genotipik çeşitliliği ortaya konulmaktadır. Genomik DNA parmak izi analizi; DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilip, PCR yöntemi kullanılarak genom içindeki tekrarlı dizilerin çoğaltılması ile gerçekleştirilmektedir (Orhan 2013).

Genomik DNA'nın restriksiyon analizi ile parmak izinin çıkartılması; mikroorganizmanın bünyesinde bulunan bütün genetik moleküller restriksiyon enzimleri ile kesilir. Restriksiyon enzimleri DNA'nın özel palindromik sıralarını tanıyarak kesen enzimlerdir. Aynı zamanda bu işleme düşük sıklıklı restriksiyon fragman analizi de denilmektedir. Mikroorganizma gruplarının farklı restriksiyon fragmanlarından oluşan parmak izleri bu işlem sayesinde gözlemlenir. Ortaya çıkan restriksiyon fragmanları agaroz jel elektroforezinde büyük boyutlarından dolayı ayrılamadığından, pulse fields jel elektroforezinde (PFGE) ayrıştırılırlar. Oluşan restriksiyon fragmanları sayısal analiz yöntemleri ile karşılaştırılarak tür içindeki benzerlik grupları ortaya çıkarılır. Bu yöntem southern blot hibridizasyonu ile de etkin bir şekilde kullanılabilir (Orhan 2013).

PCR yöntemi kullanılarak DNA parmak izinin çıkarılması; Mikroorganizmaların genomlarındaki korunmuş bölgelerin çoğaltılması sayesinde oluşturulan parmak izleri mikroorganizma karışımlarında bulunan bireylerin genetik çeşitliliği hakkında gereken bilgi sağlanmaktadır. Bu yöntem sayesinde, seçilmiş primerler ve reaksiyon şartları mikroorganizmaların alt tür seviyesine kadar ayrımının yapılmasını sağlamaktadır (Orhan 2013).

## **2.6. Nanoteknolojik Görüntüleme ve Karakterizasyon Teknikleri**

Hücreye bağlı molekülleri görüntülemek için çeşitli teknikler kullanılır.

### **2.6.1. Optik mikroskop teknikleri**

Optik mikroskoplar genelde mikron seviyesindeki materyalleri belirli çözünürlükte görüntülemek için kullanılır. İleri düzeyde görüntüleme ışık dalga boyundaki limit ve sapmalardan dolayı gerçekleştirilememektedir. Bundan dolayı, Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Taramalı tünelleme mikroskobu (STM), Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) sub-mikron boyutlarda moleküllerin görüntülenmesi için geliştirilmiştir. Bu tekniklerin çalışma prensipleri

birbirinden farklı olmasına rağmen moleküler seviyede iyileştirilmiş yüzey görüntüsü yalnızca bu cihazlar sayesinde alınabilmektedir (Joshi *et al.* 2008).

### **2.6.2. TEM görüntüleme tekniği**

Elektron ışınlarının ultra ince numune içinden interaktif şekilde iletilerek görüntü alınmaktadır. Örnek boyunca gönderilen elektronlar sayesinde oluşan görüntü objektif lens tarafından iyileştirilip odaklanarak, görüntü ekrana aktarılmaktadır (Joshi *et al.* 2008).

### **2.6.3. SEM görüntüleme tekniği**

Örnek yüzeyini yüksek enerji eşikli elektronlar ile tarayan elektron mikroskopudur. Standart mikroskoplar görüntüleme işlemi için ışık dalgalarını kullanırken, SEM elektron dalgalarını görüntü oluşturmak için kullanır. Polimer, nanokompozit, nanofiber, nanokaplama, nanopartikül gibi materyallerin yüzey yapısı SEM ile yüksek çözünürlükte görüntülenebilmektedir (Joshi *et al.* 2008).

### **2.6.4. AFM ile görüntüleme özellikleri**

Hücre içindeki yapısal dinamikleri görüntülemek için gereken; daha içeriden ve hızlı aktif tekniklerdir. Bu noktada AFM tekniği daha bütünleşik bir sisteme sahiptir. Sınıflandırılmış organik örnekleri nano altı değerlerde görüntüleme imkanlarına sahiptir. Son gelişmeler AFM'nin canlıların moleküler ve hücreSEL yapılarını araştırmak için yeni fırsatlar sunduğunu göstermektedir. Yaşayan hücrelerin mimari yapılarını gösterebilmek, onların *in vivo*'da moleküler organizasyonlarını görüntüleyebilmek için AFM yeni bir bakış açısına sahiptir. Mesela; S-layerlar, *peptidoglikan* yapılar ve bazı sporlar AFM tarafından direkt olarak görüntülenebilmektedir. AFM'de yüksek çözünürlüklü görüntüleri kaydetmek birçok biyolojik işlemin süresinden daha fazla zaman isteyen bir işlemdir. Ancak yaşayan hücrelerdeki moleküler yapıların görüntülenmesi, AFM ile henüz başılamamıştır. Yüksek hızlı AFM(HS-AFM)

biyomoleküllerin yapısını görüntülemek için geliştirilmiştir. HS-AFM'deki gelişimler proteinlerin in vitro şekilde görüntülenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bakteriyel hücrelerden elde edilen membran proteinlerinin özellikleri, yüksek çözünürlükte görüntülenebilmiştir (Shibata 2010; Yamashita *et al.* 2012)

## 2.7. Sulu İki Fazlı Sistem (ATPS)

Faz; Bir sistemin diğer kısımlarından sınırlarla ayrılmış olan, fiziksel olarak belirgin bir bölümdür. Örneğin, su ve su\* buharından oluşan bir sistemde, su ve buhar birer faz oluşturur. Çok fazlı sistem: Birden fazla faz içeren sistemlere denir. İçerdiği faz sayısına göre adlandırılır. Örneğin 2 faz içeren sistem, "2 fazlı sistem", 3 faz içeren sistem ise "3 fazlı sistem" adını alır (Gönül 2000). Hidrofilik polimerlerin çoğu, su bazlı çözeltilerle uyumlu olmadıklarından bir arada bulunan iki çözelti arasında bir sınır oluştururlar (Hatti and Kaul 2000).

Biyomolekül üretiminde saflaştırma işlemi önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu nedenden ötürü; filtrasyon, santrifüj, kurutma gibi çeşitli teknikler bulunmaktadır. BR saflaştırılırken kullanılan ATPS'nin düşük maliyet, yüksek verim, enzimatik aktivitelerin korunması gibi pek çok avantaj barındırması, sistemin pek çok çalışmada kullanılmasını sağlamaktadır (Shiu *et al.* 2014)

Sulu iki faz sistemlerin üç temel uygulaması vardır; Biyomolekülün bulunduğu ortamın konsantrasyonu, saflaştırma ve biyo-dönüşüm. Sulu iki faz sistemler; iki polimerin birbiriyle ya da bir polimerin tuz ile belirli oranlarda hazırlanmış çözeltilerinin karıştırılması sonucu elde edilmektedir. Bu sistemlerde her faz bir bileşenin zengin konsantrasyonunu içerir. Bu faz sistemlerinde en önemli özellik; fazlar arasında %85-99 arasında değişen oranlarda su içermesi ve farklı biyomoleküllerin yapılarında bir değişiklik oluşturulmadan saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır (Dilan ve Gündüz 2001).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

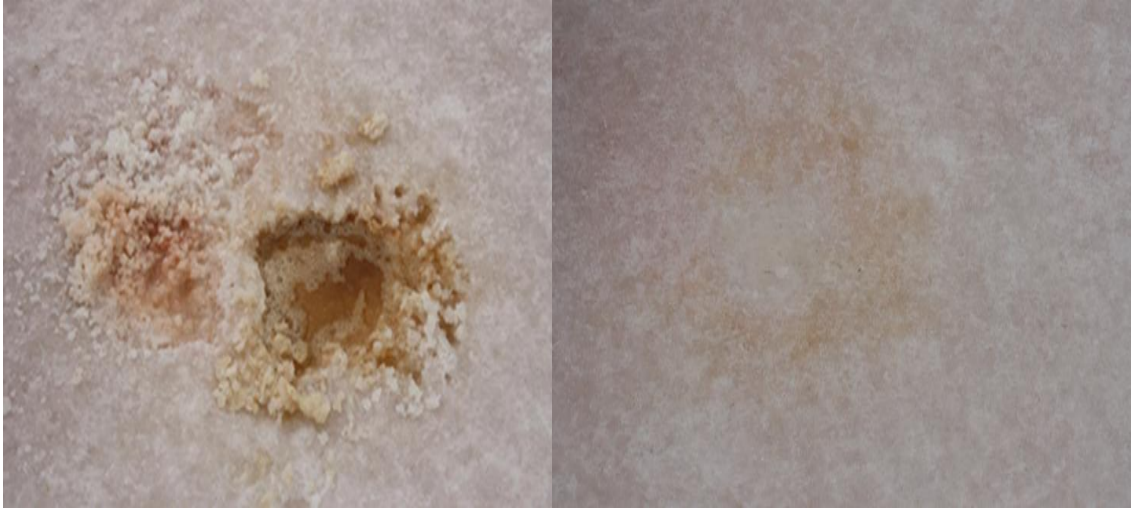
#### 3.1. Materyal

Çalışmada bakteriyorodopsin üretebilen arke izolatını elde etmek için; Türkiye'nin İç Anadolu bölgesinde, Tuz gölü, Şereflikoçhisar mevkiinde yüzey görünümü ve rengi değerlendirilerek 5 ayrı noktadan 5, 10, 30 cm derinliklerinden sıvı ve yüzeyden katı olmak üzere ayrı ayrı numuneler; 39° 4'23.15"N, 33°24'11.15"E ile 39° 2'34.85"N, 33°25'14.67"E arasında çeşitli koordinatlardan alınmıştır (Şekil 3.1, Şekil 3.2). Alınan örnekler, steril kaplara konularak laboratuvar ortamına getirilmiştir. Atlas (2010) tarafından hazırlanan Handbook of Microbiological Media kitabındaki besiyeri formülü modifiye edilerek, alınan örneklerden *H.salinarum* izolasyonu ve gelişimi için kullanılmıştır. Çalışma için gereken kimyasallar; Merck, Sigma, Sigma-Aldrich, Aldrich, Metabion International AG, Oxoid, Fluka firmalarından tedarik edilmiştir. Moleküler çalışmalarda özgün primer ve enzimler kullanılmıştır.



**Şekil 3.1.** Tuz gölünden farklı koordinatlardan numune alınırken çekilen fotoğraflar





**Şekil 3.2.** Tuz gölünden numune alınan noktaların yüzey görünümü ve rengi

### 3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

1. Otomatik pipetler (Eppendorf, GERMANY)
2. UV-Visible Spektrofotometre (PG Instrument, T80 UV/VIS Spektrofotometre, USA)
3. İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)
4. Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
5. Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
6. Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
7. Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
8. pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
9. Derin Dondurucu (Nuaire -86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)
10. Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)
11. Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)
12. Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)
13. Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
14. Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
15. Santrifüj (Hettich EBA 21, GERMANY)
16. Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)
17. Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)
18. Mikrobiyal Tanılama Sistemi (MIDI, Inc., Newark, GERMANY)
19. PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
20. Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
21. Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
22. Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)
23. Ultra Santrifüj (Beckman- Coulter ProteomeLab™ XL-A/XL-I, U.S.A.)
24. AFM (Atomik Force Microscopy) (NanoMagnetics Instruments Ltd.)

### 3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı

**İzotonik (1000 mL):** 250 g NaCl, 20 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g KCl, 1000 ml saf su içinde çözülüp, pH 7.2'ye ayarlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

**Besiyeri(katı) (1000 mL):** 250 g NaCl, 20 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 2 g KCl, 10 g bakteriyolojik pepton, 1 g maya ekstraktı, 20 g agar 1000 ml saf su içinde çözülüp, pH 7.2'ye ayarlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir (Çakıcı 2004).

