

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BRUCELLA MELİTENSİS REV1 YÜZEY MEMBRAN PROTEİNİN
KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI
VE DİAGNOSTİK ETKİNLİĞİNİN TESPİT EDİLMESİ**

İsmail KOYUNCU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2013**

Prof. Dr. Adurrahim KOÇYİĞİT'in danışmanlığında, İsmail KOYUNCU'nun hazırladığı "Brucella Melitensis Rev1 Yüzey Membran Proteinin Klonlanması, Ekspresyonu, Saflaştırılması ve Diagnostik Etkinliğinin Tespit Edilmesi" konulu bu çalışma 18.01.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Adurrahim KOÇYİĞİT

Üye : Prof. Dr. Nihat DİLSİZ

Üye : Prof. Dr. Nurten AKSOY

Üye : Doç. Dr. Şahabettin SELEK

Üye : Doç.Dr. Seyithan TAYSI

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Seyit TEMİR
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HÜBAK tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 1179

Not: Bu tezde kullanılan özgün veya başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Brucella spp.....	7
2.1.1. Brucella genel özellikleri.....	7
2.1.2. Kültür yapısı ve büyüme faktörleri.....	7
2.1.3. Antijenik yapısı.....	8
2.1.4. Dış membran proteinleri (omp; Outer membrane proteins).....	10
2.1.5. Moleküler yapısı.....	14
2.1.6. Brucella sınıflandırılması.....	16
2.2. Brusellozis.....	17
2.2.1. Brusellozisin tarihçesi.....	17
2.2.2. Brusellozisin genel özellikleri.....	17
2.2.3. Epidemiyolojisi.....	19
2.2.4. Yayılım koşulları.....	22
2.2.5. Brucella'nın insanlara geçişi.....	25
2.2.6. Brucella tanısında kullanılan testler.....	27
2.2.6.1. Mikrobiyolojik testler.....	27
2.2.6.2. Serolojik testler.....	28
2.2.6.3. Moleküler testler.....	33
2.2.7. Brucella'nın tedavisi.....	34
2.3. Rekombinant DNA teknolojisi.....	35
2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	36
2.3.2. Plazmidler ve özellikleri.....	37
2.3.3. Gen Klonlama.....	38
2.3.3.1. Klonlama Yöntemleri.....	39
2.3.3.2. Restriksiyon enzimleri (RE).....	39
2.3.4. DNA ligasyonu.....	41
2.3.5. Transformasyon.....	42
2.3.6. Kolonilerin seçimi.....	42
2.3.7. Rekombinant genin klonlandığı hücrelerin saptanması.....	43
2.3.8. Protein ekspresyonu.....	44
2.3.8.1. Ekspresyon vektörleri.....	44
2.3.8.2. Protein ekspresyonu.....	44
2.3.8.3. Protein izolasyonu ve ekspresyonunun gösterilmesi.....	45
2.3.9. Proteinlerin Saflaştırılması.....	46
3. MATERYAL ve YÖNTEM	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler	49
3.1.2. Kullanılan Marker DNA ve Proteinler	51
3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	51
3.1.3.1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	51
3.1.3.2. PCR ve ligasyon işlemi için kullanılan tampon ve çözeltiler.....	52
3.1.3.3. Protein ekstraksiyonunda kullanılan tamponlar	52
3.1.3.4. Ni-NTA affinite kolonu için kullanılan tamponlar	53
3.1.3.5. Protein miktar tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	55
3.1.3.6. Sumoproteaz için kullanılan tampon ve çözeltiler.....	55
3.1.3.7. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	56
3.1.3.8. Western Blotlamada kullanılan tampon ve çözeltiler.....	59

3.1.3.9. Dot Blotlama’da kullanılan tamponlar.....	61
3.1.3.10. ELISA’ da kullanılan tampon ve çözeltiler.....	61
3.1.4. Kullanılan Bakteri Kültürleri.....	64
3.1.4.1. Brucella melitensis Rev1	64
3.1.4.2. E. coli One Shot® Mach1™ hücreleri	64
3.1.4.3. E.coli One Shot® BL21(DE3) hücreleri.....	65
3.1.4.4. Protein klonlama ve ekspresyon vektörü.....	67
3.1.5. Kullanılan Besiyerleri	71
3.1.5.1. S.O.C. Besiyeri.....	71
3.1.5.2. LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri.....	71
3.1.5.3. LB (Luria-Bertani) katı besiyeri.....	72
3.1.6. ELISA Testinde Kullanılan Kan Serumları.....	73
3.2.Yöntem.....	74
3.2.1. Brucella Melitensis Rev1 DNA İzolasyonu.....	74
3.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	75
3.2.3. Klonlama İşlemleri.....	76
3.2.3.1. Omp28 precursor geninin genomik kopyasının üretilmesi için gene özgü primerlerin tasarlanması.....	76
3.2.3.2. PCR ile omp28 precursor gen bölgesinin çoğaltılması.....	78
3.2.3.3. Ligasyon.....	79
3.2.4. One Shot® Mach1™-T1r Kompotent Hücrelerine Transformasyon.....	81
3.2.5. Transformasyon Hücrelerinin Analiz Edilmesi.....	82
3.2.6. Plazmit İzolasyonu.....	84
3.2.7. Sekans Analizi.....	86
3.2.8. Protein Ekspresyon Çalışmaları.....	86
3.2.8.1. BL 21 (DE3) One Shot® hücrelerine transformasyon.....	86
3.2.8.2. Örneklerin analiz edilmesi.....	87
3.2.8.3. Rekombinant proteinin çözünürlüğünün tespit edilmesi	88
3.2.8.4. Denatüre lizis	89
3.2.9. Protein Saflaştırma İşlemi.....	90
3.2.9.1. Ni-NTA affinite kolon protokolü.....	90
3.2.9.2. Kolon Rejenerasyonu.....	91
3.2.10. Protein Miktar Tayini.....	91
3.2.11. SDS PAGE Elektroforezi.....	92
3.2.12. Diyaliz.....	94
3.2.13. Western Blot.....	95
3.2.14. Dot Blot.....	97
3.2.15. Sumo proteazla kesim işlemi.....	97
3.2.16. ELISA Protokol.....	98
3.2.17. Omp28 Precursor Proteinin Diagnostik Etkisinin Hesaplanması.....	99
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	101
4.1. Araştırma Bulguları.....	101
4.1.1. Brucella Melitensis Rev1 Total Genomik DNA İzolasyon Sonucu.....	103
4.1.2. Omp 28 Precursor Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	104
4.1.3. Ligasyon.....	105
4.1.4. E. Coli One Shot® Mach1™ T1R Hücrelerine Transformasyon ve Pozitif Transformant Hücrelerin Tespit Edilmesi.....	105
4.1.4.1. Omp28precursor primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR sonucu.....	106
4.1.4.2. Çapraz PCR sonucu	108
4.1.5. Plazmit İzolasyonu ve Kontrol PCR	110
4.1.6. Sekans Analizi.....	112
4.1.7. E. Coli One Shot® BL21 (DE3) Bakterilerine Transformasyon ve Pozitif Transformant Hücrelerin Tespit Edilmesi.....	114
4.1.8. Protein Ekspresyon Bulguları.....	115
4.1.9. Protein Saflaştırma Sonucu.....	119
4.1.10. Diyaliz Sonucu	123
4.1.11. Western Blot Sonucu.....	123
4.1.12. Dot Blot Sonucu.....	125

4.1.13. Sumo Proteazla Kesim Sonucu	126
4.1.14. ELİSA Sonucu.....	129
4.2. Tartışma.....	131
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	146
5.1. Sonuçlar.....	146
5.2. Öneriler.....	154
KAYNAKLAR.....	157
ÖZGEÇMİŞ.....	167
ÖZET.....	168
SUMMARY	172

ÖZ

Doktora Tezi

BRUCELLA MELİTENSİS REV1 YÜZEY MEMBRAN PROTEİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE DİAGNOSTİK ETKİNLİĞİNİN TESPİT EDİLMESİ

İsmail KOYUNCU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar: Prof.Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT
Doç.Dr. Şahabettin SELEK
Yıl: 2013, Sayfa: 174

Brusella, aerobik, spor oluşturmeyen, hareketsiz, gram negatif bir kokobasil olup, insanlarda kronik enfeksiyona neden olan, NIH/CDC'ye göre B kategorisinde bir bioterör ajanıdır. Bruselloz, hayvanlardan ya da bunların ürünlerinden insanlara bulaşan zoonotik bir hastalıktır. Türkiye'de dahil olmak üzere birçok gelişmekte olan ülkede; hem halk sağlığı hem de ekonomik önemi olan bir zoonozdur. Erken teşhis ve enfekte hayvanların ayrımı, hastalığı kontrol etmek için önemlidir. Brusella için serodiagnostik testler, hücrenin lipopolisakkarid (LPS) bileşenine karşı geliştirilmiş antikorların saptanması temeline dayanır. Ancak, diğer gram negatif bakterilerle çapraz reaksiyon nedeniyle yanlış pozitif sonuç vermesi bu yöntemin yararını sınırlamaktadır. Bu çalışmada, LPS 'ye alternatif olarak *Brucella melitensis Rev1*'e ait antijenik dış membran proteini (omp28 precursor) klonlandıktan sonra üretilip saflaştırıldı. Rekombinant proteinin tespitini ve saflaştırılmasını kolaylaştırmak için N-terminal kısmına His-sumo tag eklenmiştir. *B. melitensis Rev1* omp28 precursor geninin, ORF gen bölgesi PCR ile çoğaltılıp, direkt olarak pETSUMO vektörüne klonlandı. Klonlanan plazmitinin bütünlüğü PCR ve sekans analizi kullanılarak doğrulandı. Recombinant vektör *E. coli* One Shot® Mach1™ hücrelerinde çoğaltıldıktan sonra, *E. coli* BL21(D3) hücrelerine transfer edilip, protein ekspresyonu IPTG ile indüklendi. Eksprese edilen rekombinant protein Ni-agaroz kromatografisi ile saflaştırıldı ve anti-His antikoru kullanılarak yapılan westernblot ve dot blotla doğrulandı. Saflaştırılmış omp28 precursor proteinin brusella teşhisindeki etkinliği, Şanlıurfa'da çeşitli hastanelerden toplanan serumlarla indirect enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) yapılarak çalışıldı. Pozitif ve negatif olduğu bilinen serum örnekleri kullanıldığında omp28 precursor proteinin brusella enfekte insan serumlarında immünreaktif olduğu tespit edildi. Altmış insan serumu; omp28 precursor antijen tabanlı ELISA testi ile tarandı ve sonuçlar Rose Bengal Plate aglütinasyon testi (RBPT) ile karşılaştırıldı. Rekombinant omp28 precursor temelli ELISA testinin; sensitivitesi % 87,8 spesifitesi % 96,2 pozitif prediktif değer % 96,6 negatif prediktif değer % 78,7 ve test geçerliliği % 91,6 olarak tespit edildi. Rekombinant *B. melitensis Rev1* omp28 precursor proteinin insan bruselloz tanısı için bir protein antijeni olarak kullanılabilceği sonucuna varıldı.

ANAHTAR KELİMELER: *Brucella melitensis Rev1*, Omp28 precursor, Rekombinant DNA, Klonlama, Protein ekspresyonu, Protein Saflaştırma, ELISA

ABSTRACT

PhD Thesis

BRUCELLA MELITENSIS REV1 SURFACE MEMBRANE PROTEIN'S CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION and DETERMINE OF DIAGNOSTICS TO THE EFFECTIVENESS

İsmail KOYUNCU

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisors: Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT
Association. Prof. Dr. Şahabettin SELEK
Year: 2013, Page 174

Brucella, an aerobic, nonsporeforming, nonmotile Gram-negative coccobacillus, is a NIH/CDC category B bioterror threat agent that causes chronic human illness. Brucellosis is a zoonotic disease transmitted to humans either from animals or from their products. It is a zoonosis of both public health and economic importance in many developing countries including Turkey. Early detection and segregation of the infected animals are important in order to control the disease. Serodiagnostic tests for brucellosis is mainly based on detection of antibodies developed against lipopolysaccharide (LPS) component of cell. However, the usefulness of this method is limited by false-positive reactions due to cross-reaction with other Gram negative bacteria. In this study we evaluated a protein antigen, outer membrane 28 precursor protein (omp28 precursor), of *Brucella melitensis Rev1* as an alternative to LPS. In this study, we cloned, expressed, and purified omp28 precursor of *Brucella melitensis Rev1*. The recombinant protein was fused with 6-His and sumo epitope tags at their N- termini to facilitate detection and purification. The *B. melitensis Rev1* omp28 precursor gen was PCR synthesized based on their ORF sequence and directly cloned into an pETSUMO vector. The integrity of the constructed plasmid was confirmed using PCR and sequencing. The recombinant entry construct were propagated in *E. coli* One Shot® Mach1™ cells then transformed into *E. coli* BL21 (D3) cells for IPTG induced protein expression. The expressed recombinant protein was purified by chromatography through Ni-agarose and confirmed with Western blot and Dot blot analysis using anti-His antibody. The efficacy of purified omp28 precursor was studied in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of brucellosis in field sera collected from different hospital in Şanlıurfa. Using known negative and positive serum samples. it was found that omp28 precursor is immunoreactive to *Brucella* infected human sera. Sixty human sera were screened by omp28 precursor antigen-based ELISA and the results were compared to rose Bengal plate agglutination Test (RBPT). Recombinant omp28 precursor antigen based ELISA has shown sensitivity of 87,8% specificity of 96,2% positive predictive value 96,6 %, negative predictive value 78,78 % and accuracy of 91,6%. It was concluded that recombinant *B. melitensis Rev1* omp28 precursor could be used as a protein antigen for diagnosis of brucellosis in human

KEY WORDS: *Brucella melitensis Rev1*, Omp28 precursor, Recombinant DNA, Cloning, Protein expression, Protein Purification, ELISA

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde her türlü desteğini benden esirgemeyen, uygun bir çalışma ve laboratuvar imkânı sağlayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e kendisini tanıdığım günden itibaren sevgisini, anlayışını ve her türlü yardımını hiçbir zaman benden esirgemeyen ikinci danışman hocam Doç. Dr. Şahabettin SELEK'e, moleküler biyoloji alanında hassas çalışma becerisi kazandıran Prof.Dr. Nihat DİLSİZ'e, deneysel çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölüm başkanı Prof.Dr. Orhan ERDOĞAN'a Dr. Emrah YERLİKAYA'ya, kromatografi alanında yardımcı olan Prof.Dr.Şükrü BEYDEMİR'e Prof. Dr Mehmet ÇİFTÇİ'ye, Brucella bakterisini temin etmemde yardımcı olan Dollvet firmasının'a Dr. Nilay ÜNAL'a, tez izleme komitemde fikirleriyle yardımcı olan Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, tez savunmamda önemli katkıları olan Doç.Dr Seyithan TAYSI'ya, Biyokimya ve Biyoloji Bölümün'deki tüm akademik personele saygı ile teşekkür ediyorum. Projemi kabul edip destek sağladığı için HÜBAK'a, zamanlarını ayırarak tez savunmamda bulunacak olan tüm katılımcılara şimdiden teşekkür ediyorum.

Destekleri ile her zaman yanımda olan, en yoğun zamanlarımda yardımlarını esirgemeyen, eşim Serpil hanım'a, anneme, babama ve hayatımdaki en güzel varlığım olan biricik kızım Fatma Zehra'ma ithaf ediyorum....

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. B.melitensis Rev1 omp28 precursor protein 3D modeli.....	12
Şekil 2.2. Bruselloz vakalarının yıllara göre dağılımı.....	20
Şekil 2.3. Bruselloz vakalarının aylara göre dağılımı.....	20
Şekil 2.4. Bölge bazında yıllara göre toplam insan brusellozis vaka sayısı.....	21
Şekil 2.5. Bölge bazında yıllara göre toplam inek brusellozis vaka sayısı.....	22
Şekil 2.6. Ni-NTA ve Histidin tag içeren protein moleküllerinin etkileşim şeması.....	46
Şekil 3.1. 1000 bp DNA ladder ve 100 bp DNA ladder	51
Şekil 3.2. Prestained protein ladder.....	51
Şekil 3.3. Petsumo vektör haritası.....	69
Şekil 4.1. Brucella melitensis Rev1 den total genomik DNA izolasyonu.....	103
Şekil 4.2. Brucella melitensis Rev1 omp28 precursor geninin PCR sonucu.....	104
Şekil 4.3. Transformasyon sonrası Omp 28 precursor primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR Sonucu.....	107
Şekil 4.4. Koloni çapraz ve omp28 kontrol PCR sonucu.....	109
Şekil 4.5. İzole edilen plazmidlerin omp28 precursor kontrol PCR sonucu.....	110
Şekil 4.6. Plazmit çapraz PCR sonucu.....	111
Şekil 4.7. PETSUMO sekans analiz sonucu.....	113
Şekil 4.8. Transformasyon sonrası E.coli One Shot® BL21(DE3) hücrelerinin çapraz ve omp28 kontrol PCR sonucu.....	114
Şekil 4.9. 30 °C,1 mM IPTG ortamındaki protein ekspresyon seviyesinin SDS PAGE görüntüsü	115
Şekil 4.10. 37 °C de 3-7. saatler arasındaki protein ekspresyon seviyesinin SDS PAGE görüntüsü	116
Şekil 4.11. 0-1. ve 6-8. saatlik inkübasyon sürelerindeki protein ekspresyon seviyesinin SDS PAGE görüntüsü.....	117
Şekil 4.12. Denatüre ve nativ metodlarla yapılan protein ekstraktlarının SDS PAGE görüntüsü...	118
Şekil 4.13. Protein saflaştırma grafiği.....	120
Şekil 4.14. Ni-NTA afinite kolonu ile protein saflaştırma aşamaları SDS PAGE görüntüsü.....	121
Şekil 4.15. Ni-NTA afinite kolonu ile protein saflaştırma aşamaları SDS PAGE görüntüsü.....	122
Şekil 4.16. Western blot için hazırlanan SDS PAGE görüntüsü.....	124
Şekil 4.17. His-Sumo-Omp28 precursor füzyon Proteininin Western Blot görüntüsü	124
Şekil 4.18. Recombinant BL21 (D3) total hücre lizati ile yapılan dot blot görüntüsü.....	125
Şekil 4.19. Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırma sonrası elde edilen His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteinin dot blot görüntüsü.....	126
Şekil 4.20. Sumo protezla kesim sonucu elde edilen SDS page görüntüsü.....	127
Şekil 4.21. Omp28 precursor proteinin saflaştırma ve protezla kesim aşamaları sonucu elde edilen SDS page görüntüsü.....	128
Şekil 4.22. Brucella melitensis Rev1 total hücre lizati ve omp28 precursor proteinin ELISA sonucu.....	129

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Brucella ve çevre koşulları.....	25
Çizelge 2.2. Bazı gıda maddelerinde Brucella'nın yaşam süresi.....	26
Çizelge 2.3. Ekspresyon vektörleri ve özellikleri.....	45
Çizelge 3.1. PETSUMO vektöründe bulunan yapı ve özellikleri.....	70
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan brucellozlu hasta ve sağlıklı insan bilgileri.....	73
Çizelge 3.3. PCR'da kullanılan madde miktarları.....	78
Çizelge 3.4. PCR programı.....	79
Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan madde miktarları.....	80
Çizelge 3.6. Kontrol PCR programı.....	83
Çizelge 3.8. Sumoproteazda kullanılan maddeler.....	97
Çizelge 3.9. Omp28 precursor proteinin diagnostik etkinliğinin hesaplanmasında kullanılan tablo.....	99

SİMGELER DİZİNİ

APS	Amonyum persülfat
BSA	Bovine serum albumin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
IPTG	Izopropil β -D-1 thiogalactopiranosid
LB	Luria Broth
omp	outer membrane protein
ORF	Open reading frame
PBS	Fosfat buffer solüsyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S.O.C	Super Optimal broth with Catabolite repression
SDS	Sodium dodesil sülfat
TAE	Tris-acetate-EDTA
TEMED	N-N'-N'-N'-Tetrametiletildiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
Tween-20	Polietilen Sorbitan Monolaurat

1. GİRİŞ

Brusellozis; insanlarda sayısız organı etkileyerek spesifik veya spesifik olmayan belirtilerle hastalık yapan, laboratuvarından kaynaklı bakteriyal enfeksiyon ajanı olarak son yıllarda insidansı yükselen, hayvanlarda sıklıkla abortus (düşük) ve süt veriminin azalması gibi faktörlerden dolayı ciddi ekonomik kayıplara sebebiyet veren, ayrıca biyoterörizm saldırılarında kullanılan zoonotik bir hastalıktır (Güllüce 1993; Romero ve ark., 1995; Leal-Klevezas, 1995; Bricker, 2000; Garrido-Abellan, 2001; Bricker, 2002; Cloeckaert ve Vizcaino., 2004; Alain, 2005; Baddour ve Alkhalifa, 2007; Ames, 2007).

Hayvanlarda; brusellozis enfeksiyonlarında ana semptom, abortus dur. Plasenta enfeksiyonu, epididimis, testisit en yaygın komplikasyonlarıdır. Rapor edilen önemli etkiler yanında en önemli etki ekonomiktir, ölümler fetus ve yeni doğanlar dışında nadirdir (Dizer, 2004; Cloeckaert ve Vizcaino., 2004; Ames, 2007).

İnsanlarda ise brusellozis multisistemik bir hastalıktır ve semptomları son derece geniş yayılım gösterir. Asemptomatik enfeksiyonlarda yaygındır. Semptomatik vakalarda hastalık oldukça değişkendir ve klinik belirtiler sinsi bir şekilde aniden ortaya çıkar (Ames, 2007). Hastalık tablosu septisemiktir ve sürekli ateş, üşüme, aşırı terleme, halsizlik, uykusuzluk gibi semptomlarda buna eşlik etmektedir. İnsanlarda inkübasyon periyodu 1-3 haftadır, ancak bazen birkaç ayda olabilir. Hastalığın iyileşmesi birkaç haftadan birkaç aya hatta birkaç yıla kadar sürebilir (Rupesh, 2003). Brucella türlerinden özellikle *B. abortus*, *B. canis*, *B. suis* ve *B. melitensis* cinsleri insanlarda enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Rupesh, 2003; Ames, 2007).

Hastalığın yayılımı; enfekte hayvanların dışkı, süt, et ve bununla ilgili ürünleri ile plasenta ve abortus sonucu olur. Enfekte bir işletmede çalışanların, enfeksiyona yakalanmalarına sebebiyet verebildiğinden bir meslek rahatsızlığı olarak da görülür (Arasoğlu, 2010). Brucella mikrobuyla tanışmış olan çiftlikte yaşayan insanlar hayvanlarla doğrudan temasta bulunmasalar dahi, enfeksiyondan etkilenebilirler.

Aynı şekilde Brucella etkeninin çalışıldığı laboratuvarlarda hijyen koşullarına uyulmadığında da bulaşma gerçekleşebilir. Çiğ olarak tüketilen süt ile çiğ süttten yapılan taze peynir, tereyağı ve krema insanlarda brusellozisin önemli bulaşma faktörlerindedir. Ülkemizde, pastörize süttten ziyade kaynatılmamış süt ve bundan üretilen süt ürünlerini tüketme alışkanlıklarından dolayı bu etkene sıklıkla rastlanır (Adıgüzel, 2001). Birçok ülke, ineklerden brusellozisi başarılı bir şekilde eradike etmiş olmasına rağmen, ülkemizde bu sorun hala önemini korumaktadır (Adıgüzel, 2001). Aynı etmen insan brusellozisinin oluşumunda da önemli bir faktör olup, özellikle endemik bölgelerde, ciddi ekonomik ve sağlık problemlerine neden olmaktadır (Rijpens ve ark., 1996; Corbel 1997; Cengiz, 2000; Boschioli, 2001).

Brucelloz tanısı; heterojen ve zayıf spesifik klinik belirtileri nedeniyle, mikrobiyolojik ve serolojik testlere dayanmaktadır (Romero ve ark., 1995; Bricker, 2002; Baddour ve Alkhalifa, 2007). Mikrobiyolojik tanıda; brucella yavaş ve zor geliştiği için uzun süreli inkübasyon periyodu, özel büyüme medyumları ve alt kültürler gereklidir (Rupesh, 2003; Baddour ve Alkhalifa, 2007). Ancak mikrobiyolojik yöntemlerde sensitivite düşük olup, hastalık evresine göre %50-90 arasında değişmektedir (Garrido-Abellan, 2001). Üstelik klinik örneklerde tanı konulma prosesi oldukça uzundur ve örneklerdeki canlı Brucella miktarı da oldukça düşük olduğundan geliştirilmesi de zor olmaktadır. Ayrıca çoğu Brucella türünün zoonotik yapısı laboratuvar personeli için gizli bir tehlike olduğundan çalışan kişi deneyimli olmalı ve çalışma esnasında en iyi laboratuvar ekipmanları kullanılmalıdır (Leal-Klezevas, 2000; Bounadja, 2009).

Özellikle teknolojinin yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde veya kırsal alanlarda hastalık yaygındır ve tanıda serolojiye bel bağlanılmıştır (Rupesh, 2003; Baddour ve Alkhalifa, 2007). Yaygın olarak kullanılan serolojik testler; serum aglutinasyon test, coombs testi (CT) Anti-Brucella aglutinasyon test, rose bengal test ve kompleman birleşme testleridir. Her bir testin kendine has dezavantajları vardır. Ancak genel olarak; test duyarlılık sınırlarının genişliği, endemik bölgelerde düşük spesifite ve yüksek immün cevaplar, kronik hastalıklarda ve tekrarlayan vakalarda yanlış sonuçların alınması, çapraz reaksiyonların varlığı ve zaman, serolojik

metodlarla brusellozis tanısında karşılaşılan önemli problemlerdir. (Leal-Klezevas, 2000; Garrido-Abellan, 2001; Gupta, 2006; Baddour ve Alkhalifa 2007).

Dolayısı ile brusellozisin kontrol altına alınmasında ve eradikasyonunda, yeni tanı metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Özellikle biyolojik savaş ve agroterörizm çağına girdiğimiz için daha duyarlı ve spesifik hızlı testler şimdiye kadar olduğundan daha çok gereklidir (Bricker, 2002). Ayrıca brusellozisin hızlı ve doğru tanısı; itlaf etmek veya karantinaya almak gibi kontrol önlemlerinin kullanıldığı eradikasyon programlarının olumlu sonuçlanmasında çok gereklidir (Bricker ve Halling ve ark., 2005; Rijpens, 1996). Laboratuvarlarda patojenin tespiti ve bakteri izolasyonu ile brusellozisin tanı çalışmaları özellikle geniş popülasyonların düzenli taranmasında pratik olmayan bir yaklaşımdır (Mukherjee, 2007).

