



**LİMONİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN
REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİYLE
ÜRETİLMESİ**

EMİRHAN BOZOĞLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Ağustos - 2017

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LİMONİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT DNA
TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLMESİ**

EMİRHAN BOZOĞLAN

**TOKAT
Ağustos - 2017**

Her hakkı saklıdır

Emirhan BOZOĞLAN tarafından hazırlanan “**Limonin Dehidrogenaz Enziminin Rekombinant DNA Teknolojisiyle Üretilmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **4 AĞUSTOS 2017** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Yrd. Doç. Dr. Seçil ERDEN TAYHAN
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Yrd. Doç. Dr. Melek GÜL
Amasya Üniversitesi

İmza


.....

.....

.....

ONAY


Prof. Dr. Ebubekir ALTINTAŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü


11/08/2017

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

EMİRHAN BOZOĞLAN

4 Ağustos 2017

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LİMONİN DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİYLE ÜRETİLMESİ

EMİRHAN BOZOĞLAN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA GÖKÇE)

Turunçgil meyvelerinin sularında acılık önemli sorunlardandır. Naringin ve limonin bu sorunun kaynaklarından önemli iki etmeni oluşturmaktadır. Limonin turunçgil meyvelerindeki triterpenoid metabolizmasının ara ürünlerinden olan bir limonoiddir. Limonin dehidrogenaz enzimi 31977.03 dalton ağırlığındadır. Bu enzim turunçgil meyvelerinde bulunan limonoidlerden limoninin neden olduğu acılığı gideren bir enzimdir. Limoninin dilakton formuna karşı aktivite göstermektedir. Bu çalışmada limonin dehidrogenaz enziminin pET22b ve pTOLT vektörlerinde rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi ve aktivite testlerinin yapılması hedeflenmektedir. Çalışmada ilk olarak biyoinformatik araçlar kullanılarak gen dizisi bulunmuştur ve bu dizinin kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Gen yapay olarak sentezlettilmiş, pET22b vektörü içerisinde elimize ulaşmıştır. Klonlama çalışmaları başarılı bir şekilde yapıldıktan sonra ekspresyon basamağına geçilmiştir. Rekombinant olarak elde edilen enzimin aktivite çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak rekombinant olarak üretilen limonin dehidrogenaz enziminin portakal kabuğundan elde edilen limonin maddesine karşı aktif olduğu bu maddeyi parçaladığı spektroskopik yöntemler ile tayin edilmiştir.

2017, 50 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Limonoid, Limonin, Limonin Dehidrogenaz, Rekombinant Protein Üretimi

ABSTRACT

MASTER THESIS

PRODUCTION OF LIMONENE DEHYDROGENASE ENZYME WITH RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY EMİRHAN BOZOĞLAN

**GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR.İSA GÖKÇE

Bitterness is an important problem in the juices of citrus fruits. Naringine and limonene are two important factors in the source of this problem. Limonin is a limonoid, an intermediate product of triterpenoid metabolism in citrus fruits. The enzyme limonene Dehydrogenase is 31977.03 dalton in weight. This enzyme is an enzyme that clears the limonoids found in citrus fruit, causing limonen. Limonen shows activity against dilactone form. In this study, production of lemon dehydrogenase enzyme with pET22b and pTOLT vectors by recombinant DNA technology and activity tests are aimed. Production by DNA technology and activity tests are targeted. In the study, genome sequence was first found using bioinformatic tools and codon optimization of this sequence was performed. The gene was artificially synthesized and sent in pET22b vector. After the cloning studies have been successfully carried out, the expression step has been reached. Activity studies were performed after the enzyme was obtained recombinantly. As a result, the recombinantly produced limonene dehydrogenase enzyme is active against the citron substance obtained from the orange shell, which is determined by spectroscopic methods that break up the substance.

2017, 50 PAGES

KEYWORDS: Limonoid, Limonen, Limonene Dehydrogenase, Recombinant Protein Production

ÖNSÖZ

Üniversite hayatımda hem lisans hem de yüksek lisans öğretim süresince maddi manevi her türlü desteği gösteren, hem bilimsel hem de kişisel gelişimimde kendi imkân, olanak ve tecrübeleri ile bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen tecrübe ve önerilerinden yararlandığım değerli çalışma arkadaşlarımdan en başta Rizvan İMAMOĞLU olmak üzere Duygu DÜZGÜN ve Hümeysra AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince dersime giren tüm hocalarıma ve rahmetli Yrd. Doç. Dr. Volkan KÖSELİ hocama bana kazandırdıkları her güzel anı ve tecrübe için teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca bütün imkânları ile bana destek olan ve beni şu an olduğum kişiden çok daha iyi biri olmam için elinden geleni yapmış olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

EMİRHAN BOZOĞLAN

4 Ağustos 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER 3	
2.1 Turunçgiller.....	3
2.2 Flavonoidler ve Limonoidler.....	4
2.3 Limonoidler ve Limonin	5
2.4 Rekombinant DNA Teknolojisi	11
2.4.1 Genomik DNA ve vektör DNA izolasyonu.....	12
2.4.2 Restriksiyon enzimleri	14
2.4.3 DNA ligazlar.....	16
2.4.4 Vektörler.....	16
2.4.4.1 Plazmitler	17
2.4.4.2 Viral vektörler.....	18
2.4.5 Hedef Geni İçeren Vektörün Hücreye Aktarılması	18
2.4.6 Klonlama Vektörün Hücreden Seçimi.....	19
2.4.7 Klonlamanın Doğrulanması.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1 Materyal	20
3.1.1 Kullanılan Cihazlar.....	20
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar.....	21
3.1.3 Kullanılan Çözeltiler.....	22
3.2 YÖNTEM.....	25
3.2.1 Hedef Genin Seçilmesi	25
3.2.2 Gen fragmentlerinin Klonlanması	28
3.2.3 Restriksiyon Enzimleri ile Kesim.....	28
3.2.4 Ligasyon İşlemi	30
3.2.5 Transformasyon ve Klonlama İşleminin Doğrulanması.....	31
3.2.5.1 PİPES’li Süper Kompetent Hücre Hazırlanması	31
3.2.5.2 Transformasyon	32

3.2.5.3	Plazmid DNA Saflaştırması.....	33
3.2.5.4	Doğrulama Restriksiyon Kesimi.....	34
3.2.5.5	DNA Dizileme	35
3.2.6	Limonin Dehidrogenaz Enzimi Üretilmesi (İndükleme).....	35
3.2.7	FSB'li Kompotent <i>pLysE</i> Hücrelerin Hazırlanması	35
3.2.8	<i>E.coli BL21 pLysE</i> Hücrelerinin Parçalanması.....	36
3.2.9	Afinite Kromatografisi ile Limonin Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması	37
3.2.10	Limonin Dehidrogenaz Enziminin Portakal Kabuğu Ekstraktına Karşı Aktivitesi	37
4.	BULGULAR ve TARTIşMA.....	39
4.1	Restriksiyon Enzimi ile Kesim.....	39
4.2	Doğrulama Restriksiyon Kesimi	39
4.3	DNA Dizileme	41
4.4	LDH Enziminin Üretilmesi (indükleme)	42
4.5	LDH Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması.....	43
4.6	LDH Enziminin Portakal Kabuğu Ekstraktına Karşı Aktivitesi	43
5.	TARTIşMA ve SONUÇ	45
6.	KAYNAKLAR	48
7.	ÖZGEÇMİş.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
Bç	baz çifti
μ l	mikro litre
μ M	mikro molar
M	Molar
mM	mili molar
nm	nano metre
P	Fosfat
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
LDH	Limonin Dehidrogenaz
Kısaltmalar	Açıklama
Amp	Ampisilin
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır Serum Albümin
BAC	Bakteri yapay kromozomları
ddH ₂ O	Çift saf su (Double distilled water)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
DWV	Deforme kanat virüsü
E. coli	Escherichia coli
FSB	Frozen Storage Buffer”
IPTG	İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PİPES	piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florit

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
SOB	Super Optimal Broth
TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
YAC	Maya yapay kromozomları



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Navel portakallarındaki limonin maddesinin kapalı formülü ve kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.2. Turunçgiller de bulunan temel limonoidler	8
Şekil 2.3. Acı olmayan limonin A Monolakton'un düşük pH derecesinde acı olan Limonin A, D- dilaktone'a dönüşümü	10
Şekil 2.4. Limonin öncülü olan limonik asit monolakton'nun 17- dehidro limonoik asit monolaktone dönüşümü	10
Şekil 2.5. Plazmit kullanarak gen kulanlanması ve rekombinant DNA eldesi.	11
Şekil 2.6. pUC18 plazmit vektörü.	16
Şekil 3.1. Pet22b vektörü detaylı DNA dizisinin dairesel haritası. Restriksiyon enzim bölgeler	25
Şekil 3.2. pTOLT vektörünün restriksiyon enzim bölgelerini içeren detaylı DNA dizisi.	25
Şekil 4.1. Agaroz elektroforez görüntüsü.	38
Şekil 4.2. DNA dizileme görüntüsü.	39
Şekil 4.3. Limonin dehidrogenaz için 3 ayrı örneğin indüklenme öncesi ve sonrası jel görüntüsü.	40
Şekil 4.4. Limonin dehidrogenaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ardından SDS-PAGE görüntüsü.	41

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Bazı Turunçgil çekirdeklerinin limonoid içerikleri.....	9
Çizelge 2.2. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları.....	14
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları.....	19
Çizelge 3.2. Tez çalışması esnasında kullanılan kimyasallar ve markaları	20
Çizelge 3.3. pTOLT için restriksiyon enzim kesimi için gerekli madde içerikler.	27
Çizelge 3.4. pET22b için restriksiyon enzim kesimi için gerekli madde içerikler.	28
Çizelge 3.5. pTOLT vektörünün kullanıldığı adım için.	29
Çizelge 3.6. pET22b vektörünün kullanıldığı adım için.....	29
Çizelge 3.7. pTOLT plazmid vektörü kesimi için gerekli bileşenler ve oranları ..	33
Çizelge 3.8. pET22b plazmid vektörü kesimi için gerekli bileşenler ve oranları	34

1. GİRİŞ

Enzimler, büyük bir özgülük ve hız artışıyla kimyasal reaksiyonları katalize eder. Bu kimyasal reaksiyonlar bütün canlı organizmaların metabolizmasının temelini oluşturur ve endüstriye zarif, verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümler gerçekleştirmek için muazzam fırsatlar sunmaktadır (Godfrey, 1996). Enzim teknolojisi sürdürülebilir endüstriyel gelişmenin önemli bir bileşeni olan Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından tanınan disiplinler arası bir alandır. Uygulamaları basit endüstriyel işlemlerden, farmasötik keşif ve gelişimine kadar geniş bir alandadır. Aynı zamanda moleküler biyoloji, genetik mühendisliği, genomik ve proteomik alandaki ilerlemeler ve yeni gelişen teknolojiler sayesinde mevcut uygulamaları hızlandırır bununla birlikte süreçlerin ekonomisini geliştirerek yeni uygulama alanları açmaktadır (Panke, 2002).

Enzimler gıdaların iyileştirilmesi yönünde birçok heyecan verici uygulama için potansiyel sunmaktadır. En uygun verimin elde edilmesi ve istenen proteinin etkin bir şekilde geri kazanılması gibi ekonomik faktörler, enzimlerin kullanımındaki temel caydırıcı faktörlerdir. Değişen toplum değerleri rekombinant DNA ve protein mühendisliği teknolojilerine göre değişmesi ve tüm alternatif gıda kaynaklarını keşfetme ihtiyacının artması, enzim uygulamalarını zamanla gıda endüstrisi için daha cazip hale getirebilmektedir. Termostabilite, özgülük ve katalitik etkinlik gibi çeşitli özellikleri geliştirmek için günümüzde ticari olarak uygulanabilir enzimler üzerinde araştırma devam etmektedir. Birçok yeni enzim hidroliz, sentez veya biyokataliz ile gıda bileşenleri üretmek için enzimatik reaksiyonlarda kullanılmak üzere geliştirilmeye devam etmektedir (Jennylynd, 2009).

Turunçgil meyvelerinden elde edilen ürünlerde ki acılık etmenlerinin araştırılmasında, kimyasal yönden farklı iki tür acılık ögesinin varlığı tespit edilmiştir. Bu iki ögeden biri naringin, neohesperidin ve pincirin gibi bileşikleri içeren flavanoidler ve ikincisi de en bilindik bileşikler limonin ile nomilin olan limonoidlerdir (Altan, 1983a, b; Karabacak, 1995). Limonin, turunçgil meyvelerinde meydana gelen triteropenoid metabolizması sıradasın da üretilen ara metabolitlerden olan bir limonindir. Yapılan çalışmalar

sonucunda limon, altıntop ve portakal gibi turunçgil meyvelerinde ve meyve suyu gibi ürünlerinde limoninin varlığı tespit edilmiştir (Ting ve Attaway, 1971; Altan, 1983b).

Portakal sularında 4-6 mg/L civarında bulunduğu zaman algılanabilecek bir düzeyde acılık oluşturmaktadır. Limonin miktarı 12-15 mg/L'den sonra aşırı yoğunlukta acılığa sebebiyet vermektedir. Bu miktarlar göz önüne alındığı zaman Washington navel portakallarından meyve suyu üretimi sırasında, limoninin sebep olduğu acılık önemli bir sorun oluşturmaktadır. Kullanılan portakalların fiziksel olarak deforme olmaları acılık miktarını arttırmaktadır. Geçtiğimiz 30 yıl boyunca turunçgil meyvelerinden elde edilen sularda, özellikle portakallardan elde edilenlerde, kullanıcı beğenisini olumsuz olarak etkileyen limoninin giderilmesi amacıyla; mikrobiyolojik, biyokimyasal ve kimyasal ve ya fizikokimyasal yöntemler kullanılarak birçok araştırma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir (Ting ve Attaway, 1971; Chandler ve Nicol, 1975; Altan, 1983b).

Bu çalışmada meyve suyu sanayisinde meyve suyu üretimi yapılırken bir limonoid olan limonin molekülünden kaynaklanan acılık etmenin, rekombinant olarak limonin dehidrogenaz enzimi üretilerek giderilmesi amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında limonin dehidrogenaz enzimine ait gen dizisi biyoinformatik araçlar kullanılarak NCBI sitesinden belirlenmiş ve gen yapay olarak pET22b vektörü içerisinde sentezletirilmiştir. Rekombinant vektör elimize ulaştıktan sonra pET22b vektör sisteminde ekspresyon işlemi yapılmıştır ve ardından limonin dehidrogenaz gen dizisi pTOLT vektör sistemine klonlama çalışması yapılmıştır. pTOLT vektör sisteminde limonin dehidrogenaz enzimi üretilerek aktivite testi başarılı bir şekilde yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1 Turunçgiller

Rutaceae familyasından Aurantoideae alt familyasına ait olan Turunçgillerin bir çok mevcut türü bulunmaktadır. Turunçgillerin bazı türleri ülkemizde yetiştirilmektedir. Fakat bazı türlü yetiştirilmemekte hatta tanınmamaktadır. Turunç, tatlı portakal, limon, altıntop, mandarin gibi turunçgil meyvelerinin tarımı ülkemizde yaygın bir şekilde gerçekleştirilmektedir. (Braverman, 1949, Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001). 10. ve 11. Asırlarda turunç asıl vatanı olarak bilinen Güneydoğu Asyadan Akdeniz ülkelerine getirilmiş olan bir meyvedir. (Morton, 1987, Davies ve Albrigo, 1994).

Turunçgillerin üretim miktarları oldukça yüksek olmasının yanı sıra barındırdığı özellikler ile de diğer meyvelerden oldukça farklıdır. Başta taze üretimlerinin gerçekleştirildiği gibi farklı ürünlere de işlenebilmektedir. Turunçgillere beslenme açısından bakacak olursak; niasin, folik asit, diyet lif, potasyum, magnezyum, kalsiyum pektin vb gibi gıda bileşenlerini barındırmaktadır. Beslenme yönünden önemli bileşenlerin yanı sıra içerdiği limonoidler, fenolik bileşikler, C vitamini gibi bileşenler sayesinde insan sağlığı üzerinde oldukça önemli etkilere sahiptirler. (Baker, 1994, Rouseff ve Nagy, 1994, Farnworth, 2001, Yılmaz, 2002).