**Besiyeri(sıvı) (1000 mL):** 250 g NaCl, 20g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 g Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, 2 g KCl, 10 g bakteriyolojik pepton, 1 g maya ekstraktı 1000 mL saf su içinde çözülüp, pH 7.2'ye ayarlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir (Çakıcı 2004).

**Potasyum Fosfat çözeltisi (100 mL %24):** 220 g monobazik KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8'e ayarlanarak 1000 mL saf su içinde çözülmüştür (Shui *et al.* 2014).

**PEG (Polietilen glikol) çözeltisi (100 mL %24):** %40'luk polietilen glikol solüsyonundan 120 mL alınarak üzeri deiyonize su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır (Shui *et al.* 2014).

**CHAPS 3-[(cholamidopropyl) (dimethylammonio) propane sulfonate] çözeltisi (41,4 µL, 20 mM):** 0,0123 g CHAPS Hidrat 1 mL steril saf su içinde çözülmüştür (Shui *et al.* 2014).

**STE (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 1,21 g Tris, 1,75g NaCl ve 3,72 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, 1 N HCl ile pH 8'e ayarlanıp, toplam hacim 200 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu:** 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, pH 8'e ayarlanarak, son hacim 250 ml'ye tamamlanıp otoklavda steril edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**5 M NaCl çözeltisi:** 29,22 g NaCl, 100 mL saf su içerisinde çözülerek, otoklavda steril edilmiştir (Bozoğlu 2014).**1X TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) çözeltisi:** 0,24 g Tris ve 0,074 g EDTA saf su içerisinde çözülüp, pH'sı 8'e ayarlanarak, son hacim 200 ml'ye tamamlanıp otoklavda steril edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**%10 SDS (sodyum dodesil sülfat) çözeltisi:** 10 g SDS nin 100 mL saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlanarak, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**Dimetil sülfoksit (DMSO):** %100'lük DMSO 2ml'lik eppendorf tüplere aktararak, kullanılmaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide)-0,7 M NaCl çözeltisi:** 80 mL saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlanıp, toplam hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi:** 25 mL fenol, 24 mL kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılıp hazırlanarak -20°C'de muhafaza edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi:** 24 mL kloroform ve 1 mL izoamilalkol karıştırılıp hazırlanarak, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**%70'lik Etil alkol:** 70 mL saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 mL ye tamamlanmıştır, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**Proteinaz K:** 1 mL steril distile su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlanarak, -20°C’de muhafaza edilmiştir (Bozoğlu 2014).

**5x TBE Tamponu (pH: 8):** 54 g Tris, 27,5 g borik asit ve 20 mL 0,5 M EDTA 500 mL steril distile su içerisinde çözüldükten sonra karışımın pH’sı 8’e ayarlanarak, toplam hacim steril distile su ile 1 L’ye tamamlanmıştır (Bozoğlu 2014).

**0,5x TBE Tamponu:** 100 mL 5X TBE’nin hacmi steril distile su ile 1 L’ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Bozoğlu 2014).

**Ethidium bromide çözeltisi:** 100 mL distile su içerisinde, 1 g ethidium bromide (10 mg/ml) magnetik karıştırıcı kullanılarak iyice çözülmüş, amber şişe içinde, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Orhan 2013).

**6x yükleme tamponu:** 100 mL için, %100’lük gliserolden 40 mL alınıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırılmış, hacmi 1X TBE ile 100 ml’ye tamamlanarak, otoklavda steril edildikten sonra +4°C de muhafaza edilmiştir (Orhan 2013).

**DNase (Deoxyribonuclease) Solüsyonu:** 2000 U liyofilize DNase 1 ml distile su ile çözülmüş ve -20°C’de muhafaza edilmiştir (Shui *et al.* 2014).

**1 M 100 mL’lik Tris-HCl çözeltisi (pH:8.8):** 12.11 g Trizma tartıldı, 80 mL saf suda çözülmüştür. pH’sı 8.8’e ayarlanarak son hacmi 100 mL’ye tamamlanmıştır (Bozoğlu 2014).

**%30 Akrilamid ve Bisakrilamid (%30-%0.8) çözeltisi:** 30 g Akrilamid ve 0,8 g Bisakrilamid tartılıp, 128 mL dH<sub>2</sub>O içerisinde çözümlenerek, 37°C’de karıştırılmıştır. 0,45 µm filtre kağıdı ile filtre edilerek pH’sı 7’ye ayarlanmıştır (Bozoğlu 2014).

**Coommassie Brilliant Blue G250 reaktifinin hazırlanması (Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):** 100 mg Coommassie Brilliant Blue G250, 50 mL %95’lik etanolda çözümlenerek üzerine 100 mL %89’luk fosforik asit ilave edilmiştir. Daha sonra çözeltinin hacmi saf su ile 1 litre’ye tamamlanmıştır (Bozoğlu 2014).

**Elektroforezde kullanılan Boyama çözeltisi:** 50 mL metanol+10 mL asetik asit pipet vasıtasıyla alınarak 40 mL saf su içerisinde, 0,1 g Commassie Brilliant Blue reaktifi ile birlikte çözülmüştür. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır(Bozoğlu 2014).

**Elektroforez çözeltisi:** 50 mL metanol+10 mL asetik asit + 40 mL saf su, pipet vasıtasıyla alınarak, küçük beher içerisinde iyice karıştırılmıştır (Bozoğlu 2014).

**%10 SDS çözeltisi:** 10 g SDS tartılıp, 50 mL saf su içerisinde ısıtılarak çözülmüştür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Bozoğlu 2014).

**Ayırma jelin hazırlanması:** 15 mL 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 10,7 mL %30'luk akrilamid, %0.8'lik bisakrilamid, 0,61 mL %0.1 SDS ve 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin), 11,9 mL suda karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1.5'lik amonyum persülfat (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ilave edilmiştir (Bozoğlu 2014).

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Halofilik arke izolasyonu ve kültürü

Tuz gölünden alınan sıvı numunelerden 1 ml, katı numunelerden 1 g tuz, aseptik olarak alınıp, 9 mL steril izotonik çözelti ile süspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyondan 1 ml alınıp, tekrar 9 ml steril izotonik çözeltisine aktarılarak, 10<sup>-1</sup>-10<sup>-3</sup>'lük seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Seyreltisi hazırlanan numunelerden, katı ve sıvı besiyeri ortamlarına 2 paralel olacak şekilde ekim yapılmıştır. İnkübasyonlar; 37°C'de, 40 W gün ışığı aydınlatması kullanılarak, sıvı besiyerleri 150 rpm'de çalkalanarak, inkübe edilmiştir (Shiu *et al.* 2013). İnkübasyonun yaklaşık 4. gününden itibaren sıvı besiyerlerinde üreme, 9-15 gün sonra ise pembe-kırmızı renklenme gözlemlenmiştir.

### 3.2.2. Halofilik arkenin moleküler karakterizasyonu

#### 3.2.2.a. Halofilik arke genomik DNA'sının izolasyonu

Bozoğlu 2014 tarafından uygulanan izolasyon metodunun modifikasyonu ile arke DNA izolasyonu aşağıda belirtildiği gibi gerçekleşmiştir.

1. Steril ependorflarda, 2 ml sıvı kültürden sanrifj ile elde edilen arke hücre peleti üzerine 1000 µl STE tamponu, ilave edilmiştir.
2. Tp, maksimum hızda vortekslenerek homojenizasyon sağlanmıştır.
3. Vortekslenen tp, 10.000 rpm'de 10 dak süreyle santrifüjlendikten sonra, üst faz mikropipetle alınarak atılmıştır ve peletin üzerine tekrar 1000 µl STE tamponu eklenerek, 10 dak 10.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Bu işlem üst faz berrak olana kadar tekrar edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası, oluşan süpernatant alınarak peletin üzerine 500 µl STE tamponu ilave edildikten sonra mikropipetle kontrollü pipetajı sağlanarak, tamponun peletle iyice karışması sağlanmıştır.
5. Tp, 75°C'ye ayarlı su banyosunda 30 dak süreyle inkübe edilip, inkübasyonun 15. dakikasında tp alınarak, 4-5 kez alt üst edilerek tekrar inkübasyona bırakılmıştır.
6. Su banyosundan çıkartılan tüpe 50 µl %10'luk SDS ve 7 µl proteinaz K eklenerek, 40°C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.
7. inkübasyon sonrası ortamdaki tuz konsantrasyonu; 0,75-0,8 M olacak şekilde, 5M NaCl ve 0,1 hacim %10'luk CTAB/0,7 M NaCl eklenmiştir.
8. Tp, 65°C'ye ayarlı su banyosunda 15 dak inkübe edilmiştir.
9. Su banyosundan alınan tüpe eşit hacimde 25:24:1 fenol:kloroform:izoamilalkol ilave edilerek 15 dak oda sıcaklığında çalkalayıcı karıştırılmıştır.
10. Tp, 16.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendikten sonra oluşan üst faz, yeni steril ependorf tüplere aktarılarak, üzerine 0,1 hacim %10 CTAB/0.7 M NaCl eklenmiştir.
11. 65°C'ye ayarlı su banyosunda, tp 15 dk bekletilmemiştir.
12. Tüpe eşit hacimde 24:1 kloroform: izoamilalkol eklenerek, tüpler 15 dk oda sıcaklığında, çalkalayıcıda çalkalanmıştır.

13. Tüp tekrar 16.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek, santrifüj sonrası oluşan üst faz, tekrar yeni steril bir ependorfa alınmıştır.
14. Tüp üzerine 0,6 hacim izopropanol eklenmiştir.
15. Tüp -20°C'de 1 gece boyunca bekletilmiştir.
16. Buzdolabından çıkartılan tüp 15.000 rpm de 15 dk santrifüjlenmiştir.
17. Üzerine -20°C'de bekletilen %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15 000 rpm'de 15 dk süreyle santrifüjlendikten sonra süpernatant yavaş ve dikkatlice dökülmüştür.
18. Peletin üzerine yeniden %70 lik etanolden 500-600 µl eklenerek, 15 000 rpm de 15 dk santrifüjenmiştir. Süpernatant dikkatlice dökülerek tüpler ağzı açık bir şekilde etil alkolün uçması, DNA'nın kuruyarak şeffaf bir görünüm alması amacıyla 2-3 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.
19. Tamamen kuruduktan sonra, DNA'lar 50-70 µl TE içinde oda sıcaklığında 30 dk bekletilip, iyice çözünmesi sağlanarak üzerlerine 2-3 µl RNase ilave edilmiştir.
20. DNA'lar 4°C'ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.

### **3.2.2.b. DNA konsantrasyonunun ölçülmesi ve çalışma solüsyonunun hazırlanması**

260 nm'deki direkt absorbans ölçümüyle DNA miktarı belirlenip, genetik materyalin proteinlerden saflığı, 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edilmiştir.  $A_{260}$  ve  $A_{280}$  değerlerine bakılarak,  $A_{260}/A_{280}=1-1,7$  olan örnek çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır (Bozoğlu 2014).

### **3.2.2.c. DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu (µg/mL)**

Elde edilen çözeltinin DNA Konsantrasyonu; DNA kon. (µg/ml)= $A_{260} \times$  Seyreltme Faktörü (500)×50 (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak belirlenmiştir.

DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ise; İstenen Konsantrasyon (100ng/µL) × İstenen Hacim (200 µL)/Stok DNA Konsantrasyonu (µg/mL) formülüne uygun hazırlanmıştır (Bozoğlu 2014).



### 3.2.2.d. Arke izolatının 16S rRNA bölgesinin PCR ile amplifikasyonu

Test izolatından saflaştırılan Arkeal genomik DNA'nın 16S rRNA bölgesi, evrensel primerler (P1f ve P1r) kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır (Bozoğlu 2014).