Son yıllarda brucellanın tanısında ELISA ve PCR temelli testler kullanılmaya başlanmıştır. PCR yalnız başına veya etiketlenmiş problemlerle; izole edilmiş bakterilerden sadece Brucella'nın izolasyonunu sağlayan önemli bir tekniktir (Gupta, 2006). PCR testlerinin başlangıç safhalarında; test örnekleri genellikle kültür organizmalarının saf DNA'sının elde edilmesi ile oluşturulur. Ancak, pratikte organizmanın gelişme basamağı atlanarak klinik örneklerden direkt olarak tanı yapılması daha akıllıcadır. Ayrıca PCR işlemi genellikle zaman alıcı ve genel teşhis laboratuvarlarının kullanımı içinde uygun değildir (Fredricks, 1999, Luk, 1994; Zhong, 1999).

Biyolojik savaş veya diğer acil durumlarda sahada direkt analizi gerçekleştirmek önemli olabilir. Bu yüzden, direkt olarak enfekte veya kontamine materyallerin analizini erken evrede sağlayacak metodlar geliştirmek çok önemlidir. Çünkü örnek hazırlama, başarı için bir anahtardır. Dahası, başlangıç örneğinin konsantrasyonu, genellikle kabul edilebilir tespit limitlerinin belirlenmesi için gereklidir (Bricker, 2002). Bu nedenlerden dolayı, daha iyi diagnostik araç olarak serodiagnostik testler, gerekli olan ihtiyacı karşılama potansiyeline sahiptir.

Brucella için kullanılan serodiagnostik testler temelde brucella lipopolisakkarid (LPS) bileşenine karşı gelişen antikorların saptanması temeline dayanır. Brucelladaki

S tipi LPS yapısı bugüne kadar en güçlü antijenik özellik gösteren moleküllerdir (Baldi, 1996; Zygmunt, 1994). Bundan dolayı; hem insanlarda hemde hayvanlarda bruselloz tanısı genellikle S-LPS'ye karşı oluşmuş olan spesifik antikorların saptanması temeline dayanır (Alton,1988; Wright, 1990). Ancak Anti- LPS'ye dayalı testlerin yanlış pozitif sonuç verme sorunları bulunmaktadır. Yanlış pozitif sonuç verme, genellikle köken olarak aynı LPS yapısına sahip olan *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* o-157 bakterileri arasındaki çapraz reaksiyondan kaynaklanmaktadır (Corbel, 1995).

Serolojik testler çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar verdiği için günümüzde güvenilirliğini kaybetmiştir. Ayrıca LPS antijeninin üretimi sırasında yaşanan zorluklar ve biyolojik risk oluşturması da, bu nedenler arasında sayılabilir. Bu tür nedenler LPS antijeni yerine, alternatif antijen arayışlarına yol açmıştır. Bu yüzden Brusellozun immünolojik çalışmalarında temel gaye, LPS yapısında olmayan yeni antijenlerin tespit edilmesi ve LPS antijenlerinin neden olduğu sakıncaları ortadan kaldırmaktır (Lindler, 1996; Debbarh, 1996; Cloeckert, 2001).

Bu yüzden LPS yapısında olmayıp, insan ve hayvanlar için immünojenik ve antijenik özellik gösteren bakteriyel bileşenlerin tespit edilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda; LPS antijeninin aksine, kısmen saflaştırılmış sitoplazmik ve membran proteinlerinin humoral bağışıklık sistemini tetiklediği ve brucella tanısında yararlı bir belirteç olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir (Baldi, 1996; Zygmunt, 1994; Cloeckert, 2001; Hemmen ve ark., 1995; Letesson, 1997; Goldbaum, 1993; Limet, 1993; Cassataro, 2002; Contreras-Rodriguez, 2006). Bu sonuçlara göre bazı bakteri bileşenlerinin, immünojen, immün sistemi aktifleştirici ve koruyucu etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bakteriyel bileşenler içerisinde özellikle yüzey membran proteinleri; aşı ve tanı kiti geliştirmek için cazip görülmektedir. Bakterilerdeki dış membran proteinleri Brucella enfeksiyonunda konak hücrenin indüksiyonu ve immün yanıt oluşturmasında önemli rol oynamaktadır. Genellikle başarılı aşı ve diagnostik reaktifler öncelikle antikor oluşumu sağlayan mikroorganizmaların yüzeyindeki yapılardır. Bakterilerdeki yüzey

proteinlerinin aşı ve diagnostik reaktiflerin geliştirilmesi için önemli antijenler olduğu düşünülmektedir (Xuan ve ark., 2005).

Gen kütüphanesinin olmadığı zamanlarda; *Brucella melitensis*'in 20 kDa (Denoel, 1995), 28 kDa (Lindler, 1996) ve 31 kDa (Vizcaino, 1996) membran proteinleri ile *B. abortus*'a ait 16.5 kDa (Tibor, 1994), 22 kDa (Tibor, 1996), 25 kDa (Wergifosse, 1995), 36 kDa (Ficht, 1989), *B. ovis* 25 kDa omp (Cloeckert, 1996), membran proteinleri geleneksel yöntemlerle klonlanarak üretilmiştir. Sentezlenen bu omp'ler düşük molekül ağırlığında olup, rekombinant kütüphane verileri ve spesifik diagnostik ajanlar kullanılarak yapılan immün reaksiyon sonuçlarına göre üretilmiştir.

B.melitensis ve *B.suis* genom sekansı 2002 yılında yayınlanması sonucu (Paulsen, 2002) elde edilen genom bilgileri *Brucella* dış membran proteinlerinin (omp) klonlanması ve üretimi için son derece yararlı olmuştur (Ding ve ark; 2005). *Brucella* omp proteinleri geniş ölçekte immünojenik ve koruyucu antijenler olarak karakterize edilmiştir. Ancak çalışmaların çoğunluğu büyük molekül ağırlıklı omp'ler üzerinde yoğunlaştığından küçük omp'ler üzerindeki çalışmalar yetersiz olmuştur (Pasquevich, 2009).

Son zamanlarda küçük molekül ağırlıklı omp'ler üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen omp'ler kullanılarak yeni immünoagnostik testleri oluşturma çabaları sürmektedir. İmmünoagnostik testlerden Enzim linked immunosorbent assay (ELISA); daha duyarlı, spesifik, kolaylıkla yüksek miktarlara uygulanabilen, hızlı, basit ve daha az iş gücü gerektiren bir tekniktir. Bu yöntem geleneksel yöntemlerle *Brucella melitensis*'in. identifikasyonu, problemlili kültürler için umut veren alternatif bir metottur.

Bu tez çalışmasını; *Brucella melitensis* Rev1 suşuna ait immünojenik yapıda olduğunu düşündüğümüz yüzey membran omp28 precursor proteini rekombinant DNA teknolojisi ile üretilip affinite kromatografisi ile saflaştırdıktan ve karakterizasyonunu yaptıktan sonra, saflaştırılan proteinleri ELISA ile diagnostik etkinliğini tespit edip, rutin tanı testi olarak uygulanabilecek, kısa zamanda sonuç

alınabilen, pratik, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek immünoagnostik bir test geliştirmek amacıyla yaptık.

Bu amaç doğrultusunda, *Brucella melitensis Rev1* bakterisinin genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, yüzey membran omp28 precursor proteininin ORF gen bölgesi uygun primerler kullanılıp PCR ile çoğaltıldıktan sonra, pETSUMO ekspresyon vektörüne klonlanıp *E.coli*'ye transfer edildi, transformasyon sonrasında N-Terminal kısmında His-Sumo tag kısmı içeren rekombinant protein sentezlenerek, affinite kromatografi teknikleri ile saflaştırıldı. Saflaştırma işleminden sonra, Western blotlama ve Dot blotlama teknikleri ile proteininin karakterizasyonu yapıldıktan sonra proteinin tag kısmı sumo proteaz enzimi ile uzaklaştırılıp, nativ omp28 precursor proteini elde edildi. Saflaştırılmış omp28 precursor proteininden konvansiyonel serolojik testler geliştirmek için daha önce karakterize edilen 30 *Brucella* enfeksiyonlu ve 30 sağlıklı insan serum örneklerinden oluşan bir panel ile geliştirdiğimiz ELISA metodu test edilip, bruselloz tanısında potansiyel kullanımı tespit edildi.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Brucella* spp.

2.1.1. *Brucella* genel özellikleri

Brucella mikroorganizması; 0,6-1,5 µm, 0,5-0,7 µm boyutlarında, makrofajlar içerisinde ürediği için fakültatif intracellular karakter gösteren, sporsuz, bakteriyolojik boyalarla çabuk boyanabilen Gram (-), aerobik, küçük koko-basil veya kısa çomak şeklinde bir bakteridir. Kamçı veya pilileri olmadığından hareketsizdirler. Ancak küçük olduklarından, moleküler hareket nedeniyle, yerlerinde titreşirler (Braunien hareket). Çomaklar genellikle tek veya çift şeklinde görülür. Gerçek kapsül üretmezler. S şeklinde ve mukoid koloni oluşturan suşlarda kapsül olabilir (Güllüce, 1993; Romero ve ark., 1995; Corbel, 1997; Çelebi, 1999; Garrido-Abellan, 2001; Dizer 2004; Alain, 2005; Salehi, 2006; Temiz, 2006).

2.1.2. Kültür yapısı ve büyüme faktörleri

Brucella türleri aerobiktir, ancak bazı suşları büyümek için %5-10 karbondioksite ihtiyaç duyar. Özellikle *B. abortus* ve *B. ovis* ilk izolasyonda %5-10 CO₂'li ortama gereksinim duyar (Güllüce, 1993; Corbel, 1997; Çelebi, 1999; Garrido-Abellan, 2001; Dizer, 2004; Taşçı, 2004; Alain, 2005; Temiz, 2006). Optimal üreme ısısı 37°C olmakla birlikte, 10-40°C'de de üreyebilirler. Organizmanın büyümesi için gerekli pH aralığı 6,7-7,4'dür (Garrido-Abellan, 2001; Taşçı, 2004). *Brucella* türleri intracellular yaşadıklarından, beslenme ihtiyaçları komplekstir ve insanlarda hastalığa neden olan bakterilere göre daha uzun bir bölünme periyoduna (2,5-3,5 saat) sahiptirler. Bilhassa ilk izolasyonda kompleks besiyerlerinin kullanılması gerekir. Et özütü, triptoz gibi kompleks peptonlu, glikoz ve tuz içeren besiyerlerinde iyi ürerler.

2.1.3. Antijenik yapısı

Brucella antijenleri; aglutinojenik, presipitojenik, opsonojenik ve allerjik yapıda kompleks antijenlerdir. Kimyasal yapıları; polisakkarit, protein, lipid ve deoksiribonükleik asitlerin türlere göre değişik karışımlarından ibarettir (Güllüce, 1993). Brucella hücre yüzeyi antijenleri; hücre içi antijenlerin aksine, kültürün koloni fazında S-R değişikliğine bağlı, tür ve biyotipe göre farklılık gösterir.

Smooth ve rough Brucella türleri arasındaki farklılık; yüzey antijenlerini içeren ve immun cevaba neden olan lipopolisakkarit (LPS) komplekslerinin kombinasyonundaki farklılıklardan ileri gelir (Güllüce, 1993; Corbel, 1997; Garrido-Abellan ve ark., 2001; Cutler, 2006). Lipopolisakkarit zinciri; O-polisakkarit zincirini (major yüzey antijeni) ihtiva etmesine göre smooth (S-LPS) veya rough (R-LPS) yapısında olabilir (Corbel, 1997; Hernandez ve ark., 2007). Smooth Brucella suşlarında; S-LPS; 2 tip aminoglikoz içeren lipid A, β -hidroksimistik asit hariç ayırıcı yağ asitleri, glikoz, mannoz ve quinovosaminden oluşan bir çekirdek bölgesi ve O zincirinden oluşur (Corbel 1997). O zinciri enfekte konakçılarda antikor cevabında bir immunodominant antijendir ve S-Brucella türleri tarafından sebep olunan enfeksiyonların serolojik tanısında major antijenik determinanttır (Cloeckart ark., 2002; Hernandez ve ark., 2007). *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* türleri smooth veya rough yapısında olabilirler. *B. ovis* ve *B. canis* ise major yüzey antijen olarak R-LPS'yi eksprese ederek R formlarını oluştururlar (Cloeckart ve ark., 2002).

Brucella suşlarının; *Escherichia hermanni* ve *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1 ve *Yersinia enterocolitica* O:9 türleri ile çapraz reaksiyonunun sebebi de LPS'lerinde 4-amino, 4-6 dideoksimannoz varlığıdır (Corbel, 1997). R-LPS'nin yapısı; O zincirinin hiç olmaması veya birkaç rezidüsünün eksilmesi dışında S-LPS yapısıyla benzerdir. Bu yüzden R-LPS'nin spesifikliğı büyük oranda merkez polisakkarit ile bağlantılıdır (Corbel, 1997). Smooth Brucella türlerinden köken alan rough mutantlarının virulansında önemli bir azalma gözlenmektedir. Buna göre LPS yapısında yer alan O-polisakkaritlerinin, S-LPS taşıyan Brucella suşlarının patojenitesi için gerekli

olduğu düşünülebilir. Ancak, *B. ovis* ve *B. canis* türlerinin LPS tabakalarında O zincirleri yoktur. Bu türler koçlarda ve köpeklerde patojeniktirler ve uzun süreli enfeksiyonları indüklerler. O-polisakkarit zincirleri *Brucella* türlerinin dış membranlarındaki diğer komponentleri baskıladığı için; OM proteinleri R formundaki *B. ovis* ve *B. canis* türlerinin dış membranlarının yüzeyinde daha fazla oluşurlar ve virulansı artırırılar. *Brucella* türleri (özellikle S formları); diğer Gram (-) bakterilerin dış membranlarında yer alan ve bakteri öldürücü etkiye sahip katyonik peptidlere daha dirençlidir. Bu direncin oluşmasında da Lipit A kompleksi büyük bir rol oynamasına karşın, dış membranlarında O-polisakkarit zincirinin varlığı da önemli bir etkendir (Hernandez ve ark., 2007).

S-*Brucella* suşları aglutinasyon testinde absorbe olmamış antiserumlar ile tam olarak çapraz reaksiyon verdikleri halde, R ve M tipi koloniler çok az veya hiç çapraz reaksiyon vermezler. R antijeni olarak tanımlanan ortak bir antijenik determinant, R-*Brucella* türlerinin en büyük yüzey antijeni olarak belirlenmiştir (Güllüce, 1993; Garrido, 2001; Corbel, 1997).

Brucella'ların, ayrıca *Salmonella*'ların Vi antijenlerine benzeyen, L antijenleri de gösterilmiştir. Daha çok *B. abortus* tiplerinde bulunmuş olan L antijeni, yeni izole edilen bakterilerde var olup, onların immun serumlarla aglutinasyonuna engel olmaktadır. Bu olay, serumlar 100°C'de yarım saat ısıtıldıktan sonra ortadan kalkmaktadır (Çelebi, 1999).

Brucella dış membranı; LPS dışında major dış membran proteinlerden oluşur. Bu proteinler ilk kez 1980 yılları başında hücre yapısının deterjanla ekstraksiyonu tanımlanmış, immunojenik ve koruyucu antijen olarak karakterize edilmişlerdir. Ancak rekombinant protein teknolojisi ve monoklonal antikor kullanımı major omp'lerin smooth (S) *B. abortus* veya *B. melitensis* enfeksiyonlarında antijen olarak çok az bir etkiye sahip olduğunu, model fare enfeksiyonlarında hiç veya çok az koruyucu aktivitesinin olduğunu ve konukçu enfeksiyonu sırasında immunojenik cevap oluşturmadığını gösterdi. Ancak grup 3 proteinlerinden özellikle Omp31'in, rough *B. ovis* enfeksiyonu sırasında immunodominant antijen olduğu ve fare

enfeksiyon modellerinde *B. ovis*'de önemli koruyucu antijen olarak görev aldığı gözlenmiştir (Cloekaert, 2002).

2.1.4. Dış membran proteinleri (omp; Outer membrane proteins)

Brucella türlerinde major dış membran proteinler ilk kez 1980 yılları başında tanımlanmış ve sonrasında molekül ağırlıklarına göre; grup 1 (94 veya 88 kDa), grup 2 (36–38 kDa), grup 3 (31–34 kDa ve 25–27 kDa) olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır (Cloekaert, 2002; Moreno ve Moriyon, 2006). Ayrıca, hücre yapısında peptidoglikan tabakasına bağlı bir ve bağımsız 3 lipoprotein tanımlanmıştır. Grup 2; porin proteinleri, grup 3; en az birbirinden bağımsız üç proteini (Omp31, Omp3a veya Omp25 ve Omp3b veya omp22) içerir, fakat grup 1'in rolü ve yapısı tam olarak aydınlatılamamıştır (Moreno ve Moriyon, 2006).

Grup 2 porin proteinler; birbiriyle bağlantılı, yüksek derecede homolojiye sahip (%85) 2 porin gen taşır; omp2a ve omp2b (Cloekaert ark., 2001; Cloekaert, 2002; Cloekaert ve Vizcaino, 2004; Moreno ve Moriyon, 2006). Bu genler 36 ile 38 kDa porin proteinleri kodlar ve eksprese eder (Cloekaert ark., 2002; Lopez-Goni ve Moriyon, 2004). Brucella porinleri dış membran üzerinde dağılmış olup, zarın geçirgenliğini sağlar (Cloekaert ve Vizcaino, 2004). Porin proteinlerinin genleri kromozom üzerinde 900 bp'le ayrılmış ve kromozomun karşıt yönlerinde yerleşmişlerdir. *B. abortus* biovar 1 nükleotid sekansına göre, omp2b geni 36 kDa'luk protein kodlamakta omp2a ise yapısındaki 108 bp'lik delesyon nedeniyle 33 kDa'lık protein kodlamaktadır (Vizcaino ve ark., 2000; Cloekaert, 2002; Cloekaert ve Vizcaino, 2004). Fakat bunların şimdiye kadar tanımlanan diğer porin genleriyle homojileri azdır. Omp2 lokusu bütün Brucella türlerinde mevcuttur (Moreno ve Moriyon, 2006). Ancak sadece *B. ovis*, diğer Brucella türlerinde birer tane bulunan omp2a ve omp2b genleri yerine birbiriyle çok yakın bağlantılı iki adet omp2a geni içermektedir (Cloekaert ark., 2001).

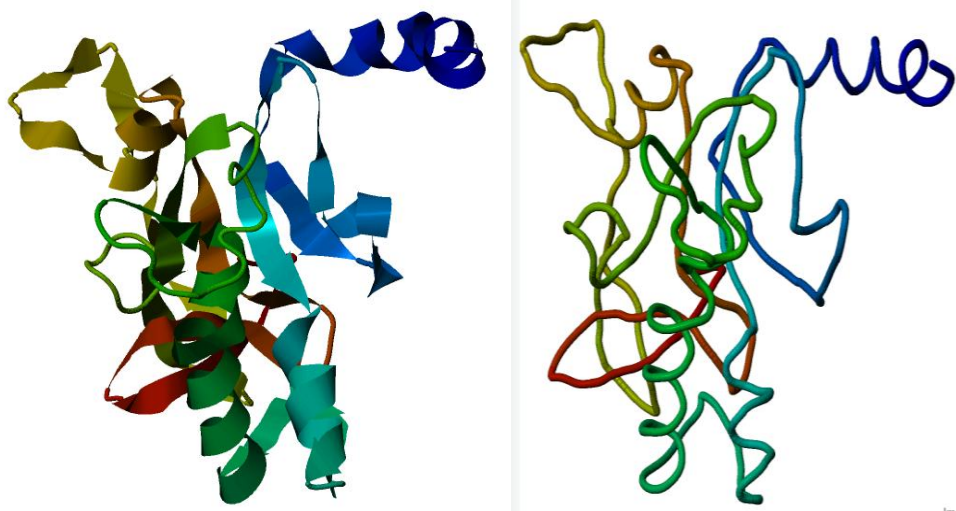
Omp2a ve omp2b yüksek derecede polimorfiktir. Bunlar; bazı türlerde spesifik sekanslara, spesifik markerlara, diğer intraspecific farklılıklara sahiptir. Bundan dolayı, omp2 genlerinin sekans analizi; önemli taksonomik ve filogenetik sonuçları beraberinde getirmektedir (Cloeckaert ve ark., 2002; Cloeckaert ve Vizcaino, 2004). Ayrıca Brucella tip suşlarında omp2 lokusunun DNA sekans analizi tür identifikasyonunda kullanılabilir nükleotid farklılıklarının varlığını göstermiştir (Ficht ve ark., 1996). Bu varyasyonların çoğu omp2a ve omp2b arasında korunmuş motiflerin basit değişiklikleri ile oluşturulabilir. Bazı omp2b gen varyantlarının nükleotid sekansları; birkaç suşta ve bazı omp2b genlerinde gözlenen, sekansın ortasında tipik omp2a motifi içeren mozaik sekans görüntüsü gösterir. Brucella cinsinde omp2 lokusundaki bu mozaik görüntü gen değişimiyle açıklanabilir. 2 çeşit porin geni arasında oluşan bu genetik değişimi destekleyen bir diğer kanıtta deniz memeli Brucella izolatlarının omp2 genlerinin araştırılmasıyla elde edilmiştir. Esasen omp2b genine oldukça çok benzemesine rağmen karasal memeli Brucella izolatlarında karşılaşılmayan spesifik bir motif içeren deniz memelilerinden elde edilen omp2a ve omp2b gen kopyaları arasında 10 bp'dan daha az olmakla birlikte bir kaç sapma mevcuttur (Cloeckaert ve ark., 2002; Cloeckaert ve Vizcaino, 2004). Fakat genelde proteinlerin antijenik değişkenliği üzerine bu varyasyonların çok az bir etkiye sahip olduğu gözlenmektedir (Moreno ve Moriyon, 2006).

In vitro ortamda *B. abortus*'ta omp2a ve omp2b geni eksprese edilmiştir, ancak diğer Brucella türlerinde ekspresyon şartları bilinmemektedir (Moreno ve Moriyon 2006). Brucella türlerinin evrimi ve omp2 geninin orjin farklılığına dayalı bu spekülasyonlar varsayımlara dayanmasına rağmen, gözlenen genetik farklılıklar ekolojik nişlerine bağlı olarak Brucella suşlarının sınıflandırılmasına olanak sağlar. (Cloeckaert ve ark., 2002; Cloeckaert ve Vizcaino, 2004).

Grup 3 proteinler; omp3a (veya omp25) ve omp3b (veya omp31) 8 beta tabakasından oluşmaktadır ve Rhizobium'un RopA ve RopB proteinleriyle bağlantılıdır. Bu iki protein familyası 26–23 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahiptir ve her grup iki boyutlu jellerde 5-8 arasında band oluşturabilir (Moreno ve Moriyon, 2006). Bu proteinleri kodladığı sanılan birçok gen, iki boyutlu

jelde bulunan verilerle Brucella genomunda tanımlanmıştır. omp3a, Brucella türlerinde yüksek derecede korunmuştur (Moreno ve Moriyon, 2006). Brucella türleri arasında bu genin homojenliği altı türün tip suşlarında genin sekans analiziyle doğrulanmıştır (Vizcaino ve ark., 2000). Sadece *B. ovis*'in omp3a geninin 3' ucunda 36 bp lik bir delesyon vardır ve bu delesyon bu türün omp3a proteininde antijenik bir kaymaya sebep olur. omp3a ve omp3b ailesi yapısal bir rol oynamasına rağmen, virulans üzerinde ilave bir fonksiyonları açıklanmamıştır. *B. abortus*'ta bunlar çok az bulunduğu için, dış membranda bunların ekspresyonun BvrR ve BvrS sistemi tarafından düzenlendiği görülmektedir (Moreno ve Moriyon, 2006).

Son yıllarda omp25 gen bölgesi üzerindeki çalışmalar *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. ovis*'in omp25 delesyon mutantlarının karakterizasyonu üzerine yoğunlaştırılmıştır. Çalışmalar omp25'in virulans bir faktör olduğunu ve böyle mutantların yeni attenué aşı suşu olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Omp25 geninden yoksun *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. ovis* mutantlarının farelerde meydana getirdiği enfeksiyon virulansının azaldığı gözlenmiştir. Üstelik omp25 geninden yoksun *B. melitensis* ile aşılınmış farelerdeki *B. melitensis* 16M virulansına karşı koruyuculuğun; günümüzde kullanılan attenué aşı suşu *B. melitensis* Rev1 ile aynı seviyede olduğu tespit edilmiştir (Cloeckart ve ark., 2002).



Şekil.2.1. *B. melitensis* Rev1 omp28 precursor proteinin 3D modeli (Anonim, 2012)

Omp31 geni; PCR-RFLP ve southern blot hibridizasyon (hindIII enzimiyle kesilen genomik DNA) yöntemleriyle araştırılmıştır. Southern blot hibridizasyon yöntemiyle omp31 geninin *B. abortus* dışındaki bütün Brucella türlerinde var olduğu tespit edilmiştir. Bütün *B. abortus* biovarlarının referans suşlarında; kromozom üzerinde omp31 geninin içinde bulunduğu polisakkarit senteziyle bağlantılı geniş bir gen kümesinde 25 kb'lık bir delesyonun varlığı nedeniyle bu gen bölgesinin bu türde olmadığı gözlenmiştir (Cloekaert ve Vizcaino, 2004). Omp31 geni; omp3a veya omp3b ile çok az homoloji gösterir. Omp31 LPS ile sıkı bir interaksiyon gösterir ve peptidoglikanla bağlantılıdır. Bu özellik bu proteinin yapısal rol oynadığını gösterir (Moreno ve Moriyon, 2006).

Omp31 geninin PCR-RFLP analizi *B. canis* ve *B. ovis* türleri için türe spesifik markırları meydana getirdi. İlave olarak, spesifik bir restriksiyon modeli *B. suis* biovar 2 için müşahade edildi. Anti-omp31 monoklonal antikorlarının kullanımıyla omp31'in *B. abortus* hariç, bütün Brucella türlerinde üretildiği gösterildi. Bütün Brucella türleri ve biovarlarının omp31 genleri son dönemlerde sekanslanmıştır. omp31 genleri Brucella cinsinde yüksek derecede korunmasına rağmen, *B. melitensis*'e nazaran, *B. ovis* geninde 9 nükleotid yerdeğişimi olduğu gösterilmiştir. Bu durum kodlanmış omp31 proteinleri arasında 7 aminoasit farklılığı ile sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda bu farklılığın omp31'in farklı antijenik yapı göstermesine neden olduğu tespit edildi. Antijenik farklılıklar Western blot testiyle kanıtlanmıştır (Cloekaert ve Vizcaino, 2004).

Omp31b, omp25b, omp25c, omp25d ve omp22 proteinleri hakkındaki bilgi azdır. Her bir Brucella türünde bu proteinlerin varlığının analizini özel olarak ifade eden hiçbir çalışma yapılmamasına rağmen, beş omp en azından tek bir Brucella türünde deneysel olarak gösterilmiştir. omp31b *B. abortus* ve *B. suis*'te; omp25b *B. melitensis* ve *B. suis*'te; omp25c *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*' te; omp22 *B. abortus*'ta tanımlanmıştır. Sadece omp25 geni defektli *B. suis* mutantında omp25 monoklonal antikorla (MAb) zayıf reaksiyona girerek tespit edildiği için, Brucella cinsinde omp25d' nin üretimi ile ilgili veri son derece azdır (Hernandez ve ark., 2007; Scott, 2007). Ancak Brucella cinsinde omp25/omp31 proteinini kodlayan gen

grubunun DNA polimorfizm ile ilgili yapılan araştırmalar *Brucella* türlerinin dış membranındaki beş proteinin oluşumu hakkında ilave bilgiler sağlamıştır (Scott, 2007).