Turunçgillerin üretiminde genel olarak kullanılan turunç ve portakal, altıntop, bergamot, limon, mandalina gibi turunçgillerde dünya genelindeki gibi ülkemizde de beslenme amaçlı kullanılmaktadır. Turunç meyvesi genelde kabuk reçeli, turunç kabuk yağı ve marmelat gibi çeşitli gıdaların üretiminde rol oynamaktadır. Yani turunç meyvesinden genelde pektin üretiminden yararlanılmaktadır. Yüksek asit içeriğinden dolayı limonun yerine kullanılabilir. Ülkemizde bazı yörelerde şarap üretimi, bazılarında ise meyve ikiye ayrılarak tuz ve biber eklendikten sonra doğrudan gıda olarak tüketilmektedir. Ayriyeten turunç meyvesi kabuklarında bulunan neohesperidin dihidrokalkon içeriği tatlandırıcı olarak kullanılabilir. Olgun meyvelerinde

%2,4-2,8, olgunlaşmamış meyvelerin kabuklarında ise %14 oranında neohesperidin dihidrokalkon bulunmaktadır. Bu madde sakarinden 20, siklamattan 200 kat daha fazla oranda tatlıdır (Morton, 1987).

Turunçgil üretimi söz konusu olduğunda dünya çapında en yaygın üretim yapan ülkeler; Brezilya, ABD, Çin, Meksika, İspanya, Hindistan, İtalya, İran, Mısır, Arjantin, Türkiye ve Pakistan'dır (FAO; 2005). Meyve suyu üretimi baz alınarak bakıldığı zaman dünya çapından portakalın en büyük iki üreticisi olan ABD ve Brezilya'da sırasıyla üretilen portakalların %87 ve %73'ü, ülkemiz de üretilen portakallardan ise %9.5'i meyve suyu olarak işlenmektedir (FAO, 2003). Çukurova bölgesi ülkemiz portakal üretiminde %70'lik bir kısmı barındırmaktadır. Aynı zamanda ülkemiz meyve suyu üretiminin de yine %70'lik kısmı Çukurova bölgesinde gerçekleşmektedir (Altan, 1991; DİE, 2004). Bir meyve suyunda tat dengesi (kuru madde/asit), acılık maddesi (limonin), esansiyel yağ miktarı, renk, askorbik asit miktarı ve çöken pulp madde miktarı ile stabilitesi gibi özellikler önemli kalite unsurlarıdır (Altan, 1991).

2.2 Flavonoidler ve Limonoidler

Flavonoidler C₆-C₃-C₆ yapısında bir karbon iskeletine sahiplerdir. C₆ bölgeleri çeşitli atomları taşıyan aromatik halkalar içerirler. Flavonoidlerin karakteristik yapısını C₃ kısmındaki karbon zincirin strüktürel özelliği ve oksitlenme düzeyi belirlemektedir. Flavon, flavanon, flavonol ve antosiyanlar turunçgillerde bulunan flavonoidlerdir. Turunçgiller içerisinde en çok bulunan flavonoid türleri turunçgil dışında hiçbir meyvede bulunmayan flavonlardan tangeritin ve nobiletin'dir. Turunçgillerde bulunan diğer flavonoidler genellikle glikozid şeklindedir. Bu flavonoidlerdeki glikozidik yapı çoğunlukla ramnoz ve glukozdur (Altan, 1983a).

Flavonoidler içerisinde acı olanlar poncirin, neohesperidin ve naringin'dir. Neohesperidin (C₂₈H₃₄O₁₅). Hesperidin (C₂₈H₃₄O₁₅)'in izomeridir. Hesperidin portakalda, mandarin, limon ve ağaç kavunlarında oldukça fazla bulunan tatsız glikozid yapıda bir moleküldür. Neohesperidin ise limon ve limon çeşitlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Alkol ve suda çözünür olan bu bileşik turunçlarda mevcut olan acılıkta

önemli bir rol oynamaktadır. Bileşikler özelliklere göre hazırlanan çözeltilerde karşılaştırıldıkları zaman neohesperidin acılık düzeyi naringene göre 1/10 kadar daha azdır. Poncirin ise altıntop kabuğu ve meyve suyunda bulunan glikozid yapıda bir flavanondur. Flavanooidlerin yanı sıra turunçgillerde limoninde önemli bir acılık etmedir (Altan, 1991).

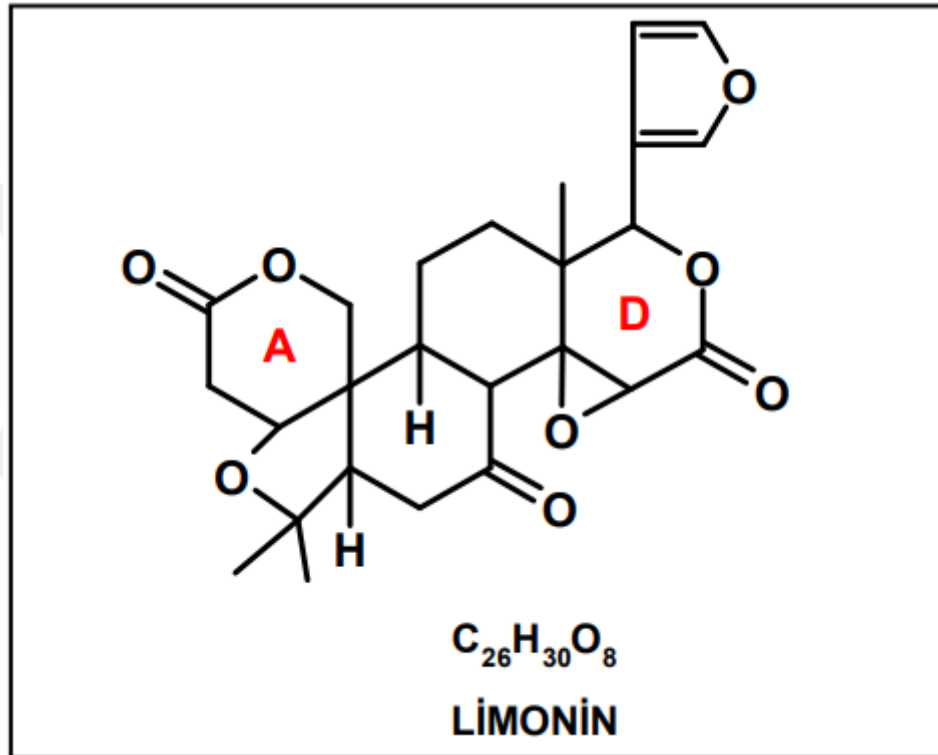
Turunçgil meyvelerindeki albedo bölgesinde ihtiva edilen limonin acılık yönünden en yüksek olan limonoidleri içermektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001). Limonin triterpenoid yapıda bilinmektedir ve özellikle portakallarda yoğun bir biçimde bulunmaktadır. Bundan dolayı portakalların meyve suyuna işlenmesi ve ürün olarak piyasa sürülmesinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır (Altan, 1983b).

Turunçgiller fiziksel bir hasar görmediyse bünyelerinde direk limonin yerine limoninin öncülü olan limonin a-halkası monolakton bulunmaktadır. Limoninin bu formu acılık oluşturmamaktadır. Fakat turunçgil meyvesi bir işleme tabi tutulursa doğranması ve ya sıkılması gibi, limonin a-halkası monolaktonun asidik özellikteki meyve suyuyla etkileşime girmesi sonucu D-halkası dehidrasyona uğrayarak limonin A, D dilakton yani limonine dönüşür. Bu madde acı tat veren bir bileşiktir. Bu sebeptendir ki portakallar ilk başta tatlı fakat herhangi bir işlemin ardından ve ya meyve suları elde edildikten bir süre sonra acılık kazanmaktadırlar. Limonin için toplumun acılık eşiği de önemli bir husustur. Bu doğrultuda toplumun geneli için acılık eşiği 1 mg/L olarak belirtilse de bazı insanların limonin konsantrasyonunun 5 mg/L düzeylerinde hissedildiği kaydedilmiştir (Ting ve Attaway, 1985; Cemeroğlu ve Karadeniz, 2001).

2.3 Limonoidler ve Limonin

Limonoidler, Rutaceae ve Meliaceae familyalarına ait bitkilerde bulunan çok yüksek düzeyde oksitlenmiş triterpenoidlerdir. Limonoidlerden ilk bilinen ve karakterize edilen bileşik limonindir. İlk olarak portakal sularından elde edilmiş ve ardından portakal suyundaki acılığın nedeni olduğu anlaşılmıştır. Limoninin ilk izolasyonu 1938 yılında yapılmış ve acı etkisi de 1949 yılında belirlenmiştir. (Higby, 1938, Emerson, 1949).

Limonin beyaz kristal yapılu bir moleküldür. Kapalı formülü $C_{26}H_{30}O_8$, molekül ağırlığı 470.50 ve erime noktası 290-292 °C'dir (Şekil 2.1.). Çözücü olarak alkol, benzen ve aseton kullanılmaktadır. Ancak az bir miktarda petrol eterinde de çözülebilmektedir. Su da ki çözünürlüğü eser miktarlardadır ki bu miktar 6 mg/L'dir. Alkali toprak metalleri ile tepkimeye girdiği zaman oluşan madde tatsız tuzlardır. Fakat oluşan bu tuzlar ortam asidik olmaya başladığı zaman (pH 6 yada 7'nin altı) limoninin acı formu olan dilaktona dönüşerek acı tat vermeye başlamaktadırlar (Kola, 2005).



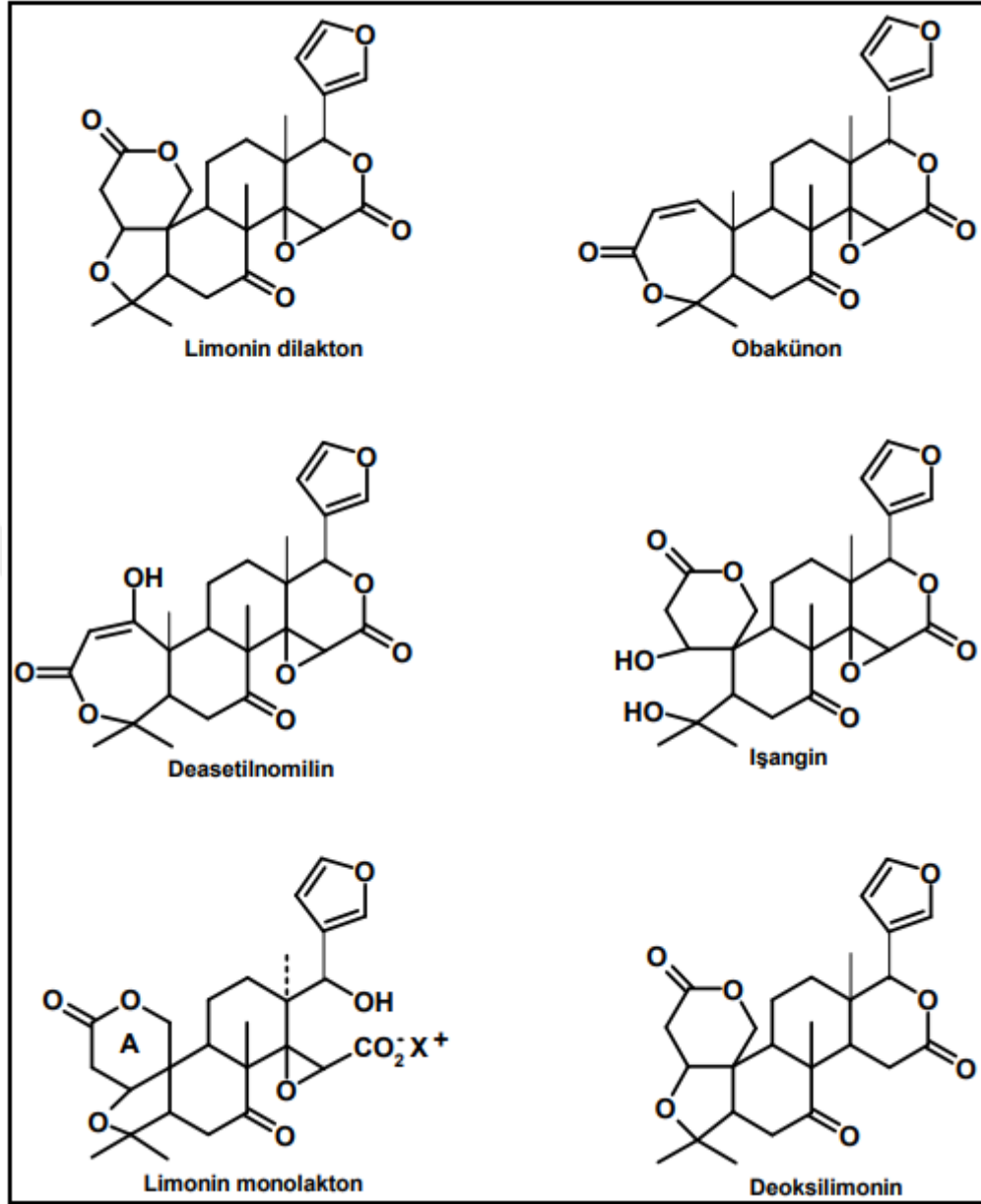
Şekil 2.1. Navel portakallarındaki limonin maddesinin kapalı formülü ve kimyasal yapısı (Kola, 2005).

Limonoidler turunçgillerin kalite unsurları arasında çok önemli bir yere sahip biyolojik olarak aktif bileşenlerdir. Limonoid aglikonlar bitkisel dokuları çeşitli zararlılara karşı koruyan bir aktivite göstermektedirler. Bu maddeler genellikle bitkinin daha olgunlaşmamış olan yaprak ve meyvelerinde bulunmaktadır. Ve buldukları yerde bitkiyi patojen organizmaların zararlı etkilerine karşı korumaktadırlar (Hasegawa 1984a).

Limonoidler ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu biyokimyasal yapıları keşfedilmiştir. Radyoaktif yöntemler ve kimyasal yapılara dayalı araştırmalar kullanılarak keşfedilen 36 limonoidlerden hepsinin kimyasal yapıları çıkarılmış ve biyosentez yolları belirlenmiştir. Limonoid aglikonların glikozidasyon ile 17b-D-glikopiranosid türevine dönüştüğü ve bu reaksiyonun meyvelerin olgunlaştığı zamanda meyve dokuları ve çekirdeklerde gerçekleştiği görülmüştür. Bunun yanı sıra limonoid sentezinin basamakları ve birikimi de ortaya çıkmıştır. Bu gelişmeler doğrultusunda ürün işlenmesi ve nihai ürünlerin karakterizasyonu için çalışmalar yapılmış bu çalışmaların ilerletilmesi için limonoidlerin ne zaman oluştuğu, birikimi ve sentezinin biyoregülasyonu üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Hasegawa ve Ark., 1997).

Turunçgillerde bulunan limonoidler yüksek oranda oksitlenmiş tetrasiklik triterpenoidlerle alakalı kimyasal bir gruptur. Yapılan hayvan çalışmaları sonucunda antikarsinojenik aktiviteye sahip oldukları ve böceklere karşı antifeedant aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Turunçgillerde bulunan limonoidler, limonoid aglikonlar ve limonoid glikozidler olarak meydana gelmektedirler. Turunçgil meyvelerinin olgunlaşmaları sırasında limonoid aglikonlar glikozide olarak limonoid glikozitleri oluştururlar. Glikozidasyon sonucu oluşan acı limonoid aglikonları doğal yollarla acılığını kaybetmektedir. Bu yol UDP-D-glikozid: limonoid glikosiltransferaz enzimi ile gerçekleşmektedir (Kola, 2005).

Turunçgillerde bulunan tüm limonoidlerde bir adet furan halkasıyla beraber bir tanede lakton halkası bulunmaktadır. Limonin, deasetilnomilin, obakünon, işangin, deoksilimonin ve limonin monolakton turunçgillerde doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Bileşiklerden bir kısmı acıdır. Şekil 2.2.'da açık formülleri verilmiştir (Higby, 1938).