### 3.2.2.e. Reaksiyonun (Master mix'in) hazırlanması

PCR'ı yapılacak örnek için 3 µl 10 x PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, %0.01 jelatin pH: 8.3), 0.6 µl dNTP (deoksinükleotidtrifosfatlar: dATP, dGTP, dCTP, dTTP – 10mM), 4 µl P1f (5'-ATT CCG GTT GAT CCT GCC GG - 3'), 4 µl P1r (5'-AGG AGG TGA TCC AGC CGC AG - 3'), 1.2 µl DMSO, 1.8 µl MgCl<sub>2</sub>(50 µM), 0.3 µM/mL *Taq* DNA polimeraz ve 12.1 µl sdH<sub>2</sub>O ile 27 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanıp, karışıma son olarak 3 µl template DNA (100 ng/µl) eklenerek son hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Barış 2009; Wen *et al.* 2009).

### 3.2.2.f. PCR programı

PCR için hazırlanan örnek, 96°C'de 3dk denatürasyon, bunu takiben 36 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 65°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama basamakları ve son olarak 72°C'de 5 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü (termocycler) cihazına yerleştirilerek, seçilen programda hedef bölgelerin amplifikasyonu yapılmıştır (Barış 2009; Wen *et al.* 2009).

### 3.2.2.g. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

1 gr agaroz üzerine 100 mL 0.5x TBE (%1'lik agaroz jel) tamponu ilave edilerek karışım mikrodalga fırında iyice çözününceye kadar kaynatılmıştır. 50°C'ye kadar soğutulan agaroz jelle 0.6 g/mL olacak miktarda ethidium bromide eklenerek, içerisine

tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine dökülmüştür. 30-35 dk beklenip, jelin donması sağlanarak, donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Ardından içerisinde 0.5x TBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Jeldeki ilk çukura, 10 kb DNA markırından [50-100-200-300-400-500-750-1000-1400-1500-2000-3000-4000-6000-8000-10000] (Sigma D-7058) 10 µl yüklenmiştir. Diğer çukurlara ise, her bir örnek için 2,5 µl 6x yükleme tamponu, 10 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklenmiştir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak, örnekler 1 saat yürütülmüştür. Jel üzerinde bulunan ve ethidium bromide ile boyanan DNA bantları jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenerek, bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edilmiştir (Bozoğlu 2014).

### **3.2.2.h. 16S rRNA gen bölgesinin sekans analizi ve gen bankasındaki verilerle karşılaştırılması**

16S rRNA PCR yöntemi ile çoğaltılan 16S rRNA gen bölgesi, *Macrogen* firmasına gönderilerek yapılmıştır. Elde edilen 16S rRNA dizileri Gen Bankasında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) değerlendirilmiştir. Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilerek, gen bankası kabul numaraları alınmıştır (Bozoğlu 2014).

### **3.2.3. Bakteriyorodopsin izolasyonu**

#### **3.2.3.a. Hücre lizatının hazırlanışı**

İzolasyon yapılırken, tüm deneyler oda sıcaklığında steril şartlar altında yapılmıştır. 150 mL'lik sıvı kültür 8000 rpm, 15°C'de santrifüj edilmiştir(Hettich EBA 21). Elde edilen hücre peleti, 68,7 µL DNase (329,6 U, Sigma-Aldrich) içeren 5 mL deiyonize su ile süspanse edilip, 30 dk boyunca iyi bir şekilde dikey tüp karıştırıcısında karıştırılarak hücre lizat çözeltisi elde edilmiştir (Shiu *et al.* 2014).

### 3.2.3.b. Mor membran izolasyonu

Elde edilen 5 mL hücre lizati çözeltisine, 10 mL %24 (w/w) potasyum fosfat çözeltisi (22 g monobazik potasyum fosfat, 2 g dibazik potasyum fosfat, pH 8) ve 10 mL %24 (w/w) polietilen glikol (PEG)8000 solüsyonu eklenip, oda sıcaklığında bir saat dikey tüp karıştırıcısı kullanılarak karıştırılmıştır. Toplamda 25 mL'lik sulu iki fazlı sistem hazırlanarak, 2 mL'lik Eppendorf tüplerine bölünmüştür. Hazırlanan bu sulu iki fazlı sistem, 8000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüj edilerek PEG zengini üst faz ile fosfat zengini alt faz arasında mor membran band elde edilmiştir. Her bir tüpte iki faz arasında oluşan mor membran bandı, otomatik pipet yardımıyla safsızlıklardan ayrıştırılmıştır (Shiu *et al.* 2013).

### 3.2.3.c. Bakteriyorodopsin saflaştırılması

Sulu iki fazlı sistem ile ayrıştırılıp toplanan mor membran ultra santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 24000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilip, mor renkte bir çökelti elde edilerek, süpernatant kısmı mikro pipet ile toplanıp mor çökeltiden ayrıştırılmıştır. Çökelti 30 mL'lik deiyonize su ile süspansiyon edilip 2 mL'lik tüplere aktarılıp, 18000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant kısımları dökülerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminden sonra, tüplerde elde edilen daha duru mor renkli çökelti pipet yardımıyla toplanıp, 10 mL deiyonize su ile tekrar süspansiyon edilerek yıkamış mor membran solüsyonu elde edilmiştir. Lipitlerden arındırmak amacıyla; hazırlanan solüsyondan 600 µL alınan numune, daha önce hazırlanan 41,4 µL 20 mM CHAPS hidrat 3-[(*cholamidopropyl*) (*dimethylammonio*) *propane sulfonate*] solüsyonu ile gece boyunca yavaş bir şekilde dikey tüp karıştırıcısı kullanılarak karıştırılmıştır. CHAPS ile muameleden sonra elde edilen bakteriyorodopsin solüsyonu 15000 rpm'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilerek, süpernatant dökülmüştür. Lipitlerden arındırılan şeffaf, mor renkli bakteriyorodopsin içeren pelet kurumaya bırakılmıştır (Shiu *et al.* 2014).

### **3.2.4. Bakteriyorodopsin karakterizasyonu**

#### **3.2.4.a. Bakteriyorodopsinin karakteristik absorbands bandının UV-Visible spektrofotometre ile belirlenmesi**

Lipitlerden arındırılan şeffaf, mor renkli bakteriyorodopsin içeren pelet 1 mL ultra deiyonize su ile süspanse edilip, kuvarz küvete aktarılarak 450- 650 nm dalga boyu aralığında UV-visible spektrofotometre ile tarama yapılmıştır. Yapılan tarama sonucunda Bakteriyorodopsinin karakteristik maksimum absorbands değeri ve bandı excel 2014 programı kullanılarak grafikte gösterilmiştir.

#### **3.2.4.b. Bakteriyorodopsinin SDS-page analizi**

Saflaştırılmış BR örneğinin moleküler ağırlığının belirlenmesi için bu işlem kullanılmıştır. Bu işlem başlangıcında elektroforez plakaları, su ve alkol ile iyice arındırılmıştır. Plakalar arasındaki bakalit bağlantılara, ince bir tabaka halinde vazelin sürülmüştür. Cam plakalar birbiri üzerine konularak, jel hazırlama cihazına yerleştirilmiştir. Seperasyon jeli hazırlanarak, plakalar arasına enjekte edilmiştir. Bu işlemler esnasında, hava almamasına dikkat edilmiştir. %10'luk SDS ile jel yüzeyinin pürüzsüz olması için ince bir tabaka oluşturuldu. Yaklaşık 30 dk. katılaşması için beklenmiştir. Katılaştıktan sonra yüzeydeki %10'luk SDS alınmıştır. Bu işlemin ardından, yağma jel üst yüzeye kadar ilave edilip, üzerine tarak dikkatlice yerleştirildikten sonra, tarağın üzeri de nemli süzgeç kağıdı ile kapatılarak bir gece bekletilmiştir. Sonraki gün tarak dikkatlice kaldırılarak, plakalar elektroforez tankına yerleştirildi (Bozoğlu 2014).

Oluşan boşluklar işaretlenerek, jelin üst kısmı; önce saf su, ardından yürütme tamponu ile yıkanmıştır. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponları yerleştirilmiştir. Örnekler, her üniteye 20 µg protein olacak şekilde hazırlanmıştır. Toplam hacim 100 µg olacak şekilde 1/1 oranında örnek tamponuna eklenmiştir. 3 dk. süre ile kaynar su banyosunda inkübe edilmiştir. Ardından numuneler soğutulmuş, çok

ince bir enjektör yardımıyla elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank kapağı kapatılarak, (+) kablo (Anot) ve (-) kablo (katot) bağlanmıştır. İlk aşamada; 30 dk'lık süre boyunca sisteme 80 voltluk akım verilmiştir. Ardından, akım 150 volta ayarlanarak, 4-5 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Akım kesildikten sonra, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice ayrılmıştır. Bu yürütme tamponu sabitleştirme çözeltisinde 15 dk süre ile bırakılarak, tekrar kullanılmak üzere saklanmıştır. Daha sonra fikse çözeltisinden alınan jel özel kabına konularak, boyama çözeltisi üstünü örtünceye kadar eklenmiştir. 45 dk kadar çalkalayıcı üzerinde bırakılmıştır. Daha sonra örnekler boyama çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisi içine konulmuştur. Belirli aralıklarda değiştirilmek suretiyle, jelin zemin rengi açılıp, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalanmıştır. Bundan sonra jeller %30'luk etil alkol içine alınarak, fotoğrafları çekilmiştir (Bozoğlu 2014).

### **1. Ayırma jeli hazırlanışı**

15 mL Tris-HCl (pH 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid- %0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>] ilave edilmiştir.

### **2. Yığılma jelinin hazırlanışı**

1 M'lik Tris-HCl'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,8 mL alınarak karıştırılmıştır. Son olarak yine günlük hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edilmiştir.

#### **3.2.4.c. Bakteriyodopsinin atomik force microscopy (AFM) ile görüntülenmesi**

*H. salinarum*' dan elde edilen mor renkli BR içeren pelet 1mL deiyonize su ile süspansiyon edilerek BR solüsyonu hazırlanmıştır. BR solüsyonu (pH 8.2) 150 mM KCl ve 10 mM

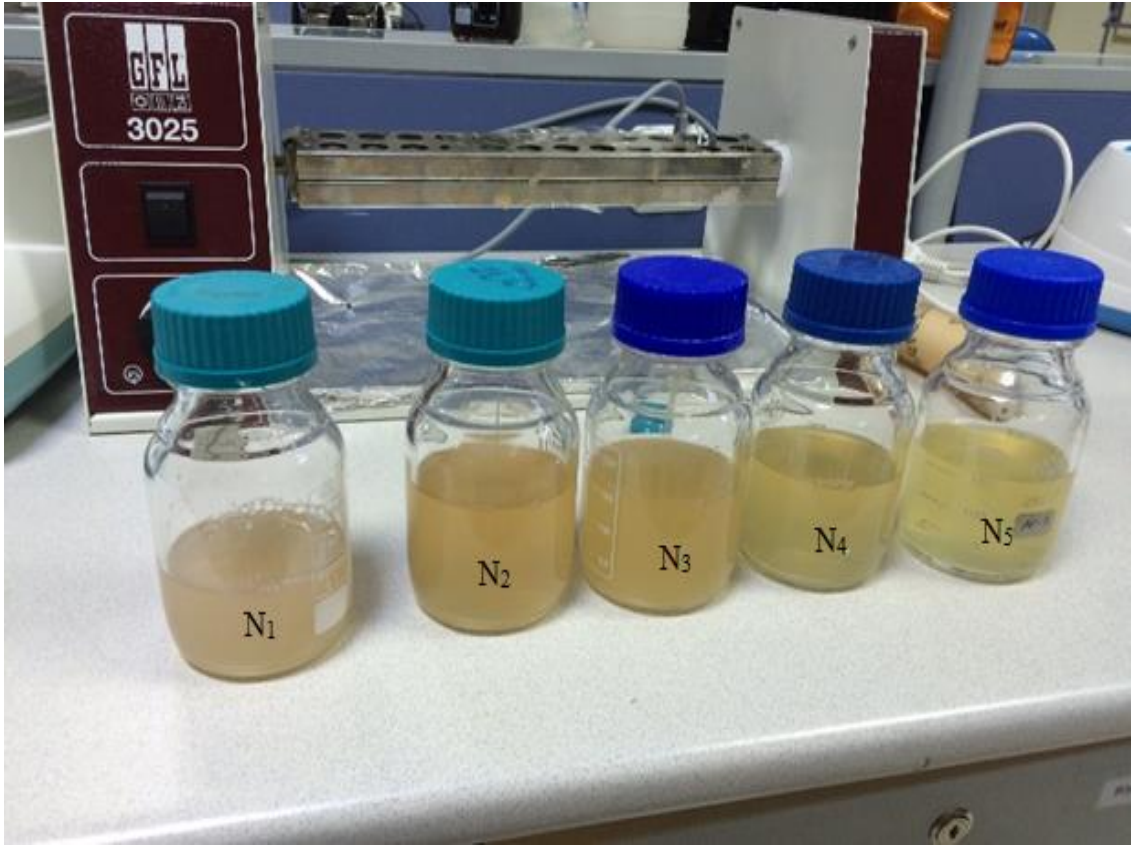
Tris-HCl ' den hazırlanan tampon içine ilave edilmiştir. Bu süspansiyondan 5 µL alınıp, 50 µL görüntüleme tamponu (300 mM KCl ve 10 Mm Tris-HCl, pH 7.8) ile karıştırılarak 1cm×1cm aseton ile yıkanıp temizlenen kuru mika üzerine pipetlenmiştir. 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra tamponların fazlası durulama ile kaldırılmıştır (Schranz *et al* 2010).