Brucella hücrelerini kuşatan lipoproteinler; Omp19, Omp16.5 ve Omp10 olmak üzere 3 protein içerirler ki; bunların, bakteriyal lipoproteinlerin genetik nitelikli karakteristikleri olduğu ve palmitik asitide içine aldığı gösterilmiştir (Moreno ve Moriyon, 2006). Bunlar *Brucella* cinsindeki DNA polimorfizmini tespit etmek için kullanılmış ancak düşük polimorfizm tespit edilmiştir (southern blot yöntemiyle) (Cloeckert ve Vizcaino, 2004). Bu lipoproteinler diğer Gram (-) bakterilerin peptidoglikan bağlantılı lipoproteinlerine benzerdir ve α -2 Protobacteriae ailesinin diğer üyelerinin homolog proteinleri ile çapraz reaksiyon gösterir (Moreno ve Moriyon, 2006).

2.1.5. Moleküler yapısı

Brucella genomuyla ilgili ilk çalışmalar; %0,8 agaroz jel elektroforez ile genomik DNA'nın restriksiyon parçalarına ayrıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis* ve *B. ovis* DNA'ları HindIII enzimi ile kesildiğinde elde edilen farklı restriksiyon parçaları, konvansiyonel agaroz jel elektroforez tüm genomun restriksiyon haritasını göstermede tek başına yeterli ve güçlü bir metot olmadığı için PFGE (pulsed-field gel electrophoresis; düşük ayırım frekansına sahip restriksiyon enzimleri ile tüm DNA'nın kesilmesiyle elde edilen DNA parçalarını ayırmak için kullanılır) metodu kullanılarak ilk verilere ulaşılmıştır.

Yapılan bütün moleküler çalışmalar sonucunda; *B. melitensis* referans suşlarının, *B. abortus* biovarlarının, *B. suis* biovar 1'in, *B. ovis*'in, *B. canis*'in ve *B. neotomae*'nin yaklaşık 2,1 ve 1,15 Mb büyüklükte; *B. suis* biovar 2 referans suşlarının ve biovar 4'ün yaklaşık 1,85 ve 1,15 Mb büyüklükte 2 halkasal kromozom taşıdığı, *B. suis* biovar 3 referans suşunun yaklaşık 3.10 Mb büyüklüğünde tek bir halkasal kromozoma sahip olduğu, *Brucella* deniz suşlarının ise *B. abortus*

kromozomunun büyüklüğüne yakın 2 kromozoma sahip olduğu, tespit edilmiştir (Boschiroli ve ark. 2001; Cloeckaert ve Vizcaino, 2004; Moreno ve Moriyon, 2006).

Kromozom sayısı ve büyüklüğündeki belirtilen farklılıklar; *rrn* lokusundaki homolog rekombinasyondan veya insersiyon sekanslarından ileri gelen yeniden düzenlemelerle açıklanabildiği (Moreno ve Moriyon, 2006) gibi *Brucella* da 2 kromozom varlığının 3 rRNA operonu içeren kromozomal bölgelerde yeni düzenlemelerden kaynaklanabileceği (Lopez-Goni ve Moriyon, 2004) belirtilmiştir. İki kromozom da birbirlerinden farklıdır ve bakterinin hayatta kalması için önemli olan genleri içermektedir. Büyük kromozom olan ChrI'in replikasyon orjini bakteri kromozomunda türe özgüdür. Ancak küçük olan ChrII'de plazmit gibi davranır. Önemli genlerin çoğu ChrI de lokalize olmuştur. Her iki kromozomunda GC içeriği yaklaşık birbirine benzerdir (Halling ve ark., 2005). 2 rRNA operonu büyük kromozomda lokalize olmuşken, diğeri küçük olanda yer almaktadır. Bakteri fizyolojisi için önemli olan *dnaK* ve *groE* genleri sırasıyla büyük ve küçük kromozomların her ikisinde de lokalize olmuştur (Cloeckaert ve Vizcaino, 2004).

Brucella cinsinin Proteobacteria sınıfının α -2 alt grubu üyeleriyle yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. İlginçtir ki, bir kromozomdan daha fazla kromozom içeren bakterilerin çoğu, hayvan veya bitki ökaryotik hücrelerle yakından bağlantılı yaşayan birçok organizma α -2 alt sınıfına aittir. Ancak kompleks genomik organizasyona sahip olma ve ortak filogeni arasındaki mevcut ilişki imkansız olarak düşünülmektedir, çünkü bu genom düzeni aynı cinsin bütün üyeleri tarafından genellikle paylaşılmamaktadır (Moreno ve Moriyon, 2006).

B. melitensis genomik sekans sonuçları, *B. abortus* üzerinde sürdürülen araştırmalar ve *B. suis*'in genomik sekansının belirlenmiş olması bizlere değerlendirmek için çok sayıda genetik detay sağlamıştır (Moreno and Moriyon 2006). Karşılaştırmalı analizler her iki genomunda birbirine çok benzer olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda her iki türün genomlarının bitki patojenleri, hayvan patojenleri ve simbiyontlarla birçok benzerliğe sahip olduğunu göstermiştir (Halling ve ark., 2005). 2,1 ve 1,15 Mb kromozom taşıyan türler için fiziksel haritalar; 1 veya

32 kb'lık küçük insersiyon ve delesyonlar nedeniyle oluşan farklılıklara rağmen yüksek derecede korunmuş restriksiyon bölgelerini ve türe 26 spesifik restriksiyon bandlarını hesaba katarak oluşturulmuştur (Moreno ve Moriyon, 2006).

2.1.6. *Brucella* sınıflandırılması

Uluslararası sistemik bakteriyoloji komitesi *Brucella* taksonomisi altkomitesi tarafından yapılan son güncellemede *Brucella* cinsi içerisinde 10 farklı tür bildirilmiştir (Anonim, 2010). Bunlardan *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae* karada yaşayan hayvanlarda enfeksiyon oluşturan klasik *Brucella* türleridir (Scholz, 2008; Verger, 1987). Bunlardan *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* insanlar için patojendir. Ayrıca *B. canis* ve deniz memelilerinden elde edilen türlerin de insanlarda hastalık oluşturabileceği bildirilmiştir (Brower, 2007; Sohn, 2003).

2.2. Brusellozis

2.2.1. Brusellozisin tarihçesi

Bu hastalık ilk kez Malta Adası'nda saptandığından, Malta Humması, Akdeniz Humması ya da Gibraltar Humması; tipik ateş traşesi nedeni ile Dalgalı Humma (Undulant Fever =Ondülan Ateş); koyunlardan insanlara bulaşması nedeni ile de halk arasında koyun hastalığı veya mal hastalığı gibi isimlerle anılır (Dizer 2004; Taşçı 2004). Dünyanın birçok bölgesinde çiftlik hayvanlarında ekonomik kayıplara sebep olan ve geniş yayılım gösteren brusellozis hastalığında WHO verilerine göre her yıl yarım milyon yeni vaka ile karşılaşmakta ve bu sayı giderek artmaktadır (Baddour ve Alkhalifa, 2007). Bir bölgede *Brucella*'nın varlığı hakkında elde edilecek bilgi, hastalığın epidemiyolojisi, tanısı, engellenmesi ve tedavisi açısından önemlidir (Salehi, 2006).

2.2.2. Brusellozisin genel özellikleri

Brucella türlerinin sebep olduğu bakteriyal bir hastalık olan brusellozis; birçok organı etkileyen, spesifik olmayan klinik semptomlarla insanlarda ve yavru kayıplarıyla hayvanlarda hastalığa sebep olan ve bütün dünyada yeniden ortaya çıkan önemli bir zoonozdur (Ames, 2007; Baddour ve Alkhalifa, 2007). *Brucella* türleri retikuloendoteliyal sistemin fakültatif intracellülar parazitidir. Özellikle mononükleer fagosit hücrelerin içinde intracellülar replikasyona uyum sağlamıştır (Elfaki ve ark., 2005).

Tüm hayvan türlerinde ana semptom düşük ya da fetüsün prematüre atılımıdır. Plasenta iltihabı, epididimis, testis iltihabı en yaygın sonuçlarıdır, diğer sendromlarda rapor edilmesine rağmen, en önemli etki ekonomiktir, ölümler fetus ve yeni doğanlar dışında nadirdir (Dizer, 2004; Cloeckert ve Vizcaino 2004; Ames, 2007). Özellikle *B. abortus* ve *B. melitensis* enfeksiyonlarının en fazla izlediği rota orofarinks, üst solunum yolları ve konjektivanın mukoz membranları boyunca yayılımıdır. Enfeksiyonun diğer muhtemel rotası dişi veya erkek genital bölge mukoz membranları aracılığıyla'dır. Bakteri, vücudun savunma sistemine galip geldiğinde,

bakteriyemi tablosu oluşur. Bu tablo 10- 20 gün sonra gözlenebilir ve 30 – 60 gün arasında sürer.

İnsanlarda brusellozise *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* biovar 1-4 ve nadiren, *B. canis* veya deniz memeli *Brucella* türleri sebep olabilir (Ayaz, 2005; Cutler, 2006; Ames, 2007; Imaoka ve ark., 2007). Vücuda giriş; mukoz membranlar, açık yaralı veya yarasız deri ile temas veya sindirim yoluyla meydana gelir (Dizer, 2004; Ames, 2007). İnsanlarda brusellozis multisistemik bir hastalıktır ve semptomları son derece geniş yayılım gösterir. Mikroorganizma ağız yoluyla alındıktan sonra sindirim sisteminde absorbe edilir ve kana geçer. Oradan lenfatik sisteme ve dalağa ulaşır. Brusellozis; ateş, baş ağrısı, malazya, sırt ağrısı, miyalji ve genel tüm vücudun ağrısı, geceleri aşırı terleme ile başlar. Bazen splenomegali, hepatomegali, öksürük ve göğüs ağrısı görülür. Gastrointestinal sistem belirtileri; anoreksiya, mide bulantısı, kusma, diyare ve kabızlık.

Birçok hastada semptomlar 2-4 hafta sürer ve spontan iyileşme bunu takip eder. Aralıklı ateş ve diğer dirençli semptomlar 2-14 günde tedrici olarak azalır ve son bulur. Birçok hastada bütünüyle iyileşme 3-12 ayda gerçekleşir. Başlangıç semptomlar görüldükten sonra hasta tedavi edilmezse prognoz kötüye gider. En yaygın semptomlar; artrit, spondilit, epididimo-orşitis ve kronik yorgunluktur. Norölojik semptomlar vakaların %5'inde görülmektedir. Bunlar; menenjit, ensefalit ve periferik nöropati, mental depresyondur. Endokardit en ciddi komplikasyonlardan biridir ve sıklıkla fetal vakalarda ölümün sebebidir. Birçok diğer doku ve organda enfeksiyondan etkilenir; nefritis, dermatitis, vaskulitis, lenfoadenopati, derin ven trombozu, granulomatoz hepatit, kolesistit, osteomyelit, anemi, lökopeni ve trombositopeni. Ayrıca brusellozis aynı zamanda kronikleşebilir, semptomlar aylarca veya yıllarca yineleyebilir (Ayaz, 2005; Cutler, 2006; Ames, 2007).

2.2.3. Epidemiyoloji

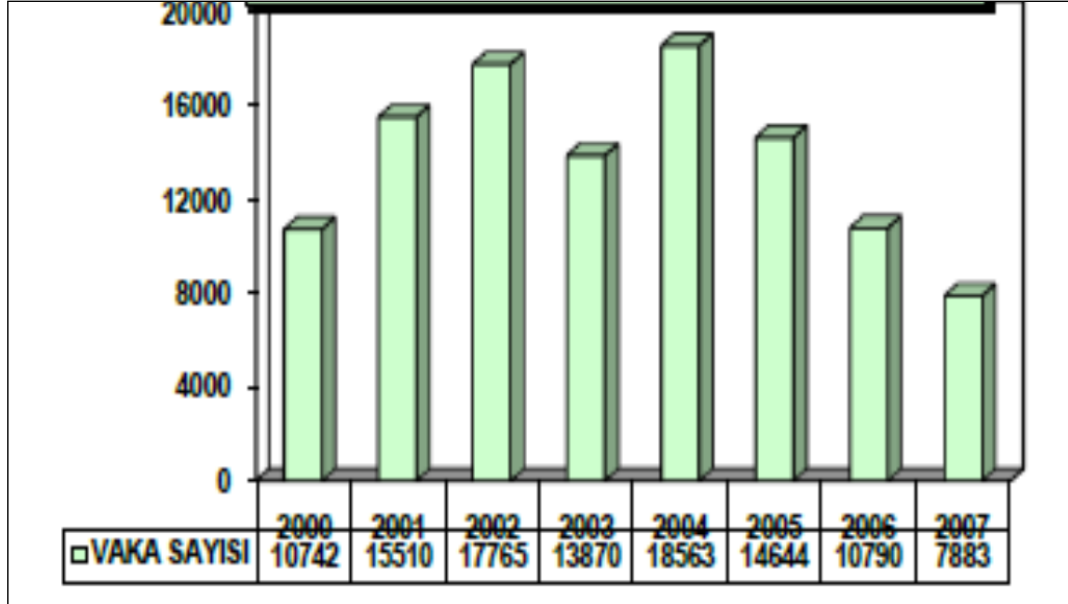
Brucella türlerinin coğrafik dağılımı farklıdır. Küresel varyasyon; U.K, U.S.A. ve Avustralya da popülasyonun $<1/100.000$, Yunanistan ve İspanya gibi Güney Avrupa ülkelerinde $20-30/100.000$, Kuveyt, Suudi Arabistan gibi Orta Doğu ülkelerinde $>70/100.000$ insidansı arasında olmaktadır (Baddour ve Alkhalifa, 2007).

B. melitensis: Özellikle kuzey ve doğu kıyıları olmak üzere Akdenizde yaygındır. Orta Doğu, Orta Asya, Arabistan Körfezi ve Orta Amerikanın bazı ülkelerinde de görülmektedir. Bu mikroorganizma Afrika ve Hindistan'dan da rapor edilmiştir, fakat Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Asya, Avustralya ve Yeni Zelanda da gözlenmemektedir (Garrido-Abellan ve ark., 2001; Garin-Bastuji ve ark., 2006; Ames, 2007).

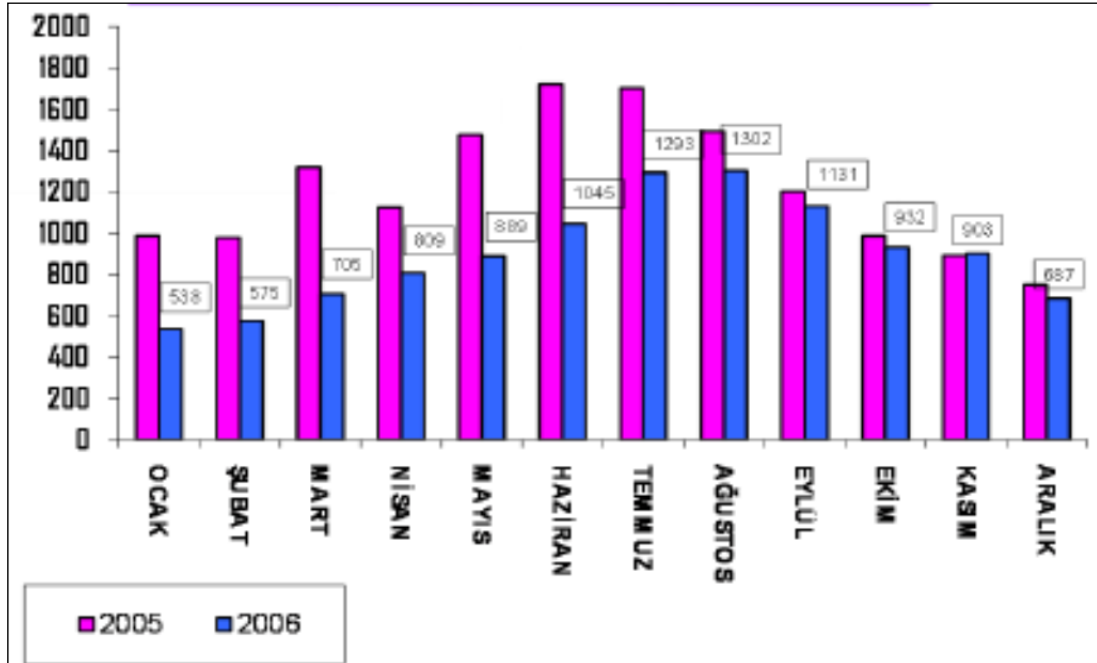
B. melitensis'in mevcut 3 biyotipinden; biyotip 1; Latin Amerika, İspanya, Portekiz ve Malta'da en yaygın olarak görülen biyotiptir, Libya, Umman ve İsrail'de de rapor edilmiştir. (Garrido-Abellan ve ark., 2001; Erdenliğ, 2003; Baddour ve Alkhalifa, 2007). Biyotip 2; Türkiye ve Suudi Arabistan'da görülmekle birlikte İtalya ve Yunanistan'da en yaygın biyotiptir. Biyotip 3; Mısır, Ürdün, Türkiye, Tunus ve İsrail de hayvanlardan en sık izole edilen *Brucella* türüdür. Ancak sıklıkla Fransa ve Kuzey Afrika'da görülmektedir (Garrido-Abellan ve ark., 2001; Erdenliğ, 2003; Baddour ve Alkhalifa, 2007). Bununla birlikte Akdeniz ülkeleri ve Orta Doğu'da da rapor edilmiştir (Baddour ve Alkhalifa, 2007). Ancak bazen biovar 2 den farklılıkları net olarak tespit edilemediğinden biovar 3'ün tanımlanması zor olmaktadır.

Ülkemizde ise hayvanlarda oldukça yaygın bir enfeksiyon hastalığı olan bruselloza, hayvancılık yapılan bölgelerde ve yakın teması olan insanlarda sık rastlanmaktadır. Ülkemizde yılda yaklaşık 10.000 bruselloz vakası görüldüğü ve vakaların genellikle İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yayılış gösterdiği tespit edilmiştir (Yılmaz, 2007). Ancak, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1970-80 yılları arasında 909 olarak bildirilen vaka sayısı, sadece 2003 yılında 13.870'e ulaşmıştır. Vakalarda görülen bu artışın, gerçek artıştan çok bildirim ve tanı koyma oranlarındaki artıştan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Ayaz, 2005). Bu

konuyla ilgili olmak üzere (Taşçı, 2004); bildirim zorunlu bir hastalık olmasına rağmen, her yıl resmi kayıtlarda görülen enfeksiyon sayısının gerçeği yansıtmadığını ve oranın rapor edilen kayıtlardan 10 ile 25 kez daha yüksek olduğunu ifade etmiştir. Ülkemizde bruselloz sıklığı 1990 yılından sonra artmıştır.

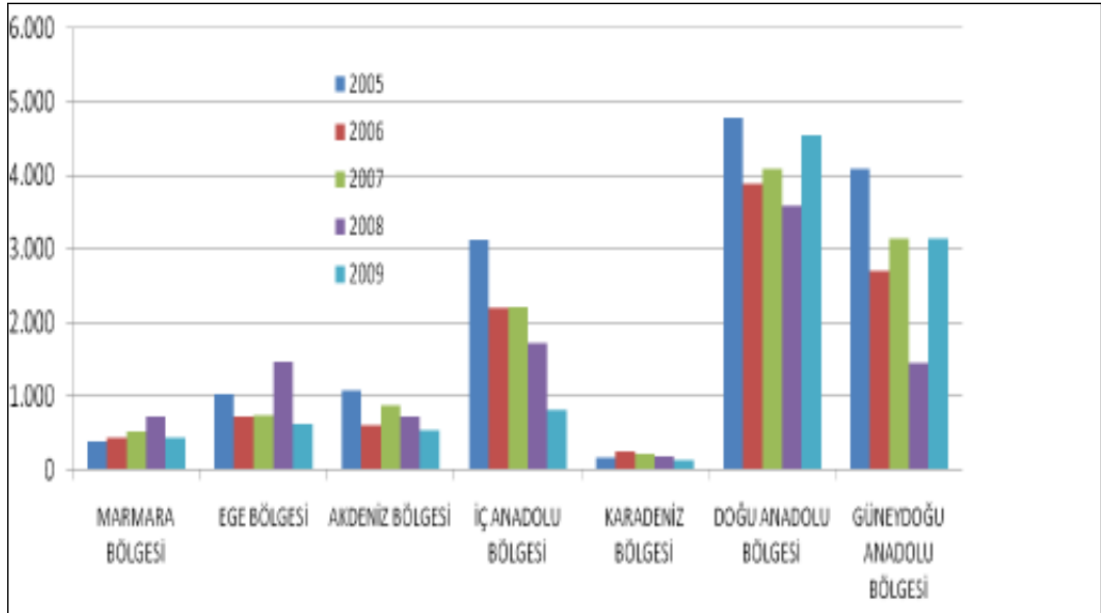


Şekil 2.2. Bruselloz vakalarının yıllara göre dağılımı (Yılmaz, 2007)



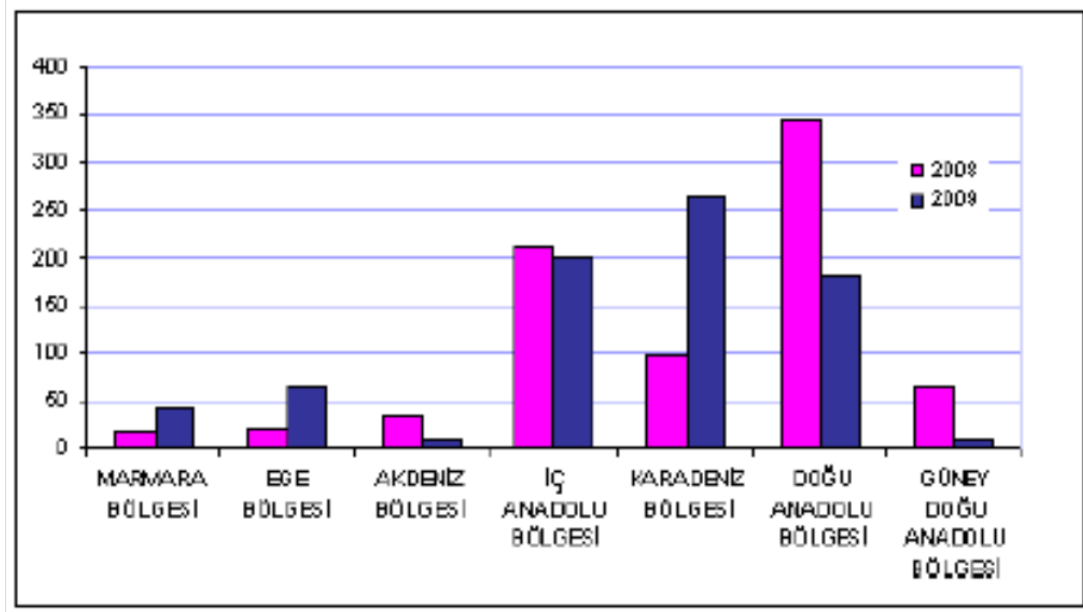
Şekil 2.3. Bruselloz vakalarının aylara göre dağılımı (Yılmaz, 2007)

Hastalık en sık Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %49,2, Doğu Anadolu Bölgesi'nde %21,7, İç Anadolu Bölgesi'nde % 19,9, Ege Bölgesi'nde %5 görülürken, bildirilen olguların sadece %0,1'i Karadeniz Bölgesi'nde görülmüştür (Ayaz 2005). Ayrıca Sağlık Bakanlığı verilerinden elde edilen 2005-2006-2007-2008-2009 yıllarına ait insan brusellozis vaka sayısını gösteren şekil incelendiğinde Doğu ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinin, ülkemizde brusellozis insidansının en yüksek olduğu bölgeler olduğu görülmektedir (Arasoğlu, 2010). Sağlık Bakanlığı'na 2003 yılında Giresun, Kastamonu, Ordu, Rize, Sinop ve Düzce illerinden bruselloz vakası bildirilmemiştir (Ayaz 2005).



Şekil 2. 4. Bölge bazında yıllara göre toplam insan brusellozis vaka sayısı (Arasoğlu, 2010)

Ülkemizde hayvan brusellozis prevalansı ise, inek popülasyonunda %1.43, koyun popülasyonunda %1.97 olarak tespit edilmiştir. Özellikle insanlar için halk sağlığı yönünden en patojenik tür ülkemizde *B. melitensis*'dir. Kırsal kesimlerde daha çok *B. melitensis* infeksiyonu görülürken, büyük şehirlerde daha çok *B. abortus* infeksiyonuna rastlanmaktadır. Ülkemizde *B. suis* ve *B. canis* türüne ait infeksiyon bildirilmemiştir (Ayaz, 2005). Tarım Bakanlığı verilerinden alınan 2008-2009 yıllarındaki inek brusellozis vaka sayıları incelendiğinde Doğu Anadolu, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgelerinde insidansın daha yüksek olduğu gözlenmektedir (Arasoğlu, 2010).



Şekil 2.5. Bölge bazında yıllara göre toplam inek brusellozis vaka sayısı (Arasoğlu, 2010)

2.2.4. Yayılım koşulları

Enfeksiyonun hayvanlar arasındaki yayılımı direkt veya indirekt yollarla gerçekleşir. Hayvanlar; enfekte aerosollerle direkt, enfekte materyallerin alınımıyla indirekt olarak enfekte olurlar. Enfekte hayvanlarla enfekte olmayan hayvanların birlikte aynı merada otlaması veya otlama sırasında kontamine edilen materyallerle teması yayılda önemlidir (Garrido-Abellan ve ark., 2001; Ames, 2007).

Konakçı olan memeli hayvanlar dışında *Brucella*'nın dış ortamda yaşaması, uygun şartlar altında spor oluşturmayan patojenik bakterilerle kıyaslandığında oldukça yüksektir. Sayısız araştırma ile *Brucella*'nın yaşadığı çevresel şartlar ve etkileri değerlendirilmiştir (Garrido-Abellan ve ark., 2001). PH, sıcaklık ve ışık şartlarında gerekli uygunluk sağlandığında (örneğin; pH>4, yüksek nem, düşük sıcaklık, indirekt güneş ışığı) *Brucella*'nın su, düşürülmüş fetus, fetal membranlar, feçes ve sıvı akıntılar, yün, saman (kuru ot), binalar/ ekipmanlar ve elbiseler üzerinde birkaç ay yaşayabildiği tespit edilmiştir. *Brucella* özellikle kuruluğa karşı çok dayanıklıdır, özellikle de ortamda organik materyal mevcut ise toprakta veya tozda uzun süre yaşayabilir. Yaşam süresi düşük sıcaklıklarda özellikle 0°C'de uzun sürelidir (Garrido-Abellan ve ark., 2001; Ames, 2007).