Şekil 2.2. Turunçgiller de bulunan temel limonoidler (Kola, 2005).

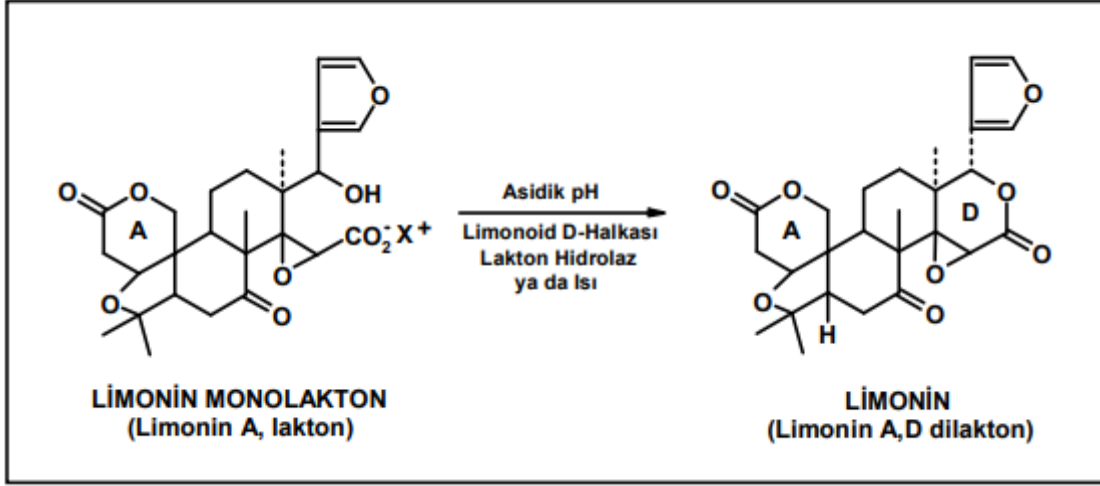
Turunçgillerde bulunan limonoidlerin asit ve alkol gibi formları ve türevleri de mevcut bulunmaktadır. Bazı turunçgil çekirdeklerinin içerdiği limonoid miktarı, asitliği ve nötrallığı Çizelge 2.1.'de verilmiştir. (Kola, 2005).

Çizelge 2.1. Bazı Turunçgil çekirdeklerinin limonoid içerikleri (Hasegawa ve Ark., 1980a).

Turunçgil Türü	Limonoid Miktarı (%)	Limonoidlerin Karakteri (%)	
		Nötral	Asidik
Altıntop	1.50	77	23
Portakal	1.10	84	16
Limon	1.10	61	39
Kalamondin	0.75	83	17
Kumquat	0.61	55	45

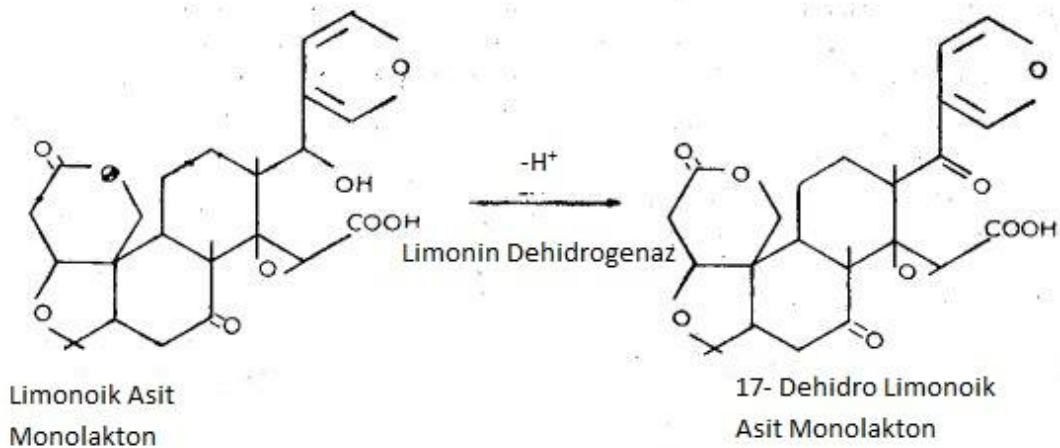
Çalışılan limonoidlerin çoğu turunçgillerin çekirdeklerinden izole edilmiştir. Bazıları ise turunçgil meyvelerinin başka kısımlarında bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda ise portakalların suyundan ve kabuğundan da limonin, limonin türevleri, asit ve nötral halleri elde edilmiştir. Limoninler gruplandırılırken kimyasal yapılarındaki benzerlikler baz alınarak yapılır. Örnek olarak karbon iskeletine bağlı bulunan metile göre veya limonoidlerin eter halkasına sahip olması gibi özelliklerle gruplandırılmaktadır (Kola, 2005).

Portakallarda acılık etmeni olarak kayda geçen tek bileşik limonindir. Portakallar arasından en çok navel portakalında bulunmakta ve turunçgiller arasından meyve suyu üretiminden en çok kullanılan portakal çeşidi de navel portakalıdır. Portakallar taze olarak kullanıldıkları zaman ve ya suları sıkıldıktan hemen sonra tüketildiklerinde herhangi bir acı tat içermemektedirler. Yalnız portakal suları hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında (1-2 saat) veya buzdolabında (bir gece) bekletildiğinde hızlı bir şekilde acılık kazandığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebi gecikmeli acılıktır. Bu da acı olmayan öncül maddelerin hızla limonine dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. (Şekil 2.3.). (Higby, 1938).



Şekil 2.3. Acı olmayan limonin A Monolakton'un düşük pH derecesinde acı olan Limonin A, D- dilaktona'a dönüşümü (Kola, 2005).

Limonin dehidrogenaz (LD) olarak adlandırılan enzimler limonin öncül maddelerinden olan limonoik asit monolaktonun 17' no'lu karbonundaki hidroksil grubunu dehidrojenize ederek acı olmayan bu öncül maddeyi asidik koşullarda ve fiziksel deformasyonlar sonucu acı forma dönüşmeyen 17- dehidro limonin monolaktone dönüştürmektedir. Bu madde acı olan dilakton formuna dönüşmemektedir (Şekil 2.4) (Hasegawa 1984a).

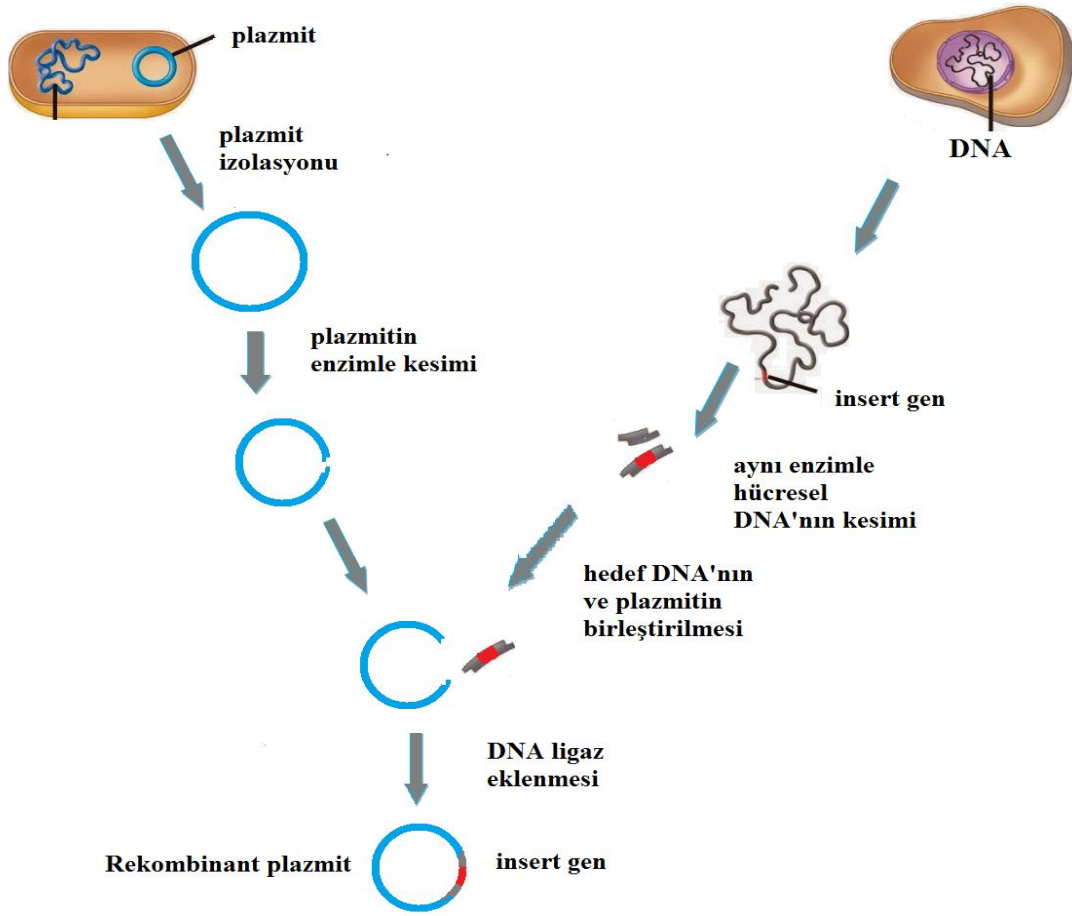


Şekil 2.4. Limonin öncülü olan limonik asit monolakton'nun 17- dehidro limonoik asit monolaktone dönüşümü (Hasegawa 1984a'dan uyarlanmıştır).

2.4 Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi 1960'lı yıllarda DNA ile yapılan çalışmalar sonucu bu alanda yer alan enzimlerin işleyişlerinin keşfedilmesiyle birlikte geliştirilen yeni yöntemlerle ortaya çıkmıştır. Bu yıllarda ve öncesinde moleküler biyoloji ile ilgili çalışmalar ve gelişen teknolojiler ile biriken bilgi rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturmaktadır (Katartaş, 2011).

Rekombinant DNA teknolojisi genellikle farklı türlerden saflaştırılan DNA moleküllerinin, genetik mühendisliği uygulamaları ile kesilip, çıkan DNA ürünlerinin farklı biyolojik kaynaklı DNA parçaları ile birleştirilmesini ve yapılan işlemler sonucu üretilmiş olan yeni DNA molekülüne denir. Hedeflenen DNA'nın ilgilenilen parçası restriksiyon enzimleri ile kesilerek bir taşıyıcıya eklenir. Bu taşıyıcı bakteri plazmidleri gibi kendisi çoğalabilen vektörlerdir. Vektöre entegre edilen ve vektör DNA' ile bütünleşmiş olan yeni DNA moleküle Rekombinant DNA denilmektedir. Rekombinant DNA olarak adlandırılan bu yeni molekül uygun bakteri hücrelerine transforme edilir. Transformasyon sonucu kopyalanan DNA orada çoğalarak klonlar (kopyalar) oluşturmaktadır. Oluşan bu kopya DNA'lar aktarıldıkları hücrelerden saflaştırılmak sureti ile ilgili tekniklerle doğrulanmaktadır (Yıldırım ve Bardakçı, 2010).



Şekil 2.5. Plazmit kullanarak gen kulanlanması ve rekombinant DNA eldesi (Pearson education Inc., 2009)

Kısacası canlı bir türden izole edilen genin yapılan çalışmaya uygun bir vektöre eklenmesi, ardından da konağa transformasyonu ile çoğaltılması ve bazen de istenilen ürünün ifade edilmesini amaçlayan çalışmalar için geliştirilen tekniklere rekombinant DNA teknolojisi denmektedir (Katartaş, 2011).

2.4.1 Genomik DNA ve vektör DNA izolasyonu

Rekombinant DNA çalışmalarında ilk basamak çalışması yapılacak olan DNA'nın ve kullanılacak olan vektör DNA'sının izolasyonudur. DNA izolasyonu gerçekleştirilirken temel prensip; ilk önce organizmanın hücre zarı veya duvarını zayıflatarak

parçalamaktır. Bu işlem SDS gibi deterjanlar, lizozim gibi enzimler ve mekanik yöntemlerin tek başına veya sırayla kullanılmasıyla gerçekleştirilir. DNA'nın açığa çıkarılması ardından çeşitli kirleticilerin (protein, polisakkarit, RNA) organik çözücüler (fenol-kloroform) ve enzimler (RNAaz enzimi) ile giderilmesi gerekmektedir. Ardından DNA tuzlu ortamda alkol ile çöktürülmektedir. Temel basamakları bu şekilde olan izolasyon işlemi çalışılan organizmaya göre farklılıklar gösterebilmektedir (Yıldırım ve Bardakçı, 2010).

Kullanılacak olan vektör tipine göre izolasyon metotları bazı değişiklikler içermektedir. Genellikle kullanılan plazmitler için DNA izolasyon metodu genomik DNA izolasyonu ile neredeyse aynıdır. Kullanılacak olan vektörü (plazmitleri) barındıran bakteri hücreleri besiyerine aktararak çoğaltılır. Ardından santrifüj cihazında toplanarak konak hücreye göre seçilen yöntemle hücre duvarı parçalanır. Parçalanan hüclerden açığa çıkan kirleticiler kimyasallar ve enzimler ile giderildikten sonra DNA etanol ile çöktürülür. Genomik DNA izolasyonundan farklı olarak bu işlemler sırasında plazmid DNA'sı ile Genomik DNA yı birbirinden ayırmak gerekmektedir. İstenmeyen bakteriyel DNA kalıntıları gen klonlama işlemi sırasında sıkıntılara yol açabilmektedir. Bakteriyel DNA ile vektör DNA'sını ayırt etmek için ikisi arasındaki yapı ve büyüklük farkı kullanılır. En sık kullanılanları alkali denatürasyonu ve etidyum bromid-sezyum klorür yoğunluk gradienti santrifüjlemesidir (Katartaş, 2011).

Plazmit yerine faj vektörü kullanılırsa bakterilerden izolasyon yerine enfekte bakteri kültürleri büyütüldükten sonra bulunduğu besi yerinden izole edilir. Bu işlem sırasında mevcut sıkıntılardan biri hücre dışı faj oranının belli bir seviyede olmasıdır. Bu yoğunluğun yakalanabilmesi için 1-2 litrelik kültürlerin oluşturulması gerekmektedir. Büyütülen kültürlerin santrifüj edilmesiyle oluşan pelet ve süpernatant kısımdan süpernatant alınarak polietilen glikol ile çöktürme işlemi gerçekleştirilir. Pelet kısmında bakteriler süpernatant kısmında ise üretilen fajlar bulunmaktadır. Polietilen glikol ile çöktürme işleminde süpernatanttaki fajlar çöker ve kapsidler uzaklaştırılır (Yıldırım ve Bardakçı, 2010).

2.4.2 Restriksiyon enzimleri

Hücrelerde meydana gelen DNA eşlenmesi transkripsiyon, çeşitli DNA hasarlarının giderilmesi, yabancı DNA'ların ortamdan arındırılması gibi işlemler enzimler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu enzimler hücrelerden izole edildikten sonra uygun ortam şartları oluşturularak tekrar kullanılabilirler. Ticari olarak üretilen enzimlerden restriksiyon enzimleri rekombinasyonda vazgeçilmez unsurlardandır. Restriksiyon endonükleazlar belirli nükleotid dizilerini tanıyarak reaksiyon veren enzimlerdir. Bu işlemi gerçekleştirirken çift zincirli DNA molekülünün iki zincirini birden keserler. Bakteri ve arkelerin ihtiva ettiği enzimler viral kaynaklı DNA moleküllerini parçalayarak bir savunma mekanizması oluşturmuşlardır. Hücre DNA'sı kendini metilasyon enzimleri ile metilleyerek restriksiyon endonükleazların aktivitesinden korumaktadır (Yıldırım ve Bardakçı, 2010).

Moleküler biyolojide makas olarak isimlendirilen endonükleazlar gerçekleştirdikleri kesim ardından simetri merkezinde aktivite göstermişlere küt uçlu, simetri merkezinin dışında aktivite göstermiş ise yapışkan uçlu fragmentler oluşturmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinde hedeflenen gen ile vektörün benzer enzimler veya aynı yapışkan uçları oluşturan farklı enzimler ile kesilmesi sonucunda kesim bölgelerinin uyum sağlaması ve daha verimli sonuçlar oluşturmaya neden olmaktadır (Katartaş, 2011).