AFM görüntülemesi tapping-modda alınmıştır. Cantilever sapmasını belirlemek için kızılötesi lazerli optik ışın sapma detektörü kullanılmıştır. Lazer ışını, 50x objektif lens kullanılarak küçük cantilevere odaklandı. Cantilever 6-7 µm uzunluğa, 2 µm genişliğe, 90 nm inceliğe ve  $0.2 \text{ Nm}^{-1}$  esneklik sabitine sahiptir. Cantileverin rezonant frekansı ve sulu solüsyon içinde kalite faktörü yaklaşık 1 mHz ve 2 mHz'dir. Cantileverin serbest salınım şiddeti yaklaşık 1 nm ve set-point şiddeti, serbest şiddetin %90'ı olacak şekildedir. Tapping-mode kuvveti 30 pN'den az olduğu tahmin edilmektedir. Uç genişliği yaklaşık 1,5 nm'ye ayarlanmıştır. Uç apeksi argon gazı aracılığıyla plazma aşındırması ile keskinleştirilmiştir. AFM görüntüleri oda sıcaklığında alınmıştır. BR örneklerinin ışıklandırılması için 532 nm dalga boyunda yeşil lazer, 50x objektif lens ile aydınlatılmıştır. Objektif lensin ışık çıkış yoğunluğu 0.004-0.5 nW arasında değişken olarak ölçülmüştür (Shibata *et al* 2010).

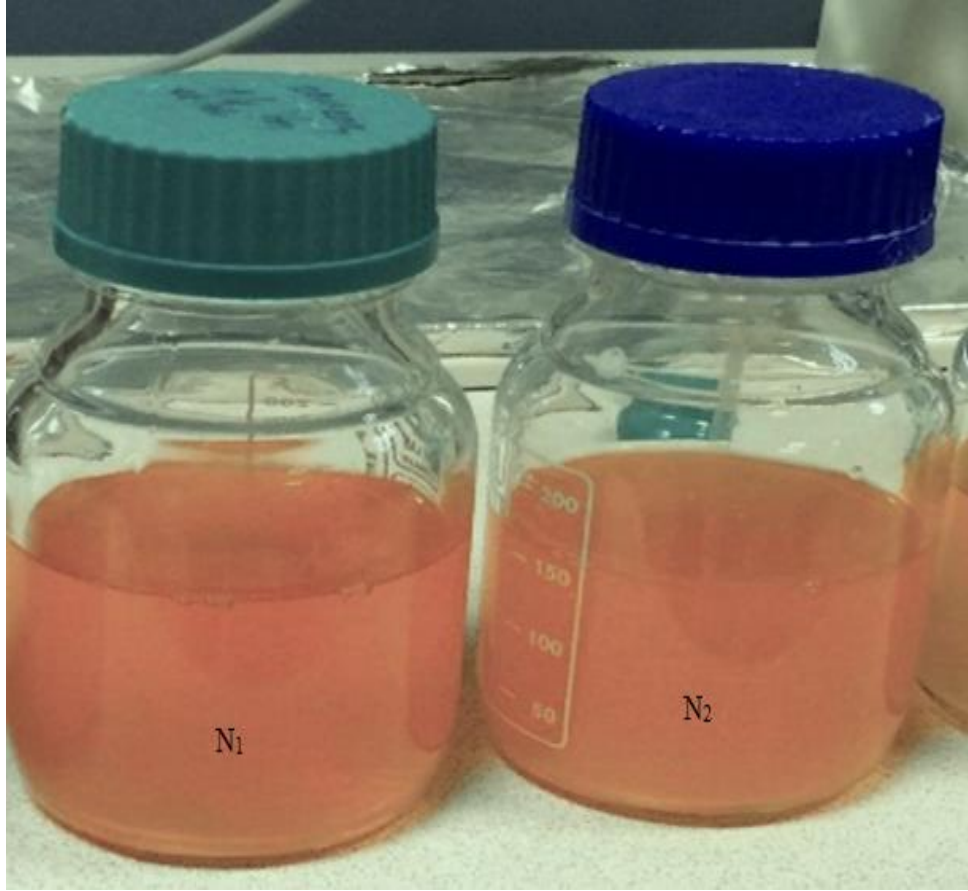
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Halofilik Arke İzolasyonu ve Kültürü Sonuçları

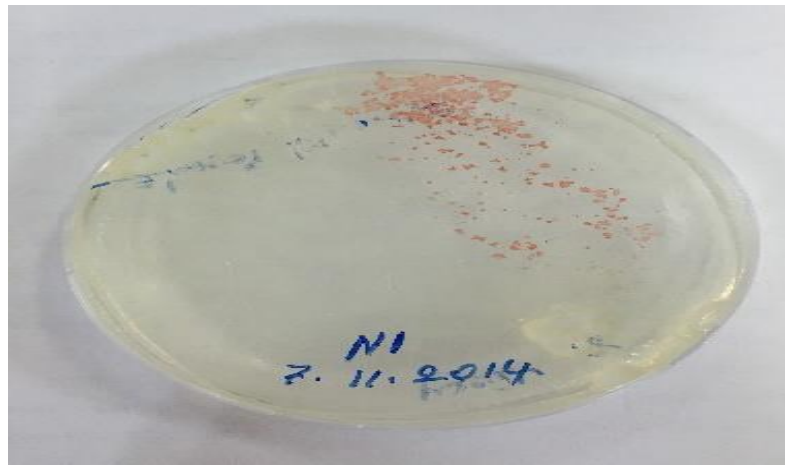
Bu çalışmada Tuz Gölü'nden, beş ayrı noktadan alınan örnekler, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub>, N<sub>5</sub> olarak kodlanmıştır (Şekil 4.1). Her bir örneğin üç ayrı seyreltisi hazırlanmıştır. İnkübasyona bırakılan örneklerden, 9-15 gün sonra, sıvı besiyerlerinden, N<sub>1</sub> ve N<sub>2</sub> de (Şekil 4.2), katı besiyerlerinden N<sub>1</sub> kodlu örnekte (Şekil 4.3), pembe-kırmızı renkte halofilik arke gelişimleri gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.1.** Halofilik arke izolasyonu için Tuz Gölü'nden beş ayrı noktadan alınan N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, N<sub>4</sub>, N<sub>5</sub> kodlu örneklerin sıvı kültürleri ve 37°C'de, 40 W gün ışığı aydınlatması altında, 150 rpm'de çalkalamalı olarak inkübasyonun yaklaşık 4. gününden itibaren sıvı kültürlerde gözlemlenen halofilik arke gelişimleri fotoğrafı



**Şekil 4.2.** Halofilik arke gelişimi gözlenen N<sub>1</sub> ve N<sub>2</sub> kodlu sıvı kültürlerde, 37°C’de, 40 W gün ışığı aydınlatması altında, 150 rpm’de çalkalamalı olarak yaklaşık 9-15 gün inkübasyonun sonunda gözlemlenen pembe-kırmızı renklenme fotoğrafı



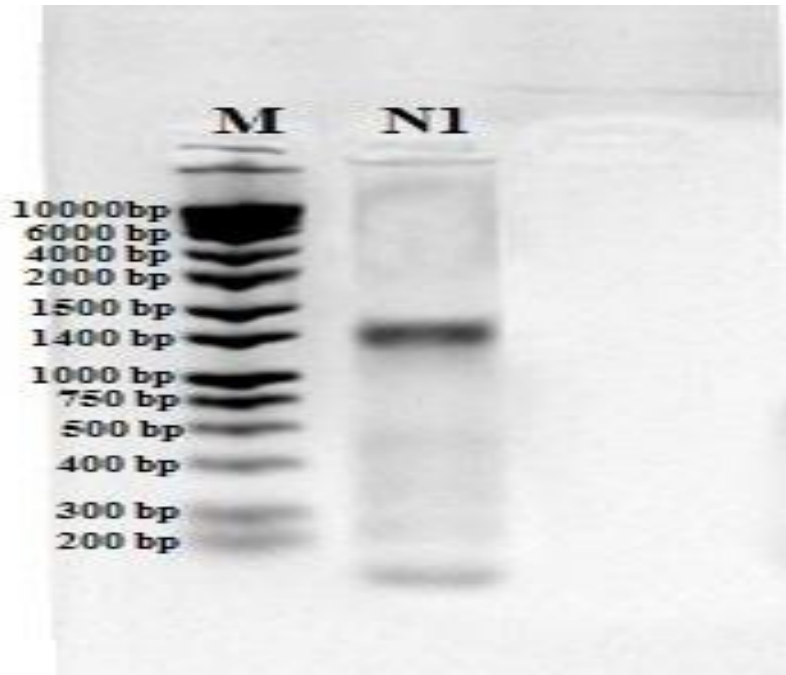
**Şekil 4.3.** Halofilik arke izolasyonu için ekim yapılan N<sub>1</sub> kodlu katı kültürde 37°C’de, 40 W gün ışığı aydınlatma altında, 15 gün inkübasyon sonunda gelişimi gözlemlenen arke izolatının pembe-kırmızı renkte koloni morfolojisi fotoğrafı



## 4.2. Halofilik Arke İzolatının Moleküler Karakterizasyon Sonuçları

### 4.2.1. Halofilik arke izolatının 16S rRNA amplifikasyon sonucu

Test edilen arke izolatının 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçlarına bakılarak, N<sub>1</sub> kodlu izolatın 1365 baz çifti uzunluğunda, tek bant verdiği belirlenmiştir.