Süt ve süt ürünlerinde *Brucella* yaşam süresi, ürünün tip ve kullanım tarihi, nem seviyesi, sıcaklık, pH değişimleri, depolama şartları ve var olan diğer bakterilerin biyolojik aktivasyonunu içine alan çeşitli faktörlerle bağlantılıdır. Bakteri ısıya karşı oldukça duyarlı olduğundan pastörizasyon ve uzun süreli kaynatma ile kolaylıkla inaktive edilebilir (Garrido-Abellan ve ark., 2001). *Brucella*, pişirme ile fermente edilen peynirlerde de uzun süre yaşayamaz. Güvenirliliği sağlamak için gerekli olan fermentasyon zamanı bilinmemekte, fakat 3 ay kadar olduğu tahmin edilmektedir. Ancak asitlendirilmiş peynirlerde, laktik asit, kısa süreli fermentasyon ve kuruluk *Brucella*'nın yaşam süresini artırır. Süt veya kremanın önceden pastörizasyonu bu ürünlerde güvenirliliği sağlamak için gereklidir (Garrido-Abellan ve ark., 2001). Süt ürünlerinin aksine, et ürünlerinde *Brucella*'nın yaşam süresi oldukça kısadır. Kasların her gramındaki mikroorganizma sayısı azdır ve pH'nın düşürülmesiyle kolaylıkla azaltılacaktır (Garrido-Abellan ve ark., 2001).

Çizelge 2.1. Brucella ve çevre koşulları (Garrido-Abellan ve ark., 2001)

Ortam	Şartlar	Yaşam süresi
Direkt gün ışığı	< 31°C	4 saat
Su	-4 °C	4 ay
Su (laboratuar)	20 °C	2,5 ay
Su (göl)	37 °C pH=7,2	< 24 saat
	8 °C pH= 6,5	> 2 ay
Toprak	Laboratuvarda kurutulmuş	< 4 gün
	18 °C'de kurutulmuş	69-72 gün
	Islak	< 7 gün
	Nemli hava	> 2 ay
İdrar	37 °C, pH= 8,5	16 saat
	8 °C, pH=6,5	6 gün
Kesilmiş süt suyu	17-24 °C	< 5 gün
	5 °C	> 6 gün
Gübre	Yaz	24 saat
	25 °C	1 ay
	Kış	2ay
	8 °C	1 yıl
	-3 °C	3 ay
Yün	Eşya deposu	4 ay
Saman		Birkaç gün- ay
Sokak tozu		3-44 gün
Çayır/otlak	Gün ışığı	< 5 gün
	Gölge	> 6 gün

Çizelge 2.2. Bazı gıda maddelerinde Brucella'nın yaşam süresi (Garrido-Abellan ve ark., 2001)

Ürün	Brucella türleri	Sıcaklık (°C)	pH	Yaşam süresi
Süt	<i>B. abortus</i>	71.1	-	5-15 saniye
	<i>B. abortus</i>	38	4.00	<9 saat
	<i>B. abortus</i>	25-37	-	24 saat
	<i>B. abortus</i>	0	-	18 ay
Krema	<i>B. abortus</i>	4	-	6 hafta
	<i>B. melitensis</i>	4	-	4 hafta
Dondurma	<i>B. abortus</i>	0	-	30 gün
Yağ	<i>B. abortus</i>	8	-	142 gün
Peynir	<i>B. abortus</i>	-	-	6-57 gün
Beyaz peynir	<i>B. melitensis</i>	-	-	15-100 gün
Rokfort	<i>B. melitensis</i>	-	-	4-16 gün
Çedar	<i>B. melitensis</i>	-	-	20-60 gün
Peynir suyu	<i>B. abortus</i>	-	-	6 ay
	<i>B. abortus</i>	17-24	4.3-5.9	< 4 gün
	<i>B. abortus</i>	5	5.4-5.9	> 6 gün
	<i>B. abortus</i>			

2.2.5. Brucella'nın insanlara geçişi

İnsanlar genellikle gastrointestinal sistemde yaşayan mikroorganizmalarla, mukoz membran veya üzerinde açık yarası bulunan derinin enfekte materyalle kontaminasyonu ile enfekte olur. Brucella aerosollerle de yayılış gösterebilir (Rijpens ve ark., 1996; Dizer, 2004; Elfaki ve ark., 2005; Cutler, 2006; Ames, 2007). İnhalasyonla bulaşma genellikle çobanlar, hayvan bakıcıları, çiftçiler ve çiftlikte çalışanlar, kasaplar, mezbaha işçileri, et işleyen fabrikalarda çalışanlar, veteriner hekimler ve yardımcıları, teknisyenler, laboratuvar çalışanlarında görüldüğü için hastalık mesleki bir tehlike niteliği taşımaktadır (Taşçı, 2004). İnsanlar için enfeksiyonun ana kaynakları;

- Düşük fetusla temas
- İnfekte hayvan dokuları, kanı veya lenfasının, bütünlüğü bozulmuş deri, mukoz membranlar veya konjektivaya direkt teması,
- Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi,

- Pişirilmemiş et tüketimi,
- Laboratuvar kültürleri veya doku örnekleri ile temas,
- Kazara canlı Brucella aşılıları ile enjeksiyon.

İnsandan insana transmisyon nadirdir ancak kan transfüzyonu, kemik iliği transplantasyonu veya seksüel birleşme ile geçiş rapor edilmiştir (Şekil 2.7) (Rijpens ve ark. 1996; Dizer, 2004; Cutler, 2006; Ames, 2007; Baddour ve Alkhalifa, 2007). Ülkemizde insanlara en çok bulaşma, çiğ süttten yapılan peynir ve krema yağlarla olur. Kırsal kesimde sütler pastörize edilmemektedir. Akdeniz Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada; yöre halkının brusellozun bulaşma yollarını bilmesine rağmen halen pastörize edilmeden üretilen süt ve süt ürünlerinin tüketiminin önlenemediği saptanmıştır. Sürekli eğitimler ile bu sorunun giderilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Yapılan 280 serilik bir çalışmada da olguların % 40'ı bulaşma yolunu bilmesine karşın yine de süt ürünlerinin kaynatılmadan tüketimi alışkanlığından vazgeçemediklerini belirtmişlerdir (Ayaz, 2005).

Yoğurt yapım teknolojisinde, sütün kaynatılması ve yoğurt mayasının sütü asitlendirmesi sebebiyle, yoğurt tüketimine bağlı bulaşma olmadığı; infekte hayvan dışkısının gübre olarak kullanılmasına bağlı olarak, sebzelerin kontamine olup bulaşmada rol oynayabileceği bildirilmiştir. Kasaplık hayvan etleri Brucella içerirserde, olası az sayıdaki etkenin uygulanan ısı işlemi ile inaktivasyonuna bağlı olarak, Brucella enfeksiyonu oluşum riskinin az olduğu bildirilmektedir. Sütün mutlaka pastörize edilerek tüketildiği yerlerde, doğrudan temas ile bulaşma ağız yoluyla alınımından daha ön plandadır (Dizer, 2004; Taşçı, 2004).

Değişik zamanlarda bildirilen bruselloz olgularında en fazla görülen enfeksiyon kaynakları; hayvancılık, mesleki temas (%28-90) ve çiğ süt ve süt ürünlerinin kullanımıdır (%30-72). Toplumun değişik kesimlerinden yapılmış olan seroepidemiolojik çalışmalarda kasaplar, besiciler, mezbaha ve mandıra çalışanları gibi riskli kesimlerde %8,6-25, risk grubunda olmayanlarda %2,8 oranında seropozitiflik saptandığı bildirilmiştir (Ayaz, 2005). Ülkemizde çeşitli tarihlerde yapılan bruselloz seropozitiflik oranı ise %2-6 olarak belirlenmiştir (Yılmaz, 2007).

2.2.6. Brucella tanısında kullanılan testler

2.2.6.1. Mikrobiyolojik testler

Altın standart olarak kabul edilen tanı yöntemleridir. Bakteriyojik karakterizasyonu takiben konukçu doku, süt veya vaginal akıntılardan alınan şüpheli bakteri kolonilerinin izolasyonudur (Bricker, 2002; O'Leary ve ark., 2006; Bounaadja ve ark., 2009). Analiz edilen çok sayıda fenotipik özellik göz önüne alınarak, Brucella organizmaları; cins, tür, alttür bazen suş özelliklerde aşı suşları olarak tanımlanmaktadır (Bricker, 2002). Fakat bu süreç birçok güçlüğe sahiptir;

- Proses uzun bir süre almaktadır (yaklaşık 2 hafta).
- Testler komplekstir ve oldukça yetenekli personel tarafından yetkilendirilmiş laboratuvarlarda uygulanma zorunluluğu bulunmaktadır.
- Birçok Brucella türü; test sırasında enfeksiyon ajanı elle manipüle eden laboratuvar personeli için oldukça zararlıdır (Elfaki ve ark., 2005; İlhan ve ark., 2008; Bounaadja ve ark., 2009).
- Sonuçlar kesin değildir. Özellikle bazı türler ve biovarlar arasındaki küçük farklılıklar ve incelenen çok sayıdaki karakterden dolayı, ayrıca küçük mutasyonların varlığı uygun olmayan sonuçları beraberinde getirdiği için sonuçları yorumlamak güçleşmektedir (Leal-Klezevas ve ark., 1995; Bricker, 2002; Ancora ve ark., 2005).
- Bazen diğer testler pozitif olmasına karşın kültürler bu sonucu desteklememektedir (Romero ve ark., 1995).

Mikroskopik Direkt Tanı: Ziehl-Neelsen metodunun Stamp's modifikasyonu yöntemi mikroskopik tanı için kullanılır. Mikroorganizmalar; düşük ürünleri, vajinal akıntılar, süt ve çeşitli dokulardan elde edilebilir. Brucella türleri asit faz değildir, ancak zayıf asitle dekolorizasyona karşı dirençlidir ve mavi zeminde kırmızı leke bırakır (Garin-Bastuji ve ark., 2006; Kılıç, 2007). Gram ve Stemp boyama metodlarından da Brucella etkenlerini tanımada yararlanır (Güllüce, 1993). Süt ve süt ürünlerinde çok az sayıda mikroorganizma olduğu için direkt tanı ile tespiti çok

güçtür. Ayrıca ayırt edici veya immünohistokimyasal boyama ile direkt mikroskopik incelemenin duyarlılığı çok düşüktür (Ames, 2007; Kılıç, 2007).

Kültür Yöntemi: Bu yöntemde *Brucella* türleri çeşitli dokulardan, sekresyonlardan, özellikle fetal membranlardan, vajinal sekresyonlardan, süt, artrit akıntıları, lenf nodülleri, meme bezi, düşük fetüslerin mide içeriği, dalak ve akciğerinden elde edilebilir (Ames, 2007). Özellikle kan kültürü yöntem protokülünün standardize edilmiş olması, diğer örnekler göre daha kolay alınması, tekrar edilebilirliğinin yüksek olması ve günümüzde otomatize kan kültür sistemlerinin varlığı nedeniyle en çok kullanılan yöntemdir (Kılıç, 2007). *Brucella* türleri; zenginleştirilmiş, seçici (Farrell ve modifiye edilmiş Thayer-Martin besiyerleri, BCYE: Buffered charcoal-yeast extract medium, BCYE-PAC: Polimiksin, anizomisin ve Sefamandol içeren BCYE) veya özel ticari besiyerlerinden izole edilebilir (Garin-Bastuji ve ark., 2006; Ames, 2007). Yine bu teknikte de örneklerdeki *Brucella* miktarı çok düşükse tespit zor olmaktadır. Leal-Klezevas ve ark., (2000), bu yöntemle kan ve süt örneklerinden bakterinin geliştirilmesinin hassas olmadığını rapor etmiştir (Arasoğlu, 2010)

2.2.6.2. Serolojik testler

Hızlı, duyarlı ve uygulaması kolay olan bu testlerin;

- Diğer bakterilerle (*Yersinia enterocolitica* O:9 gibi bakterilerle O zincirlerinin antijenik yapısı benzer olduğu için) çapraz reaksiyon göstermeleri,
- Özellikle brusellozisin endemik olduğu yerlerde yaşayan insanlarda oldukça sık zayıf serolojik cevap vermeleri,
- Aşılanmış hayvanlarda yanlış pozitif sonuçlara sebep olmaları,
- Kronik hastalıklar ve relaps gelişiminde tanı da yetersiz olmaları sebeplerinden dolayı duyarlı ve spesifik olmadığı bilinmektedir (Leal Klezevas ve ark., 1995; Hemmen ve ark., 1995; Hamdy ve Amin, 2002; Navarro ve ark., 2002; Rupesh, 2003; Garin-Bastuji ve ark., 2006; O'Leary,

2006; Ames, 2007; Baddour ve Alkhalifa, 2007; İlhan, 2008; Bounaadja ve ark., 2009).

Standart Tüp Aglutinasyon Testi/Tüp Aglutinasyon Testi (STA): İlk kez Wright ve Smith tarafından 1897 yılında ortaya çıkarılmıştır. Dilüe edilmiş hasta serumu ve *Brucella* antijeninin bir tüpte bir araya getirilmesi, 37°C’de bir gece bekledikten sonra aglutinasyonun gözlenmesi esasına dayanır (Rupesh, 2003). *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* türlerine karşı gelişen antikorları (IgG ve IgM antikorlarını) eşit şekilde saptayabilirken, *B. canis* saptanamaz (Kılıç, 2007). Avantajları arasında; genellikle ilk pozitifleşen basit bir test olması, veri fazlalığı, akut brusellozda yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermesi, doğru, tekrarlanabilir ve güvenilir olması sayılabilir. Ancak zaman alıcı olması, saha çalışmalarına uygun olmaması, hastalık evresinin saptanamaması, uzun süre yüksek titrede antikor varlığı, çapraz reaksiyonların varlığı (özellikle *Y. enterocolitica* O:9), yalancı negatiflik bu tekniğin önemli dezavantajlarıdır (Kılıç, 2007). Hastalığın erken dönemlerinde, özellikle yüksek titreli serumlarda prozon ve blokan antikorlar nedeniyle testte negatif sonuçlar elde edilebildiğinden; STA’da şüpheli titre veren serumlar RBT, CFT ve diğer serolojik testlerle desteklenmelidir (Güllüce, 1993).

Rose Bengal Test (RBT): Pietz tarafından ineklerde bruselloz taraması için geliştirilen “asit plate aglutinasyon testinin” bir modifikasyonudur. RBT testi, antijen olarak laktat bufferda tamponlanmış (pH=3.65±0.05) ve Rose-Bengal ile boyanmış *B. abortus* S99 (veya S-1119-3) suşunun (%8 bakteriyel süspansiyon olarak) kullanıldığı hızlı aglutinasyon testidir. Diğer hızlı aglutinasyon testlerinden en önemli farklılığı düşük pH’da (pH=3.65±0.05) tamponlanmış antijenin kullanılmasıdır. Hasta serumu ile boyalı *Brucella* antijeni bir tüpte bir araya getirilerek var olan aglutinasyon gözlenir. RBP testi, *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. Suis*’in LPS antijenine karşı gelişen esas olarak IgG ve kısmen de IgM antikorlarını saptamaktadır (Güllüce, 1993; Kılıç, 2007). Aktif brusellozlu olgularda; duyarlılık: % 96-100 ve özgüllük ise % 91-100, kronik bruselloz da ise duyarlılık düşüktür (% 33-50). Pozitif sonuçlar STA veya ELISA ile doğrulanmalıdır ve benzer antijenik yapı nedeniyle yalancı pozitif reaksiyonlar sıklıkla gözlenir. Ancak enfeksiyonun ilk

evrelerinde RPT tanı için uygun bir test değildir. Akut enfeksiyonda RBT ve STA birlikte kullanımı en yüksek tanı performansını sağlamaktadır. Ancak, özellikle kronik bruselloz, re-enfeksiyon, relaps ve hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerdeki serolojik taramalarda bu testlerin sonuçlarının yorumlanmasında sıklıkla sorunlar yaşanmaktadır (Kılıç, 2007).

Coombs testi (CT) anti-human aglütinasyon test (AHG): Brusellozda aglütinasyon vermeyen blokan antikorların antihuman immünglobulin (AHG) kullanılarak aglütinasyon reaksiyonuna katılmasını sağlayan indirekt antihuman globulin test (Coombs Testi) yöntemidir. Aglütinasyon, insana karşı geliştirilmiş (anti-human gamaglobulin) “coombs reajeni” eklenerek indüklenbilir. Yüksek hızda uygulanan santrifüleme mekanik olarak blokan antikorlarının aglütinasyonunu provoke eder. CT özellikle bruselloz şüpheli olguların STA sonuçlarının negatif olduğu veya düşük antikor titrelerinin saptandığı durumlarda (fokal, lokalize veya kronik) oldukça yararlı bir yöntemdir (Kılıç 2007). Bu tür tanısal sorunlar genellikle kronik bruselloz olgularında gözlenmektedir. Uygulamada STA'dan sonra aglütinasyon olmayan tüpler santrifüjenip 3 kez yıkanır ve üst sıvısı atılarak dip kısmı kullanılır. Üzerine sulandırılmış Anti-IgG (coombs) serumu konur (Kılıç 2007). Yalancı negatiflik oranı % 6-7 olan zaman alıcı (sentrifügasyon ve yıkama işlemi) ve subjektif değerlendirme yapılarak sonuçlandırılan bir test olması dezavantajlarıdır (Kılıç 2007).

Immunocapture Aglütinasyon (Brucella Capt): Hem *Brucella* aglütininlerini hem de aglütinasyon vermeyen IgG ve IgA antikorlarını tek aşamada saptayabilen immün yakalama tekniğine dayanan bir testtir. Anti-human immunoglobulin ile kaplı kuyucuklara serum eklenir ve sonrasında *B. melitensis* antijeninin eklenmesinden 24 saat sonra değerlendirilme yapılır. Bu yöntemle IgG ve IgA antikorları saptanmaktadır.

Immunochromatography Lateral Flow-Dipstick: Immunochromatographic *Brucella*-Specific Immunoglobulin M ve G Lateral Flow Testi, ELISA testinin basitleştirilmiş bir versiyonudur. *Brucella*'ya spesifik olarak LPS (lipopolisakkarit)

içeren nitroselüloz bir strip (bu strip üzerinde reagent bölgesi veya emici bölge mevcuttur, numune bu kısma uygulanır) plastik bir stick içerisine yerleştirilmiştir. Emici bölge; kurutulmuş ve stabilize kolloidal gold immun konjugat içerir. Kolloidal gold konjugat anti-human IgM, IgM flow testinde deteksiyon ajanı olarak kullanılırken; kolloidal gold konjugat anti-human IgG, IgG flow testinde deteksiyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Numune uygulandıktan 10-15 dk. sonra stickin test penceresindeki kontrol ve antijen hatlarının boyanmasına göre değerlendirme yapılır. Kontrol hattı bütün uygulamalarda gözlenmelidir ancak numune eğer pozitifse antijen hattında renklenme gözlenir (Smits ve ark., 2003). IgM Dipstick Testinde, kullanılan sticklere antijen olarak *B. abortus* S-1119-2 LPS kodlanmıştır ve hasta serumları bunlar üzerine uygulanır. Kontrol sticklerinde tek band gözlenirken, bruselloz hastalarında iki band gözlenir. Duyarlılık ve özgüllük ilk iki ayda % 89-93 ve % 93-98,6; 2-4.ay arasında ise duyarlılık %83,1 düzeyindedir (Kılıç 2007).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): ELISA yöntemi, polistiren bir yüzey üzerine absorbe edilmiş antijenle test örneğindeki antikörlerin özgül bağlanmasının, antikora bir enzimin bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir. İlk temel prensipleri Engvall ve Perlmen tarafından 1971 yılında yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Güllüce, 1993). Bruselloz tanısında kullanılan duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek serolojik yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu yöntemle IgM, IgG ve IgA antikörlerin saptanması sağlanır. Konvansiyonel yöntemlerle saptanamayan olgularda pozitif sonuçlar alınması, akut ve subakut olguların tanısında kullanılabilecek en uygun test olması, kronik bruselloz tanısında IgM, IgG ve IgA profillerinin saptanmasını sağlaması, mesleki maruziyete bağlı aktif ve sublinik vakaların ayırımının yapılabilmesi açısından sıklıkla kullanılmaktadır. Kantitatif olması, objektif sonuç vermesi, kolay uygulanabilmesi, çok sayıda örnek çalışılabilmesi, yaklaşık 3 saatte sonuçlandırılabilmesi, kitle taramalarına uygun olması en önemli avantajlarıdır. Ancak teknik, ekipman gereksinimi, antijenik standartizasyonun olmaması, sonuçların yorumlanmasında yaşanan sorunlar gibi dezavantajlara da sahiptir (Kılıç, 2007).

Immunofluorescence Assay (IFA): Antijen-antikor kompleksinin flouresans bir boya kullanılarak tespiti esasına dayanır. Yüksek duyarlılık ve özgüllük, kısa zamanda sonuçlanması testin avantajlarıdır ancak diğer serolojik testler ile yüksek korelasyona rağmen, STA, CT ve KBT testine karşı bir üstünlüğü gösterilememiştir (Kılıç, 2007). Konvansiyonel metodlarla karşılaştırıldığında farklı antikor sınıflarını saptamada kullanılır (Altay, 2008).

Kompleman Birleşme Testi (KBT): Antijen-antikor birleşmesinin komplemanı uyarmasına dayanarak geliştirilen iki basamaklı bir testtir. Bir seri dilüsyonu yapılmış olan serum örneğinin her birine eşit miktarda antijen eklenir. Eklenen antijenle serum örneğindeki antikor (var ise) birleşerek immün kompleks oluşturur. Belirli bir titreden sonra immün kompleks oluşmaz veya yeterli düzeyde oluşmaz. Aynı ortama kompleman eklenir. Eklenen kompleman, immün kompleks oluşmuş tüplerde aktive olur ve tüketilir (antijen-antikor kompleksine bağlanır). Belirli bir tüpten sonra dilüsyon nedeniyle serumdaki antikor miktarının azalmasına bağlı olarak eklenen kompleman tüketilemez. Bütün tüplere indikatör hücreler (anti-eritrosit, antikor kaplı eritrositler) eklenir. İmmün kompleks aracılığı ile tüplere eklenen kompleman tüketilmiş ise eklenen indikatör hücrelerde parçalanma olmaz zamanla tüpün dibine çökerler. Tüplerde antijen-antikor kompleksi aracılığı ile tüketilmemiş kompleman kalmış ise kalan aktif kompleman miktarı ile ilişkili olarak indikatör hücrelerin tamamında veya bir kısmında lizis (hemoliz) olur. Hemoliz olan ilk tüpten bir önceki tüpteki serum titrasyonu antikor miktarını tanımlamak için kullanılır. Bu teknik çoğunlukla bruselloz tanısında doğrulayıcı bir test olarak tercih edilir (Garin-Bastuji ve ark., 2006; Kılıç., 2007). Temel olarak IgG1 ve IgM (IgA ise komplemanı fiske etmez) antikorları saptanır. Ancak testin kompleks oluşu, çözeltilerin fazlalığı, birçok aşamada gerçekleşmesi, serumun anti-kompleman aktivitesi, hemolizli serum eldesinin güçlüğü, düşük titrelerdeki subjektiflik gibi sebepler bu testin dezantajlarıdır (Garin-Bastuji ve ark., 2006; Baddour ve Alkhalifa, 2007).

Radio immun assay (RIA): Antijen-antikor kompleksinin radioizotop kodlanmış ikinci bir antikorla tespit edilmesi esasına dayanır. Yüksek duyarlılık ve

özgüllüğe sahip bu teknikte I^{25} ile işaretli antikorlar kullanılarak IgM, IgG ve IgA tipi antikorlar saptanabilmektedir. Pahalı, alete bağımlı olması, deneyimli personel gereksinimi, radyoaktif artık ürünlerin varlığı ve radyoizotopların yarı ömürlerinin kısa olması gibi dezavantajları nedeniyle yaygın kullanım alanı bulamamıştır (Kılıç, 2007).

Fluorescence Polarization Assay (FPA): Direkt olarak antijene bağlanan antikorları ölçmek için moleküler dönüş özelliğini kullanan bir sistemdir. Teknik, B. Abortus'a karşı aşı ve doğal enfeksiyon sonucu gelişen antikorları ayırt edilebilir, düşük "yalancı pozitiflik" oranı, insanda; % 96,1 duyarlılık ve % 97,9 özgüllük özelliklerine sahip bir testtir (Kılıç, 2007).

2.2.6.3. Moleküler testler

PCR, DNA veya RNA üzerindeki seçilmiş bir veya birden fazla sayıda bölgenin in vitro koşullarda oligonükleotid primerler ve Taq polimeraz enzimi kullanılarak Therma cycler cihazı yardımıyla çoğaltılması esasına dayanır (Adıgüzel, 2006). PCR tekniği günümüzde, temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi), klinik tıpta (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, AIDS, lösemi tanısı gibi), analık babalık tayininde, tıbbın diğer kollarında, in vitro şartlarda çoğalabilen veya çoğalamayan patojen mikroorganizmaların neden oldukları hastalıkların tespitinde, tohum saflığının belirlenmesinde, doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısında, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Arı, 1999).

2.2.7. Brucella'nın tedavisi

Brucella spp. retiküloendotelial sistem hücrelerinde hücre içine yerleştiğinden dolayı çoğu antibiyotik hücre duvarını geçemez. Etkenin bu intrasellüler özelliğinden dolayı şimdiye kadar hayvanlarda hastalığın güvenilir bir tedavisi bulunamamıştır. Fakat sanitasyon metotlarının uygulanması, hastalığın yayılmasının engellenmesi ve aşılama gibi etkili yöntemlerle potansiyel enfeksiyon riski azaltılabilir (Nicoletti, 1985). Son on yılda sığırlarda brusellozisin tedavisinde birçok kemoterapötik madde kullanılmış, fakat hiçbirisinin tam etkili olmadığı bildirilmiştir.

Radwan ve ark. (1993), doğal enfekte ineklerde brusellozisin eliminasyonunu sağlayacak uzun etkili oksitetrasiklin ve streptomisin intramuskuler ve intramamarial yolla 6 haftadan fazla bir süreyle infüzyonunu içeren bir medikasyon önermişler. Yapılan bu uygulamanın pahalı olması, başarısızlıkla sonuçlanması, tedaviden sonra hayvanların alıkonulma süresinin uzun olması ve gelişen antibiyotik direnci gibi nedenlerden dolayı bu tedavi Avustralya'da eradikasyon programı için pratik bulunmamıştır.

Brucella mikroorganizmalarının vücuttan yok edilmesi uzun süreli ve kombine antibiyotik tedavisini gerektirir ve bu her zaman başarılı olmaz. Yapılan bu tür denemelerde tedavide çok başarılı sonuçlar alınamamıştır. Hayvanlar etkeni gizli olarak taşımaya devam eder ve diğer hayvanlar için enfeksiyon kaynağı olurlar. Hem ekonomik olmaması hem de taşıyıcılığın önlenememesi nedeniyle hayvanlarda tedavi önerilmez.