Yaklaşık olarak 1200 farklı belirlenmiş restriksiyon enzimi mevcuttur. Tip 1, tip 2 ve tip 3 olarak adlandırılan 3 farklı gruptan oluşmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinde en yaygın kullanılan grup tip 2 dir. Tip 2 restriksiyon enzimlerinin en önemli özelliği DNA'yı tanıma bölgesi içerisinden keserler. Geri kalan gruplar ise tanıma bölgesi dışından kesim gerçekleştirdiği için bilinmezliğe sebebiyet verir ve bu nedenden dolayı tercih edilmemektedir. Tip 2 endonükleazlar rekombinasyonun vazgeçilmez unsurlarından birisidir. Bunun en temel sebepleri 4-8 nükleotid uzunluğunda bir tanıma bölgelerinin olması ve palindromik olmalarıdır. Yani zigzag şeklinde 5'-3' ile 3'-5' tanıma bölgeleri aynı diziyi ifade etmektedir Çizelge 2.2. (Ayter, 1988).

Çizelge 2.2. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları (Kuk, 2008).

Enzimin adı	İzole edildiği mikroorganizma	Oluşturduğu uç	Tanıma dizisi
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] GATCC-3' 3'-C CTAG [^] G-5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] AATTC-3' 3'-C TTAA [^] G-5'
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yapışkan uç	5'-GGTAC [^] C-3' 3'-C [^] CATGG-5'
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] TCGAC-3' 3'-C AGCT [^] G-5'
<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	Yapışkan uç	5'-C [^] TCGAG-3' 3'-G AGCT [^] C-5'
<i>AluI</i>	<i>Artrobacter luteus</i>	Künt uç	5'-AG [^] CT-3' 3'-TC [^] GA-5'
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcessens</i>	Künt uç	5'-CCC [^] GGG-3' 3'-GGG [^] CCC-5'

Endonükleazlar ile kesilen DNA'dan oluşan fragmentleri ayırt etmek için jel elektroforezi kullanılmaktadır. Jel elektroforezinde fragmentlet büyüklüklerine göre ayrılırlar. İstenilen bölge jelden saflaştırıldıktan sonra plasmid DNA ile çoğaltılarak kullanılabilir. Bu işlemi gerçekleştirirken kanakçı organizmanın kendi DNA'sının üremesine engel olunmalıdır. Oluşturulan yapışkan uçların kendi kendilerine hidrojen bağı oluşturmak sureti ile birleşmeleri her ne kadar mümkün olsada yeterli değildir. Rekombinant DNA teknolojisi için önemli olan bir diğer enzim grubu DNA ligazlar bu basamakta devreye girmektedir (Ayter, 1988).

2.4.3 DNA ligazlar

Ligasyon, restriksiyon endonükleazlar ile kesilerek meydana gelen yapışkan uçlu fragmentlerin ya kendi aralarında ya da aynı enzim ile kesilmiş başka DNA fragmentleri ile invitro şartlarda DNA ligaz enzimleri ile birleştirilme olayıdır. DNA replikasyonunda meydana gelen parçaları 3'-5' yönünde fosfodiester bağları ile bağlarlar. Ayrıca hasar görmüş DNA tamirinde de görev almaktadırlar. Hedef DNA fragmenti ile kesilmiş durumda olan vektörün yapışkan uçları aynı enzim ya da aynı yapışkan ucu bırakan farklı enzimler kullanıldığı takdirde aralarında hidrojenbağı kurmaktadır. Ortamda ATP varlığında ligazlar yapışkan ucu bulunan DNA fragmentlerinden birinin 3' hidroksil ucuyla vektörün 5' fosfat ucu arasında 3'-5' fosfodiester bağının oluşumunu tetiklemektedirler (Katartaş, 2011).

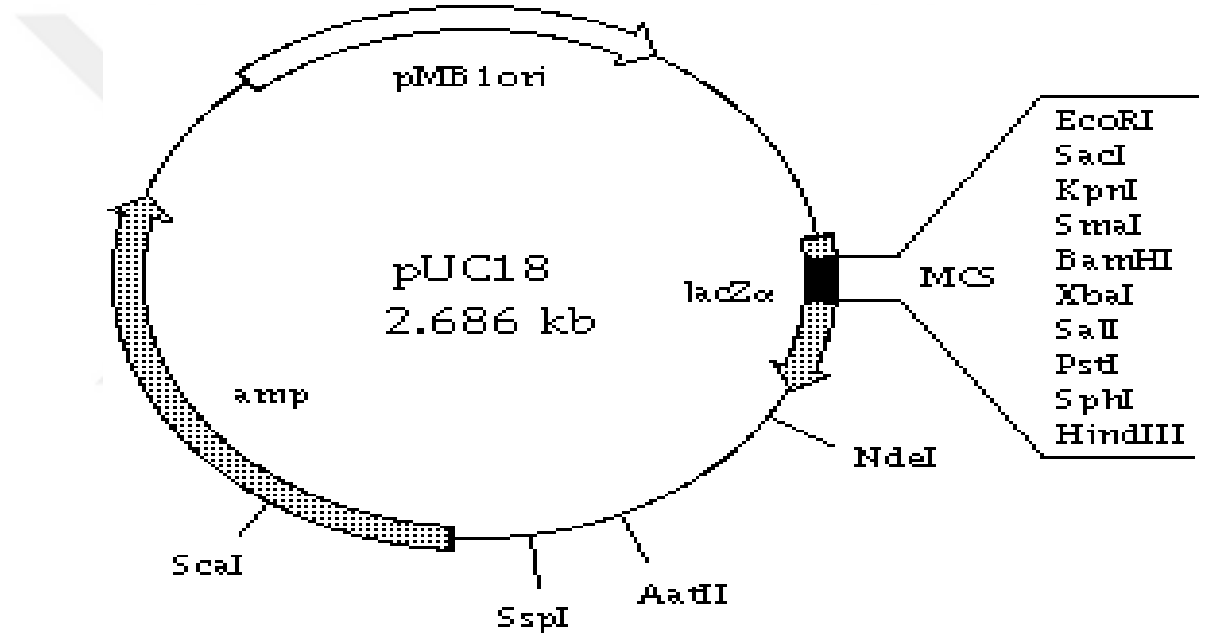
Bu ligasyon işlemi küt uç oluşturan restriksiyon endonükleazlar ile kesilen DNA ve vektör arasında da bağlanmaları sağlayabilmektedir. Bunun için T4 DNA ligaz enzimi kullanılır fakat başarı oranı yapışkan uca göre çok düşüktür. Çünkü küt uçların karşı karşıya gelme ihtimalleri çok azdır (Ayter, 1988).

2.4.4 Vektörler

Elde edilen hedef geni çıplak bir şekilde hücre içerisine aktarmak, aktarılsa bile geni hücre içerisinde çoğaltmak mümkün olmadığı için bakteri hücresi içerisinde bağımsız olarak kendini replike edebilecek bir DNA molekülü ile birleştirilmesi gerekmektedir. Hedef genin bağlanacağı DNA molekülünün bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Aktarılacağı konak hücre ile uygun bir replika merkezine sahip olmalı ve çoğaldıktan sonra izolasyonu kolay olmalıdır. Seçilen vektörün hedef geni taşıyıp taşımadığını anlayabilmek için belirteç gen bölgelerine sahip olması gerekmektedir. Bunlar genel bir antibiyotiğe direnç geni ve ya konak hücrenin sentezleyemediği bir enzim ya da florasan özelliğe bir protein gibi belirteçler olmalıdır. Vektör seçimi yapılırken hedef genin büyüklüğü, yapılan çalışmanın amacı gibi bir çok farklı özelliğe göre seçim yapılır (Katartaş, 2011).

2.4.4.1 Plazmitler

Plazmidler, doğal olarak bütün bakterilerde mevcuttur. Bulunduğu bakteriye ortam şartlarına uyum sağlamasında ve maruz kaldığı çevresel şartlar ile baş edebilmesine yardımcı olan ekstra özellikler katmaktadırlar. Bazı substratları parçalayabileceklerine yardımcı olarak enzimler ya da antibiyotiğe direnç göstermelerini yardımcı olacak antibiyotikleri inaktif hale getiren enzimleri sentezlemelerine yarayan dizileri içerebilmektedirler. Konak hücre içerisinde bağımsız olarak replike olabilirler. Çift zincirli ve halkasal yapıya sahiptirler (Katartaş, 2011).



Şekil 2.6. pUC18 plazmit vektörü (Katartaş, 2011).

Genel amaçlı kullanılan ve bilinen en eski plazmit vektör olan Pbr322 4361 baz çiftine sahiptir. Hedef geni içerip içermediğini kontrol etmek için kullanılan belirteçler amfisillin ve tetrasiklin antibiyotiklerine dirençli genlerdir. Bu gen dizileri içerisinde klonlama yapılabilmesi için yaygın kullanılan restriksiyon enzim kesim yerleri bulunmaktadır. Kapalı haldeyken antibiyotik direnç geni dizilerinin bulunduğu bölgelerden kesildiği zaman yapışkan uçlu doğrusal DNA moleküllerine dönüşmektedir. Bu sayede kesilmiş ve yapışkan uç oluşturmuş hedef DNA ile DNA ligaz enzimleri sayesinde birleşebilmektedir. Hangi antibiyotik direnci sağlayan dizinin içerisinde

yerleştirildiyse o antibiyotiğe duyarlı olacağı için bu yöntemle seçilebilir hale gelmektedir (Ayter, 1988).

Pbr322'den daha gelişmiş bir vektör olan Puc vektörü antibiyotiklere direnç genlerinin yanı sıra *E.coli* B-galaktosidaz geninin de bir parçasını içermektedir. Bu dizinin içerisinde de enzim kesim bölgeleri bulunmaktadır. Bu dizinin içerisine klonlama yaptığı takdir de hücreler X-gal içeren bir besi yerine ekilirse kolaylıkla seçilebilmektedir. Puc vektörü 5-10 kb boyutundaki DNA fragmentleri için kullanılmaktadır (Katartaş, 2011).

2.4.4.2 Viral vektörler

Plazmitlerin vektör olarak kullanımlarında maksimum 10 kb büyüklüğündeki DNA fragmentleri kabul edebildiği için daha büyük klonlamaları mümkün kılmak adına viral vektörler geliştirilmiştir. En çok kullanılan faj bir *E.coli* virüsü olan lambda fajıdır. 45 kb büyüklüğünde olan bu faj içerisindeki 15 kb lık bir dizi sayesinde konakçı genomuna sızarak kendisini çoğaltmaktadır. Doğrusu olan bu genom cos bölgeleri içermesinden dolayı halkasal yapıda oluşturabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı aynı plazmitler gibi konakçı hücreye aktarılabilirler (Yıldırım ve Bardakçı, 2010).

Plazmid ve viral vektörler dışında kullanım amacına göre birçok vektör bulunmaktadır. Kozmid vektör gama fazı ve plazmit DNA parçasından meydana gelen hybrid vektörlerdir. Bac ve yac vektörleri daha büyük DNA parçalarını klonlamak için kullanılan bakteri ve maya yapay vektörleridir (Katartaş, 2011).

2.4.5 Hedef Geni İçeren Vektörün Hücreye Aktarılması

Hedef gen fragmentini vektöre entegre ettikten sonra, vektörün kendisini çoğalta bilmesi için bir konakçı kullanılmaktadır. Vektör konakçı hücre içerisine kimyasal ve ya fiziksel yöntemler kullanarak aktarılmaktadır. Bu işleme transformasyon denmektedir. Genel olarak ucuz ve etkin olduğu için kimyasal yöntemler tercihilmektedir yalnız elektroparasyon metodu daha etkin ve kısa sürede gerçekleştiği için tercih

edilebilmektedir. Transformasyon için kullanılacak hücelere kompetant hücelere denir. Bu hücelere ticari olarak ulaşılabileceği gibi kompetant hücelere laboratuvar ortamında da hazırlanabilmektedir (Kuk, 2008)

2.4.6 Klonlama Vektörün Hücreden Seçimi

Hedeflenen geni doğru bir şekilde almış rekombinant plazmitlerin transformasyonu sonrası besiyerinden seçilmesi önemli bir problemdir. Transformasyon sonucu çoğalan organizmalar onlarca farklı koloni oluşturmaktadır. Oluşan kolonilerin hangilerinde rekombinant plazmitlerin olduğunu tespit edebilmek için kullanılan, plazmit vektörlerin içerdikleri antibiyotik direnç genleridir. Bu genler sayesinde basitçe seçim yapılabilmektedir (Yıldırım ve Bardakçı, 2010).

2.4.7 Klonlamanın Doğrulaması

PCR analizi, doğrulama kesimi ve en kesin bilgi olarak DNA dizisi analizi ile Rekombinant DNA'nın doğrulaması yapılabilmektedir (Kuk, 2008)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışması esnasında kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları

Kullanılan Cihaz	Markası
MD ₅₀₀ mikrodalga fırın	ARÇELİK
DNA Engine, PCR makinesi	BIORAD
Güç kaynağı	BIORAD
Bio TDB100 Termostatlı Blok Isıtıcı	BIOSAN
Spin Cihaz	BIOSAN, Combi Spin FVL 2400N
Çalkalayıcı İnkübatör	BIOSAN ES 20
Mikro 22R santrifüj	HETTICH
80 dondurucu,	HETTICH
50L otoklav,	HMC HIRAYAMA
UV/VIS Spektrofotometresi,	VARIAN CARRY 50
Etüv	MEMMERT
Sonikatör	SONICS (VCX130)
UV Gösterici	SYNGENE SYTC/1422
Dikey Soğutucu +4°C	UĞUR
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	VELP SCIENTIFICA ARE
Buzdolabı	VESTEL GTP 455A
Yüksek Hızlı Santrifüj	VISION VS 30 000i
Kar makinesi	VISION

Çalkalayıcı İnkübatör	ZHICHENG - ZHWY111C
-----------------------	---------------------

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallar ve markaları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Tez çalışması esnasında kullanılan kimyasallar ve markaları

Kullanılan Kimyasal	Markası
Agar	BD Bacto™ Agar
Agaroz	Sigma Aldrich
Akrilamid	Amresco
Ampisilin	Sigma Aldrich
APS	Biorad
<i>BamHI</i>	Takara
Beta Merkaptotanol	Carlo Erba
Bezamidin	Merck
BSA	Promega
CaCl ₂ .2H ₂ O	Carlo Erba
DMSO	Merck
DTT	Bio Basic
Etanol	Merck
Etidyum bromür	ICN
Gliserol	VWR
HCl	Merck
IPTG	Amresco
İmidazol	Merck
Jelden DNA izolasyon kiti	Geneaid
KCH ₃ COO	Merck
KCl	Sigma

Kloramfenikol	Sigma
<i>KpnI</i>	Takara
LB Broth Base	Invitrogen lennox L Broth Base
Naringin	Alfa Aesar
Dietilen Glikol	Sigma

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler

PMSF çözeltisi : 1 ml absolute etanolde 150 µg çözülerek hazırlanmıştır.

Kloramfenikol Çözeltisi: 1 ml'de 34 mg kloramfenikol olacak şekilde absolute etanolde çözülmüştür. Ardından 0,2 µm'lik filtre ile steril edilerek hazırlanmıştır.

FSB çözeltisi: Total hacim 1,000 ml olacak şekilde 7.4 g KCl, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 100 g gliserol, 10 ml 1 M (pH:7.5) KCH₃COO alınmıştır. pH:6,5'e ayarlanarak otoklavlanmıştır.

Ampisilin: 15 ml saf su içerisinde 1,5 gr ampisilin çözülmüştür. 0.2 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra tüplere bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

IPTG: 15 ml saf su içerisinde 1,5 gr IPTG çözülerek 0.2 µm'lik steril filtrelerle muamele edilmiştir. Ardından mikrotüplere bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

LB çözeltisi: 1,000 ml suda 20 g LB (luria-Bertani) Broth Base olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. 500 ml'lik kısmı ikiye bölünerek üzerine 3,75 g agar eklenmiştir. 250 ml için 3,75 g agar olacak şekilde. Geri kalan kısım 4 ml'lik ve 50 ml'lik erlenlere dağıtılmıştır. 250 ml çözelti içeren stok şişeleri, 50 ml'lik erlenler ve 4 ml'lik tüplerin ağız kısımlarına alüminyum folyo kapatılarak otoklava atılmıştır.