**Şekil 4.4.** Halofilik arke gelişimi gözlenen N<sub>1</sub> kodlu sıvı kültürden yapılan 16S rRNA PCR amplifikasyonu sonunda elde edilen arke izolatının tek bant PCR görüntüsü

### 4.2.2. Halofilik arke İzolatının 16S rRNA gen bölgesinin sekans analiz sonuçları

Arke izolatının 16S rDNA genlerinin baz dizileri belirlenmiş ve diziler Gen bankasında var olan 16S rDNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda elde edilen tanı sonucu, yüzdesi, Genbank numarası ve nükleotid sayısı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Ayrıca bu izolatın 16S rDNA gen bölgesinin baz sıraları da **EK 1**’de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** İzolatların 16S rRNA BLAST sonuçları

İzolat kodu	Gen Bank Numarası	Nükleotit Sayısı*	Benzerlik Oranı (%)**	En Yakın Filogenetik Grup
N1	KP280003	1324	99	<i>Halobacterium salinarum</i>

\* Eşleştirme için kullanılan 16S rRNA nükleotit sayısı

\*\* En yakın filogenetik türün 16S rRNA dizisi ile benzerlik oranı

### 4.3. Bakteriyorodopsin İzolasyonu Sonuçları

#### 4.3.1. Hücre lizat sonucu

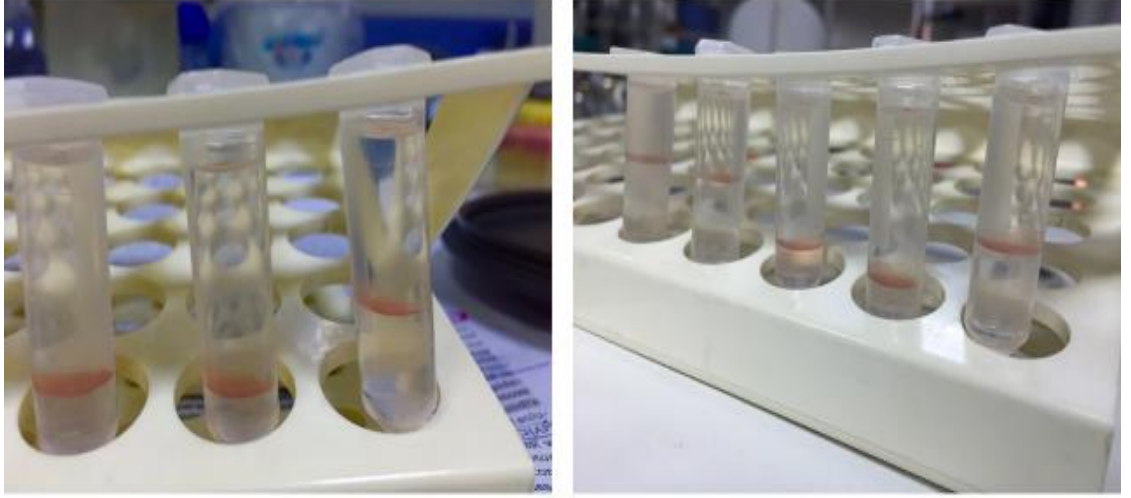
Pembe- kırmızı renk gözlemlenen sıvı kültürlerden hazırlanan, hücre lizatı Şekil 4.5’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.5.** Halofilik arke gelişimi gözlenen, N<sub>1</sub> ve N<sub>2</sub> kodlu 150 ml’lik sıvı kültürlerin 8000 rpm, 15°C’de santrifüjü sonrası elde edilen hücre lizatı fotoğrafı

#### 4.3.2. Mor membran izolasyon sonucu

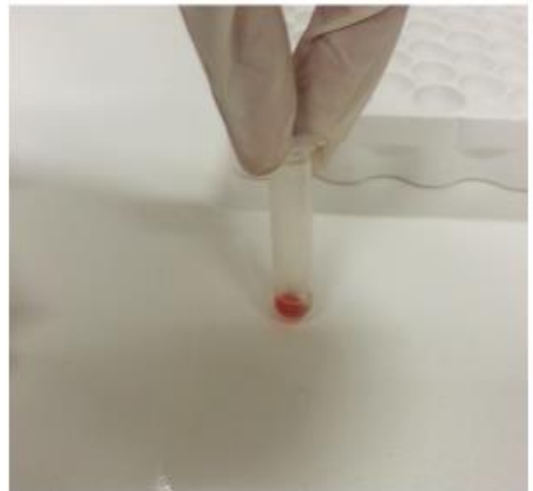
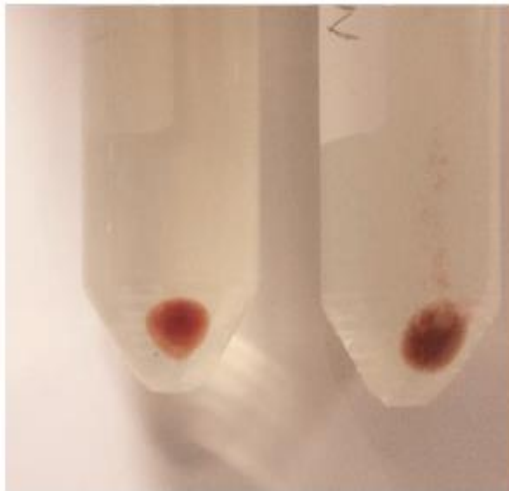
Elde edilen mor membran Şekil 4.6’da gösterilmiştir.



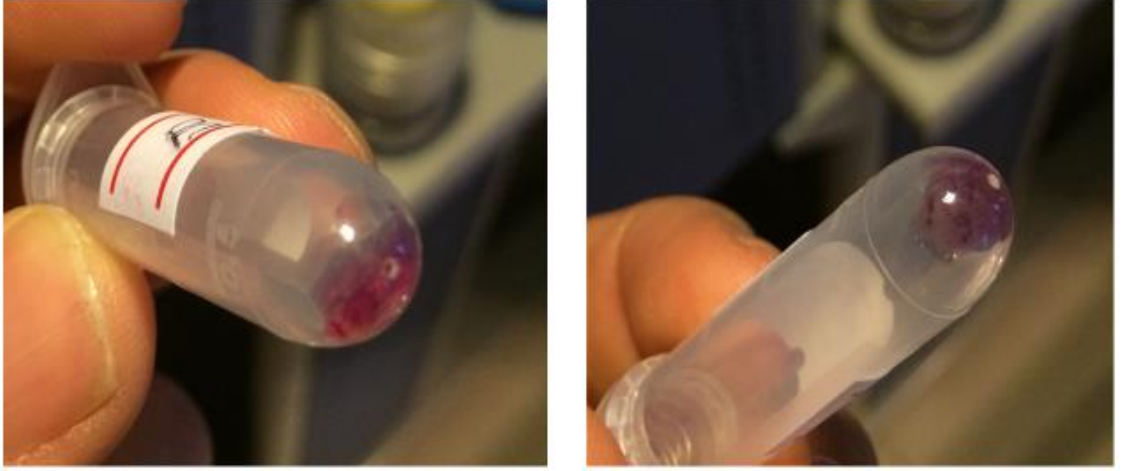
**Şekil 4.6.**  $N_1$  ve  $N_2$  kodlu sıvı kültürlerden elde edilen hücre lizatının, potasyum fosfat ve PEG solüsyonları ile hazırlanan sulu iki fazlı sistem ile, 8000 rpm'de 15 dk  $4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj sonrası PEG zengini üst faz ile fosfat zengini alt faz arasında oluşan ince tabaka halinde mor membran bandı görüntüsü

### 4.3.3. Bakteriyorodopsin izolasyon sonucu

Deiyonize su ile yıkama sonucu elde edilen mor membran Şekil 4.7'de, CHAPS ile lipitlerden arındırılan mor renkte BR peleti Şekil 4.8'de gösterilmiştir



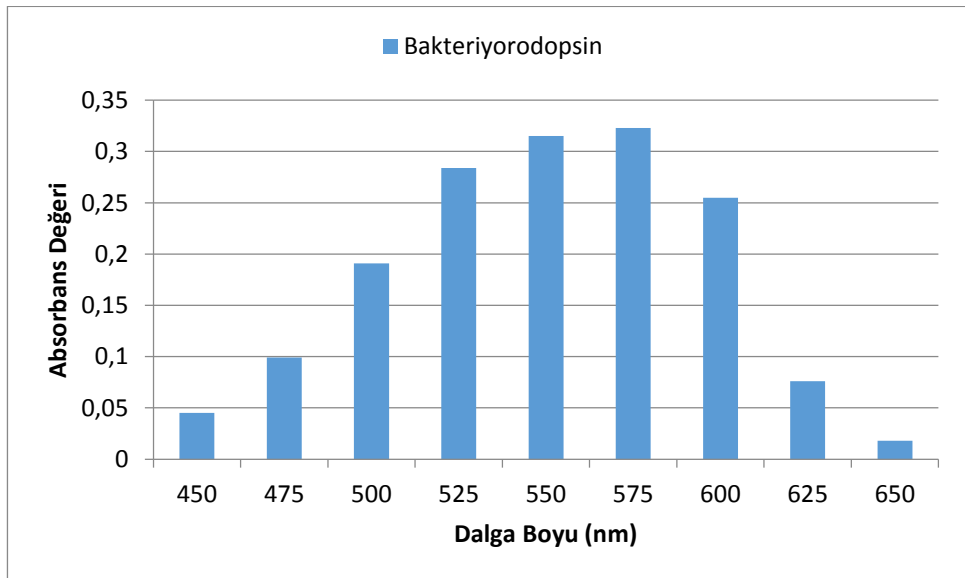
**Şekil 4.7.** 1) Sulu iki fazlı sistem ile ayrıştırılıp toplanan mor membranların, 24000 rpm, 30 dk  $4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj sonrası elde edilen mor renkte çökelti ve 30 mL'lik deiyonize su ile süspansiyon edilmesi. 2) Süspansiyonların 2 ml'lik tüplerde 18000 rpm'de 30 dk  $4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj ile yapılan yıkama işlemi sonrası elde edilen mor renkli çökelti görüntüsü



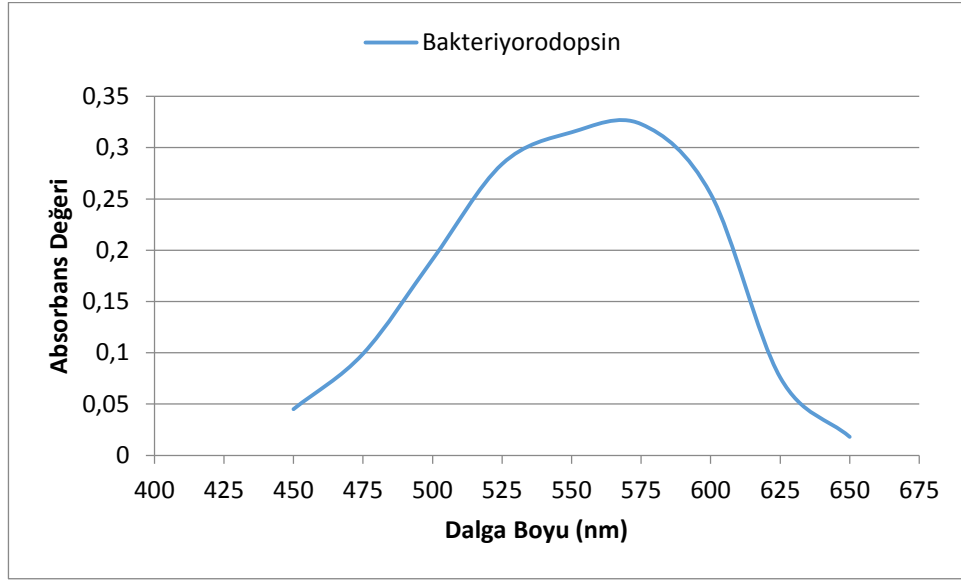
**Şekil 4.8.** Lipitlerden arındırmak için CHAPS ile yıkanan mor renkli çöktürlerin, 15000 rpm, 30 dk, 4°C'de santrifüj sonrası elde edilen şeffaf, mor renkli bakteriyorodopsin pelet görüntüsü

#### 4.4. Bakteriyorodopsinin karakterizasyon sonuçları

##### 4.4.1. Bakteriyorodopsinin karakteristik absorbans bandının UV visible spektrofotometre ile elde edilen sonuçları



**Şekil 4.9.** UV visible spektrofotometre ile Bakteriyorodopsinin karakteristik maksimum absorbans değerinin grafikte gösterimi.