İnsanlarda hastalığın tedavisine yönelik birçok antimikrobiyal kombinasyon denenmiştir. Tetrasiklin, rifampisin, streptomisin ve gentamisin gibi aminoglikozidler Brucella türlerine karşı etkili antibiyotiklerdir. Fakat Brucella'nın intrasellüler özelliğinden dolayı birkaç antibiyotiğin uzun süre verilmesi gerekmektedir. Erişkinlerde tedavide altın standart 1 g streptomisin 14 gün süreyle kas içi enjeksiyonu ve 100 mg doksisisiklinin 45 gün süreyle günde iki kez oral yolla alınması şeklindedir. Streptomisine alternatif olarak 5 mg/kg dozunda gentamisin 7 gün süreyle günde bir kez kas içi enjeksiyonu da tedavi amaçlı kullanılabilir.

(Hasanjani, 2006). Yaygın kullanılan diğer bir tedavi yöntemi ise doksisisiklin ve rifampisin 6 hafta süreyle günde iki kez oral yolla alınması şeklindedir. Bu yöntemin oral yolla alınması gibi bir avantajı vardır. Doksisisiklin, rifampin ve kotrimoksazolün kullanıldığı üçlü kombinasyon özellikle nörobrusellozis tedavisinde başarılı sonuçlar vermektedir (McLean, 1992). Doksisisiklin kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmektedir fakat relapsların önlenmesi için diğer iki ilaca da ihtiyaç vardır. Siprofloksasin ve kotrimoksazol tedavisi yüksek orandaki relapslarla ilgilidir. Brucella kökenli endokarditiste cerrahi müdahale optimal bir uygulama olarak görülmektedir. Optimal brusellozis tedavisine rağmen relapslar hastaların % 5-10'unda görülebilmektedir. Deneysel çalışmalarla kotrimoksazol ve rifampinin brusellozisli hamile kadınlarda güvenle kullanılabilceği kanıtlanmıştır (Anonim, 2011). Kronik bruselloziste immunostimülant tedavi amaçlı levamizol yararlı olmaktadır (Thornes, 1977). Antijen tedavisi potansiyel olarak risk taşıdığı için tavsiye edilmemektedir (Heymann, 2004; WHO, 2006)

2.3. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, bir canlıdan herhangi bir yolla yalıtılan bir genin uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğaltılmasını ve bazen de ifade edilmesini amaçlayan çalışmalara ait tekniklerin toplamıdır. Belirli bir amaç için doğrudan genetik materyal üzerinde yapılan bu teknoloji ile, invitro şartlarda genetik materyalde planlı değişiklikler yapılabilmekte, istenilen genlerin istenilen canlıya sokularak, doğal biçimde bulunmadığı bu konakta çoğaltılması ve istenilen ürünü vermesi için nakledilen genin ifadesi sağlanabilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi özellikle 1960'lı yılların sonlarına doğru DNA ile ilgili bazı enzimlerin etki mekanizmalarının anlaşılması sayesinde gerçekleştirilen bir dizi yöntemleri kapsamaktadır. Bununla birlikte bu süreç 1940'lardan 1970'lere kadar moleküler biyolojinin gelişmesini sağlayan bilgi birikimi de rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturmuştur. Genetik çeşitlenme olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan rekombinant DNA teknolojisine (rDNA) ilişkin ilk çalışmalar, 1973 yılında başta Cohen olmak üzere bir araştırma grubunun önderliğinde invitro koşullarda gerçekleşmiştir. Buna göre doğada eldesi imkânsız

olan yeni gen düzenlemelerinin yapılması bu teknolojiyle sağlanabilmekte, bir canlının genotipi önceden belirlenebilmekte ve yönlendirilebilmektedir. (Anonim, 2012).

Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretimi şu aşamalardan oluşmaktadır. **1-Protein gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması, 2-Klonlama, 3-Transformasyon, 4-Protein ekspresyonu, 5-Protein saflaştırılması**

2.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR: Polymerase Chain Reaction) spesifik bir DNA'nın belirli uzunluktaki bir hedef bölgesinin dizinini (kalıp) hücre-dışında yüksek miktarda çoğaltmak için etkili bir yöntemdir. Hedef DNA dizininin derişimi, PCR tepkimesi ile her döngüsü üç basamaktan oluşan çok sayıda (30-60 döngü) ardışık döngü ile artırılır. PCR tepkimesi ile gen miktarının artırılmasının temeli DNA polimeraz enzimi ile ssDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla DNA parçasının derişiminin artırılmasıdır. PCR ile hedef genin derişiminin artırılabilmesi için hedef genin her iki ucundaki DNA dizininin tamamlayıcısı olan, uygun koşullarda hedef ssDNA'nın uçlarına bağlanabilen, 3'-hidroksil uçlarından sentezin başlamasını ve devam etmesini sağlayan ve klonlama için uygun restriksiyon enzim konumlarını içeren yaklaşık 20-30 nükleotitten oluşan iki sentetik oligonükleotit primer (ileri primer ve geri primer) tasarlanır. Birbirinden sıcaklık etkisiyle ayrılmış iki DNA zinciri de primerler yardımıyla çoğaltılması sırasında kalıp olarak kullanılabilir. Bir PCR reaksiyonunda her bir döngü üç önemli basamaktan oluşmaktadır.

- 1. Denatürasyon:** PCR sisteminde ilk basamak, tepkime karışımının sıcaklığının 94°C'ye çıkarılmasıyla dsDNA'dan ssDNA oluştuğu basamaktır. Hedef DNA'ya ek olarak tepkime kabında primerler, dört dNTP ve Taq DNA polimeraz enzimi de bulunmaktadır. Sıcaklık 94°C'ye çıkarıldıktan sonra tepkime kabı 1 dk bu sıcaklıkta bekletilir.

2. **Hibridizasyon:** İkinci basamakta, sıcaklık 94°C'den primerlerin yapışma sıcaklığına (50-60°C) düşürülür. Böylece primerler hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelerine bağlanırlar.
3. **Ampifikasyon:** Son basamak olan üçüncü basamakta, sıcaklık Taq DNA polimerazın katalitik fonksiyonu için optimum olan 72°C'ye çıkartılır ve böylece herbir primerin 3'-hidroksil grubundan DNA sentezi başlar. DNA sentezinin tamamlanması için gerekli süre hedef DNA'nın büyüklüğüne (1dk/kb) bağlı olarak değişir.

2.3.2. Plazmidler ve özellikleri

Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu büyük DNA kromozomuna ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazma içinde serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100kb büyüklüğünde plazmid adı verilen dairesel DNA molekülleri içerir. Plazmidler, içinde buldukları konakçı hücre ile uyum içinde yaşarlar. Plazmidlerin en önemli özelliği, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilmeleri ve kendi replikasyonlarını kontrol edebilmeleridir. Plazmidlerin büyüklüğü idealde 10 kb'ı geçmemelidir. Çünkü büyük DNA moleküllerinin saflaştırma sırasında kırılma olasılığı vardır, ayrıca büyük plazmid molekülleri çok zor manipüle olurlar. Plazmidler genellikle bir veya bir kaç gen taşırlar ve bu genler konakçı bakterinin belirli karakteristik özellikleri göstermesine neden olurlar. Örneğin; Kanamisin veya ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik derişimlerinde bakterilerin yaşamlarını sürdürebilme kabiliyetleri genellikle bakterilerde bulunan plazmidlerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır. Plazmidler hücrede sabit ve karakteristik bir kopyalama sayısında muhafaza edilirler. Yani bu sayı nesilden nesile sabit olarak kalır. Kopyalama sayısı plazmidlerde bulunan genler tarafından belirlenir fakat konakçı hücre ve çoğalma koşullarından etkilenir.

Genellikle bakteriyal plazmidler hücre içinde dairesel DNA molekülleri olarak bulunurlar. Plazmidler kopyalama sayısına göre düşük (low) ve yüksek (high) kopyalama sayılı olarak iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma oldukça geniştir. Plazmidlerin transfer şekli, sıklığı, antibiyotik dirençliliği gibi bazı özelliklerine göre daha detaylı bir sınıflandırma yapmak mümkündür.

2.3.3. Gen klonlama

Gen klonlama işlemi bir genetik bilginin tam bir eşinin aseksüel üretilmesidir. PCR ile genetik bilginin çoğaltılmasını takiben gen klonlama deneyindeki temel adımlar şunlardır;

1. Rekombinant DNA molekülü oluşturmak için klonlanacak geni içeren DNA'nın 'vektör' olarak adlandırılan sirküler DNA molekülünün içine yerleştirilmesi
2. Vektörün konak hücre içine aktarılması (Transfeksiyon veya transformasyon)
3. Konak hücrede rekombinant DNA molekülünün çoğaltılması (hem vektör hemde taşıdığı gen)
4. Hücre bölündükçe rekombinant DNA molekülü kopyalarını yeni hücrelere aktarılması
5. Konak hücrelerin büyük miktarlarda üretimi (koloni veya klon)

PCR ürünleri bir veya iki restriksiyon enzimi ile yapışkan ya da küt uçlar oluşturacak şekilde kesilir. Kesilmiş PCR ürünleri ve vektör uygun şartlar ve oranlarda DNA ligaz enzimi aracılığıyla bir araya getirilerek rekombinant DNA molekülü oluşturulur. İçinde bizim istediğimiz DNA molekülü olan vektör konak hücreye aktarılır ve seçici bir ortamda konak hücrelerle beraber çoğaltılır.

2.3.3.1. Klonlama yöntemleri

Klonlama; 1. A/T klonlama, 2. Yapışkan uç oluşturarak klonlama, 3. Küt uç oluşturarak klonlama yöntemleriyle yapılmaktadır.

A/T klonlama: T/A klonlamada restriksiyon endonükleaz enzimlerine gerek yoktur. Bu klonlama 3'-A uzantısına sahip çift iplikli PCR ürünleri oluşturan ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan DNA polimeraz kullanılarak gerçekleştirilebilir. Yapışkan uç ve küt uç klonlamalar sırasında özgül DNA dizilerini tanıyan restriksiyon enzimleri kullanılır.

2.3.3.2. Restriksiyon enzimleri (RE)

Restriksiyon enzimleri; metilaz aktiviteleri, alt ünite yapıları, kesim özgüllükleri ve kofaktör ihtiyaçlarına göre; tip I, tip II, tip III ve homing endonükleazlar olarak incelenirler. Klonlama için en az bir restriksiyon enzimine ihtiyaç vardır.

a- Tip I enzimler: Hem metilasyon hemde modifikasyon yapan enzimlerdir. Bu enzimler aktiviteleri için 5- adenzilmetionin, ATP ve Mg^{+2} ma gereksinim duyarlar. Hedef dizideki adenin rezidülerini metilasyona uğratırlar ve kesimleri rastgele olmaktadır. Kesim olayında belirleyici faktör enzimin metilasyon aktivitesidir.

b- Tip II enzimler: Tam hedef nükleotidden kesim yapma özellikleri nedeni ile klonlama ve moleküler biyoloji araştırmaları için ideal enzimlerdir. Tip II RE Mg^{+2} iyonlarının varlığında çift iplikli DNA üzerindeki palindromik dizileri tanıyan ve bu diziyi içindeki özel bir bölgeden kesen enzimlerdir. Tip II RE'ler kesim sonucunda DNA'da oluşturdukları uçların motiflerine göre iki alt gruba ayrılmaktadır.

Yapışkan Uç (Sticky End): Bu enzimlerin oluşturduğu uçların ligasyon etkinlikleri yüksektir. Bu nedenle klonlama çalışmalarında tercih edilmektedirler.

Küt Uç (Blunt End): Bu tür uçların ligasyon etkinlikleri düşüktür. Bu tür uçlar genellikle klonlama çalışmalarında önerilmemektedir. Ancak, bunlar özellikle DNA parçalarının ucuna bir ya da birden fazla RE tanıma bölgesi bağlamak için kullanılmaktadır.

Gerek yapışkan uç gerekse küt uç oluşturan RE'lerinden bazıları DNA üzerinde aynı dizileri tanıyabilmektedirler.

c- Tip III Enzimler: Tip I'ler gibi bunlar da metilasyon ve modifikasyon yapabilen çok fonksiyonlu enzimlerdir ve ATP'ye bağlı kesim gerçekleştirmektedirler. Bu enzimler DNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanmalarına rağmen kesimi farklı bölgeden ve rastgele yapmaktadır. Kesim tanıma bölgesine yakın bir konumda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle tip III enzimler klonlamada kullanılmamaktadır.

d- Homing Endonükleazlar: Diğer restriksiyon enzimlere kıyasla iyi derecede korunmuş ve benzerlik gösteren protein yapılarına (LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H, Ile-Cys) sahip, uzun (12-40 baz çifti) ve asimetrik bölgeleri tanıyıp kesen, aktivitesi için protein ve RNA'ya ihtiyaç duyan enzim grubudur. Tüm biyolojik sistemlerde (bakteri, ökaryot, alg) bulunmaktadır.

Restriksiyon Enzimlerinin Star Aktivitesi: Restriksiyon endonükleazların en dikkate değer özelliklerinden biri, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden ayırt edebilme başarılarının, optimal olmayan şartlarda oldukça değişmesidir. Örneğin, EcoRI enziminin tanıma bölgesi (5'-GAATTC-3')'ne bağlanma oranı en yakın tanıma bölgesi (5'TAATTC)'ne kıyasla 105 kat daha fazladır. Ancak, enzim için optimal olmayan şartlar altında oran oldukça değişmekte ve pek çok enzim için bu durum söz konusu olmaktadır. Benzer bölgeleri kesme işlemine, bir enzimin star aktivitesi denilmektedir. Bu durum moleküler biyoloji çalışmalarında oldukça önemli olmaktadır. Bu nedenle kullanılan enzimlerin star

aktiviteye sahip olup olmadıkları bilinmelidir. Restriksiyon enzimlerinin içinde klonlanacak DNA dizisini istenmeyen bir noktadan kesen enzimler kullanılmamalıdır. Çoğaltılacak gen bölgesi için kullanılacak primerlerin uçlarında restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri bulunmalıdır. Hem klonlama vektörü hem de klonlanacak gene ait PCR ürünleri restriksiyon enzimleriyle, uygun şartlarda kesilirler. Ürünler jel ekstraksiyonu veya DNA'yı bağlayabilen kolonlar kullanılarak saflaştırılabilir.

2.3.4. DNA ligasyonu

Rekombinant DNA molekülünün oluşumundaki son adım kesilmiş vektör ve kopyalanacak DNA'nın uygun şartlarda bir araya getirilmesidir. Sonrasında ligaz enzimi nükleotidler arasında fosfodiester bağları (çift iplikli DNA'nın 5' ucunda yer alan fosfat grubunun ATP ile 3'-OH grubuna bağlanması) kurarak açık uçları kapatır. Yapışkan uçlar ligasyon etkinliğini arttırmaktadır. Bağlamadaki sorunlardan biri vektörün yabancı DNA'ya bağlanması yerine kendi uçlarının birleşip halka şeklini kazanmasıdır, bunu engellemek için yapılan uygulamalardan biri, vektörün 5' uçlarındaki fosfat gruplarının fosfataz enzimi ile yok edilerek fosfodiester bağ oluşumunu önlemektir.

Ligasyon tepkimesinin gerçekleşmesi için ortamda nanogram miktarında makro molekül DNA bulunur. Makromoleküllerin klonlanması için klonlanacak makromolekül DNA uçlarının karşı karşıya gelmesi gerekmektedir. Bu olasılığın düşük olması klonlama tepkimelerinin gerçekleşme olasılığını da azaltmaktadır. Ligasyon tepkimesinde ortamda bulunan vektörün ve genin derişimi çok önemlidir. Vektör ve gen derişimleri DNA parçalarının büyüklüğüne göre değiştiğinden bunların uygun derişimleri optimize edilmelidir.

2.3.5. Transformasyon

Rekombinant DNA molekülünü içine alabilmesi için uygun hale getirilmiş konak hücrelere (Kompetan hücre) ligasyon ürününün aktarılmasıdır. Hücrelerin kompetan hale getirilmesi için temel olarak iki yöntem vardır. Elektroporasyon (düşük voltajlı elektrik akımı) ve CaCl_2 metodu. Ligasyon ürünü ve kompetan hücreler uygun şartlarda inkübe edilir. Bu yöntem ile ilgili birçok yöntem (protokol) bulunmaktadır. Bunlardan en uygunu ve en çok kullanılanı, *E.coli* hücrelerinin CaCl_2 ile yıkanması ve $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra plazmid DNA ile aynı ortama konulup, 42°C 'de 1-2 dakika bekletilerek ısı şokuyla plazmid DNA'sının hücreye transferidir.

Transfer yapıldıktan sonra hücreler katı ortamda uygun bir işaretleyici antibiyotik kullanılarak çoğaltılırlar. Bu yöntemde hücrenin, istenen DNA molekülünü hangi mekanizma ile içine aldığı halen bilinmemektedir. Protoplast transformasyon yönteminde bakterilerin hücre duvarı kısmen lizozim enzimi ile enzimatik olarak hidroliz edilir. Ortamda osmotik stabilizatörlerin (sakkaroz gibi) bulunması durumunda, hücrelerin parçalanmaları önlenir. Transformasyon için diğer bir teknik de elektroporasyondur. Bu yöntemde pulse etkiyle yüksek voltaj uygulanarak DNA istenen hücreye transfer edilir. Bu yöntemde de hücrenin hangi mekanizma ile DNA'yı aldığı henüz bilinmemektedir.

2.3.6. Kolonilerin seçimi

Ligasyon ürününün aktarıldığı konak hücrelerinin seçilimi için bu hücreler uygun besiyeri ve inkübasyon şartlarında tutulur. Çoğu plazmid klonlama vektörü konak hücreye antibiyotik direnci veren en az bir gen taşımaktadır. Bu antibiyotikleri içeren seçici ortamlarda inkübe edilirler fakat bu konak hücreler zamanla antibiyotik etkisini önleyen enzimler salgılayabilir. Bu yüzden transformasyonu takiben seçici ortama alınmalıdırlar.

2.3.7. Rekombinant genin klonlandığı hücrelerin saptanması

Transformasyon işleminden sonra, istenen geni taşıyan hücrelerin uygun yöntemlerle seçimi gerekir. Transformasyon sonunda ortamda çok fazla koloni bulunacağı için seçici işaretleyici (selective marker) gereklidir. En yaygın yöntem antibiyotiklere karşı direnç sağlayabilecek gen taşıyan plazmidlerin klonlamada kullanılmasıdır. *E.coli* ile yapılan çalışmalarda genellikle ampisilini etkisiz hale getirecek geni ampR taşıyan plazmidler tercih edilmektedir. Transformasyon işleminden sonra koloniler seçici işaretleyici görevini yapacak antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar. Plazmidi taşıyan hücrelerin hepsi bu ortamda yaşama kapasitesine sahiptir. Antibiyotik içeren ortamda yaşayabilen hücrelerin hepsi klonlamada kullanılan plazmidi taşımalarına rağmen klonlanması amaçlanan geni taşıma olasılıkları çok düşüktür.

Üretilen konak hücrelerde rekombinant plazmidi içermeyen hücreler olabilir. Bunları tesbit etmenin çeşitli şekilleri vardır. Birincisi, bazı plazmidler beta-galaktozidaz (lac Z) geni içerir. Eğer araya sokulması istenen DNA (insert) bu plazmid içine doğru şekilde girmişse gen inaktive olmaktadır. X-gal ve IPTG içeren besiyerinde insert içeren plazmidler beyaz koloniler oluştururken, ligasyon basamağında hedef insert içermeyen plazmidleri içeren bakteriler mavi koloniler oluşturmaktadır. İkincisi, insert'in varlığı kolonilerde ekstraksiyon yapıldıktan sonra PCR yöntemiyle uygun büyüklükteki bandın görüntülenmesidir. Üçüncüsü ise gen ve plazmidin primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR işlemiyle uygun bandların görüntülenmesidir.

2.3.8. Protein ekspresyonu

2.3.8.1. Ekspresyon vektörleri

Bu vektörler klonlanacak genin yerleşebileceği ve içinde pek çok restriksiyon enzimi için tanıma dizileri bulunan klonlama bölgeleri içerirler. Bu bölgeler ‘lac Z’ gibi çeşitli promotör genlerin kontrolü altındadır. Şekil 2,3’de çeşitli ekspresyon vektörleri ve özellikleri sunulmuştur.

Çizelge 2.3. Ekspresyon vektörleri ve özellikleri (Anonim, 2012)

Konakçı	Avantajları	Dezavantajları
<i>Bakteriler (E.coli)</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Yüksek verim *Basit ve ucuz çoğalma *İyi mekan/zaman verimi *Kapsamlı bilinen organizma, basit kullanılabilme ve yönlendirilebilme *Çok sayıda transkripsiyon ve translasyon düzeyinde kontrol elemanları bilinmekte 	<ul style="list-style-type: none"> *Ökaryotik hücrelerde olan posttranslasyonel modifikasyon ve sekresyon mekanizmalarına sahip değil *Ekspresyon ürünleri inclusion cisimleri adı verilen güç çözümlü formda
<i>Böcek Hücreleri (Baculovirüs sistem)</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Yüksek ökaryotik hücrelerin birçok posttranslasyonel modifikasyonları, protein proses ve sekresyon mekanizmaları *Yüksek verim mümkün *Protein çoğunlukla çözümlü formda *Baculovirüsler insanlar için enfeksiyöz değil *Büyük proteinlerin ekspresyonu için de uygun sistem 	<ul style="list-style-type: none"> *Böcek hücrelerinin çoğalması bakterilerden daha masraflı ve çok zaman alır *Rekombinant baculovirüslerin çıkışı çözümlülerinin kazanılması için daha uzun yöntemler gerekli *Memeli hücrelerinden farklı bazı posttranslasyonel glikozilasyon
<i>Mayalar</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Organizma iyi tanıyıyor, çoğalma ve işlem ayrıntılı tanımlanmış *Yüksek ökaryotik hücrelerin birçok posttranslasyonel modifikasyonları, protein proses ve sekresyon mekanizmaları 	<ul style="list-style-type: none"> *Memeli hücrelerinden farklı bazı posttranslasyonel glikozilasyon *Bakterilerden daha düşük verim
<i>Memeli hücreleri</i>	<ul style="list-style-type: none"> *Yüksek ökaryotik hücrelerin bütün posttranslasyonel modifikasyonları, protein proses ve sekresyon mekanizmaları 	<ul style="list-style-type: none"> *Nisbeten zaman gerektiren ve pahalı çoğaltma *Kötü zaman/mezan verimi

2.3.8.2. Protein ekspresyonu

Vektör; IPTG, Triptofan, L-arabinoz gibi maddelerle uyarılabilen operatör bir gen içermektedir. Bu uyarılmanın zamanlaması proteinin elde edilmesini ve miktarını belirler. Konağın logaritmik faza hangi OD’de ulaştığı, uyarıcının miktarı ve süresi, sıcaklık optimizasyon sürecinde en iyi ürünü alabilmek için ayarlanması gereken faktörlerdir.

2.3.8.3. Protein izolasyonu ve ekspresyonunun gösterilmesi

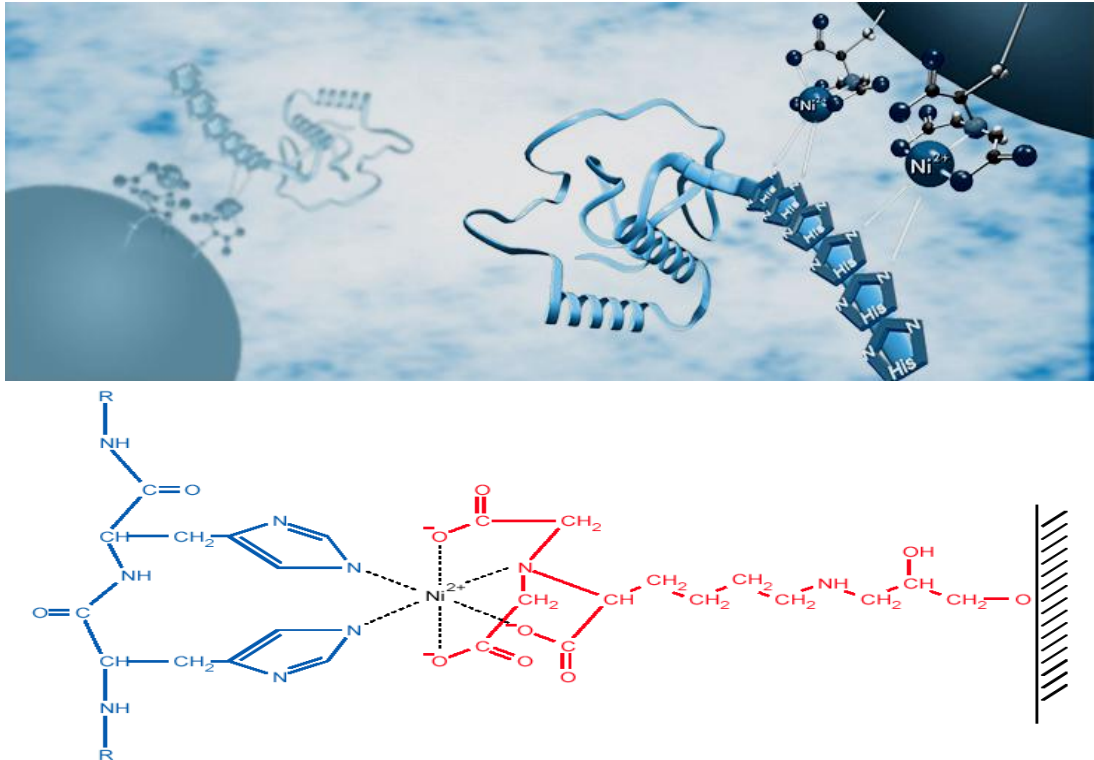
Hücre içinde bulunan proteinler önce hücre dışına çıkarılmalıdır. Bu genellikle tampon özelliği taşıyan bir sıvı aracılığıyla olur. Proteinleri hücre içerisinde tutan hücre zarının parçalanmasından sonra ortaya çıkan protein ve nükleik asit çözeltisine hücreden arındırılmış lizat adı verilir. Proteinler doğal ve denatüre edici şartlarda saflaştırılabilir. Bunu proteinin çözünürlüğü, hücre içi yerleşimi, biyolojik aktivitesi gibi şartlar belirler. İnklüzyon cisimleri içinde yoğunlaşan proteinlerin elde edilmesi için denatüre edici şartlar kullanılır. Protein varlığının doğrulanması için çeşitli yöntemler vardır.

1. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS page sonrası comassie blue ile boyama).
2. SDS-PAGE sonrasında Western Blotlama ıslak (wet) ve yarı kuru (semidry) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Daha sonra sırasıyla nitroselüloz membrana aktarma, bloklama, proteine özgül enzim işaretli Ab'la karşılaşma ve ışığa veren substrat eklenmesi sonrası fotoğraf filmi ile saptama gerçekleştirilir.
3. Direk koloni kopyalama: Transformasyon sonrası seçici ortamda üreyen kolonilerin üzerini kaplayacak şekilde nitroselüloz membran kapatılır ve daha sonra kaldırılarak IPTG'li seçici besiyerine aktarılır. Ekspresyon araştırması bu membran üzerinden çalışılır.
4. Dot Blotting: Bu yöntemde, hücre lizatı ve rekombinant protein nitroselüloz membrana damlatılıp daha sonraki membran aşamaları Western Blot'a benzer şekilde uygulanır.
5. Proteinin varlığını gösterebilmek için uyarılma öncesi ve sonrası durum kıyaslanmalıdır. Bunun için SDS-PAGE ile doğru büyüklükteki band varlığı araştırılır. Daha sonra Western Blotlama yöntemi ile jeldeki proteinler bir membrana aktarılarak saptanır.

2.3.9. Proteinlerin saflaştırılması

Proteinlerin uygun şekilde elde edilebilmesi için ekspresyon ve kültür şartlarının etkinliği kadar protein saflaştırma işlemlerindeki aşamaların şartları da önemlidir. Kültür miktarı, doğal veya denatüre şartlar altında çalışılması, inklüzyon cisimciklerinin oluşumu gibi aşamalar bunlar arasındadır.

Ni-NTA affinite kromatografi tekniği kullanılarak 6-histidinli uç taşıyan rekombinant proteinlerle doğal veya denatüre şartlar altında çalışılabilir. Inklüzyon cisimciklerindeki birçok protein deterjanlar, denatüre edici ajanlar (8M üre, 6M GuHCl gibi), diyaliz, ısı, pH gibi parametreler kullanılarak çözünür hale getirilebilirler. Ni-NTA affinite kromatografi tekniğinde rekombinant proteine bağlı 6-histidin molekülünden ikisi nikel-nitrilotriasetik asit molekülleriyle kaplı katı faza tutunurlar (Şekil 2.7). Histidin moleküllerinin fazlalığı hem afiniteyi artırmakta hemde protein molekülünde olabilecek sayıca daha az olan histidin molekülleriyle yarışarak kontaminant proteinlerin bağlanmasını önlemektedir.



Şekil 2.6. Ni-NTA ve Histidin tag içeren protein moleküllerinin etkileşim şeması (Anonim, 2012)

Yüksek pH'da bağlanan rekombinant protein, yıkama ve elüsyon adımlarına doğru pH'sı giderek düşürülen tamponlarla veya artan imidazol konsantrasyonuyla, protein içinde bulunduğu matriksi bırakarak elüe olur. Kontaminant proteinlerin bağlanmasını engellemek için gerekirse belirli miktarlarda imidazol tamponlara ilave edilebilir. Histidin analogu olan bu molekül sondaki yıkama adımları ile kolayca uzaklaştırılabilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1.Çalışmada kullanılan cihaz ve kimyasal maddeler

<u>Kullanılan cihazlar</u>	<u>Marka</u>
Santrifüj	Hettich Universal 30 RF
Derin dondurucu	Rewco
Dikey jel elektroforez sistemi	Biorad Mini- Protean® Tetra Cell Protein Elektroforezi
ELISA plate	Bio-Tek
Fraksiyon kollektörü	Bio-Rad, Foxy 200
Isıtma tablası	Eppendorf thermomixer
İnkübasyonlu orbital shaker	İnnova 40
inkübatör	Binder, Redline
Jel görüntüleme sistemi dansitometri	Biorad GS –800
Laminar flow kabin	Thermo
Otoklav	Nüve, OT32
PCR cihazı	Applied Biosystems 2720 Thermal Cyclers
Semidry western blot sistemi	Sigma
Su banyosu	Nüve BM 402
Syringe filters	Corning
Ultra santrifüj	Beckman coulter, Optima LE- 80K
Ultrasonikatör	Bandelin, sonopuls
UV Transilluminator	Syngene
UV-Visible spektrofotometre	Cecil
Yatay jel elektroforez sistemi	Biorad
<u>Kullanılan kimyasal malzemeler</u>	
Affinite kolonu	Thermo, His Pure Ni-NTA chromatography cartridge
100 bp DNA ladder	Vivantis, VC 100 bp
1000 bp DNA ladder	Vivantis, VC 1 kbp
Protein Ladder	Thermo, Pageruler Prestained
10 mM dNTP mix	Promega, U1511
10 X Taq DNA polymerase Buffer	Vivantis
6X Loading dye	Vivantis
Anti-His G antibody	İNVİTROGEN, R940-25
Anti-Human IgG (γ -chain specific)- Horse peroxidase antibody produced in goat	İnvitrogen
APS	Merck,
Bacto®-tryptone	Merc
Bacto®-yeast extract	Merc
B-mercaptoetanol	Merc
Bromofenol Blue	Sigma
BSA (Albumin from Bovine Serum)	Sigma
D(+) Glucose	Sigma

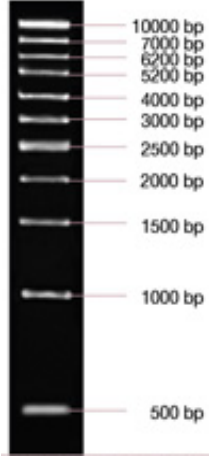
DMSO	Carlo erba
EDTA	
Etidyum bromür,	Sigma
Glisin	Merck
HisPure Ni-NTA chromatography cartridge	Thermo
Imidazol	Sigma
IPTG, Dioxane-Free	Promega
Isopopanol	Merc
Glycerol	
Coomassie Brilliant Blue	
K ₂ HPO ₄	merc
Kanamycin Sulfate	İnvitrogen
KCl	Merc
KH ₂ PO ₄	Merc
LB agar	Sigma
Lizozim (Lysozyme from henn egg white)	vivantis
MgCl ₂	Vivantis
N,N'- Dimethyl- bis- Acrylamide	Sigma
Acrylamide	
NaAc	Sigma
NaCl	Merc
NaH ₂ PO ₄	Merc
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo
Proteinaz K	Vivantis
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat),	Sigma
T4 DNA Ligase Buffer	İnvitrogen
Taq polimeraz	Vivantis
TEMED (N-N'-N'-N'-Tetrametiletilendiamin)	Sigma
TMB 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin	Sigma
Tris Base	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tryptone	Merc
Tween-20 (Polietilen Sorbitan Monolaurat)	Sigma
Yeast Extract	Merc

Kullanılan kitleler

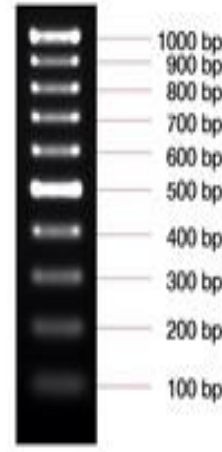
Champion pETSUMO Protein Expression System	İnvitrogen, K300-01
GenElute HP Plazmid Miniprep Kit	Sigma, NA0150
GF-1 Bacterial DNA extraction Kit	Vivantis, GF-BA-100
WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit	İnvitrogen, WB7103

3.1.2. Kullanılan marker DNA ve proteinler

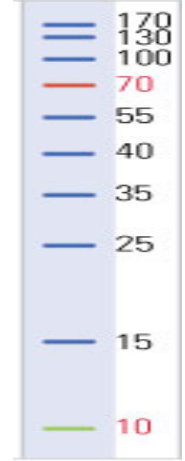
Agaroz jel elektroforezinde; Vivantis, VC 1 kbp DNA ladder ve Vivantis, VC 100 bp DNA ladder kullanıldı. Protein elektroforezinde ise Thermo, Page ruler prestained protein ladder kullanıldı.



Şekil 3.1. Vivantis, VC 1 kbp DNA ladder



100 bp DNA ladder



Şekil 3.2. Prestained protein ladder

3.1.3. Kullanılan tampon ve çözeltiler

3.1.3.1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler

TAE Buffer (10x): Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlamak ve elektroforezi yürütmek için kullanıldı. 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek kullanıldı.

Etidyum Bromid: Son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 500 µl'lik hacimlerde dH₂O'da çözülerek stok solüsyon olarak hazırlanıp ve 4 °C'de saklandı. Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde kullanıldı.

3.1.3.2. PCR ve ligasyon işleminde kullanılan tampon ve çözeltiler

PCR Tamponu	100 mM Tris-HCl, pH 8.3 500 mM KCl 0.01% gelatin
dNTP Mix	12.5 mM dATP 12.5 mM dCTP 12.5 mM dGTP 12.5 mM dTTP Suda, pH 8.0
10X Ligasyon Buffer	60 mM Tris-HCl, pH 7.5 60 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mg/ml bovine serum albumin 70 mM β-mercaptoethanol 1 mM ATP 20 mM dithiothreitol 10 mM spermidine

3.1.3.3. Protein ekstraksiyonunda kullanılan tamponlar

Nativ Lizis Tamponu: Rekombinant *E.coli* BL21 (D3) hücrelerinin ekstraksiyon işleminde kullanıldı.

Native lizis tamponu pH: 7,8

KH ₂ PO ₄	1 M	0.3 ml
K ₂ HPO ₄	1 M	4.7 ml
NaCl	400 mM	2.3 g
KCl	100 mM	0.75 g
Glycerol	10%	10 ml
Triton X-100	0.5%	0.5 ml
İmidazol	10 mM	0,068 g
Deiyonize su		100 ml'ye tamamlandı.

Denatüre Lizis Tamponu: Hücre içerisinde inklüzyon tanecikleri halinde üretilen rekombinant omp28 precursor proteinin, çözünür hale getirilmesini sağlayarak yüksek verimlilikte saflaştırılmasını sağlar.

Denatüre lizis tamponu pH: 8,0

Üre	8 M	48 g
NaH ₂ PO ₄	100 mM	1,42
Tris-HCl	10 mM	0,16 g
Triton X-100	% 1	1ml
imidazol	10 mM	0,068 g
Deiyonize su		100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.4. Ni-NTA affinite kolonu için kullanılan tamponlar

Affinite kolonu ile saflaştırma işleminde kolonun hazırlanması, örneklerin yüklenmesi ve kolona bağlanan proteinlerin kolondan kopmasını sağlayan tamponlardır. Tüm tamponlar hazırlandıktan sonra, çözünmeyen maddelerin kolona zarar vermesini engellemek için 0.45 µl filtrelerden geçirildi.

PBS (pH; 7,4)

Madde	Konsantrasyon	Miktar
Na ₂ HPO ₄	20 mM	1,429 g
NaCl	300 mM	8,766 g
deiyonize su		500 ml'ye tamamlandı.

Binding Buffer; kolona örnek yüklemeye önce kolon matriksinin, pH ve iyon durumunu dengeye getirir, kolon matriksinin maksimum oranda His-tag içeren proteinleri bağlamasını sağlarken, spesifik olmayan protein bağlanmasını da engeller. Ayrıca protein örneklerinin kolona yüklenmesinde taşıyıcı rol oynar.

Binding /Equibilation buffer (pH: 7,4)

imidazol	10 mM	0.068 g
Üre	8 M	48 g
TritonX-100	%1	1 ml
PBS		PBS ile 100 ml'ye tamamlandı.

Washing Buffer; içerisindeki imidazol konsantrasyonu sayesinde kolona düşük iyonik güçte bağlanmış rekombinant protein haricindeki proteinlerin kolondan ayrılmasını sağlayarak, rekombinant proteinin yüksek saflıkta elde edilmesini sağlayan en önemli etmenlerden biridir.

Washing buffer (pH: 7,4)

imidazol	20 mM	0.136 g
Üre	8 M	48 g
TritonX-100	%1	1 ml
PBS		PBS ile 100 ml'ye tamamlandı.

Elüsyon Buffer; kolon matriksine kuvvetli bir şekilde bağlanan His-tag'lı rekombinant proteinin kolondan ayrılmasını sağlar. Bu işlem elüsyon bufferın içerdiği yüksek konsantrasyondaki imidazol ile olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlu imidazol, kolona bağlı his gurupları ile yer değiştirerek kolona bağlanır, bu sayede his içeren proteinler kolondan ayrılır.

Elution buffer (pH: 7,4)

imidazol	300 mM	2,04 g
Üre	8 M	48 g
TritonX-100	%1	1 ml
PBS		PBS ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.5. Protein miktar tayininde kullanılan tampon ve çözeltiler

Protein miktar tayininde Bradford metodu kullanıldı. Bu metod için kullanılan çözeltiler aşağıda verilen tabloya göre hazırlandı.

Bradford ayıracı

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 g
% 95 'lik etanol	50 ml
% 95'lik Fosforik asit	100 ml
deiyonize su	1L'ye tamamlandı

0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml % 95 'lik etanolde çözüldü. Bu çözelti üzerine %95 'lik 100 ml Fosforik asit ilave edildikten sonra deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı. 0,45 µm lik filtre ile filtre edildikten sonra ışık almayan bir şişeye konarak + 4 °C'de saklandı.

Standart: 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.

3.1.3.6. Sumoproteaz için kullanılan tampon ve çözeltiler

Sumoproteaz rekombinant olarak üretilip saflaştırılan His-Sumo-omp28 precursor proteinin, saflaştırıldıktan sonra His-Sumo kısmını proteinden ayıran enzimdir. Sumoproteaz enziminin optimum reaksiyon vermesi için, tampon içindeki NaCl ve imidazol konsantrasyonun optimize edilmesi gerekir. Bu işlem için protein çözeltisinin ortamına göre tuz konsantrasyonu yüksek ya da düşük buffer kullanılır. Protein çözeltimiz için tuz konsantrasyonu düşük bufferı kullandık.

SUMO Proteaz (1 U/ μ l) koruyucu buffer 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
1% Igepal (NP-40)
250 mM NaCl
500 μ M DTT
50% (v/v) glycerol

10X SUMO Proteaz reaksiyon buffer 500 mM Tris-HCl, pH 8.0
2% Igepal (NP-40)
10 mM DTT

3.1.3.7. SDS PAGE elektroforezinde kullanılan tampon ve çözeltiler

SDS PAGE elektroforezinde aşağıda verilen tampon ve çözeltiler kullanılmıştır.

1-%30 Akrilamid / %0,08 Bis akrilamid; SDS-page jelinin ana bileşeni olup, polimerleşerek jeli meydana getirir. Bu maddeler kullanım konsantrasyonuna bağlı olarak farklı büyüklükteki proteinlerin birbirinden ayrılmasını sağlar.

Akrilamid 30 g
Bis akrilamid 0,8 g
Deiyonize saf su 100 ml'ye tamamlandı.
0.45 μ m filtre ile süzülüp, + 4°C'de karanlıkta saklandı.

2-1,5 M Tris-HCl / SDS, pH=8,8; Ayırma jelinin hazırlanmasında kullanılan tampondur. Kullanmadan önce içerisinde bulunan SDS'den dolayı kontrol edilmesi gerekir.

Tris baz 18,2 g
SDS 0,4 gr
Deiyonize saf su 100 ml'ye tamamlandı.
0.45 µm filtre ile süzülüp + 4°C'de saklandı.

3- 0,5M Tris-HCl/ SDS, pH=6,8; Yığıma jelinin hazırlanmasında kullanılır.

Tris baz 6,05 g
SDS 0,4 gr
Deiyonize saf su 100 ml'ye tamamlandı.
0.45 µm filtre ile süzülüp +4°C'de saklandı.

4- %10 APS: TEMED'le beraber serbest radikal molekülleri oluşturarak polimerleşmenin meydana gelmesini sağlar.

Amonyum persülfat 0,1 g
Deiyonize su 1 ml çözülür
Çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı.

5- Yürütme Tamponu, pH=8,3 (5X): Örnekleri jele yüklendikten sonra, tank içerisinde uygun iyonik bir ortam oluşturup, protein moleküllerinin elektrik akımıyla hareket etmesini sağlar.

Tris base 15.1 g
Glycine 72.0 g
SDS 5.0 g
Deiyonize su ile 1L'ye tamamlandı.
pH ayarlanmaz. Çalışma yapılacağı zaman su ile 1X olarak dilüe edilir.

6- 2X SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu; İçerisindeki β -mercaptoetanol protein molekülündeki disülfid bağlarının kopmasını, SDS ise protein molekülünün negatif yükle kaplanmasını sağlayarak denatüre olmasını sağlar. Gliserol ve Bromo fenol ise örneklerin jele kolayca yüklenmesini ve jelde hareketinin görüntülenmesini sağlar.

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml
Glycerol (100%)	2.0 ml
β -mercaptoethanol	0.4 ml
Bromophenol Blue	0.02 g
SDS	0.4 g
Deiyonize su ile	10 ml'ye tamamlandı.
Küçük tüplere konulup, kullanıncaya kadar -20°C 'de saklandı.	

7- 1X SDS PAGE Örnek Yükleme Tamponu; 2X SDS-PAGE tamponu deiyonize su ile 1:1 oranında dilüe edilerek hazırlandı.

8- Boyama Çözeltisi; elektrik akımıyla jelde farklı seviyede yürüyen protein moleküllerinin görüntülenmesini sağlar. Bu işlem çözelti içerisindeki Comassie Brilliant Blue G-250 boyasının protein molekülleriyle bağlanması sonucu oluşur.

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 g
Metanol	50 ml
Asetik asit	10 ml
Deiyonize su	100 ml'ye tamamlandı.
+ 4°C 'de karanlıkta saklandı.	

9- Jel Yıkama Çözeltisi; Jel yıkama çözeltisi jel boyanması sırasında, protein molekülü haricindeki jelde bulunan boyanın uzaklaştırılmasını ve protein bandlarının jelde ayırt edilmesini sağlar

Metanol 50 ml
Asetik asit 10 ml
Deiyonize su 100 ml'ye tamamlandı.
+ 4°C'de saklandı.

3.1.3.8. Western blotlamada kullanılan tampon ve çözeltiler

1-Transfer Tamponu (10x) pH: 8.3: SDS page jelinde bulunan protein moleküllerinin jelden, PVDF membrana aktarılmasını sağlar. Semidry sistem kullanıldığı için az miktarda kullanılır. Bu tampon iyonik ortam oluşturarak elektrik akımı sağlar, bu sayede proteinler jelden membrana transfer edilir.

250 mM Tris-HCl 30,275 g
1,92 M Glisin 144.13g
Deiyonize su 1L'ye tamamlandı.
pH ayarlanmaz, yakınlığı ölçülür

2- Transfer Tamponu (1x) pH: 8.3: Stok halinde hazırlanan transfer tamponu (10x) tamponununun dilüe edilmesi ve metanol eklenmesi ile elde edilir. İçerisindeki metanolden dolayı taze olarak hazırlanır.

Transfer Tamponu (10x) 10 ml
Metanol 20 ml
H₂O 100 ml'ye tamamlandı.

3- Blocking Tamponu: Kit içerisindeki blocking buffer aşağıda belirtilen şekilde hazırlanarak kullanıldı. Transformasyon işleminden sonra; membrandaki protein moleküllerinin arasını doldurarak, primer antikorun bu bölgelere bağlanıp spesifik olmayan sonuçların ortaya çıkmasını engeller.

Deiyonize su	5ml
Blocker dilüent part A	2ml
Blocker dilüent part B	3ml
Toplam	10 ml

4- Primer Antikor Dilüsyon Tamponu: Membranda bulunan His-Sumo-Omp28 precursor proteinin His kısmıyla bağlanabilen primer Anti-His antikorunu içerir. Antikor yalnızca His rezidüsü bulunan proteine bağlanarak, protein tanımlanmasında öncülük eder.

Deiyonize su	7ml
Blocker dilüent part A	2ml
Blocker dilüent part B	1ml
Anti - His antikor	2 µl
Toplam	10 ml

5- Antikor Yıkama Tamponu: Antikor yıkama tamponu His-Sumo-Omp28 precursor proteinine bağlanmayan Anti – His antikorlarını uzaklaştırır. Bu sayede istenmeyen reaksiyonların oluşumu engellenir.

Deiyonize su	150 ml
Antikor yıkama solüsyonu (16 x)	10 ml
Toplam	160 ml

6- Sekonder Antikor: Kit içerisinde bulunan kullanıma hazır sekonder antikor çözeltisi kullanıldı. Bu çözelti alkalın fosfataz konjuge edilmiş Anti–mouse IgG keçi antikorunu içerir. Sekonder antikor primer antikora bağlandıktan sonra alkalın fosfataz substratı ortama konarak renk oluşumu sağlanır.

7-Kromojenik Substrat: Kit içerisinde hazır bulunan BCIP/NBT çözeltisini içerir. Alkaline fosfataz tarafından parçalanarak membranda morumsu bir renge dönüşür. Bu sayede membrandaki protein varlığı ve miktarı tespit edilmiş olur.

3.1.3.9. Dot Blotlama'da kullanılan tamponlar

Dot Blot Dilüsyon Buffer (pH; 8.0): Dot blot işleminin ilk aşamasında protein moleküllerini dilüe edip istenen konsantrasyona getirdikten sonra, membrana aktarılmasını sağlar.

10 mM Tris-HCl	0.157 g
25 mM EDTA	0.930 g
H ₂ O	100 ml' ye tamamlanır.

3.1.3.10. ELISA' da kullanılan tampon ve çözeltiler

Bu çalışmada indirek ELISA tekniği kullanıldığından dolayı saflaştırılan omp28 precursor proteinin ELISA plakalarına bağlanması gerekmektedir. Bu işlem için aşağıda verilen tamponlar kullanılmıştır.

1- Antijen Kaplama Tamponu (Bikarbonat/Karbonat Buffer Ph; 9,6): Antijen kaplama tamponu; protein örneğinin istenilen oranda dilüsyonunu sağlamanın yanı sıra yüksek pH ortamıyla polisterilen mikroparka ile protein molekülleri arasında bağ sağlayarak protein moleküllerinin mikroparkelere bağlanmasını sağlar.

Na ₂ CO ₃	3,03 g
NaHCO ₃	6 g
Distile su	1L'ye tamamlandı.

2- PBS (pH; 7.4): Yıkama tamponunun hazırlanmasında kullanıldı.

Na ₂ HPO ₄	2,32 g
KCl	0,2
K ₃ PO ₄	0,2
NaCl	8 g
Distile su	1L'ye tamamlandı.

3- PBST (Yıkama Tamponu) (pH; 7.4): ELISA'da bağlanmayan antijen ve antikorların ortamdan uzaklaşmasını sağlayarak nonspesifik bağlanmaları engeller.

Na ₂ HPO ₄	2,32 g
KCl	0,2
K ₃ PO ₄	0,2
NaCl	8 g
%0,05 Tween-20	500 µl
Distile su	1L'ye tamamlandı.

4)- Blocking Solüsyonu: Mikropleytlere protein bağlandıktan sonra, protein bağlanmayan bölgeleri bloke etmek amacıyla kullanılır. Bu sayede primer antikorun nonspesifik bağlanmaları engellenmiş olur.

% 2 BSA	1 g
PBST	50 ml

5- Antikor Dilüsyon Tamponu

% 1 BSA	0.5 g
PBST	50 ml

6- Primer Antikor: Primer antikor kaynağı olarak Brucella ile enfekte olmuş insan serumu kullanıldı. Bu amaçla Şanlıurfa'daki çeşitli hastanelerin mikrobiyoloji laboratuvarlarına başvurmuş, Rose Bengal Testi pozitif, Tüp Aglütinasyon Test sonucu 1/320 olan 30 brucella enfeksiyonlu hastanın serumları toplandı. Ayrıca negatif kontrol olarak kullanılmak üzere şu ana kadar brucella enfeksiyonu geçirmemiş 30 kişinin serumu kullanıldı. Alınan serumlar 1:100 oranında antikor dilüsyon tamponunda dilüe edilerek kullanıldı.

7- Sekonder Antikor: Bu çalışmada sekonder antikor olarak; keçide üretilmiş horseradish peroksidaz konjuge edilmiş Anti-Human IgG (γ -chain specific) antikorunu

kullanıldı. Bu antikor His-Sumo-omp28 precursor proteinine bağlanan insan antikorlarına bağlanır. Sekonder antikora konjuge edilmiş olan horseradish peroksidaz enzim substratı ortama konduğunda renk oluşturarak tepkime verir. Meydana gelen rengin yoğunluğu His-Sumo-omp28 precursor proteinin antijenik özelliğinin miktarını gösterir.

8- Substrat: ELISA testinde konjuge edilmiş horseradish peroksidaz enzimin substratı olarak TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) kullanıldı. TMB solüsyonu kullanılmadan önce aşağıdaki tabloda olduğu gibi iki farklı çözelti olarak hazırlandı. Her iki tampon (özellikle; tampon A'nın içeriğindeki H₂O₂'dan dolayı) taze olarak hazırlanması gerekir. Mikropleytlere konulacağı zaman TMB-A ve TMB-B tamponları 1:1 oranında karıştırılarak substrat solüsyonu hazırlandı. Reaksiyon sonunda açık mavi bir renk oluşur, sonrasında ortama stop solüsyonu (2M H₂SO₄) eklendiğinde açık berrak sarı bir renk oluşmaktadır.

TMB TAMPON- A

NaAc	1,36
Sitric asit	0,16 g
% 30 H ₂ O ₂	30 µl
Deiyonize su	50 ml'ye tamamlandı.

TMB TAMPON- B

TMB (önce 300µl DMSO ile çözüldü)	0,015 g
EDTA-Na ₂	0.02 g
Sitrik asit	0,095 g
Gliserol	5 ml
Deiyonize su ile	50 ml'ye tamamlandı.

3.1.4. Kullanılan bakteri kültürleri

3.1.4.1. *Brucella melitensis* Rev1

Brucella melitensis Rev1 attenüe olarak $0.5-4 \times 10^9$ cfu/doz 'da keçi, koyun gibi hayvanlarda aşı olarak kullanılan *Brucella melitensis* suşudur. *Brucella melitensis* Rev1 bakterisi, liyofilize standart doz aşısı, Dollvet firmasından (Şanlıurfa) temin edildi.

3.1.4.2. *E. coli* One Shot® Mach1™ T1R hücreleri

Genotipi; F- $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 hsdR(rK- mK+) \Delta recA1398 endA1 tonA$ şeklinde olan, Mach1™-T1R *E. coli* suşu yabancı W strain (ATCC #9637, S. A. Waksman) nin modifiye edilmesi ile sağlanmıştır. Bu hücreler klonlama amacıyla kullanılmaktadır. Protein ekspresyonu için kullanılmaz. *E. coli*'nin bu suşu T7 RNA polimeraz içermez, fakat rekombinant plazmidin çoğalması ve stabil bir yapıda kalmasını sağlar. Ekspresyon vektörüne aktarım yapıncaya kadar rekombinant plazmid bu hücrede çoğaltılabilir ve muhafaza edilebilir. Bu *E. coli* suşu rekombinant plazmidin kontrolü için gereklidir. Mach1™-T1R *E. coli* hücrelerinde aşağıda verilen mutasyonlar sağlanarak çeşitli özelliklerin ortaya çıkması sağlanmıştır.