Agaroz Elektroforez Jeli: 150 ml 1 X TAE tampon çözeltisi içerisine 1,5 gr agaroz eklenmiştir. Mikrodalgada eritilerek homojenize edildikten sonra 1,5 µl etidyum bromür eklenmiş ve kasete dökülerek hazırlanmıştır.

SDS Elektroforez Jeli:

Alt Tampon: 182 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1 000 ml saf suda çözülerek pH:8.8 olarak ayarlanmıştır.

Üst Tampon: 60.5 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1 000 ml saf suda çözülerek pH:6.6 olarak ayarlanmıştır.

Yürütme jeli: 2.7 ml %40 akrilamid, 2.25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µl %10 APS ve 20 µl TEMED.

Yükleme jeli: 0.35 ml %40 akrilamid, 1 ml üst tampon, 2.55 ml su, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED. Tüm maddeler katılmıştır ve en son TEMED eklenip kasete döküldü. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü ve polimerleşmesi beklenmiştir.

Elektroforez Tamponu (1X): 3 g Tris, 14.4 g Glisin, 1 g SDS bileşikleri son hacim 1 000 ml olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yüklem Tamponu (5X): 0.6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 ml gliserol (%50), 2 ml %10'luk SDS, 0.5 ml β-ME (β- Merkaptoetanol), 1 000 µl %1'lik Bromfenol mavisi ve 0.9 ml saf su karışımından hazırlanmıştır.

SDS Jel boyama (Staining) Çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzöldükten sonra, karışımın üzerine 100 ml asetik asit ve 450 ml saf su eklenerek hazırlanmıştır

Destaining Çözeltisi: 100 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 800 ml saf su karışımından hazırlanmıştır

Amonyum Persülfat (APS-%10): 0.5 g APS 5 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır

Tris Tamponu: 12: 115 g tris alınarak bir miktar suda çözüldü. pH derişik HCl ile 7,5'e getirildi. 2.922 g NaCl (50 mmol) eklendi ve hacim su ile 1 litreye tamamlandı.

İmidazol çözeltilisi: 2,045 gram imidazol (300 mmol) üzerine bir miktar tris tamponu eklendi ve çözündürüldü. Toplam hacim bu tamponla 100 ml'ye tamamlandı.

Diyaliz çözeltilisi: 10 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH:7.5 olacak şekilde 3 litre distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Afinite Kromatografisiyle Safıaştırmada Kullanılan Çözeltiler:

NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu: 65 ml 0.2 M NaH₂PO₄ ve 0.2 M 435 ml Na₂HPO₄ karıştırıldıktan sonra pH:8.0'a ayarlanarak toplam hacim saf su ile 1 000 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (Loading Buffer) 2.92 g NaCl 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözüldü.

Yıkama tamponu (Wash Buffer): (25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH:8): 0.85 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözüldü.

Elüsyon tamponu (Elution Buffer): (300 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH:8.0): 10.2 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (pH:8.0) çözüldü.

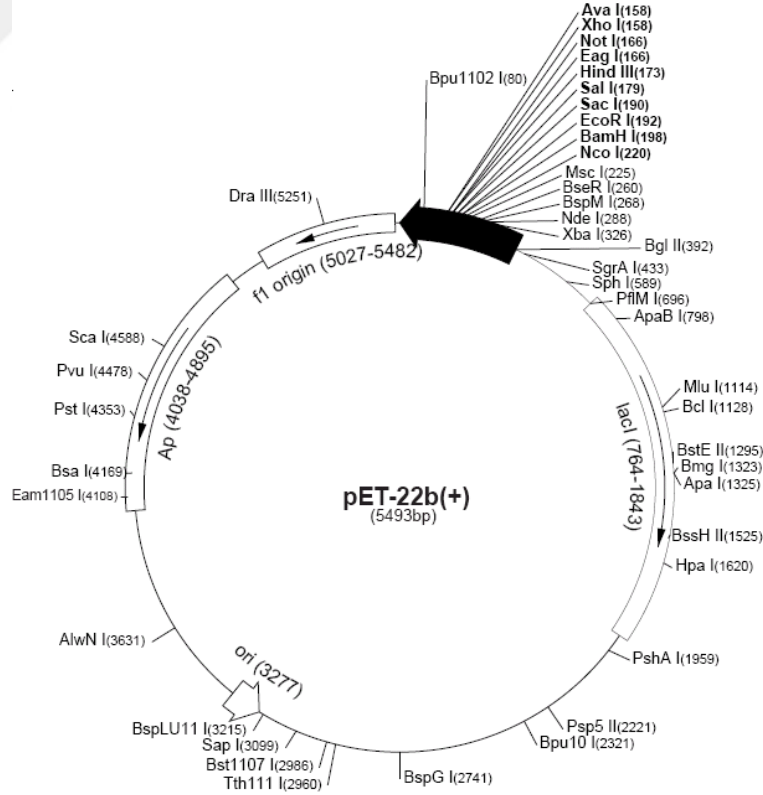
Tris Tamponu: 12.12 g tris alınarak bir miktar suda çözüldü. pH derişik HCl ile 7.5'e getirildi. 2.92 g NaCl eklenmiştir ve hacim su ile 1 000 ml'ye tamamlanmıştır.

300mM imidazol Tris/HCl Tamponu: 2.04 g imidazol 100 ml Tris/HCl tamponu içinde çözüldü. pH derişik HCl ile 7.5'e getirildi.

3.2 YÖNTEM

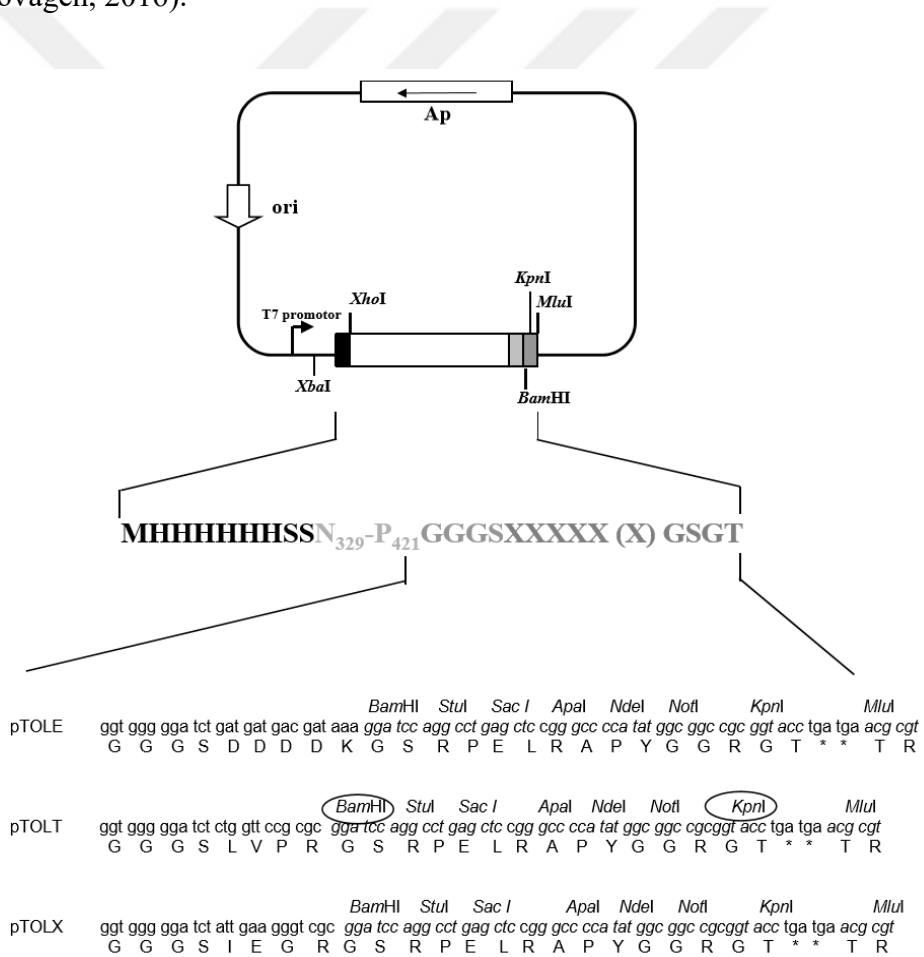
3.2.1 Hedef Genin Seçilmesi

Limonin dehidrogenaz enziminin üretimi için gerekli olan DNA dizisine NCBI'dan ulaşıldı. Klonlama için öncelik olarak pet22b vektörü seçildi (Şekil 3.1) pTOLT (Şekil 3.2) vektöründe kullanıldı. NCBI'dan ulaşılan diziye E. coli K12 hücresi için biyoinformatik araçlardan yararlanılarak kodon optimizasyonu yapıldı. Klonlama sırasında kullanılmak üzere dizinin başına ve sonuna sırasıyla BamHI, NcoI ve KpnI, XhoI restiriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklendi. Üretimi amaçlanan enziminin nükleotid dizisi üretim sonrası saflaştırma basamağında kullanılmak üzere His taga uyumlu şekilde tasarlanmıştır. Biyoinformatik araçlar ile düzenlenmiş olan gelen dizisi Macrogen firmasına sentezlettirildi.





Şekil 3.1. Pet22b vektörü detaylı DNA dizisinin dairesel haritası. Restriksiyon enzim bölgeler (Novagen, 2016).



Şekil 3.2. pTOLT vektörünün restriksiyon enzim bölgelerini içeren detaylı DNA dizisi (Anderluh ve ark., 2003).

Orjinal dizi ile kodon optimizasyonu yapılan dizinin clustal omega programı ile karşılaştırılması.

orjinal	GCTTTGATGAAAACATAAATTGTTTATTAATAATACTATGGCTTCTTCTGGTATTGGTTTG
Optimize	GCTTTGATGAAGACTAAGTTGTTTCATCAACAACACTATGGCTTCTTCTGGTATCGGTTTG *****.*****.***** ** ** * *****
orjinal	GAAACTGATGCTATTAAGCTGCTCAAGCTGTTTATTGTCAAGGTCAAATTTGTATGTCT
Optimize	GAAACTGACGCTATCAAGCTGCTCAAGCTGTTTACTGTCAAGGTCAAATCTGTATGTCT ***** ** ** .***** *****
orjinal	GAAGAACAAGAAGCTTTGTGTCCATTTGATAGATTGGAAGGTGAAGTTGCTATTTGTTGTT
Optimize	GAAGAACAAGAAGCTTTGTGTCCATTCGACAGATTGGAAGGTGAAGTTGCTATCGTTGTT ***** ** *****
orjinal	GGTGTGGTCCATCTGAAAGAAGAAGATTGTTGTTGAAAGTTGCTGATGTTATGGAATCT
Optimize	GGTGTGGTCCATCTGAAAGAAGAAGATTGTTGTTGAAAGTTGCTGACGTTATGGAATCT *****.***** *****
orjinal	AAAACCTCCAAAATTTATTGAAGTTATGGCTATGGAAGTTGGTGCTTCTGCTTTGTGGGCT
Optimize	AAGACTCCAAAGTTTCATCGAAGTTATGGCTATGGAAGTTGGTGCTTCTGCTTTGTGGGCT ** .***** .** ** *****
orjinal	GGTTTTAATGTTTCATGCTTCTGCTAATGTTTTTAGAGAAGCTGCTTCTTTGGCTACTCAA
Optimize	GGTTTCAACGTTTCACGCTTCTGCTAACGTTTTAGAGAAGCTGCTTCTTTGGCTACTCAA ***** ** ***** *****
orjinal	ATCAAGGTACTCCATTGGGTTTTGCTGTTCCAAGTGAAGCTTTTGAATGGCTACTCCA
Optimize	ATCCAAGGTACTCCATTGGGTTTCGCTGTTCCAAGTGAAGCTTTGAAATGGCTACTCCA ** ***** *****
orjinal	GATGGTACTGGTGCTTTGAATTATGGTGTAGAAAGACCAAAGGTGTTATTGGTGTATT
Optimize	GACGGTACTGGTGCTTTGAACTACGGTGTAGAAAGACCAAAGGTGTTATCGGTGTTATC ** ***** ** *****.***** *****
orjinal	TCTCCATGGAATTTGCCATTGTTGTTGATGACTTGGAAGTTGGTCCAGCTTTGGCTTGT
Optimize	TCTCCGTGGAACCTGCCATTGTTGTTGATGACTTGGAAGTTGGTCCAGCTTTGGCTTGT *****.***** *****.***** *****
orjinal	GGTAATACTGTTGTTGTTAAACCATCTAGAATTAATGGTTTGTAAAGATGCTATTGAT
Optimize	GGTAACACTGTTGTTGTTAAGCCATCTAGAATCAACGGTTTGTCAAGGACGCTATCGAC ***** *****.***** ** ***** ** .** ***** **
orjinal	AAAGGTGCTAAAGTTGTTTGTGGTGGTATGGCTCAAGGTGCTGTTGGTGTTTGAATTAT
Optimize	AAGGTGCTAAAGTTGTTTGTGGTGGTATGGCTCAAGGTGCTGTTGGTGTTTGAACTAC ** .***** .***** ***** **
orjinal	TTGAATAGAGTTAATGCTGTTCAACCAGGTGGTACTGTTATTTCTTTGTGTGGTCCAGCT
Optimize	TTGAACAGAGTTAACGCTGTTCAACCAGGTGGTACTGTTATCTCTTTGTGTGGTCCAGCT ***** ***** ***** ***** *****
orjinal	TCTGCTGGTTTTGATATTGCTAATGATTCTGTTTATGGTTTGTCTTCTGGTATGATATG
Optimize	TCTGCTGGTTTCGACATCGCTAACGACTCTGTTTACGGTTTGTCTTCTGGTACGACATG ***** ** ** ***** ** ***** ***** ***** ** **
orjinal	ATTAAACAATTGACTCCATTGGGTTTTGCTGCTAAACCAGAAGATAATGTTGAACCATAT
Optimize	ATCAAGCAATTGACTCCATTGGGTTTCGCTGCTAAACCAGAAGACAACGTTGAACCATA ** ** .***** ***** *****.***** ** *****
orjinal	TTGTTGGGTGCTTCTAGAAAACAAGGTAAAGGTATTACTACTACTGTTATTTCTATTGAT
Optimize	TTGTTGGGTGCTTCTAGAAAGCAAGGTAAAGGTATTACTACTACTGTTATCTCTATCGAC *****.*****.***** ***** *****

3.2.2 Gen fragmentlerinin Klonlanması

Tasarlanan geni içeren plazmit Macrogen firması tarafından sentezlendi ve laboratuvarımıza ulaştırıldı. Kompetent *E.coli* DH5 α hücreleri kullanılarak plazmit hücreler çoğaltıldı. Bunun için *E.coli* hücrelerine ısı şoku uygulama yoluyla plazmit aktarıldı. Plazmit içeren hücreler 1:1 oranında ampisilin içeren katı besiyerine inokule edildi. İnkübasyon süresi bir gece 37°C olarak ayarlandı. İnkübasyondan sonra seçilen koloniler 1:1 oranında ampisilin içeren sıvı besiyerine aynı inkübasyon şartları geçerli olacak şekilde inokule edildi. İnkübasyonu tamamlanan tüpler alındı ve plazmit DNA'lar, Biobasic Plazmit DNA izolasyon kiti yardımı ile kit protokolüne uygun olacak şekilde saflaştırıldı.

3.2.3 Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

Çizelge 3.3. pTOLT için restriksiyon enzim kesimi için gerekli madde içerikler.

LD Geni için	pTOLT Vektör kesimi için
DNA (22 μ l)	Vektör DNA (16 μ l)
Buffer K (3 μ l)	Buffer K (3 μ l)
BSA (3 μ l)	BSA (2,5 μ l)
BamH I (1 μ l)	BamH I (2,5 μ l)
Kpn I (1 μ l)	Kpn I (2 μ l)

Çizelge 3.4. pET22b için restriksiyon enzim kesimi için gerekli madde içerikler.