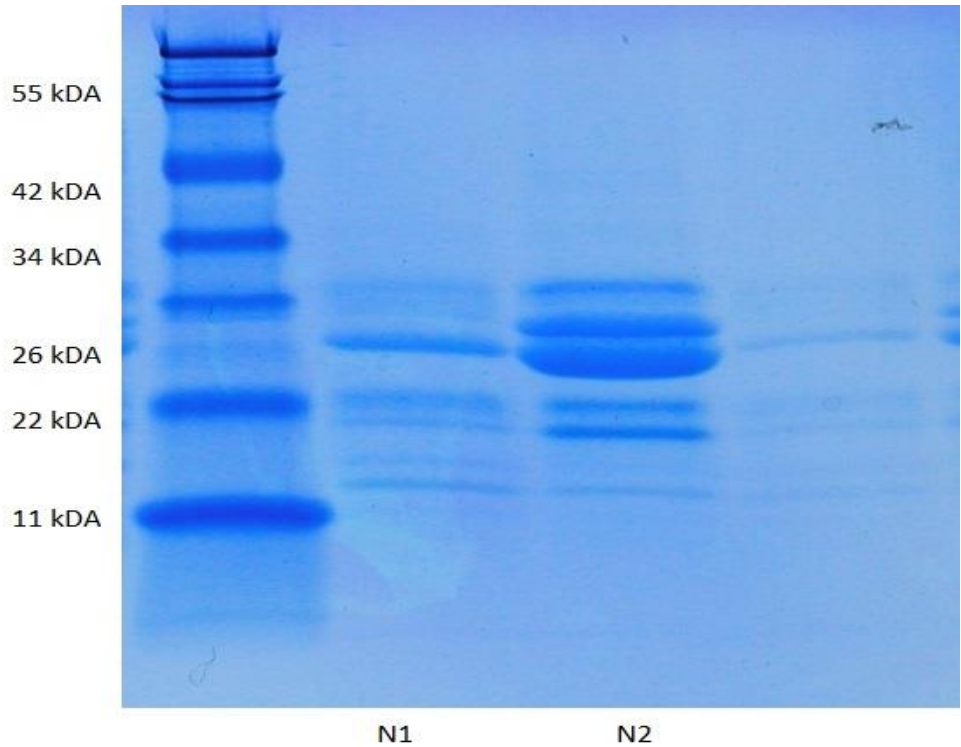
**Şekil 4.10.** Bakteriyorodopsin solüsyonunun 450-650 nm dalga boyu aralığında UV-visisble spektrofotometre ile taraması sonucu elde edilen absorbans grafiği.

Bakteriyorodopsin molekülü 500-650 nm aralığında yeşil ışığı absorbe ederek, mor renkte görünen bir moleküldür. BR 'nin karakteristik olarak maksimum absorbans değeri, yaklaşık 568 nm dalga boyu olarak bilinmektedir. Çalışmamızda yaptığımız dalga boyu taramasında da maksimum absorbans değeri, 575 nm dalga boyunda belirlenerek, literatür çalışmalarına yakın bir değer elde edilmiştir (Şekil 4.9 – 4.10).

#### 4.4.2. Bakteriyorodopsinin SDS-Page analizi sonuçları

Elde edilen saflaştırılmış BR peletine, moleküler ağırlığı ve saflığı belirlenmek üzere SDS-Page işlemi uygulanmıştır. Elektroforez plakaları su ve alkol ile yıkanarak, plakalar arasındaki bağlantı mikalarına ince tabaka halinde vazelin sürülmüştür. Plakalar jel hazırlama cihazına yerleştirilerek, aralarına enjektör yardımıyla ayırma jeli yerleştirilmiştir. Bu esnada örneklerin havasız şartlarda kalmasına dikkat edilmiştir. Jel yüzeyinin pürüzsüzlüğü için %10'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturulmuştur. 30 dk. içinde katılan SDS, örnekler üzerinden alınıp üst yüzeye kadar yığılma jel yerleştirilmiştir. Bu jel üzerine dikkatlice tarak yerleştirilerek, üzeri nemli süzgeç kağıdı ile kaplanarak gece boyunca bekletilmiştir. Sonraki gün taraklar dikkatli bir şekilde

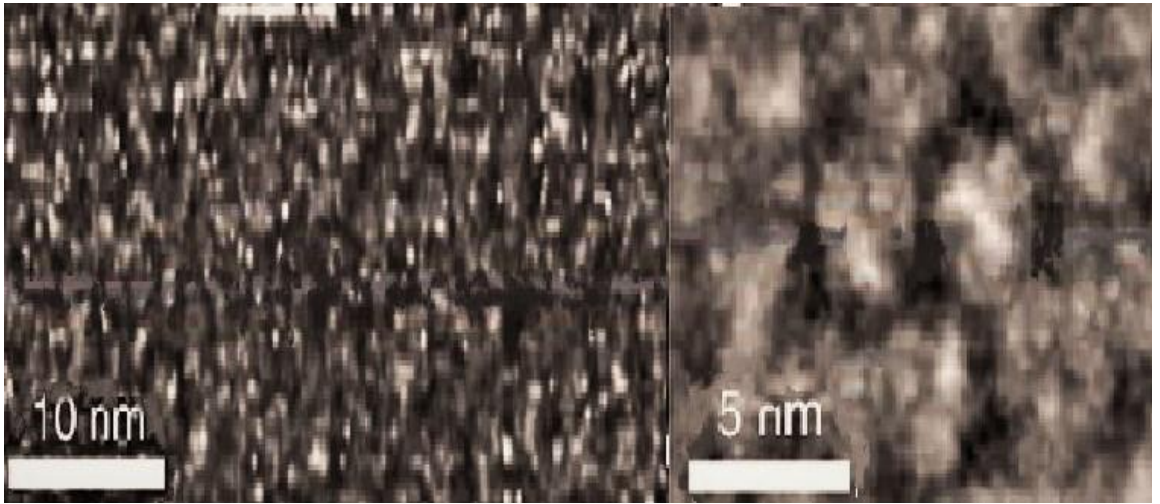
çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Oluşan boşluklar işaretlenerek jel yüzeyi sırasıyla saf su ve yürütme tamponu ile yıkanmıştır. Tankın alt ve üst kısımlarına tampon ilave edilerek N1 ve N2 örneklerinden 20 µg kadar alınmıştır. Kaynar su banyosunda 3 dk inkübe edildikten sonra soğutulan numuneler ince bir enjektörle elektroforeze yerleştirilmiştir. Tank kapağına anot ve katot kablolar bağlanarak 30 dk boyunca 80 voltluk elektrik akımı verilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında akım 150 volta ayarlanarak 4-5 saat örnekler bekletilmiştir. Bu süre sonunda akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice ayrılmıştır. Örnekler üzerinde bulunan yürütme tamponu sabitleştirme çözeltisinde 15-20 dk bekletilmiştir. Bu işlemden sonra fikse çözeltisinden çıkarılan jel, boyama çözeltisi ile örtülmüştür. Çalkalayıcı üzerinde 45 dk bekletildikten sonra renksizleştirme çözeltisine alınmıştır. Jelin zemin rengi protein bandı belirginleşinceye kadar belirli aralıklarla açılmıştır. Bu işlem 1-2 gün boyunca devam ettikten sonra jeller %30'luk etil alkol içine alınarak fotoğrafları çekilmiştir. Saflaştırılmış BR'nin SDS-Page analizi sonucunda, yaklaşık 26 kDa olarak Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.11.** Bakteriyorodopsinin SDS-Page profili

#### 4.4.3. Bakteriyorodopsinin atomik force microscopy (AFM) ile görüntülenmesi

*H. salinarum*' dan elde edilen mor renkli BR içeren pelet 1mL deiyonize su ile süspansiyon edilerek BR solüsyonu hazırlanmıştır. BR solüsyonu (pH 8.2) 150 mM KCl ve 10 mM Tris-HCl ' den hazırlanan tampon içine ilave edilmiştir. Bu süspansiyondan 5 µL alınıp, 50 µL görüntüleme tamponu (300 mM KCl ve 10 Mm Tris-HCl, pH 7.8) ile karıştırılarak 1cm×1cm aseton ile yıkanıp temizlenen kuru mika üzerine pipetlenmiştir. 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra tamponların fazlası durulama ile kaldırılmıştır. AFM görüntülemesi tapping-modda alınmıştır. Görüntülerde BR trimerlerinin oluşturduğu altıgen form gözlemlenmiştir (Şekil 4.12.).



**Şekil 4.12.** Atomik kuvvet mikroskobu ile alınan Bakteriyorodopsin trimerlerinin oluşturduğu hexagonal kafes, yüzey morfolojisi, boyut görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlık ile yaşıt olan gelişme, geliştirme içgüdüğü medeniyetlerin oluşmasını sağlamış ve tarihe yön vermiştir. İnsanlığın kaydettiği çalışmalar, araştırmalar, araçlar ve yöntemlerin bütün olarak oluşturduğu kavram olan teknoloji; yunanca “*Techne*”; sanat, yetenek ve “*Logia*”; bilgi, bilim anlamına gelen kelimelerin birleşiminden doğan bir kelimedir (Celep 2007). Aslında aynı zamanda ‘Bilme Sanatı’ gibi bir ifadeyle de Türkçe’ye çevrilebilir. Uzun süreçlerin ardından gelişen ve hali hazırda gelişmekte olan teknoloji, Dünya tarihinin son iki asrında çok önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Gelişiminde savaşların da çok etkili olduğu teknoloji özellikle iki dünya savaşının yaşandığı 20. yy’da tarihte görülmedik derecede hızlı gelişim göstermiştir. Bu gelişimlerin bir sonucu olarak yeni teknik çalışmalar ve araştırmalar çoğalmış ve teknoloji yeni materyal arayışına girmiştir. Bu noktada biyolojik materyaller; birçok avantajlarından ötürü teknoloji için vazgeçilmez çalışma unsurları olmuştur. Biyolojik materyallerin esnek yapılara sahip olması, doğanın diğer komponentleri ile uyumu, yüksek verimli çalışmaları gibi özellikleri sayesinde teknoloji, günümüzde tahmin edilmedik noktalara ulaşmıştır. Bu hızlı gelişmeler teknik cihazlarında gelişmesini sağlamış ve bilimin varsayımsal kısımları da araştırılmaya müsait hale gelmiştir. Yeni metodların kullanılması ile birlikte bilimin tüm alanları genişlemiştir. Bu genişleme bazı spesifik konulara yetersiz geldiğinden; yeni bilim dalları oluşmuş, bazı konular farklı açılardan ele alınmıştır. Bu yeni doğan bilim dalları arasında Nanoteknoloji; geleceğe ve teknolojiye yön vermesi açısından, önemli bir yere sahiptir.

Maddenin nano boyutta kontrolü ile geliştirilen çalışmaları kapsayan nanoteknolojinin temeli, 1950’li yıllarda Richard Feynman’ın öngörülleriyle atılmıştır. K. Eric Drexler’in çabaları nanoteknoloji biliminin gelişmesine katkı sağlamıştır. Doğal bir döngüye sahip teknolojik gelişmelerde doğadan alınan ilham, bilimin daha organize şekilde yapılanmasını sağlamış ve yapılan birçok çalışma ile doğanın insanoğluna sunduğu avantajlar kullanılmaya çalışılmıştır. Doğada bulunan birçok sistem, teknoloji sayesinde taklit edilmek veya geliştirilmek amacıyla ele alınmıştır. Günümüzde kullanılan birçok teknolojik araçta, doğadan alınan fikirler görülebilmektedir. Üzerinde çalışılan canlılar



arasında mikrobiyal boyutta olan türlerin de bulunması bu açıdan nanoteknolojiyi biyolojiye yakınlaştırmış ve bu yakınlaşma Biyonanoteknolojiyi oluşturmuştur. Biyolojik materyallerin ve moleküllerin nanoteknolojik araçlarda biyolojik işlemleri kontrolü amacı ile geliştirilen biyonanoteknoloji ayrıca; Biyolojik yapıların makro ve supra moleküler boyuttaki kendinden yapılanmalı (self-assemble) prensipleri üzerinde çalışmaktadır. Bu yapılar genelde protein bazlı, olağan üstü güçlü ve hafif olabilmektedir. Buna ek olarak, bazen kompleks mekanizmaların minyatürü halindedirler (Ramsden 2009).