- *lacZ* $\Delta M15$ gen bölgesi rekombinant plazmidin mavi /beyaz görüntülenmesini sağlayarak ayırımını sağlar.
- *hsdR* mutation; metillenmemiş PCR ürünlerinin etkili bir şekilde transformasyonunu sağlar.
- $\Delta recA1398$ mutation; rekombinant klonda homolog rekombinasyonun oluşumunu azaltır.
- *endA1* mutation; plazmidin ürün miktarını ve kalitesinin artışını sağlar.
- *tonA* mutation; T1 ve T5 fajlarına karşı direnç kazandırır.

3.1.4.3. E.coli One Shot® BL21(DE3) hücreleri

Genotipi F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm* (DE3) şeklinde olan *E.coli* BL21 (DE3) protein ifade konakçısı olarak kullanılmıştır. Bu hücreler yalnızca protein ekspresyonu için kullanılır. Klonlama için kullanılmaz. Bu rekombinant ırkta, protein ifadesi vektördeki T7 promotorunun kontrolü altındaki, T7 RNA polimerazı tarafından yapılır. Bakteri genomu ise; IPTG ile kontrol edilebilen yani uyarılabilen transkripsiyonu gerçekleştirilebilen T7 RNA polimeraz genini rekombinant olarak bulundurmaktadır. Burada kontrol edilebilen promotorun kullanılması rekombinant proteinin istenildiği anda üretilmesini sağlar. Vektörün üzerindeki bölgenin baskılanması ise lac repressör proteini tarafından yapılır. Vektörde ve *E.coli* genomunda bulunan her iki T7 promotorunun kontrolü lac repressör proteinine bağlanarak onu inhibe eden yapay laktoz analogu olan IPTG (izopropil- β -D tiogalaktopirinosidaz) ile yapılabilir. *E.coli* laktoz bulunmayan ortamda büyütüldüğünden lac repressör proteini laktoz ile inhibe edilemediğinden sürekli olarak her iki promotora bağlanarak hedef protein ile T7 RNA polimeraz genlerinin transkripsiyonunu engeller. Ortama IPTG eklendiğinde, lac repressör proteini IPTG'ye bağlanarak transkripsiyonel baskılamayı kaldırır ve T7 RNA polimeraz proteini üretilbildiğinden hedef rekombinant proteininin üretimi gerçekleştirilmiş olur (Studier, 1986).

DE3 lambda; DE3 lysogen genini içermesi anlamına gelmektedir. Bu gen lacUV5 promotör kontrolündeki T7 RNA polimerazın bağlanması için gereken gen bölgesini içerir. T7 RNA polimerazın aktifleşmesi için IPTG gerekmektedir. Bu *E. coli* B/r suşu lon proteaz içermez. Ayrıca dış membran proteazında (OmpT) bir mutasyona sahiptir. Bu iki anahtar proteazın eksikliği, bu suş içerisinde üretilen heterolog proteinlerin yıkımını azaltır.

BL21(DE3) *E.coli* içerisindeki heterolog genleri tarafından kontrol edilen bakteriyofaj T7'yi kullanır. pETSUMO vektöründe istenilen gen bölgesinin ekspresyonu T7 promatörü tarafından kontrol edilmektedir. T7 promatörü ise lac operator bölgesinin modifiye edilmesiyle sağlanmıştır. Bakteriyofaj T7 ve T7

promatör bölgelerinin ekspresyonu gen 10 (ϕ 10) tarafından kontrol edilmektedir. T7 RNA polimeraz promotörü özellikle bu bölgeyi tanır. İstenilen gen bölgesinin ekspresyonu için gerekli olan T7 RNA polimerazın sağlanması için hücrelerin polimeraz ekspresyonunun indüklenmesi ya da faj polimeraz ekspresyonu ile enfekte olması gerekmektedir. pETSUMO sisteminde T7 polimeraz ihtiyacı BL21(DE3) *E. coli* şusunda düzenlenmiş bir şekilde sağlanmaktadır. Yeterli miktarda T7 RNA polimeraz imal edildiğinde, T7 promator bölgesine bağlanarak istenilen genin transkripsiyonunu sağlar.

BL21(DE3) *E. coli* suşu T7 gen bölgesinin düzenlenmesi için özellikle kullanılmıştır. Bu suş DE3 bakteriyofaj lambda lisogen taşıyır. Bu λ DE3 lisogen; Lac represörünü içeren lacI geni, lacUV5 promotör kontrolünde bulunan T7 RNA polimeraz gen bölgesi ve lacZ genin küçük bir bölgesini içerir.

lacI geni; lac yapısı int geninin içerisine konulur. Bu tür lac yapıları int genini inaktive eder. Int geninin bozulması yardımcı faj yokluğunda faj eksizyonu (lizisini) önler. LacI tarafından sentezlenen, lac repressor T7 RNA polimerazın ekspresyonunu baskılar. Karşılıksız indükleyici eklenmesi örneğin izopropil β -D-thiogalaktosid (IPTG) eklenmesi lacUV5 promotör tarafından T7 RNA polimerazın eksprese edilmesini sağlar.

T7 lac Promoter: Yapılan çalışmalar λ DE3 lysogenindeki lacUV5 promotörünün indükleyici madde yokluğunda dahi, T7 RNA polimerazı daima bazal olarak sentezlediği gösterilmiştir (Studier, 1986). Genel olarak, bu bir sorun değildir, fakat ilgilendiğimiz gen ürünü *E.coli* için toksik ise, bu genin bazal ekspresyonu plazmidin kararsızlığına ve hücre ölümüne neden olabilir. Bu problemi gidermek için pETSUMO vektörüne ilgili genin ekspresyon kontrolü için, T7 lac promotör bölgesi yerleştirmiştir. T7 lac promatörü T7 promatörü içerisine yerleştirilmiş lac operatör sekansından oluşmaktadır. Lac operatör, lac I geni tarafından sentezlenen lac represörünün bağlanabileceği bölgeyi içerir. Bu şekilde BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmış olan genin bazal transkripsiyonunu başlatan T7 RNA polimerazın baskılanması sağlanır.

3.1.4.4. Protein klonlama ve ekspresyon vektörü

PETSUMO plazmidi rekombinant olarak üretilmek istenen proteinin N terminal bölgesine, 13 kDa büyüklüğündeki His-SUMO proteinini rekombinant olarak bağlanarak (füzyonu) üretilmesini sağlayan bir protein ifade vektörüdür. Vektör üzerinde protein ifadesi tac promotörü altında sıkı (sızıntısız transkripsiyon) bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu promotor bölge laktoz analogu olan izopropil- β -D-tiogalaktosidaz (IPTG) ile indüklenerek protein ifadesi başlatılır. Üretilen protein His-SUMO proteinine bağlı olarak üretilir ve saflaştırılması adımı sadece His (histidine) proteinine bağlanabilen Ni-NTA agaroz partikülleri kullanılır. Bu sayede füzyon proteininin His-SUMO kısmı bu partiküller tarafından tutularak ifadesi yapılmış olan proteinin saflaştırılması sağlanır. Eğer istenirse füzyon proteini sumo proteaz enzimi ile kesilerek His-SUMO proteininin üretilen proteinden ayrılması da sağlanabilir.

pETSUMO plazmidi PCR ile üretilen genlerin klonlanması amaçlanarak üretilmiştir. Plazmidin klonlama bölgesinin 3' uçlarına bir adet ekstra timin bazı yerleştirilmiş ve plazmid üzerinde bulunan 5' uçların fosfat grupları çıkarılmıştır. Bu sayede plazmidin ligasyon esnasında halkasal yapı oluşturması engellenerek klonlama etkinliği artırılmıştır. Bu tür plazmidlere yapılacak olan klonlamanın gerçekleşebilmesi için klonlanacak parçanın 3' kısmında sarkan adenin bazı (karşı iplikte tamamlayıcısı olmayan) olmalıdır. Böylelikle klonlanacak parçada bulunan sarkan A bazı ile plazmidde bulunan sarkan T bazı ligasyon ile hibridize olur. Fosfat eksikliğinden dolayı birleşmeyen diğer uçlar ise transformasyondan sonra konağın DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılır, böylelikle tam bir halkasal DNA molekülü oluşmuş olur. Klonlama bölgesi vektör üzerinde β -galatosisidaz enzimini üreten lac-Z geni içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede pozitif klonların taranması kolonilerdeki renk farklılığına göre yapılabilmektedir.

PETSUMO vektörü hem klonlama hem de ekspresyon vektör özelliğine sahiptir. İstenilen gen bölgesi vektöre yerleştirildikten sonra, restriksiyon endonükleazları kullanıp insert edilen geni tekrardan çıkarıp başka bir vektöre

klonlamaya gerek kalmaz. Ayrıca SUMO vektör sistemi, yüksek aktivite ve spesifitede protein ekspresyonu sağlayan, *E.coli*'nin T7 promotör bölgesinin heteroluğu olan bakteriyofaj T7 RNA polimeraz sistemine sahiptir.

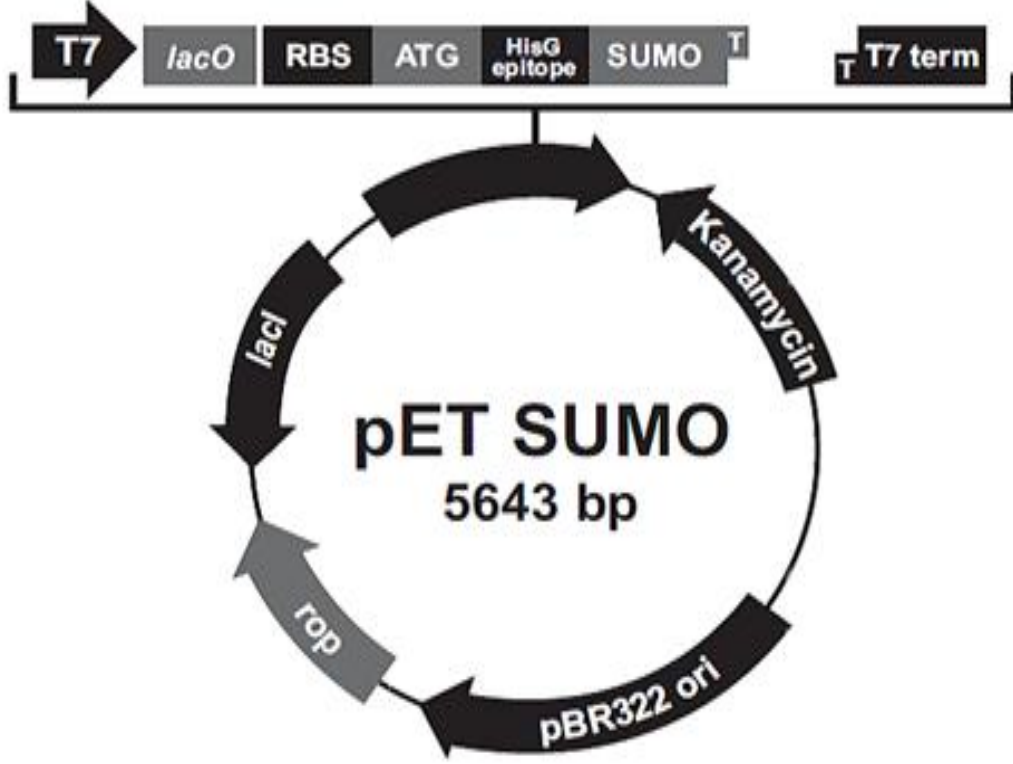
SUMO proteini *Saccharomyces cerevisiae*'dan elde edilen Smt3 türü bir proteindir. Smt3 proteini 11 kDa ağırlığında olup memelilerdeki SUMO-1 proteinin homologudur. Bu vektördeki smt3 proteini sumo olarak adlandırılır. SUMO proteini apoptosis, nuclear transport ve hücre döngüsü gibi çeşitli olayların düzenlenmesinde rol oynayan ubikuitin benzeri bir proteindir. SUMO ubikuitin gibi lizin yan zinciri ile hedef proteine kovalent bağ ile bağlanır. Bununla birlikte, ubikuitin modifikasyonu aksine, SUMO modifikasyonu protein yıkımından ziyade proteinin fonksiyon ve aktiviteleri üzerinde değişikliğe yol açar.

Bu vektör üzerinde yapılan çalışmalar rekombinat proteinin üretim miktarında ve çözünürlüğünde önemli düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir. SUMO proteinin tersiyer yapısı bir sistein proteaz tarafından tanınmaktadır. Sumoproteaz özellikle hedef proteini SUMO'dan ayırır (Li ve Hochstrasser, 1999; Mossessova ve Lima, 2000). PETSUMO sistemiyle üretilen proteinler, sumoproteaz yardımıyla sumo proteininden ayrılır. SUMO proteini ve hedef protein arasında ekstra amino asitler eklenmediğinden sumo proteinden hemen sonra hedef proteinin başlangıç a.asiti yer alır.

Kanamisin direnç gen bölgesi klonlanan *E.coli*'lerin seçimini sağlar. lacI geni; lac repressörünü sentezleyerek PETSUMO vektör sisteminde Pet T7 lac promotöründen ve *E.coli*'nin ana kromozumu üzerindeki lacUV5 promotörünün bazal transkripsiyonunu azaltır. pBR322 origin bölgesi replikasyonun azalması ve *E.coli*'de bakımını sağlar.

T/A klonlama; pETSUMO vektörü PCR ürünlerinin direkt olarak hızlı bir şekilde tek basamakta vektöre aktarılmasını sağlar. Taq polimeraz template DNA'ya gereksinim olmaksızın PCR ürününün sonuna tek A bazı ekler. PETSUMO vektörünü

ucuna tekli T bazı eklenerek lineer hale getirilmiştir. Bu yapı ucunda A bulunan PCR ürünlerin vektör içerisine eklenmesini sağlar.



Şekil 3.3. pETSUMO vektör haritası

Çizelge 3.1. pETSUMO vektöründe bulunan yapı ve özellikleri

ÖZELLİK	FAYDASI
T7 promotör	<i>E.coli</i> suşlarında IPTG ile indüklenerek T7 RNA polimerazın üretilmesini sağlar. Bu yapıda rekombinant proteinin yüksek oranda sentezlenmesini sağlamaktadır.
lac operatör (lacO)	lac repressor bağlanma bölgesidir. Bu yapı rekombinant proteinin bazal ekspresyonunu azaltır.
Ribosome binding site	T/A klonlamada optimal aralığa sahiptir. PCR ürünlerinin yeterli oranda translasyonunu sağlar.
N-terminal 6xHis tag	Rekombinant proteinin Ni-NTA kolonlarında saflaştırılmasını sağlar. Anti-HisG antikorları kullanılarak rekombinant proteinlerin tespit edilmesini sağlar.
SUMO ORF	Rekombinant proteinin ekspresyonu ve çözünürlüğünün artmasını ayrıca, sumoproteaz tarafından kesilmesini sağlayarak doğal proteinin elde edilmesini sağlar.
SUMO Forward priming site	Vektöre eklenen genin sekans analizini sağlar.
TA Cloning® site (5' T-overhangs)	PCR ürünlerin direk olarak ligasyonunu sağlar.
T7 Reverse priming site	Eklenen genin sekans analizini sağlar.
T7 transcription termination region	Bakteriyofaj T7 sekansıdır. Transkripsiyonun verimli bir şekilde sonlanmasını sağlar.
Kanamycin resistance gene	Transformant <i>E. coli</i> hücrelerinin seçici besiyeri ortamında ayırt edilmesini sağlar.
pBR322 origin of replication (ori)	Vektörün <i>E.coli</i> içerisinde kopyalanmasını ve stabil bir halde kalmasını sağlar.
ROP ORF	pBR322 origin ile etkileşime girerek düşük sayıda kopya oluşumunu sağlar.
lacI ORF	lac repressor kodlayan bölgedir. T7 lac promotör bölgesine bağlanarak rekombinant proteinin bazal ekspresyonunu azaltır. Ayrıca <i>E.coli</i> hücrelerini genomundaki lacUV5 bölgesine bağlanarak T7 RNA polimeraz üretimini engeller.

3.1.5. Kullanılan Besiyerleri

3.1.5.1. S.O.C besiyeri

S.O.C besiyeri antibiyotik içermeyen bir besiyeri olup, transformasyon işleminden sonra strese girmiş olan bakteri hücrelerinin kendini toparlaması için kullanılır. Besiyerinin bileşenleri aşağıda verilmiştir.

S.O.C. Medium	2% Tryptone
	0.5% Yeast Extract
	10 mM NaCl
	2.5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM glikoz

3.1.5.2. LB (Luria-Bertani) sıvı besiyeri

E.coli One Shot® Mach1 ve BL21 (D3) bakterilerin plazmid izolasyonu ve protein ekspresyonu çalışmalarında çoğalması için hazırlanan besiyeridir. Bu besiyerine son konsantrasyonu 50 µg/ml kanamisin olacak şekilde kanamisin eklenerek, yalnızca plazmidi içeren bakterilerin çoğalması sağlanmaktadır. Ayrıca besi ortamına sonradan eklenen %1'lik glikoz, bakterinin bazal ekspresyon mekanizmasını inhibe ederek, yalnızca ortama IPTG eklendiğinde protein ekspresyonu sağlayarak protein ekspresyon verimini artırır.

LB (Luria-Bertani) Besiyeri

Tryptone	% 1.0	10 g
Yeast Extract	% 0.5	5 g
NaCl	% 1.0	10 g

1. Yukarıda verilen maddeler 500 ml deiyonize suda çözüldükten sonra NaOH ile pH; 7,0'ye ayarlandı. Deiyonize su ile 900 ml'ye tamamlandı.
2. 121 °C, 1 atm basınçta 20 dk otoklav edildi.
3. Otoklavlanarak steril edildikten sonra oda ısısında soğutuldu, sıcaklık 55 °C'ye indiğinde kanamisin eklenip karıştırıldı.
4. Toplam hacimde % 1 glikoz olacak şekilde 10 g glikoz 100 ml deiyonize steril suda çözüldükten sonra 0,22 µm filtre ile steril edilip, besiyeri glikoz çözültisi ile 1L 'ye tamamlanarak, +4 °C 'de saklandı.

3.1.5.3. LB (luria-bertani) katı besiyeri

LB katı besiyeri transformasyon işleminden sonra pozitif bakteri kolonilerinin ayırt edilmesi için kullanılır. İçeriği sıvı besiyeri ile aynı olup temel fark ortamda bulunan agardır.

LB Agar (Luria-Bertani) Besiyeri

Tryptone	% 1.0	10 g
Yeast Extract	% 0.5	5 g
NaCl	% 1.0	10 g
LB agar	% 1.5	15 g

1. Yukarıda verilen maddeler 500 ml deiyonize suda çözüldükten sonra NaOH ile pH; 7,0'ye ayarlandı. Deiyonize su ile 900 ml'ye tamamlandı.
2. 121 °C'de, 1 atm basınçta 20 dk otoklav edildi.
3. Otoklavlanarak steril edildikten sonra oda ısısında soğutuldu, sıcaklık 55 °C indiğinde kanamisin eklenip karıştırıldı.
4. Toplam hacimde % 1 glikoz olacak şekilde 10 g glikoz 100 ml deiyonize steril suda çözüldükten sonra 0,22 µm filtre ile steril edildikten sonra besiyeri üzerine konulup 1L'ye tamamlandı.
5. Laminar kabinde 20 ml besiyeri, petri kaplarına konarak kapakları yarı açık halde bırakılıp katılaşması sağlandı.
6. Besiyeri katılaştıktan sonra, LB agar petrileri ters çevrilerek +4 °C'de saklandı.

3.1.6. ELISA testinde kullanılan kan serumları

Bu amaçla Şanlıurfa'daki çeşitli hastanelerin mikrobiyoloji laboratuarlarına başvurmuş, Rose Bengal Testi pozitif, Tüp Aglütinasyon Test sonucu 1/320 olan 30 brucella enfeksiyonlu hastanın kan serumları toplandı. Ayrıca negatif kontrol olarak kullanılmak üzere şu ana kadar brucella enfeksiyonu geçirmemiş Rose Bengal Test sonucu negatif, 30 kişinin kan serumu kullanıldı.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan brucellozlu hasta ve sağlıklı insan bilgileri

	Cinsiyet	Yaş ort	Rose bengal test sonucu	Tüp aglütinasyon titresi
Brucellozlu hasta	13 Kadın 17 Erkek	26,56	(+)	1/320
Negatif kontrol	18 Erkek 12Kadın	25,3	(-)	-

3.2.Yöntem

3.2.1. *Brucella Melitensis* Rev1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu GF-1 Bakteriyal DNA izolasyon kiti (vivantis) kullanılarak yapıldı. Bakteriyal DNA izolasyon kiti gram negatif ve gram pozitif bakterilerden yaklaşık olarak 20 µg genomik DNA'yı saflaştırmak için dizayn edilmiştir. Kit; cam filtre membranlarından oluşan kolonlara yüksek tuz ortamında DNA'nın bağlanması prensibine dayanır. Spin kolon teknolojisi kullanılarak çeşitli yıkama tamponları ile DNA haricindeki hücresel bileşenlerin ortamdan uzaklaşmasını sağlayarak, en son aşamada düşük yoğunluklu tuz ile DNA'nın elüsyonunu sağlar. Kolondan elüe edilen DNA miktarı $A_{260/280}$ 1,7 -1,9 civarında olup, PCR reaksiyonunda kullanılabilir safliktadır.

DNA izolasyon protokolü aşağıdaki işlemlerden oluşmaktadır.

1. Daha önceden çoğaltılıp, liyofilize edilen *Brucella melitensis* Rev 1 kültür ortamından 4 ml alınarak 10.000 x g'de oda ısısında 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı.
2. Kalan pelet 100 µl Tampon R1 ile karıştırılıp, süspansiyon hale getirilinceye kadar pipetlendi. (Bakterilerin iyice parçalanabilmesi için peletin tam olarak karışması gerekir)
3. Hücre süspansiyonunun üzerine 10 µl lizozim (50 mg/ml) eklendikten sonra karıştırılıp, 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi.
4. 10,000 x g 'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısmı atıldı.
5. Kalan pelet üzerine, 180 µl buffer R2 ve 20 µl proteinaz K ilave edilip karıştırıldıktan sonra, 65 °C'deki çalkalamalı inkübatörde 20 dakika inkübe edildi.(inkübasyonun sonunda lizatın homojen şeffaf bir hale gelmesi gerekmektedir)

6. Ortamdaki RNA'yı uzaklaştırmak için ortama 20 µl RNase (20mg/ml) ilave edilip 37 °C 'de 5 dakika inkübe edildi. (Bu işlem sırasında kalan kalıntı RNA parçaları kolon yıkaması sırasında ortamdan uzaklaştırılır).
7. Tüpteki çözelti miktarının iki katı kadar (yaklaşık 440 µl) buffer BG eklenip tüp birkaç kez alt üst edilerek ortamın homojenize edilmesi sağlandı. Sonrasında 65 °C'de 10 dakika inkübe edildi.
8. 200 µl saf etanol ilave edilip hızlıca karıştırıldı.
9. Karışım kolona yüklenip, 10,000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibine geçip, kalan sıvı ortamdan uzaklaştırıldı.
10. Kolon üzerine 750 µl wash buffer ilave edilip, 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibindeki sıvı atıldı.
11. Kolona herhangi bir şey eklemeden, kolonda kalan fazla etanolü uzaklaştırmak için 10,000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi.
12. Kolon temiz bir tüpe alınarak, kolon üzerine 100 µl elüsyon buffer ilave edilip, 10,000 x g 'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün dibinde kalan sıvı içerisinde saf genomik DNA bulunmaktadır.
13. Elde edilen DNA %1'lik agaroz jel elektroforezinde yüklenip, incelendikten sonra, kullanılmaya kadar – 20 °C 'de saklandı.

3.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi

1. %1'lik agaroz jel için 1,8 gr agaroz, 180 ml TAE buffer içerisinde çözüldükten sonra ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda eritildi.
2. Sıcaklık 55 °C'ye indikten sonra konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi.
3. Agaroz jel tankına döküldükten sonra oda ısısında donması sağlandı. Elde edilen jel TAE buffer içeren tanka yerleştirildikten sonra tarak çıkarıldı.

4. 10 µl DNA örneği 2 µl 6X loading buffer ilave edilip karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.
5. Elektroforez 120 volt'da, 80 dakika yüzdürüldükten sonra, UV₂₅₄ nm jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.2.3. Klonlama işlemleri

3.2.3.1. Omp28 precursor geninin genomik kopyasının üretilmesi için gene özgü primerlerin tasarlanması

Brucella melitensis Rev1 omp28 precursor proteinine ait gen dizilimi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ve <http://www.uniprot.org/> sitelerinden, **Brucella melitensis strain Rev1 Omp28 precursor (omp28) gene, complete cds GenBank: AY634231.1** olarak tespit edildikten sonra; ilgili gen bölgesi için LightCycler Probe Design Software 2 (Roche) programı kullanılarak primer dizayn'ı yapıldı.

Gen bölgesinin ismi; ***Brucella melitensis* strain Rev1 Omp28 precursor (omp28) gene, complete cds**

GenBank: AY634231.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS AY634231 753 bp DNA linear BCT 28-JUN-2004

DEFINITION *Brucella melitensis* strain Rev1 Omp28 precursor (omp28) gene,complete cds.

ACCESSION AY634231

VERSION AY634231.1 GI:49090354

KEYWORDS .

SOURCE *Brucella melitensis*

ORGANISM *Brucella melitensis* Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;Brucellaceae; Brucella.

REFERENCE 1 (bases 1 to 753)

AUTHORS Chaudhuri,P., Prasad,R. and Kumar,V.