LD Geni için	pET22b Vektör kesimi için
DNA (22 µl)	Vektör DNA (16 µl)
Buffer K (3µl)	Buffer K (3 µl)
BSA (3 µl)	BSA (2,5 µl)
BamH I (1 µl)	BamH I (2,5 µl)
Kpn I (1 µl)	Kpn I (2 µl)

Çizelgede gösterilen oranlarda hazırlanan tüpler vortekslenildi ve 5 sn'ye mikrosantrifüje konuldu. 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi 4 saat olarak ayarlandı ve bu süre zarfında her 45 dk da bir spin yapıldı.

İnkübasyon süresi sonunda Gen için yapılan restriksiyon kesim sonuçları %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Çıkan jel görüntüsünde genimizin bulunması gereken yerde bant görülünce kesilerek alındı. Biobasic Gel and PCR Clean-Up kiti ile kit protokolü baz alınarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

Vektör için gerçekleşen kesim ürünleri de Biobasic Gel and PCR Clean-Up kiti kullanılarak kit prosedürüne uygun bir şekilde saflaştırıldı.

Biobasic Gel and PCR Clean-Up kiti prosedürü:

Kesilen Jel parçası 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarılır. 100 mg'a 300 ml oranında Cleanup Solution eklenir. Jeli eritmek için 60°C'de belirli aralıklarla karıştırılarak 10 dk boyunca jel erimesi gerçekleştirilir.

Jel eridikten sonra EZ10 olarak isimlendirilen spin kolona aktarılır. Oda sıcaklığında 2 dk süreyle bekletilir. Ardından 2 dk süresince 10.000 rpm'de santrifüj edilir.

Spin kolonun altına gecen sıvı uzaklaştırılır. Kolona 750 µl yıkama solusyonu eklenir. 10.000 rpm'de 2 dk süresince santrifüj edilir. Toplama tüpüne gecen sıvı kısım atılır ve kolon tekrar toplama tüpüne konulur. Aynı işlem tekrarlanır.

Toplama tüpünde kalan sıvı atılır ve toplama tüpünü atmadan son kez 1 dk 10.000 rpm’de santrifuj edilir. Yıkama solusyonunun tamamından kurtulmak için yapılır.

Toplama tüpü atılan kolon 1.5 ml’lik eppendorfa alınır. Kolonun tam orta noktasına gelecek şekilde 40-50 µl su ve ya elution buffer eklenir. 2 dk süresince 50oC’de bekletilir.

2 dk 10.000 rpm’de santrifuj edilir.

Saflaştırma ürünü eppendorfa geçmiş olur.

3.2.4 Ligasyon İşlemi

Restiriksyon ile kesim sonucu elde edilen ürünler saflaştırıldıktan sonra plazmit DNA’sı ve gen parçalarının birleştirilmesi için T4 DNA ligaz enzimi kullanıldı.

Ligasyon işlemi için gerekenler ve miktarları:

Çizelge 3.5. pTOLT vektörünün kullanıldığı adım için.

Ligasyon Karışımı 1	Ligasyon Karışımı 2
0,5 µl vektör	2,5 µl vektör
3 µl T4 DNA Ligaz Tamponu	3 µl T4 DNA Ligaz Tamponu
20,5 µl İnsert	18 µl İnsert
1 µl T4 DNA Ligaz	1 µl T4 DNA Ligaz

Çizelge 3.6. pET22b vektörünün kullanıldığı adım için.

Ligasyon Karışımı 1	Ligasyon Karışımı 2
0,5 µl vektör	2,5 µl vektör
3 µl T4 DNA Ligaz Tamponu	3 µl T4 DNA Ligaz Tamponu
20,5 µl İnsert	18 µl İnsert
1 µl T4 DNA Ligaz	1 µl T4 DNA Ligaz

Çizelgede verilen değerler baz alınarak yapılan pipetlemer doğrultusunda hazırlanan ligasyon karışımları +16oC’de inkübe edildi. Bir gece inkübasyonu süren ürenler transformasyon işlemine kadar +4oC’de muhafaza edildi.

3.2.5 Transformasyon ve Klonlama İşleminin Doğğrulanması

3.2.5.1 PİPES’li Süper Kompetent Hücre Hazırlanması

DH5α hücreleri -80oC’de ki stoklardan alınarak LB besiyeri içeren petrilere ekilerek 37oC’de 16 saat süreyle inkübasyona bırakılır.

İnkübasyon sonuclandıktan sonra petrilere bulunan kolonilerden 1 tane seçilir ve 25 ml SOB içeren 250 ml’lik erlenlere inokülasyonu gerçekleştirilir. 250 rpm, 37oC’de 6 saat inkübe edilir.

250 ml SOB içeren erlenler hazırlanır. 6 saatlik inkübasyonu biten kültürden 2ml,4ml ve 10 ml alınarak hazırlanan erlenlere dağıtılır.

250 ml SOB ve 2,4,10 ml DH5α içeren 3 erlen 150 rpm’de 14 saat süresince 18-22°C arasında bir sıcaklıkta inkübe edilir.

İnkübasyon süresince 45 dk’da bir 600 nm’de OD değerlerine bakılır. OD değeri 0,55’e gelen kültürler shakerdan çıkarılır.

İnkübasyonunu tamamlamış kültürler 10 dk süresince buzlu suda bekletilir.

Ardından kültürler +4⁰C’de 3900 rpm’de santrifüje bırakılır.

Santrifüj ardından süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde sonuna kadar alınır ve atılır.

Kalan hücrelere 0°C'de muhafaza edilen 80 ml PİPES'li tampon çözeltisi eklenerek süspansiyon haline getirilir. Hücreler hassas olduğu için dikkatli bir şekilde yapılmalıdır.

Ve hücreler tekrar +4°C'de 3900 rpm'de santrifüje bırakılır. Süpernatant tamamen uzaklaştırılır.

0°C'de muhafaza edilen 20 ml PİPES'li tampon çözeltisi eklenerek tekrar süspansiyon haline getirilir.

1.5 ml DMSO eklenerek yavaşça karıştırılır. 10 dk süresince buz banyosunda inkübe edilir.

Steril eppendorf tüplerine hızlı ve dikkatli bir şekilde bölünür. Donması daha hızlı olsun diye sıvı azot kullanılarak dondurulur.

Hazırlanan hücreler eppendorflar içerisinde -80°C'de muhafaza edilir (Inoue ve ark., 1990).

3.2.5.2 Transformasyon

Stokta bekletilen kompetent hücrelerden 200 µl alınır ve eppendorfa aktarılır. Üzerine 5 µl ligasyon ürünü eklenir ve 1 saat süresince buz banyosuna bırakılır.

Buz banyosundan alınan hücreler hemen 2 dk süresince 42°C'de ısı şokuna maruz bırakılır.

Ardından 5 dk boyunca buz içerisinde bekletilir.

Bu işlemlerin ardından 300 µl LB besiyeri eklenerek 250 rpm'de, yarım saat süresince 37°C'de inkübe edilir.

Yarım saatlik süre zarfında kendini toplayan hücreler antibiyotik ihtiva eden besiyerlerine yayma ekim yapılarak ekilir. 1 gece 37°C’de inkübasyona bırakılır (Hanahan, 1985).

3.2.5.3 Plazmid DNA Saflaştırması

Petrilere hücreler koloniler halinde gelişme göstermektedir. Bu kolonilerin pTOLT vektörünü içerdiği düşünüldüğü için seçilen koloniler ampisilinli 4 ml’lik steril sıvı LB besiyeri içerisine aktarılır. İnokülasyon ürünleri 37oC’de bir gece inkübasyona bırakılır. Santrifüjlenerek hücreler çöktürülür ve süpernatant uzaklaştırılır.

Elde edilen hücrelerden plazmit DNA’sı Biobasic Plasmid DNA Purification kiti ile saflaştırılır.

Biobasic Plasmid DNA Purification protokolü

Kültür 1.5-5 ml tüpe alınır, 12000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir ve sıvının tamamı dökülür.

100 µl Solüsyon 1 ilave edilir ve iyice karıştırılır (vortekslenir) 1 dakika beklenir.

Karışıma 200 µl Solüsyon 2 ilave edilir ve kibarca 5-6 defa alt üst edildikten sonra oda sıcaklığında 1 dakika bekletilir (Vorteksleme genomik DNA kontaminasyonlarını önlemek için yapılmamalıdır.).

Karışıma 350 µl Solüsyon 3 ilave edilir ve kibarca çalkalayıp 1 dakika oda sıcaklığında bekletilir.

5 dakika 12000 rpm’de santrifüje edilir.

Süpernatant EZ10 adlı spin kolona ilave edilir ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir.

Altta biriken sıvı atılır. Kolona 750 µl “Yıkama Solüsyonu” ilave edilir ve 10000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Altta biriken sıvı atılır ve kolon tekrar toplama tüpüne konur.

Kolona 750 µl “Yıkama Solüsyonu” ilave edilir ve 2 dk 10000 rpm’ de 2 dakika santrifüj edilir. Altta biriken sıvı atılır ve yıkama solüsyonunun kalan kısmını temizlemek için 1 dakika daha santrifüj işlemi yapılır.

Kolon 1,5 ml’lik yeni eppendorf tüpüne aktarılır. Kolonun ortasına 50 µl steril distile su ilave edilir ve 2 dakika 50 C’de bekletilir.

2 dakika 10000 rpm’de santrifüje edilerek plazmit DNA saflaştırılır.

3.2.5.4 Doğrulama Restriksiyon Kesimi

Hedef genimizin plazmit vektör içerisine düzgün bir şekilde klonlanıp klonlanmadığını tespit edebilmek için plazmitimizi *E.coli*’den saflaştırdıktan sonra doğrulama kesimi yapılmıştır.

Çizelge 3.7. pTOLT plazmid vektörü kesimi için gerekli bileşenler ve oranları.

pTOLT Vektör Sistemi İçin Kesim
18 µl Plazmit DNA 80ng/µl
2.5 µl 10X Buffer K (Takara)
2.5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl KpnI (10 U/µl)
1 µl BamHI (15 U/µl)

Çizelge 3.8. pET22b plazmid vektörü kesimi için gerekli bileşenler ve oranları.

pET22b Vektör Sistemi İçin Kesim
18 µl Plazmit DNA 80ng/µl
2.5 µl 10X Buffer K (Takara)
2.5 µl BSA (10 mg/ml)
1 µl KpnI (10 U/µl)
1 µl BamHI (15 U/µl)

3.2.5.5 DNA Dizileme

Doğrulama kesimi sonucu ve jel görüntüleri sonucu pozitif olduğu düşünülen plazmit DNA'lardan 30 µl'lik örnekler alınarak DNA dizilemeye gönderildi.

3.2.6 Limonin Dehidrogenaz Enzimi Üretimi (İndükleme)

Hazırlanan rekombinant proteinin ekspresyon uygulamasında *E. coli BL21 pLysE* suşu kullanıldı. Stoktan alınan hücreler (-80 0C'den) 4 µl kloramfenikol ve ampisilin bulunduran 4 ml'lik LB ortamına inoküle edildi. 250 rpm'de, 370C'de bir gece süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu gerçekleşen hücreler FSB'li kompetant hücre hazırlama prosedüre bağlı kalınarak kompetent hale getirildi.

3.2.7 FSB'li Kompetent *pLysE* Hücrelerin Hazırlanması

50 ml steril LB (Luria Bertani) besi yeri bulunan iki tane erlene gece inkübasyona bırakılan kültürden birer ml alınarak eklendi ve 37 0C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.

Optik yoğunluk, 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0.7 olduğunda erlenler inkübatörden alınmıştır ve +40C 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.

Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 50 ml soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklenir, çok iyi vortekslenir. Sonrasında 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.

1 saatin sonrasında; +4 0C, 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine 8 ml soğuk FSB çözeltisi eklendi ve tüpe vurarak çözünme sağlanmıştır.

Peletin tamamı çözününce üzerine 560 µl DMSO eklenerek, 3 saat buza gömülmüştür. 3 saatin sonrasında kompetent hücre hazır hale gelmiştir (Hanahan, 1983).

Kompetent hücrelere pozitif plazmitler başlık 3.2.6.'da anlatılan protokole göre transfer edildi. Transformasyonun sonrasında hücreler kloramfenikol ve ampisilin antibiyotiği bulunan LB Agar besiyerine yayma yöntemiyle ekilmiştir ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Çoğalan hücrelerden birer koloni olarak içerisinde kloramfenikol ve ampisilin antibiyotiği bulunan 4 ml'lik LB besiyerine inoküle edilerek bir gece 37°C'de 240 rpm de inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler 600 ml antibiyotikli LB bulunan 2 L'lik steril erlenlere inoküle edilmiştir. Her saat 600 nm'deki absorbansları okunarak yetiştirilmiştir. OD:0.7 olduğunda vektör sistemine uygun olarak IPTG ilave edilerek indüklenmiştir. 3 saatlik inkübasyonun sonrasında erlenler alınarak, 6 000 rpm'de 8 dakika santrifüj yapılmıştır. Toplanan E. coli BL21 pLysE hücreleri -20°C'de saklanmıştır (Guda ve ark., 1995)..

3.2.8 *E.coli BL21 pLysE* Hücrelerinin Parçalanması

İndükleme işleminin sonrasında -20°C'de muhafaza edilen hücreler çıkarıldı ve buza gömüldü. Üzerlerine Yükleme tamponundan (pH 8) eklenerek süspansiyon haline getirildi. Süspansiyona 100 mM bezamidin ve PMSF'den eklendi ve buz üzerine alındı. Buz üzerindeki hücreler sonikatörle 1 saat parçalandı. Santrifüj ile (6000 rpm, 10 dakika) süpernatant kısım alındı. Alınan süpernatant 30000 rpm ve +40°C'de 1 saat santrifüj edilerek, karışımdaki hidrofobik karakterdeki proteinler ile diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürüldü.

3.2.9 Afinite Kromatografisi ile Limonin Dehidrogenaz Enziminin Saflaştırılması

Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Ni-NTA agaroz rezin ve kolondan elüsyon için imidazol içeren elüsyon tamponu kullanıldı. Önce küçük bir polikarbonat kolon içerisine Ni-NTA agaroz (Qiagen)1 ml kadar konulduktan sonra, kolon yükleme tamponu ile yıkandı. Santrifüj işleminden sonra alınan protein karışımı kolona aktarıldı ve kolondan gelen fraksiyonların tümü toplandı. Kolon tekrar yükleme tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin de ayrılması sağlandı. Daha sonra kolona tutunmuş olan protein elüsyon tamponuyla iki ayrı fraksiyon olarak elüe edildi.

Ayrıca kolondan elüe edilen her fraksiyondan 200 µl'lik numuneler alındı ve 100 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 2 dakika 100 OC'de denatüre edildikten sonra önceden hazırlanan SDS PAGE (sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelinin kuyucuklarına yüklendi. SDS-PAGE işleminin tamamlanmasının sonrasında distile su ile yıkanan jel daha sonra stain solüsyonu ile boyandı. Boyanan jel destain ile iyice temizlendikten sonra bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alındı (Laemmli 1970).

3.2.10 Limonin Dehidrogenaz Enziminin Portakal Kabuğu Ekstraktına Karşı Aktivitesi

Afinite kromatografisi ile saflaştırılan limonin dehidrogenaz enziminin aktifliği kontrol etmek için portakal kabuğu ekstraktı kullanıldı. Portakal kabuğu ekstraktı buhar distilasyonu ile elde edildi. Olgunlaşmamış portakallar alınarak kabukları soyuldu. Soyulan kabuklar küçük küçük kesildi ve ardından kahve öğütücüsü ile çekildi. Çekilen portakal kabuğu ağırlığının 2 katı kadar distile su eklendi ve bir müddet bekletildi. Ardından damıtma sistemi kuruldu. Toplama kabında su buharı ile birlikte biriken yağ pipet ile toplandı ve şişelendi. Eter yardımı ile sudan ayrıştırılan ekstrakt kaynar suyun içerisine bırakılarak eteri de uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi.