Biyokimyasal çalışmalarda integral membran proteinlerinin sayıca çok miktarda izolasyonu önemlidir. Bazı membran proteinlerinin, doğal ve stabil bir formda biyolojik aktivitelerini ve yapısal entegritelerini bozmadan çok miktarda izolasyonu gerçekleştirmek zor olabilmektedir (Sivars and Tjerneld 1999). Biyoanalitik kimyada mikroakışkan cihazların geliştirilmesi; analiz hızı, ayrıştırma çözünürlüğü gibi önemli hususlarda büyük fırsatlar sunmuştur (Pamme 2007). Proteinlerin hızlı ve efektif bir şekilde izolasyonunu sağlamak amacıyla, mikro akışkan sıvı aracı geliştirilmiştir. Bu sistem içinde sulu iki fazlı sistem (ATPS), iyonik sıvı iki fazlı sistem (ILTPS) gibi iki saflaştırma sistemi, buna ek olarak tuzlardan ayırtmak için üç katmanlı desalting sistemi de bulunmaktadır (Huh *et al.* 2009). Sıvı iki fazlı sistem ile protein saflaştırma işlemi, entegre membran proteinlerinin izolasyonunda etkileyici bir yöntemdir (Sivars and Tjerneld 1999).

Bakteriyorodopsin'in izole edildiği örnekler Konya il sınırları içinde yer alan Tuz Gölü'nden alınmıştır. Alınan 5 örnek ile besiyerlerine yapılan ekimlerden, 2 tanesinde gelişim gözlemlenmiştir. Test edilen arke izolatının 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçlarına bakılarak, N<sub>1</sub> kodlu izolatın 1365 baz çifti uzunluğunda, tek bant verdiği belirlenmiştir. 16S rRNA PCR sekans analizi sonuçlarına göre, gelişimi gözlemlenen izolatların DNA örneklerinin *Halobacterium salinarum* ile %99 oranında benzer olduğu kaydedilmiştir. İzolatın 16S rRNA gen bölgesi baz sırası **EK 1**'de verilmiştir.

Çalışmamızda halofilik arkelerin izolasyonu amacıyla hazırlanan besiyeri, Atlas (2010) tarafından özellikle *H.salinarum* kültürü için verilen bilgiler ve besiyeri formülü modifiye edilerek hazırlanmıştır. Bu kültürden gelişimi sağlanan *H.salinarum* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan besiyerinde 1/1000 oranında maya ekstraktı kullanılmıştır. İnkübasyon 150 rpm'de yapay gün ışığı altında 37°C'de gerçekleştirilmiş, gelişim 4-15 gün arasında gözlemlenmiştir. Literatürde bulunan *H.salinarum* izolasyonu çalışmaları arasında Özcan (2004) tarafından hazırlanan besiyeri ortamında ise; Sehgal-Gibbons besiyeri formülü kullanılmıştır. Bu formülde farklı olarak Casamino asit, pepton yerine besin kaynağı olarak kullanılmış, 37°C'de 120 rpm'de çalkalamalı inkübasyon uygulanarak, gelişim 3-15 gün arasında gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra; çalışmamızda kullanılan formül aynı şekilde, Çakıcı (2004) tarafından besiyeri hazırlanışında kullanılmıştır. Ayrıca, çalışmamızdan farklı olarak gelişim 39°C'de 7 gün sonra gözlemlenmiştir. Araştırmamızdaki kültür oluşturma süreci literatürde bulunan Shiu *et al.* tarafından 2014 yılında gerçekleştirilen çalışma ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada ikinci günün ardından 8000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilen kültürden elde edilen hücre peleti ikinci kez 48 saatlik yeni bir besiyeri ortamına aktarılmıştır. Bir diğer çalışmada (Wen *et al.* 2009) ise kültür, çalışmamızda olduğu gibi 37°C'de inkübe edilerek gelişim 7 gün içinde gözlemlenmiştir.

Bakteriyorodopsinin izolasyonu için sıvı besiyerlerinden elde edilen 150 ml'lik sıvı kültür, 8000 rpm'de 15°C'de santrifüj edilerek, hücre peleti 68,7 µl DNase içeren 5 ml deiyonize su ile süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون daha sonra 30 dk dikey tüp karıştırıcısında hücre lizat çözeltisi elde etmek için karıştırılmıştır. Ardından elde edilen 5 ml lizat çözeltisine; 10 ml %24 potasyum fosfat çözeltisi ve 10 ml % 24 polietilen glikol çözeltisi eklenerek dikey tüp karıştırıcısında bir saat karıştırılmıştır. Toplamda 25 ml hazırlanan çözelti, 2 ml'lik tüplerde 8000 rpm'de 4°C'de 15 dk santrifüj edilerek mor membran izolasyonu yapılmıştır. Yapılan bu işlemler, izolasyonun gerçekleştirilmesinde seçilen yöntem olan sulu iki fazlı sistem gereği yapılmıştır. Bu işlem aynı zamanda Shiu *et al.* (2014) tarafından da kullanılmıştır.

Anton (2008) tarafından yapılan çalışmada; mor membran saflaştırılması sulu iki fazlı sistem yerine, lineer sukroz gradyanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Huh *et al.* (2009) ise izolasyon işlemini, sulu iki fazlı sistemi de içeren mikroakışkan araç kullanarak yapmayı başarmıştır. Literatürdeki başka bir çalışmada (Lobasso *et al.* 2012) izolasyon için oda sıcaklığında kromatografi işlemi uygulanarak, hazırlanan solüsyonların konulduğu 1 ml'lik tüpler arasında 25 adet mor renkli parçalar gözlemlenmiştir. Aynı kromatografi işlemi 1999 yılında Lopez *et al.* tarafından Bakteriyorodopsin izolasyonu için kullanılmıştır.

Çalışmamızda elde edilen mor membranın yıkanması işlemlerinde, saflaştırılmış BR solüsyonu CHAPS ile lipitlerinden arındırılmıştır. Bu işlem sonunda berrak bir görüntüye sahip mor renkte çökelti gözlemlenmiştir. BR'nin saflaştırılması için Miercke *et al.* (1988), pH 8'de cholade ya da deoxycholade kullanarak delipite işlemini gerçekleştirmiş ve optik saflığı düşük bir BR çökeltisi elde etmiştir.

Çalışmamızda BR karakterizasyonunda, UV-Visible spektrofotometre kullanılarak önceden izole edilmiş BR, 1 ml ultra deiyonize su ile süspanse edilerek, karakteristik absorbans bandını belirlemek amacıyla kuvarz küvette, 450 nm'den 650 nm'ye kadar tarama yapılmıştır. Çıkan sonuçlar literatürdeki araştırmalarla kıyaslandığında elde edilen bulgular yakınlık göstermektedir (Hampp 2000; Adamov *et al.* 2008).

Çalışmamızda saflaştırılan BR'nin moleküler ağırlığı, SDS-Page analizi ile 26.800 Da olarak belirlenmiştir. Bu işlemde kullanılan teknik aynı zamanda, Bozoğlu tarafından (2014) yapılan; *Brevibacillus sp.* bakterisinden elde edilen lakkaz enzimini saflaştırma ve karakterizasyonu çalışmasında kullanılmıştır. Literatürde bulunan bir diğer çalışmada (Shui *et al.* 2014) BR'nin moleküler ağırlığını ve saflığını belirlemek için SDS-Page yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca Anton (2008) tarafından yapılan çalışmada SDS-Page sayesinde mor membranın moleküler ağırlığı 26 kDa olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen saflaştırılmış BR solüsyonu kurutularak, AFM ile alınan görüntüsünde, BR'nin 5 nm boyutunda olduğu gözlemlenmiştir. Butt *et al.* 1990 yılında

Bakteriyorodopsini AFM ile görüntüleyerek yüzey topografisini yaklaşık 1,1 nm çözünürlüğünde çıkarmıştır. Bakteriyorodopsin üzerinde yapılan diğer çalışmalarda (Shibata *et al.* 2010; Pfreundschuh *et al.* 2014) AFM sayesinde 5 nm boyutunda altıgen yapıda bulunan BR trimerleri gözlemlenmiştir. Yine bu çalışmalarda yüzey analizi yaklaşık 1 nm boyutunda yapılmıştır. AFM görüntüleme tekniği; organik örnekleri nano altı değerlerde daha içeriden ve proaktif görüntüleme görüntüleme imkanları sağladığından çalışmamızda görüntülerin alınması için seçilmiştir.

## **Sonuç**

Yeni teknik araç ve sistemlerde kullanılması üzerinde bir çok çalışması olan ayrıca bir model sistem veya nanobiyomolekül olarak revaçta olan Bakteriyorodopsin'in saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla yaptığımız bu çalışmada Tuz gölün'den alınan örneklerden elde edilen *H.salinarum* kütive edilmiştir. Oluşturulan kültürlerden elde edilen pelet içeriğinde bulunan BR, bazı tekniklerle saf haline getirilmeye çalışılmıştır. BR'nin teknolojik uygulamalarda kullanılması için gereken bu teknikler, bu proteini monomer bir hale getirebilir ve bir biyomateryal olarak kapasitesinin tamamı elektronik devrelerde kullanılabilir veya taklit edilebilir. Dünyada BR hakkında pek çok çalışma ve patent bulunmasına karşın, ülkemizde BR'nin teknik kullanımı üzerinde çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda BR'nin kullanımı için ilk adım olan saflaştırma ve izolasyon işlemi başarıya ulaştırılmıştır. Önemli tuz kaynaklarına sahip olan Türkiye'de gelecek yıllarda, birçok avantaja ve elektronik açıdan yüksek kapasiteye sahip olan BR hakkında teknik çalışmalar yönünde adımlar atılacağı öngörülmektedir.

**KAYNAKLAR**

- Adamov, G.E., Devyatkov, A.G., Gnatyuk, L.N., Goldobin, I.S., Grebennikov, E.P., 2008. Bacteriorhodopsin-Perspective Biomaterial for Molecular Nanophotonics, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 196: 254-261
- Anonymous, 2014. (<http://www.mdpi.com/1424-8220/9/12/9741/htm#sthash.sPG16tAw.dpuf>; [http://www.brasdelport.com/?page\\_id=135&lang=en](http://www.brasdelport.com/?page_id=135&lang=en); <http://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriorhodopsin>; <http://www.mdpi.com/1424-8220/9/12/9741/htm>)
- Anton, C.M., 2008. Photolithography Based Patterning of Bacteriorhodopsin Films, Degree of Doctor, Mechanical Engineering, Michigan Technological University
- Atlas, R.M., 2010. *Handbook of Microbiological Media*, ASM Press, CRC Press Taylor & Francis Group, 786
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu Karakterizasyonu Ve Tanısı, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Barnett, Z., 2008. Scanning Tunneling Microscopy. University of Tennessee Physics Department Publications, Knoxville, 1-6.
- Barnett, Z., 2009. Scanning Tunneling Microscopy. Course: Solid State II. Physics Department. University of Tennessee, 1:1-2
- Bartos, H., Götz, F., Peters, R.P., 2004. Lab-on-a-Chip Devices and their Potential for Nanobiotechnology, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 2: 13-26
- Baundry, J., Tajkhorshid, E., Molnar, F., Philips, J. and Schulten, K., 2001. Molecular Dynamics Study of Bacteriorhodopsin and the Purple Membrane. *American Chemical Society, Urbana Illinois*, 105(5): 905-918.
- Bayley, H., Braha, O., Cheley, S., Gu, L., 2004. Engineered Nanopores, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 7: 93-108
- Bayramoğlu, E., Çivi, S. 2012. Deri Sanayiinde Koruyucu Olarak Tuz ve Tuzda Gelişen Mikroorganizmalar, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 10, (2) , 13-26
- Bozkurt, G., 2007. Fotokromik Bileşiklerin Sentezi ve Özelliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Bozoğlu, C., 2014 . Ağrı Diyadin Kaplıcasından İzole Edilen Termofilik Brevibacillus Sp. (Z1) Bakterisinden Lakkaz Enziminin Saflaştırılıp, Karakterize Edilmesi ve Endüstride Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Burns, D., Dyll-Smith, M., 2006. Cultivation of Haloarchaea, *Methods in Microbiology*, 35(22): 535-552
- Butt, H.J., Downing, K.H., Hansma, P.K., 1990, Imaging the Membrane Protein Bacteriorhodopsin with Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal*, 58: 1473-1480
- Carpenter, G., 2006. Nanotechnology; The Plastics of the 21st Century?, 1-15
- Celep, Ş., 2007. Nanoteknoloji ve Tekstilde Uygulama Alanları, Yüksek Lisans, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana

- Choi, J., Montemagno, C.D., 2007. Light-Driven Hybrid Bioreactor Based on Protein-Incorporated Polymer Vesicles, *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 6(1): 171-176
- Couto, S.R. and Herrera J.L.T., 2006. Industrial and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 24: 500-513.
- Curnow, P., 2009. Membrane proteins in nanotechnology. *Biochemical Society Transactions*, 37: 643-652.
- Çakıcı, Ö., 2004. Tuz Gölünden İzole edilmiş *Halobacterium salinarum* Suşunun Biyokimyasal ve Genetik Karakterizasyonu. Yüksek Lisans, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Dai, G., Ohno, Y., Ikeda, Y., Tamogami, J., Kikukawa, T., Kamo, N., Iwasa, T., 2010. Photoreaction Cycle of Phoborhodopsin (Sensory Rhodopsin II) from *Halobacterium Salinarum* Expressed in *Escherichia Coli*, *Photochemistry and Photobiology*, 86: 571-579
- Delamarche, E., 2004. Microcontact Printing of Proteins, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 3: 31-49
- Diez S., Helenius, J.H., Howard, J., 2004. Biomolecular Motors Operating in Engineered Environments, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 13: 185-195
- Dilan E. and Gündüz U., 2001. PEG-Fosfat-Su Sistemlerinde Protein Dağılımı. Gazi Üniversitesi Kimya Mühendislik Bölümü, Ankara 1-5.
- Dilan, E., Gündüz, U., 2001. PEG-Fosfat-Su Sistemlerinde Protein Dağılımı, Gazi Üniversitesi, Ankara
- Drexler, K.E., 2006. *Engines of Creation 2.0*. Wowio Books Exclusive. E-book, Prelude: 25- 30
- Fakruddin, M., Hossain, Z., Afroz, H., 2012. Prospects and Applications of Nanobiotechnology: a Medical Perspective, *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 31
- Fortina, P., Kricka, L.J., Surrey, S., Grodzinski, P., 2005. Nanobiotechnology: the Promise and Reality of new Approaches to Molecular Recognition, *Trends in Biotechnology*, 23, (4), 168-173
- Gazit, E., 2007. Introduction to Nanobiotechnology and Bionanotechnology. Plenty of Room for Biology at the Bottom. Imperial College Press, 1:1-15
- Gonzalez, O., Gronau, S., Pfeiffer, F., Mendoza, E., Zimmer, R., Oesterhelt, D., 2009. Systems Analysis of Bioenergetics and Growth of the Extreme Halophile *Halobacterium Salinarum*, *PLoS Computational Biology*, 5(4): 1-12
- Gönül, N., 2000. Çok Fazlı Sistemler I. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 81: 1-98.
- Hampp, N., 2000. Bacteriorhodopsin as a Photocromic Retinal Protein for Optical Memories, *American Chemical Society*, 100(1): 1755-1775
- Hampp, N., Oesterhelt, D., 2004. Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 11: 146-165
- Hassanshahian, M., Mohamadian, J., 2011. Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline lakes in Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4: S59- S65.

- Hatti-Kaul, J., 2000. Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols, *Methods in Biotechnology*, 11, 1-10
- He, J. A., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J., Tripathy S. K. 1999. Bacteriorhodopsin Thin Film Assemblies-Immobilization, Properties and Applications, *Advanced Materials*, 11, (6), 435- 505
- Huh, Y.S., Jeong, C.M., Chang, H.N., Lee, S.Y., Hong, W.H., Park, T.J., 2010. Rapid Separation of Bacteriorhodopsin Using a Laminar-flow Extraction System in a Microfluidic Device, *American Institute of Physics, Biomicrofluidics*, 4: 1-10
- Joshi, M., Bhattacharyya, A., Wazed Ali, S., 2008. Characterization Techniques for Nanotechnology Applications in Textiles, *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 33: 304-317
- Karakoç, Veyis, 2013. Arsenik Baskılanmış Nanopartiküllerle Çevre Sularından Arsenik Uzaklaştırılması. Doktora, Hacettepe Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı, Ankara
- Katz, E., Willner, I., 2004. Nanoparticle-Biomaterial Hybrid Systems for Bioelectronic Devices and Circuitry, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 14: 200-221
- Kayır, Y.Z. ve Baççıl, E.G., 2010. Nanoteknoloji Nedir?. KOSGEB Sincan İşletme Geliştirme Merkezi, 1-6
- Litchfield, C.D., Sikaroodi, M., Gillevet, P.M., 2006. Characterization of Natural Communities of Halophilic Microorganisms, *Methods in Microbiology*, 35(21): 513-533
- Lobasso, S., Lopalco, P., Lattanzio V.M.T. and Corcelli, A., 2003. Osmotic shock induces the presence of glycardiolipin in the purple membrane of *Halobacterium salinarum*. *Journal of Lipid Research*, 44: 2120-2126.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2005. *Brocks Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, Inc, 11th Edition
- Manjasetty, B.A., Nair, T.R.G., Ramaswamy, Y.S., 2008. Nano-Biotechnology: Structure and Dynamics of Nanoscale Biosystems. *JRI- Journal of Research & Industry*, 22-25
- Miercke, L.J.W., Ross, P.E., Stroud, R.M. and Dratz, E.A., 1989. Purification of Bacteriorhodopsin and Characterization of Mature and Partially Processed Forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (13): 7531-7535
- Morris, J. and Willis, J., 2007. *Nanotechnology White Paper*. Science Policy Council. U.S Environmental Protection Agency, 1: 4-15
- Mosin, O., Ignatov, I., 2014. Phochrome Transmembrane Protein Bacteriorhodopsin from Purple Membranes of *Halobacterium Halobium*. Applications in Bio-and Nanotechnologies. *Journal of Medicine, Phsiligy and Biophysics*, 6: 42-60
- Norbert, H., 2000. Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories. *Chemical Reviews*, 100: 1755-1776
- Offenhäusser, A., Vogt, A.K., 2004. Defined Networks of Neural Cells in Vitro, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 5: 66-72
- Orhan, F., 2013. Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

- Ozcan, B., 2004. Türkiye'den Halofilik Arkeobakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Doktora, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri A. and Caliskan, M., 2006. Characterization of Extremely Halophilic Archea Isolated from Saline Environment in Different Part of Turkey. *Microbiology*, 6: 739-746
- Pandey, P.C., 2006. Bacteriorhodopsin- Novel biomolecule for nano devices. *Analytica Chimica Acta*, 568: 47-56
- Pfeundschuh, M., Martinez-Martin, D., Mulvihill, E., Wegmann, S., Muller, D.J., 2014. Multiparametric High-Resolution Imaging of Native Proteins by Force-Distance Curve-Based AFM, *Nature Protocols*, 9(5): 1113-1130
- Rainey, F.A., Oren, A., 2006. Extremophile Microorganisms and the Methods to Handle Them, *Methods in Microbiology*, 1: 1-25
- Ramsden, J., 2009. *Nanotechnology*. Ventus Publishing. 8: 92-105
- Ramsden, J.J., 2005. What is nanotechnology?. *Nanotechnology Perceptions*, 3-17
- Rhinow, D., Hampp, N., 2010. Curvature of Purple Membranes Comprising Permanently Wedge-Shaped Bacteriorhodopsin Molecules is Regulated by Lipid Content, *American Chemical Society*, 114: 549-556
- Rinaldi, R., Maruccio, G., Biasco, A., Pompa, P.P., Baramanti, A., Arima, V., Visconti, P., D'amico, S., D'Amonne, E., Cingolani, R., 2006. Metalloprotein-Based Electronic Nanodevices, *Bionanotechnology; Proteins to Nanodevices*. Springer Publishing, 2: 9-19
- Salemme, F.R., 2006. Design Principles for Self-Assembling Devices from Macromolecules. *Bionanotechnology*, 1-8
- Sawitowski, T., 2004. *Biocompatible Inorganic Devices, Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 1: 1-10
- Schranz, M., Baumann, R.P., Rhinow, D., Hampp, N., 2010. Dynamics of Bacteriorhodopsin in Solid-Supported Purple Membranes Studied with Tapping-Mode Atomic Force Microscopy, *American Chemical Society*, 114: 9047-9053
- Shibata, M., Uchihashi, T., Yamashita, H., Kandori, H., Ando, T., 2011. Structural Changes in Bacteriorhodopsin in Response to Alternate Illumination Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy, *Angewandte Chemie International Edition*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 50: 4410-4413
- Shiu, P., Chen, H, M., Lee, C. 2014. One-step purification of delipidated Bacteriorhodopsin by aqueous-three-phase system from purple membrane of Halobacterium. *Food and Bioproducts Processing* (9 2),113–119
- Shiu, P.J., Ju, Y.H., Chen, H.M., Lee, C.K., 2013. Facile Isolation of Purple Membran from Halobacterium Salinarum via Aqueous-Two-Phase System, *Protein Expression and Purification*, 89: 219-224
- Sivars, U., Tjerneld, F., 1999. Mechanisms of Phase Behaviour and Protein Partitioning in Detergent /Polymer Aqueous Two-Phase Systems for Purification Integral Membrane Proteins, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1474: 133-146
- Sleytr, U.B., Egelseer, E.M., Pum, D., Schuster, B., 2004. S-Layers, *Nanobiotechnology*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 6: 77-89
- Stroschio, M.A., Dutta, M., 2005. Integrated Biological- Semiconductor Devices, *Proceedings of The IEEE*, 93(10): 1772-1783



- Subramaniam, S., Henderson, R., 2000. Molecular Mechanism of Vectorial Proton Translocation by Bacteriorhodopsin, *Nature*, 406: 653-657
- Tazebay, U.H. and Erdoğan, M., 2011 .Nanobiyoteknoloji İnsanlığa Ne Sunacak ?. *Bilim ve Teknik*, 39-42
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2004. *Microbial Metabolism, Microbiology; an Introduction*, Pearson Benjamin Cummings, 5: 111-148
- Trivedi, S., Choudhary, O.P., Gharu, J., 2011. Different Proposed Applications of Bacteriorhodopsin, *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 5: 35-40
- Villaverde, A., 2010. Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories. *Microbial Cell Factories*, 1-4
- Wen, H., Yang, L., Shen, L., Hu, B., Li, Z., Jin, Q. 2009. Isolation and characterization of culturable halophilic microorganisms of salt ponds in Lianyungang, China, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1727–1732
- West, J.L. and Halas, N.J., 2000. Applications of nanotechnology to biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11: 215-217
- Yalçın, K.A., 2010. Nanoteknoloji ve Gıda Sanayiinde Uygulama Alanları. Yüksek Lisans, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ
- Yamashita, H., 2012. Single-Molecule Imaging on Living Bacterial Cell Surface by High-Speed AFM, *Journal of Molecular Biology*, 422, 300–309
- Yaşa, İ., Kahraman, Ö., Tekin, E., Koçyiğit, A., 2008. Çamaltı Tuzlasından Ekstrem Halofilik Archea İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 2: 117- 121
- Yıldız, E., 2008. Çankırı Çankaya Tuz Madeni'nden Halofilik Arkelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/HATAY
- Zaitsev, S.Y., Solovyeva, D.O., Nabiev, I., 2012. Thin films and assemblies of Photosensitive Membrane Proteins and Colloidal Nanocrystals for Engineering of Hybrid Materials with Advanced Properties, *Advances in Colloid and Interface Science*, 183-184: 14-29

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzurum'da doğdu. İlk, orta, lise ve lisans öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2005 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. 2012 yılında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nano Bilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı, Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2013 yılında aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görevlendirilen Hıdıroğlu, halen Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.