Portakal kabuğu ekstraktı KMnO_4 ile tepkimeye girerek mor menekşe rengi koyu kahverengine dönerek çökelti oluşturmuştur. Limonin dehidrogenaz saflaştırılırken imidazol kullanıldığı ve imidazolün barındırdığı halkasal yapıdan dolayı KMnO_4 ile tepkime vererek çökeltiyeye sebep olmuştur. Bu nedenle imidazolu uzaklaştırmak için diyaliz yöntemi kullanıldı.

Portakal kabuğuna KMnO_4 eklendiğinde çökelti oluşmuştur. Saflaştırılan limonin dehidrogenaz ile KMnO_4 herhangi bir tepkime göstermemektedir. 0.001 molar potasyum manganat ile muamele edilir. 1 ml ekstrakt için 100 ul enzim kullanılmıştır. 35°C 'de 90 dakika boyunca bekletilmiştir. pH 8-9 arası ayarlanmıştır. Bu süreç sonrası eklenen potasyum manganat çözeltisinin meydana getirdiği renk değişiminin gözlenmesi ve potasyum manganat çözeltisi ile muamele etmeden 500 nm'de verdiği absorbans değerleri göz önünde bulundurulmuştur (Puri, 2002).

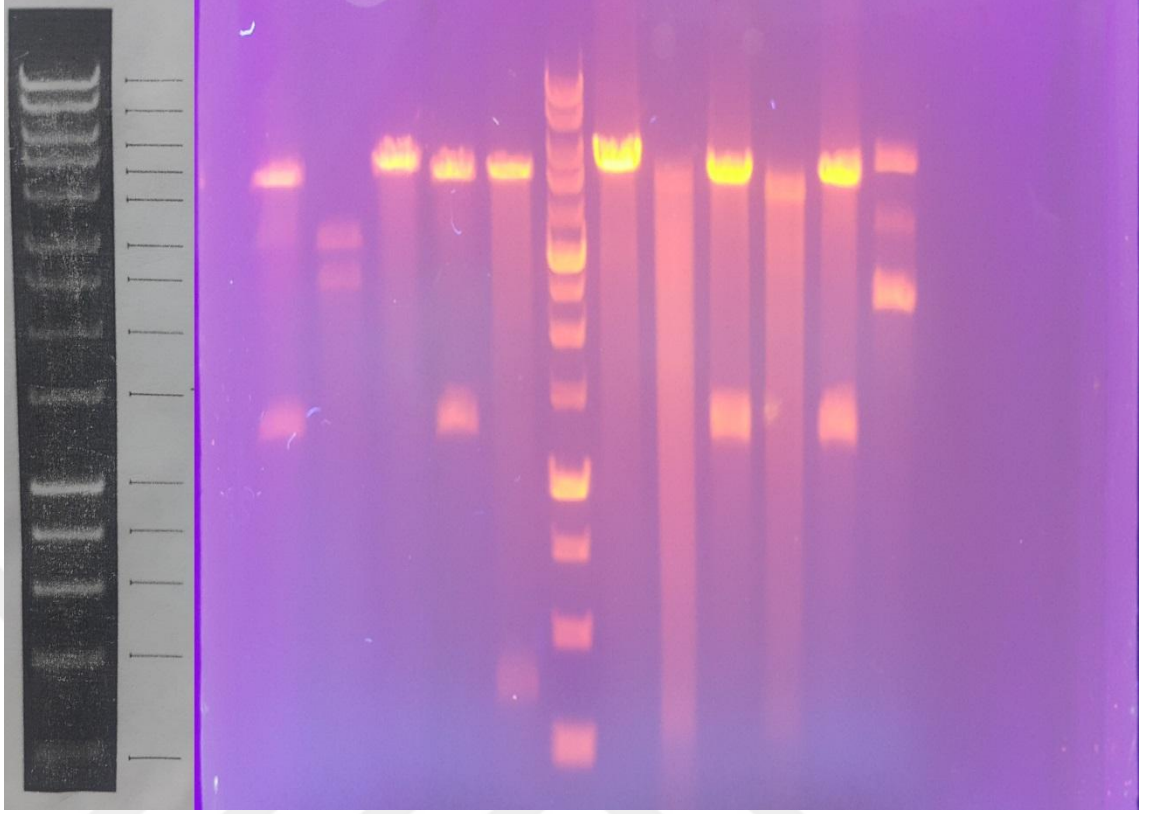
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Restriksiyon Enzimi ile Kesim

Limonin dehidrogenaz enzimini taşıyan plazmit restriksiyon enzimi ile kesildi. %1'lik agaroz jelde yürütülerek jelden kesildi ve başarılı bir şekilde saflaştırıldı.

4.2 Doğrulama Restriksiyon Kesimi

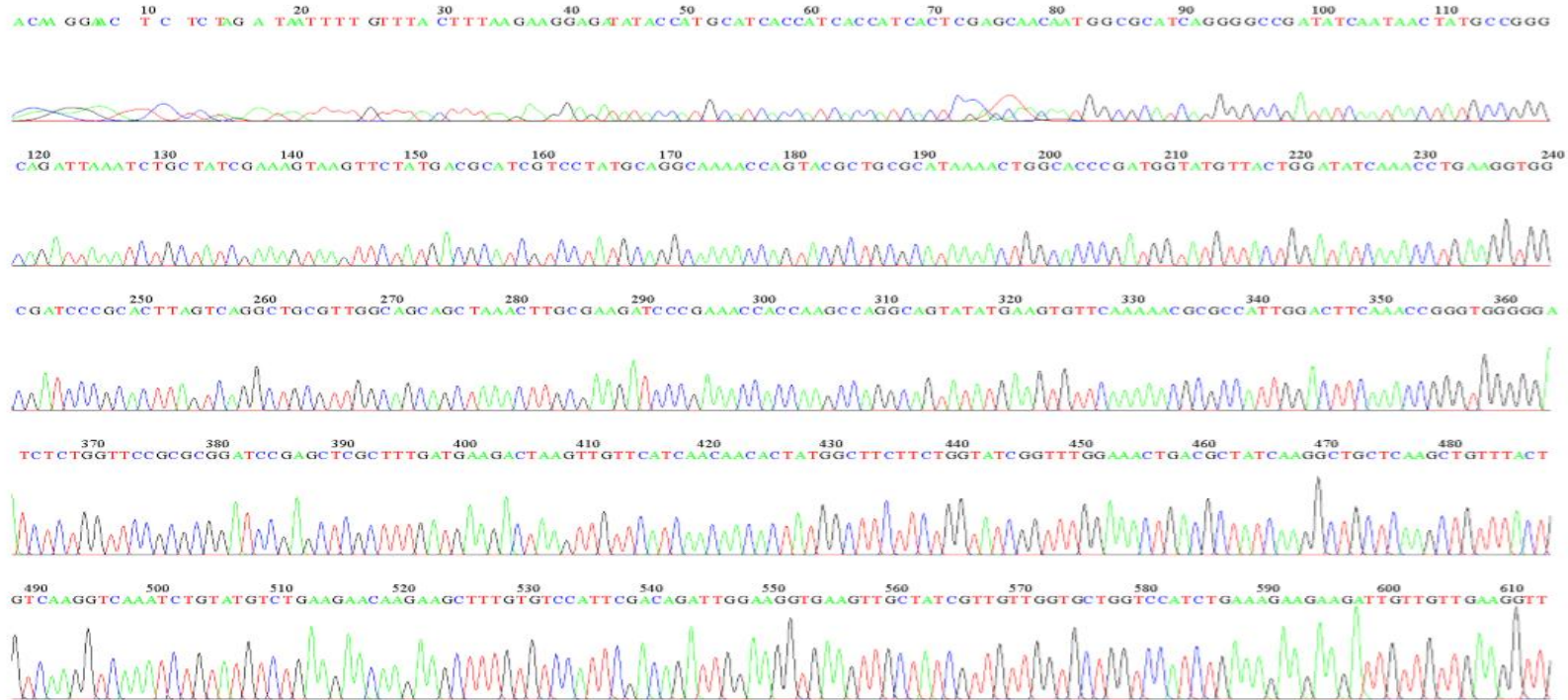
Saflaştırılan limonin dehidrogenaz geni ve vektörler uygun restriksiyon enzimleri ile kesildi ve ardından ligasyona bırakıldı. Geni içeren plazmitler E. coli DH5 α suşuna transforme edildi. Öncelikle petrilere inokülasyonu gerçekleştirilen hücreler koloniler oluşturduktan sonra seçilen koloniler 4'er ml'lik antibiyotik içeren LB besiyerine aktarıldı. Yetişen kültürlerden plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi ve saflaştırılan plazmitler klonlama esnasında kullanılan enzimler ile kesilerek doğrulama kesimi dediğimiz basamak gerçekleştirildi. Bu işlem 2 saat süreyle devam etti ve ardından %1'lik agarozjel elektroforezinde gözlemlendi Şekil 4.1.



Şekil 4.1. Agaroz elektroforez görüntüsü. Beklenen doğru bantlar ok'lar ile gösterilmiştir.

4.3 DNA Dizileme

File: Lim4_T7promoter.ab1 Run Ended: 2017/4/5 19:37:34 Signal G:1935 A:2143 C:2619 T:2739
Sample: Lim4_T7promoter Lane: 3 Base spacing: 15.4816265 1429 bases in 17258 scans Page 1 of 2

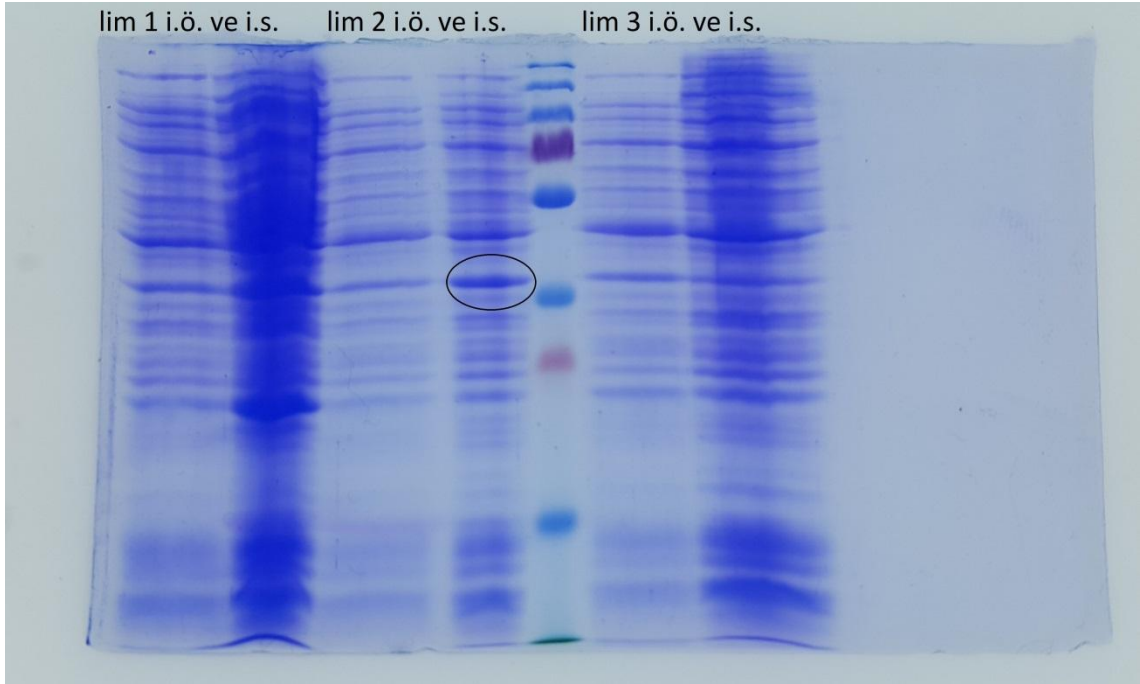


Şekil 4.2. DNA dizileme kromatogramı.

Limonin dehidrogenaz enzimini kodlayan DNA fragmanının pTOLT vektörüne herhangi bir çerçeve kayması gibi bir problem olmadan başarılı bir şekilde klonlamanın yapıldığı görmek üzere saflaştırılan rekombinant vektörler DNA dizilemeye gönderildi. DNA dizileme kromotogramından alınan DNA dizi analiz edildiğinde klonlamanın başarılı olduğu görüldü Şekil 4.2.

4.4 LDH Enziminin Üretilmesi (indükleme)

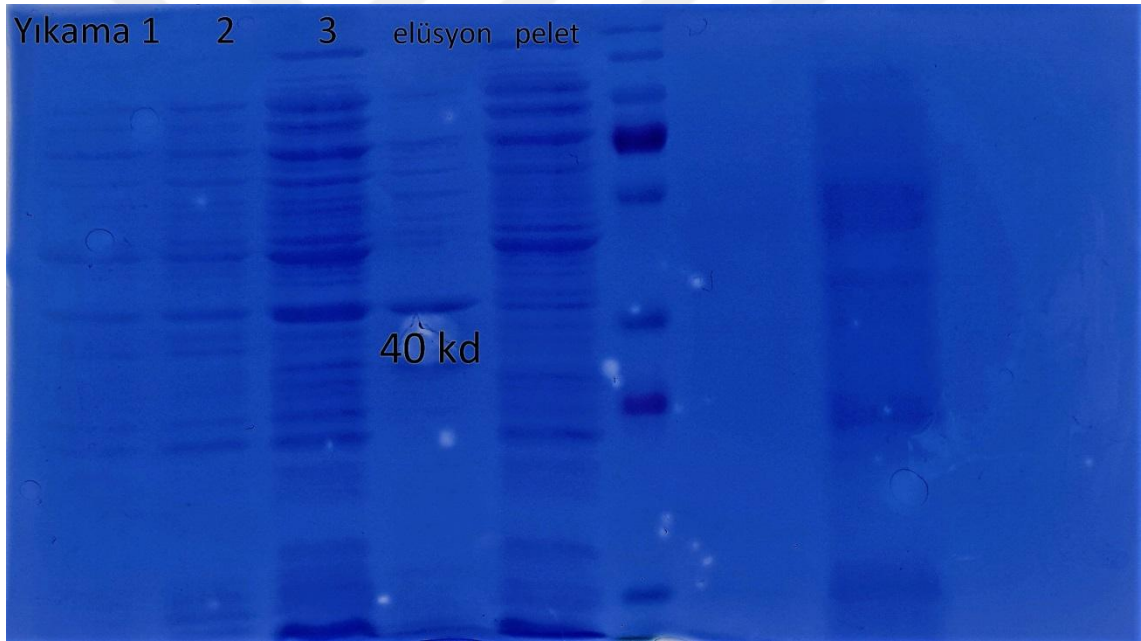
E. coli BL21 *pLysE* suşuna DNA dizileme için gönderilen plazmitler transfer edildi. Transformasyon gerçekleştirildikten sonra petrilere yayma ekim yapıldı ve tek koloni seçilerek 4 ml'lik antibiyotik içeren LB besiyerine inoküle edildi. İnokülasyon şartları 370C'de bir gece olarak ayarlandı. Oluşan kültürler 50 ml'lik antibiyotik içeren LB besiyerine aktararak 370C'de 240 rpm'de çalkalayıcı inkübatör kullanılarak inokülasyona bırakıldı. OD600:0,7 olduğunda IPTG ile indükleme yapıldı. İndükledikten sonra 4 saat kadar inkübe edilen kültürlerden örnekler alınarak SDS-PAGE'de analiz edildi Şekil 4.3.



Şekil 4.3. Limonin dehidrogenaz (lim) için 3 ayrı örneğin indükleme öncesi (i.ö) ve indükleme sonrası (i.s) jel görüntüsü.

4.5 LDH Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

İndüklenme sonrası 20°C’de saklanan hücreler alınarak buz içerisinde sonikatörle parçalanmıştır. Ardından 30.000 rpm’de +4°C’de 1 saat santrifüjlendi. Hidrofobik proteinler ve hücre materyalleri çöktürüldü. Süpernatant ve peletten örnekler alındı. Peletten alınan örnekler SDS örnek yükleme tamponu ve resüpsansiyon buffer ile çözündürülerek jele yüklendi. Süpernatant kısım afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Afinite kromatografisinde kullanılan kolonun dolgu maddesi Ni-NTA agaroz rezini olarak ayarlanmıştır. Kolondan elüsyon yapılırken de imidazol içeren elüsyon tamponu kullanıldı. İşlemlerin ardından elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edildi Şekil 4.4.



Şekil 4.4. Limonin dehidrogenaz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması ardından SDS-PAGE görüntüsü.

4.6 LDH Enziminin Portakal Kabuğu Ekstraktına Karşı Aktivitesi

Limonin dehidrogenaz aktivitesini incelemek için portakal kabuğu ekstraktı kullanıldı. Olgunlaşmamış portakallar seçilerek kabukları ayıklandı ve bu kabuklar öğütüldü. Hazırlanan portakal kabuğu miktarının 2 katı kadar distile su eklendi ve su buharı distilasyonu yapıldı. Elde edilen örnekten üst kısımda biriken madde pipetle alınarak eterde çözüldü ve ardından su banyosunda bekletilerek eter uzaklaştırıldı.

1 ml portakal kabuğu ekstraktı için 100 ul enzim kullanılmıştır. 35°C'de 90 dakika boyunca bekletilmiştir. pH 8-9 arası ayarlanmıştır. Bu süreç sonrası eklenen potasyum manganat çözeltisinin meydana getirdiği renk değişiminin gözlenmesi ve potasyum manganat çözeltisi ile muamele etmeden 500 nm'de verdiği absorbans değerleri göz önünde bulundurulmuştur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enzim endüstrisinden elde edilen ürünlerin kullanım alanlarının çok çeşitli olması, maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle bu alanda yapılan çalışmalara verilen önem son yıllarda giderek artmıştır (Gessese, 1998). Turunçgil meyve suyu üretiminde flavonoid ve limonoid moleküllerinden kaynaklanan acı tat oluşumu bu meyve suyu endüstrisi için önemli bir sorun teşkil etmektedir. Oluşan acı tat sorununu gidermek için birçok fizikokimyasal ve biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır (Soares ve Hotchkiss, 1988). Bu çalışmada bir limonoid olan limonin bileşiğinden kaynaklanan acı tat oluşumunu bir biyoteknolojik yöntem olan rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen limonin dehidrogenaz enzimi ile giderilmesi araştırılmıştır. Limonin dehidrogenaz üretimi için kullanılan ekspresyon sistemi için bakteriyel bir sistem kullanılmıştır. Bakteriyel ekspresyon sistemleri düşük maliyet ve yüksek miktarda protein üretiminden dolayı oldukça yaygın olarak tercih edilmektedir (Jia ve Jeo 2016). Fakat üretilen protein büyük olduğu zaman, protein katlanmaları, inklüzyon cisimciği oluşturma yatkınlığı ve birtakım post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirememesi gibi durumlar da bu bakteriyel sistemin dezavantajlarıdır (Rosano ve Ceccarelli, 2014). Bir aminoasit birden fazla kodon tarafından ifade edilebilmektedir ve bazı kodonlar diğerlerinden daha fazla kullanılabilir. Fakat ifade edilme oranı organizmanın türüne göre değişmektedir (Moreno ve ark., 2005).

Protein ekspresyon çalışmaları sırasında proteindeki aminoasitleri birden fazla kodon kullanarak farklı kombinasyonlarda diziler oluşturulabilmektedir. Burada önemli olan organizmaların kullanılan kodona göre farklı oranlarda verimli olmasıdır. Organizmadan organizmaya bir amino asitin ifadesi için kullanılacak olan kodonlar farklı ifade oranlarına sahiptirler. Bu nedenle konakçı organizmaya göre istenilen proteinin üretilmesi için kullanılan nükleotid dizisinde kodon optimizasyonu yapılmalıdır. Konakçı hücre için ifadelenebilir güç olan nadir kodonları uzaklaştırmak onun yerine organizmaya uygun bir dizileme seçmek gerekmektedir. Bu şekilde oluşturulan bir dizinin ekspresyon seviyesinde diğerlerine nazaran muazzam artışlar görülmektedir. Kodon kullanım tabloları ile organizmalara uygun kodon seçimi mümkün

olduğu gibi bu işlemi otomatik olarak yapan programlarda mevcuttur. Biz tez çalışmamızda jCat kodon optimizasyon proğramını tercih ettik (<http://www.jcat.de/>). Bu sayede bu tez çalışmasında kullanılmış olan *E.coli* K12 suşu için uygun kodonlar seçilmiştir. Ekspresyonu kısıtlayacak olan kodonlar kaldırılarak yerine ifadelenme oranı yüksek olanlar tercih edilmiştir.

Proteini kodlayacak olan nükleotid dizisi biyoinformatik araçlar kullanılarak hazırlanırken kodon optimizasyonu yanı sıra klonlama işlemleri için bazı enzim bölgeleri de eklenmiştir. Klonlama sırasında kullanılmak üzere dizinin başına ve sonuna sırasıyla BamHI, NcoI ve KpnI, XhoI restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklendi. Bu enzimler kullanılan plazmit vektör sistemi göz önünde bulundurulurken yapıldı (şekil 3.2). Seçilen enzimler sayesinde plazmit sisteminden dizimizin başına ve sonuna fazladan nükleotid dizi gelmeyecek şekilde transformasyon gerçekleşmiştir.

Protein ekspresyon çalışmasında hücrelerin hızlı büyümesi ve kolay bir şekilde çoğaltılabilmesi, saflaştırma basamağının basit teknikler içermesi, maliyet acısından uygun olması gibi temel özellikler göz önünde bulundurulurken konak hücre seçimi yapılmaktadır (Chen, 2012). *E.coli* hücreleri üzerinde en fazla çalışma yapılan ve bilinen bir tür olduğu için bu tez çalışmasında *E.coli* K12 suşu ile çalışılmıştır.

Çalışmada ilk olarak biyoinformatik araçlar kullanılarak gen dizisi bulunmuştur ve bu dizinin kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Gen yapay olarak sentezlettirilmiş, pET22b vektörü içerisinde elimize ulaşmıştır. Klonlama alışmaları başarılı bir şekilde yapıldıktan sonra ekspresyon basamağına geçilmiştir. Rekombinant olarak elde edilen enzimin aktivite çalışmaları yapılmıştır. Limonin dehidrogenaz enzimini üreten pLysE hücreleri bu plazmiti içermeyen hücreler ile karşılaştırılarak protein farklılıkları gözlemlenmiştir. Sonuç olarak rekombinant olarak üretilen limonin dehidrogenaz enziminin portakal kabuğu ekstraktına karşı aktif olduğu bu maddeyi paraladığu nicel ve nitel yöntemler ile gözlemlenmiştir.

Rekombinant retim tekniklerinde protein ekspresyonunu arttırmak aynı zamanda saflaştırma işlemlerinde kolaylık sağlamak amacı ile füzyon protein teknolojisi geliştirilmiştir. *E.coli* gibi ekspresyon sistemlerinde eksprese edilen rekombinant proteini çözünebilir formda ve yüksek verimde elde etmede birtakım sorunlarla

karşılaşılabilmektedir. Bu gibi sorunları ortadan kaldırmak için kullanılan yöntemlerden biri de füzyon proteinlerinin kullanımıdır (Wang ve ark., 2010). Füzyon proteinleri, eksprese edilen proteinleri periplazmik bölgeye yönlendirmede, hedef proteinin ekspresyonunu artırmada, saflaştırma işlemlerinin daha kolay gerçekleştirilmesinde etkilidir. Aynı zamanda inklüzyon cisimciği oluşumu da bu şekilde önlenmektedir. Fakat füzyon proteinlerinin enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi de zaman zaman söz konusu olabilmektedir (De Marco ve ark., 2004). Portakal kabuğu ekstraktı ile yapılan aktivite testinde elde edilen sonuçlara bir etkide çalışmamızda kullanılan TOL füzyon proteininin limonin dehidrogenaz enzimi üzerindeki olası etkileri olabilir. Böyle bir etkinin varlığını kanıtlamak için sonraki çalışmalarda TOL proteinini uzaklaştırmaya yarayan proteaz kesim bölgeleri içeren yeni bir vektör sistemi ile çalışılması planlanmaktadır.

Ökaryotik sistemlerde protein sentezi ardından, yapılarına değişik oligosakkarid molekülleri takılır ve bu tür modifikasyonlar üretilmesi istenilen proteinlerin yapıları ve fonksiyonları için önemlidir. Proteinlerin karbohidratlar ile yapısal modifikasyonu hücrenin endoplazmik retikulum ile golgi organellerinin zarlarında bulunan enzimler tarafından katalizlenir ve karbohidratlar proteinlerin asparajin, serin veya treonin aminoasitlerinin yan zincirlerine glikozidik bağ ile bağlanır. Proteinlerin karbohidratlarla bu tür tepkimeleri son derece özgüdür, enzimatik olarak katalizlenir ve proteinlerin sentezinden sonraki bu tür modifikasyonu protein glikozilasyonu olarak bilinir. Prokaryotik sistemlerde bulunan önemli eksikliklerden biridir. Bu tür post-translasyonel modifikasyonların eksikliği proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında sıkıntı çıkarabilir (Katartaş, 2011). Çalışmamızda protein miktarı ve var olan proteinimizin enzim aktivitesindeki sınırlamalar bu tür modifikasyonların kullanılan sistemde var olmayışından kaynaklanabilir.

6. KAYNAKLAR

- Altan, A., 1983a. Turunçgil Sularında Acılık Ögesi Olarak Naringin. *Gıda Dergisi* 8 (1) 29–32.
- Altan, A., 1983b. Turunçgil Sularında Acılık Ögesi Olarak Limonin. *Gıda Dergisi* 8 (3) 125–128.
- Altan, A., 1991. Çukurova Bölgesinde Yetiştirilen Portakal Çeşitlerinin Meyve Suyuna İşlenmeye Uygunluk Durumları. Çukurova I. Tarım Kongresi, 302-315, Adana.
- Ayter Ş, 1988,. İnterferonların Rekombinant Dna Teknolojisi İle Eldesi, *Ankem Derg* 2 (No 3); Ss 213-220
- Baker, R.A., 1994. Potential Dietary Benefits Of Citrus Pectin And Fiber. *Food Tech.*, 48: 133- 137.
- Braverman, J.B.S., 1949. Citrus Products Chemical Composition And Chemical Technology. Interscience Publishers Inc., New York, 424 S.
- Cemeroğlu, B., F. Karadeniz, 2001. Meyve Ve Sebze İşleme Teknolojisi 2. Cilt: Meyve Suyu Üretim Teknolojisi. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları* No: 25, Ankara, 384 S.
- Chandler, B. V.; Nicol, K. J., 1975. Debittering Citrus Products With Enzymes, *Csıro Fd. Res. Q.*, 35, S. 79-88.
- Chen, R., 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology Advances*, Volume 30, 1102-1107.
- Davies, F.S., L.G.Albrigo.1994. Citrus. Cab International. Wallingsford, Uk
- De Marco, V., Stier, G., Blandin, S., De Marco, A., 2004. The solubility and stability of recombinant proteins are increased by their fusion to NusA. *Biochemical and biophysical research communications*, 322(3), 766-771.
- Die., 2004. Tarımsal Yapı Ve Üretim. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü. Devlet İstatistik Enstitüsü Matbaası, Ankara.
- Emerson, O. H., 1949. The Bitter Principle Of Navel Orange. *Food Technol.*, 1949, 3, 248-250.
- Fao., 2003. Citrus Fruit Fresh And Processed Annual Statistics. Ccp: Cı/St/2000 Food And Agriculture Organization Of The United Nations.
- Fao., 2005. Fao Statistical Database, Faostat-Agriculture. Food And Agriculture Organization Of The United Nations.
- Farnworth, E.R., M. Lagace, R. Couture, V. Yaylayan And B. Stewart, 2001. Thermal Processing, Storage Conditions, And The Composition And Physical Properties Of Orange Juice. *Food Research Interational*, 34: 25-30.
- Godfrey T, West S (Eds): *Industrial Enzymology*. London: Macmillan Press Ltd.; 1996.
- Guda, C., Zhang, X., Mcpherson, D.T., Xu, J., Cherry, J.H., Urry, D.W., Daniell, H., 1995. Hyper Expression Of An Environmentally Friendly Synthetic Polymer Gene. *Biotechnol. Lett.*, 17,745–750.
- Hanahan, D., 1983. Studies On Transformation Of Escherichia Coli With Plasmids J. *Mol Biol.*, 166, 557–580.
- Hanahan, D., 1985. Techniques For Transformation Of E. Coli. In *Dna Cloning: A Practical Approach*, Irl Press, Oxford, United Kingdom, 1, 109-135.

- Hasegawa, S., Suhayda, C. G., Hsu, W. J., Robertson, G. H., 1997. Purification Of Limonoid Glucosyltransferase From Navel Orange Albedo Tissues. *Phytochemistry*, 46 (1) 33–37.
- Hasegawa, S.; Bennett R. D.; Verdon, C. P., 1980a. Limonoids In Citrus Seeds: Origin And Relative Concentration. *J. Agric. Food Chem.*, 28 (5) 922- 925.
- Higby, R. H., 1938. The Bitter Constituents Of Navel And Valencia Oranges. *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (12) 3013-3018.
- Inoue, H., Nojima, H., Ve Okayama, H., 1990. High Efficiency Transformation Of Escherichia Coli With Plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- Jennylynd James, Benjamin K. Simpson Ve Dr. Maurice R. Marshall, 2009, Application Of Enzymes In Food Processing, 437-463
- Karabacak, N., 1995. Çukurova Bölgesinde Yetiştirilen Marsh Seedless Ve Red Blush Altıntop Çeşitlerinin Narincin Ve Toplam Flavonoid İçerikleri İle Çeşitli Faktörlerin Bunlar Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Bilimi Ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685
- Moreno, R., Haro, A., Castellanos, A., Berenguer, J., 2005. High-Level Overproduction of His-Tagged Tth DNA Polymerase in *Thermus thermophilus*. *Applied And Environmental Microbiology*, 591–593.
- Morton, J.F., 1987. Sour Orange (Morton, J.F. (Editör) *Fruits Of Warm Climates*). S: 130-133. Creative Resource Systems, Inc., Box 890, Winterville, Nort Carolina, Usa.
- N.F.F. Soares and J.H. Hotchkiss, 2008. Naringinase Immobilization in Packaging Films for Reducing Naringin Concentration in Grapefruit Juice
- Kola, Osman, 2005,. Washington Portakal Sularındaki Limonin Acılığının, Çukurova Üniversitesi, 26-66.
- Panke S, Wubbolts Mg: Enzyme Technology And Bioprocess Engineering. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13: 111-116.
- Puri, Munish, Lakhwinder Kaur, And Satwinder Singh Marwahal, 2002, Partial Purification And Characterization Of Limonoate Dehydrogenase From *Rhodococcus Fascians* For The Degradation Of Limonin, *J. Microbiol. Biotechnol*, 669–673.
- Rouseff., R.L. And S. Nagy, 1994. Health And Nutritional Benefits Of Citrus Fruit Components. *Food Techology*, 48: 125-132.
- Salih Kuk, Ahmet Erensoy 2008, Gen Klonlama, Plazmit Seçimi Ve Fasciola Hepatica Cathepsin L1 Uygulamaları, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye, 16-22
- Ting, S. V.; Attaway, J. A., 1971. Citrus Fruits, In “The Biochemistry Of Fruits And Their Products” Volume 2., Ed. By Hulme, A. C. Academic Press, New York.
- Yıldırım A., Bardakçı F. Ve Ark., , 2010, Moleküler Biyoloji, Geliştirilmiş 2. Baskı, ‘Rekombinant Dna Teknolojisi Bölüm 13, Nobel Yayın;Ss 471-502
- Yılmaz, E., 2002. Turunçgil Meyvelerinin İnsan Sağlığına Etkileri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 13: 47-52.
- Zübeyde Katartaş, 2011, “Rekombinant Dna Teknolojisi İle İlaç Üretimi”, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bitirme Ödevi, 3-19.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgeler

Adı Soyadı Emirhan BOZOĞLAN
Doğum Tarihi ve Yeri 03/04/1991 Çankaya
Yabancı Dili İngilizce
Telefon 546 427 52 11
E-mail emirhanbozoglan@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	09.06.2014

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-2017	BHC Biyoteknoloji	Ar-Ge Mühendisi