TITLE Cloning and sequencing of Omp28 gene of *Brucella melitensis* Rev1 strain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 753)

AUTHORS Chaudhuri,P., Prasad,R. and Kumar,V.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-MAY-2004) Bacteriology, Indian Veterinary Research Institute, Bareilly, Uttar Pradesh 243122, India

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..753
 /organism="Brucella melitensis"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="Rev1"
 /db_xref="taxon:29459"

gene 1..753
 /gene="omp28"

CDS 1..753
 /gene="omp28"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="Omp28 precursor"
 /protein_id="AAT51971.1"

/db_xref="GI:49090355"

/translation="MNTRASNFLAASFSTIMLVGAFSLPAFAQENQMTTQPARIAVTG

EGMMTASPDMAILNLSVLRQAKTAREAMTANNEAMTKVLDAMKKAGIEDRDLQTGGIN

IQPIYVYPDDKNNLKEPTITGYSVSTSLTVRVRELANVVKILDESVTLGVNQGGDLNL

VNDNPSAVINEARKRAVANAIKAKTLADAAGVGLGRVVEISELSRPPMPMPIARGQF

RTMVAAAPDNSVPIAAGENSYNVSVNVVFEIK"

ORIGIN

>gi|49090354|gb|AY634231.1| Brucella melitensis strain Rev1 Omp28 precursor (omp28) gene, complete cds

ATGAACACTCGTGCTAGCAATTTCTCGCAGCCTCATTTTCCACAATCATGCTCGTTCGGCGCTTT
 CAGCCTGCCCGCTTTTCGCACAGGAGAATCAGATGACGACGCAGCCCGCGCGCATCGCCGTCACCG
 GGAAGGCATGATGACGGCCTCGCCGATATGGCCATTCTCAATCTCTCGGTGCTACGCCAGGCA
 AAGACCGCGCGCAAGCCATGACCGCAATAATGAAGCCATGACAAAAGTGCTCGATGCCATGAA
 GAAGGCCGGCATCGAAGATCGCGATCTCCAGACAGGCGGCATCAATATCCAGCCGATTTATGTCT
 ACCCTGACGACAAGAACAACCTGAAAGAGCCTACCATCACCGGCTATTCTGTATCCACCAGTCTC
 ACGGTTTCGCGTGCGCAACTGGCCAATGTTGGAAAAATTTGGATGAATCCGTCACGCTCGGTGT
 TAATCAGGGCGGTGATTTGAACCTGGTCAATGATAATCCCTCCGCCGTGATCAACGAGGCGCGCA
 AGCGCGCAGTGGCCAATGCCATTGCCAAGGCGAAGACGCTTGCCGACGCTGCAGGCGTGGGGCTT
 GGCCGTGTGGTGGAAATCAGTGAACCTGAGCCGCCCGCCCATGCCGATGCCAATTGCGCGCGGACA
 GTTCAGAACCATGGTAGCAGCCGCACCGGACAATTCGCTGCCGATTGCCGAGGCGAAAACAGCT
 ATAACGTATCGGTCAATGTCTGTTTTTGAATCAAGTAA

Dizayn edilen primerler:

Forward 5' -ACATTGGATCCATGAACACTCGTGCTAGC-3'
 Reverse 5' CGGCCAAGCTTTTACTTGATTTCAAAAACGACA-3'

SUMO Forward 5' -AGATTCTTGTACGACGGTATTAG-3'
 T7 Reverse 5' -TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

3.2.3.2. PCR ile omp28 precursor gen bölgesinin çoğaltılması

Omp28 precursor gen bölgesinin plazmid vektörüne klonlanması ve gen bölgesinin istenilen miktarda çoğaltılması için PCR yapıldı.

- 1- PCR işlemi için çizelge 3,3'te verilen PCR bileşenleri belirtilen miktarda ince çepirli ısı iletimi fazla olan PCR tüpüne konularak hazırlandı.

Çizelge 3.3. PCR'da kullanılan madde miktarları

Madde	Konsantrasyon	Miktar
Taq buffer	10x	5 µl
MgCl ₂	50 mM	1,5 µl
dNTP	10 mM	1 µl
Primer F	10 pmol/ µl	1 µl
Primer R	10 pmol/ µl	1 µl
DNA	200 ng	4 µl
Taq DNA polimeraz	5U/ µl	0,25 µl
Saf su	deiyonize	36,25 µl
	Toplam	50 µl

- 2- PCR bileşenleri laminar kabin içerisinde herhangi bir kontaminasyon olmayacak şekilde buz üzerindeki PCR tüpüne konulduktan sonra, tüp dibinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde iyice karıştırılıp PCR cihazına konuldu.

- 3- PCR işlemi çizelge 3,4'te verilen program kullanılarak yapıldı. Kullanılan vektör sistemine klonlama için; klonlanacak parçaların uç kısımlarında A bazına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle klonlanacak parçaların uç kısımlarına A bazı eklenmesi gereklidir. Thermus cinsine ait birçok polimeraz enziminin 3' ucuna polimerizasyon sonrasında ekstradan bir baz ekleme (genellikle adenin) özelliği

vardır. Burada polimeraz enzimini bu özelliğini ortaya çıkarmasını sağlamak için final extension safhası 10 dk yapılarak bu işlemin yapılması sağlandı. PCR programının son safhasında 72 °C'de 10 dk uygulanarak taq polimeraz enziminin PCR ürünün uç kısımlarına Poli Adeninleri eklenmesi sağlandı.

Çizelge3.4. PCR programı

	sıcaklık	süre	
Initial denaturation	94 °C (ön denatürasyon)	3 dk	30 döngü
Denaturation	94 °C	3 dk	
Annealing	60 °C	45 sn	
Extension	72 °C	1 dk	
Final extension	72 °C	10 dk	

4- PCR işlemi sonucunda, ürünün 10 µl'si agaroz jel elektroforezine yüklenerek, istenilen PCR ürünün oluşup oluşmadığı kontrol edildi.

3.2.3.3. Ligasyon

PCR ile çoğaltılan gen bölgesinin vektöre eklenmesi için yapılan bir işlemdir. Bu çalışmada kullanılan vektör uç kısımlarına timin nükleotidleri eklenerek, linear bir yapıya getirilmiştir, bu sayede PCR sonucunda uç kısmında A bulunan PCR ürünü T ile etkileşime girerek hidrojen bağlarıyla bağlanır. Ortamda bulunan DNA T4 ligaz enzimi ise bu bağı kovalent haline getirerek genin vektöre eklenmesi sağlanır. Ligasyon aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır.

1- Optimal ligasyon verimliliği için taze (en fazla 1 gün önce) PCR ürünü gerekmektedir. PCR ürünün ucunda bulunan A grupları zamanla bozunduğu için, ligasyonun etkinliği azalacaktır, bu yüzden bu PCR ürünün taze olarak kullanılması gerekir.

Fazla miktarda PCR örneği kullanılırsa PCR örneklerinde bulunan tuzlar T4 DNA Ligazı inhibe edebilir. Bu yüzden ligasyon işleminde kullanılacak PCR ürünün optimize edilmesi gerekir. 1:1 oranında vektör: PCR ürünü ligasyon için en verimli

orandır. Genellikle 0,5 ile 1,0 µl tipik PCR ürünü ortalama gen uzunluğu (400-700 bp) arasında ise 1:1 vektör: istenilen gen bölgesi oranını vermektedir.

2- Ligasyon için aşağıdaki tabloda verilen maddeler PCR tüpüne konuldu.

Çizelge 3.5. Ligasyon işleminde kullanılan madde miktarları

	Miktar
Taze PCR ürünü	2 µl
10X Ligasyon Buffer	1 µl
pET SUMO vector (25 ng/µl)	2 µl
Steril su	4µl
T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units)	1 µl
toplam	10 µl

3- Ligasyon karışımı hazırlandıktan sonra PCR cihazında 15 °C'de gece boyunca (8 saat) inkübasyona bırakıldı.

4- Hazırlanan ligasyon örneği kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.4. One Shot® mach1™-t1r kompotent hücrelerine transformasyon

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmidin çoğaltılması veya protein ifadesinin gerçekleştirilmesi için kompotent hücrelere plazmidin aktarımı gereklidir.

Transformasyon öncesinde aşağıda verilen hazırlık aşamalarının yapılması gerekir.

1- Daha önceden hazırlanan 50 µg/ml kanamisin içeren LB petrilere 37 °C'de 30 dk inkübe edildi.

2- S.O.C. besiyeri oda ısısında bekletip ılıklaştırıldı.

3- Transformasyonda kullanılacak 1 şişe One Shot® hücreleri buz üzerinde eritildi.

Hazırlık işlemi tamamlandıktan sonra transformasyon işlemine geçildi.

1-Kompetent One Shot® *E. coli* hücreleri -80 °C'den alınıp ve buzda 5 dakika süre ile bekletildi.

2- Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenip, pipetleme yapmadan, hafif bir şekilde karıştırdıktan sonra, buzda 30 dakika süre ile bekletildi.

3- Süre sonunda örnekler buzdan alınıp, 42 °C'ye ayarlanan ısı bloğuna yerleştirildi (Bu aşamada hücre membranındaki porların açılarak plazmidlerin hücre içerisine girmesi sağlanır).

4- Hücreler ısı bloğunda 30 saniye süre ile bekletildikten sonra, hemen buza alınarak 3 dakika buzda bekletildi (Burada 42°C ve buzda bekletilme süreleri önemlidir ve aşılmamalıdır).

5- Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 250 µl oda ısısında bekletilen S.O.C. besiyeri eklendi.

6- 37 °C'de orbital shakerde 200 rpm ve 37 °C'de 1 saat süre ile inkübe edildi.

7- Kültür ortamından; 150 ve 100 µl alınarak, önceden ılık hale getirilmiş iki farklı seçici besiyeri petrilere yayılıp, bir gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. (Hücreler katı besiyerine ekildiklerinde çok fazla üremeye bağlı petri yüzeyini kaplayarak, halı oluşturabilir ve bu nedenden dolayı, tekli koloniler seçilemez. Bu yüzden iki farklı petriye ekim yapılarak tekli koloni oluşumu sağlanır)

3.2.5. Transformasyon hücrelerinin analiz edilmesi

Transformasyon işleminden sonra kanamisinli seçici besiyerine ekilen hücrelerden plazmid transfer edilen hücreler, kanamisine dirençli gen bölgesi içerdiğinden dolayı ortamda çoğalırken, plazmid içermeyen hücreler kanamisine karşı direnç gösteremediklerinden dolayı ölürlür. Fakat ortamda çoğalan kolonilerin hepsi istenilen plazmidi içermemektedir. Besi ortamında çoğalan koloniler; 1- omp28 precursor genini içermeyen plazmidlere sahip koloniler 2- omp28 precursor gen bölgesi N ve C terminal kısımları ters yerleşmiş koloniler 3- omp28 gen bölgesini doğru bir şekilde içeren koloniler. Bu koloniler içerisinde istenilen koloniyi seçmek için; farklı özelliklere sahip koloni PCR işlemleri yapıldıktan sonra istenilen koloni seçilerek yola devam edildi.

Koloni PCR üç farklı PCR işleminden oluşmaktadır:

1- Çapraz PCR A (omp28 precursor Forward ve T7 reverse primerleri): omp28 precursor gen bölgesinin forward primeri ve plazmidin T7 reverse primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılır. Bu PCR sonucunda elde edilen ürün miktarı 858 bp olacaktır.

2- Çapraz PCR B (omp28 precursor reverse ve sumo forward primerleri) : omp 28 precursor gen bölgesinin reverse primeri ve plazmidin sumo forward primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılır. Bu PCR sonucunda elde edilen ürün miktarı 900 bp olacaktır.

3- Koloni PCR (omp28 precursor Forward ve omp28 precursor reverse): omp28 Forward ve omp28 reverse primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılır. PCR sonucunda omp28 precursor gen bölgesi (753 bp) elde edilecektir.

Koloni PCR işlemi aşağıdaki işlemlerden oluşmaktadır:

1- 50 µg/ml kanamisin içeren LB petrilerinde bulunan pozitif kolonilerden on tanesi seçilerek petri üzerinde işaretlendi.

2- Mevcut pozitif kolonileri korumak için kürdanla alınan koloniyi önce başka bir petriye ekip kopyalandıktan sonra 20 µl steril su içeren tüp içerisinde süspansiyon edildi.

3- Elde edilen reaksiyon karışımı; hücreleri parçalamak ve nükleazları inhibe etmek için 94 °C'de 10 dk inkübe edildi.

4- 10,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Plazmid içeren süpernatant alınarak yeni tüplere konuldu.

5- Bu şekilde elde edilen süpernatant koloni PCR sırasında template DNA olarak kullanıldı. PCR işlemi aşağıdaki tabloda verilen programa göre hazırlandı.

Çizelge 3.6. Kontrol PCR programı

	sıcaklık	zaman	
Initial denaturation	94 °C (ön denatürasyon)	3 dk	
Denaturation	94 °C	3 dk	35döngü
Annealing	55 °C	1dk	
Extension	72 °C	1 dk	
Final extension	72 °C	10 dk	

6- PCR ürünü % 1' lik agaroz jelde görüntülendi.

7- Elde edilen pozitif kolonilerin tekleştirilmesi için koloniler, 50 µg/ml kanamisin içeren LB petrilerine ekildi.

8- Petrilerde oluşan kolonilerden tek bir koloni izole edilip, 50 µg/ml kanamisin içeren 1-2 ml LB besiyerine konuldu.

9- Bu kültür ortamında bakteriler durağan faza ulaşmaya kadar çoğaltıldıktan sonra; 0,85 ml kültür ortamı 0,15 ml steril gliserol ile karıştırılıp, cryoviallere konularak -80 °C'de saklandı.

3.2.6. Plazmid izolasyonu

Plazmid izolasyonu klonlamanın kontrol edilmesi için ya da plazmidin protein ifade konakçısına aktarılması için yapılabilir. Bunun dışında klonlanan parçanın kalıp olarak kullanılarak üzerinde değişiklik yapılması veya tekrar çoğaltılması amacıyla da plazmid izolasyonu yapılabilir. Koloni PCR sonucunda pozitif olduğu tespit edilen koloniden; protein ekspresyonu yapan *E.coli* BL21 hücrelerine transformasyon ve sekans analizi için plazmid izolasyonu yapıldı.

Plazmidler One Shot® Mach1™-T1R *E.coli* içerisinde düşük oranda kopyalandıkları için istenilen oranda plazmid elde etmek için hücrelerin yüksek miktarda kültür ortamında çoğaltılması gerekmektedir. Yeterli miktarda hücre çoğaltıldıktan sonra plazmid izolasyon aşamalarına geçildi.

1. Gece boyunca çoğaltılan One Shot® Mach1™ T1R *E.coli* hücrelerinden 8 ml alınıp 12,000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.
2. Elde edilen pelet üzerine 200 µl resüpsension çözeltisi ilave ettikten sonra homojen oluncaya kadar pipetleme yapılarak karıştırıldı.
3. Süspanse edilen karışım üzerine 200 µl lizis buffer eklendikten sonra karışım viskoz ve açık bir hale gelinceye kadar, tüpler 6-8 defa hafifçe alt üst edilerek karıştırılıp, oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
4. 350 µl nötrolizasyon tamponu eklendi. Tüp 6-8 kez alt üst edilerek karıştırıldı. Karışım 12,000 x g'de 10 dk santrifüj edilerek, plazmid DNA dışındaki genomik DNA, protein, lipid gibi yapıların, bulutumsu bir yapı gibi dibe çökmesi sağlandı
5. Kolon tüp içerisine konuldu. Kolon üzerine 500 µl kolon hazırlama solüsyonu konulduktan sonra 12,000 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı dökülerek kolon hazır hale getirildi.
6. Hazırlanan kolon üzerine süpernatant yüklendi. 12,000 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı döküldü.

7. Kolon üzerine 500 µl wash solution 1 eklenip, 12,000 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı döküldü.
8. Kolon üzerine 750 µl wash solution 2 eklendikten sonra, 12,000 x g'de 1 dk santrifüj edilip, dipte kalan sıvı döküldü. Bu sayede kolondaki tuzlar ve kalıntılar ortamdan uzaklaştırıldı.
9. Herhangi bir şey eklemeyen kolon 12,000 x g'de 1 dk santrifüj edilerek etanol ortamdan uzaklaştırıldı.
10. Kolon yeni bir tüpe konularak üzerine 100 µl elüsyon buffer eklenip, 12,000 x g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan plazmidli sıvı toplanarak, -20 °C ' de kullanıncaya kadar depolandı.
11. Plazmidlerin 10 µl'si % 1'lik agaroz jelde görüntülendi.
12. İzole edilen plazmidlerin bir kısmı kullanılarak çapraz PCR işlemi yapıldı. PCR ürünü % 1'lik agaroz jelde görüntülendi.
13. Çapraz PCR sonucu pozitif olan plazmidlerin bir kısmıyla'da sekans analizi yapıldı.

3.2.7. Sekans analizi

Sekans analizi, plazmid içerisine yerleştirdiğimiz genlerin doğru yönde yerleşip yerleşmediğini ve N- terminal kısmında tag füzyon proteinin bulunup bulunmadığını kontrol etmek amacıyla yapıldı. Bu işlem için plazmide özgün SUMO Forward ve T7 Reverse primerleri kullanıldı. Sekans analizi; genoks firması (Ankara) tarafından Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi, kullanılarak sekans analiz cihazı (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) kullanılarak otomatik (Fluoresan İşaretleme) dizi Analizi yapıldı. Elde edilen sekans sonucu <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> programları kullanılarak incelendi.

3.2.8. Protein ekspresyon çalışmaları

3.2.8.1. BL 21 (DE3) one shot® hücrelerine transformasyon

1- Bir şişe BL21(DE3) One Shot® hücreleri buz üzerinde eritildikten sonra, hücrelerin üzerine 5 µl hacimde 10 ng plazmid DNA'sı eklendi, hafifçe karıştırıldı.

2- Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.

3- Hücreler ısı bloğunda çalkalamadan 42 °C'de 30 saniye ısı şokuna tabi tutuldu.

4- Isı şokundan hemen sonra tüp buz üzerine alınarak, 5 dk inkübe edildi.

5- Tüpün üzerine 250 µl oda ısısında bekletilmiş S.O.C. medium eklendi.

6- Tüpün kapağı kapatıldıktan sonra, orbital shakerde 200 rpm ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

7- Tüpte transformasyona uğramış olan karışımından 100 µl alınarak, önceden ılık hale getirilmiş 50 µg/ml kanamisin içeren LB petrilere yayılarak 37°C'de inkübe edildi.

8- İnkübasyon sırasında oluşan kolonilerden en iyi gelişen üç koloni seçilerek kontrol PCR işlemi yapıldı.

9- Kontrol PCR işleminden sonra pozitif olan koloni 10 ml 50 µg/ml kanamisin içeren % 1 glikozlu LB sıvı besiyerine konularak, orbital shakerli inkübatörde 37 °C, 200 rpm'de gece boyunca inkübe edildi.

10- 1,7 ml kültür ortamının bir kısmı steril gliserol ile karıştırılıp -80 °C'de saklandı.

11- Besiyerinden 500 µl alınarak 10 ml 50 µg/ml kanamisin % 1 glikoz içeren LB besiyerine konuldu.

12- 2 saat 37°C, 200 rpm'de çoğaltıldı. 1 ml alınarak spektrofotometrede 600 nm ölçüldü.

13- Bu sürede OD₆₀₀ de absorbans 0,5'e ulaştıktan sonra; 10 ml besiyeri 5 ml 'lik iki tüpe bölündü. Bu tüplerden birinin üzerine final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. Bu şekilde tüplerin biri IPTG ile indüklenmiş diğeri indüklenmemiş oldu (Bu işlem hangi zaman aralığında protein ekspresyonun fazla olduğunu tespit etmek amacıyla yapıldı).

14- Her iki kültür ortamının 37 °C, 200 rpm'de çoğalmalarına devam edildi. 3 ile 7. saatleri arasında saat başı her iki kültür ortamından IPTG (+) ve IPTG (-) 500 µl örnek alınıp ayrı bir tüpe konuldu.

15- 15,000 rpm 'de 1 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı. Kalan pelet SDS PAGE yapmak üzere -80 °C 'de saklandı.

3.2.8.2. Örneklerin analiz edilmesi

- 1-** 4., 5. 6., ve 7. saatlik inkübasyon süresinden sonra toplanan örnek peletleri 80 µl 1X SDS-PAGE örnek buffer ile karıştırılıp buz üzerine konuldu.
- 2-** 95 °C 'de 5 dakika inkübe edildi,
- 3-** 10,000 rpm'de 2 dk santrifüj edildikten sonra 10 µl'si SDS-PAGE yapıldı. Kalan örnekler -80 °C'de saklandı.

Bu işlem sonucunda hangi saat aralığında protein ekspresyonun optimum olduğu tespit edildi.

3.2.8.3. Rekombinant protein çözünürlüğünün tespit edilmesi

Protein ekspresyonun hangi saat aralığında optimum olduğu tespit edildikten sonra, eksprese edilen proteinin çözünür olup olmadığını test etmek gerekir. Protein ekspresyonu sırasında rekombinant protein üretimi çok fazla olduğundan dolayı, hücre sitoplazmasında membran ile çevrilerek inklüzyon tanecikleri halinde depolanır. Eksprese edilen rekombinant proteinler inklüzyon taneciklerine

dönüşmüşse çözünmez bir yapı kazanır. İnküzyon tanecikleri halinde depolanan proteinler, denatüre şartlar altında lizis edilerek ortaya çıkarılır.

1. Omp28 precursor proteini içeren recombinant BL21(DE3) hücrelerinin kültür ortamından 250 µl alınarak 5 ml 50 µg/ml kanamisinli ve % 1 glikoz içeren LB besiyerine konulup gece boyunca 37 °C, 200 rpm'de inkübe edildi. Bu şekilde yapılan kültür ortamına starter kültür ortamı denir. Bu kültür ortamı protein ekspresyonu için taze kültür ortamı sağlar. Her protein ekspresyonu öncesinde muhakkak starter kültür ortamı hazırlanmalıdır.
2. Starter kültür ortamından 1 ml alınıp 20 ml, 50 µg/ml kanamisin ve % 1 glikoz içeren LB besiyerine ekildi.
3. 2 saat 37°C, 200 rpm'de çoğaltıldı. 1 ml alınarak spektrofotometrede 600 nm ölçüldü.
4. Bu sürede OD₆₀₀ de absorbans 0,5 ulaştıktan sonra; 20 ml' lik besiyeri, 10 ml 'lik iki tüpe bölündü. Bu tüplerin birinin üzerine final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi.
5. 6 saat 37°C, 200 rpm'de çoğaltıldı.
6. 15,000 rpm 'de 2 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı.
7. Kalan pelet PBS ile yıkandıktan sonra, 15,000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı.
8. Kalan pelet üzerine 1,5 ml nativ lizis buffer eklenip karıştırıldıktan sonra üzerine konsantrasyonu 1mg/ml lizozim olacak şekilde lizozim eklendi.
9. 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
10. Lizat üç defa – 80 °C'de dondurulup 42 °C 'de eritildi.
11. 2 dk 40 W 8 sn pulslarla ultrasonikasyonla parçalandı.
12. + 4 °C, 10,000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.

13. Süpernatant 1:1 oranda 2X SDS page bufferla, pelet ise 80 µl 1X SDS bufferla karıştırıldı.

14. 95 °C 'de 5 dk inkübe edilip SDS PAGE yapıldı.

SDS page sonucunda eksprese edilen protein çoğunluğunun pelet kısmında olduğu tespit edildiğinden protein saflaştırma işleminde denatüre lizis metodu uygulandı.

3.2.8.4. Denatüre lizis

1. 50 ml kültür ortamı santrifüj edildikten sonra, elde edilen pelet PBS ile yıkayıp, pelet üzerine 2 ml lizozim (1mg/ml) eklenip karıştırıldı.
2. Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
3. 6 ml denatüre lizis buffer eklendikten sonra karıştırıldı.
4. 10 dk, 40 W, 8 sn pulslarla ultrasonikasyonla buzlu ortamda parçalandı.
5. Oda ısısında 1 saat shakerde inkübe edildi.
6. Oda ısısında 10,000 rpm'de, 30 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant kısmı protein saflaştırma işleminde kullanılmak üzere – 20 °C' de saklandı.

3.2.9. Protein saflaştırma işlemi

PETSUMO vektörü ile rekombinant olarak üretilen proteinler histidin ile füzyon yapıda bulduklarından, proteinlerin saflaştırılması için histidine afinite gösteren Ni- NTA partikülleri içeren kolon kullanıldı.

3.2.9.1. Ni-NTA affinite kolon protokolü

1. Saflaştırma işlemi oda ısısında yapıldı.
2. Kolon fraksiyon kollektörüne bağlandıktan sonra akış hızı 2 ml/dakika olacak şekilde ayarlandı.
3. Kolon içerisindeki etanolü uzaklaştırmak için kolondan 50 ml saf su geçirildi.
4. Kolonu dengelemek için kolona Equibilation buffer yüklendi. Kolondan akan fraksiyonunun absorbans ve pH'sı buffer ile aynı oluncaya kadar bu işleme devam edildi.
5. Protein örneğinin pH ortamını dengelemek için; 5 ml protein örneği: 5 ml Binding /Equibilation buffer ile karıştırılıp 0.45 µl filtrelerden geçirildikten sonra kolona yüklendi. Bu aşamada histidin içeren proteinler kolona bağlanırken bağlanmayan proteinler kolondan akar. Kolondan akan bindig tamponu 1 ml 'lik fraksiyonlar halinde toplandı.
6. Kolon washing buffer ile yıkandı. Histidin haricinde kolona kısmi olarak bağlanan proteinlerin kolondan koparak ayrılması sağlandı. Washing buffer 1 ml lik fraksiyonlar halinde toplandı. Son fraksiyonda protein kalmayınca kadar bu işleme devam edildi.
7. Kolona elüsyon buffer yüklenerek kolona bağlanan rekombinant proteinin ayrılması sağlandı.
8. Elüsyon fraksiyonları toplandıktan sonra kolonun, başka bir saflaştırma işleminde kullanılması için rejenere işlemi yapıldı.

3.2.9.2. Kolon rejenerasyonu

Kolon protein verim ve saflığını etkilemeden birçok kez kullanılabilir. Kolonu her kullanımdan sonra ve saklamadan önce rejenere etmek gerekir. Rejenerasyon işlemi kolona bağlı kalan protein ve imidazolun kolondan ayrılmasını sağlayarak çapraz bağlanmaları azaltır. Ayrıca çapraz bağlanmaları engellemek için her defasında kolona yalnız bir protein örneği yüklenmelidir.

1. Kolon 50 ml MES buffer (20 mM 2-(N- morpholine)-ethanesulfonic acid, 0.1 M Sodium chloride pH. 5.0) ile 1 ml/dakika akış hızında yıkandı.
2. 75 ml deiyonize saf su ile 2 ml/dakika akış hızında yıkandı.
3. Kolon kullanılacaksa Binding/Equilibration buffer ile dengelenir, depolanacaksa 10 ml % 20 etanol yıkandıktan sonra içerisinde etanol kalacak şekilde kollektörden çıkarıp, hava ile temasını engellemek için kapağı kapatılarak + 4 °C'de saklandı.

3.2.10. Protein miktar tayini

Bradford metoduyla protein miktarı ölçüldü. Bu metod 0,1-200 µg protein ölçme hassasiyetine sahiptir.

1. 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.
2. 20 µl örnek ya da standart üzerine 980 µl Bradford ayırıcı eklendikten sonra vortekslendi.
3. Oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
4. Spektrofotometerde 595 nm okundu.

3.2.11. SDS PAGE elektroforezi

Proteinlerin denatüre edilerek büyüklüklerine göre ayrılması SDS PAGE yöntemi ile yapılır. Bu yöntem ile proteinler dimer, tetramer ya da moleküler kompleks oluştursalar bile denatüre formlarında monomer yapıları gözlenir. Yöntem ile oluşturulan jel proteinlerin büyüklük hesaplamasında ve Western Blot'da kullanılabilir.

SDS PAGE jeli iki farklı özellikteki jelden oluşur. Bunlardan ilki ayırma jelidir ve proteinlerin asıl olarak ayrımının yapıldığı jeldir. Sahip olduğu por çapı dar olan bu jel genellikle % 8-12 oranında hazırlanır. Diğer jel ise yığıma jelidir. Bu jel daha geniş por büyüklüğüne sahiptir. SDS'nin proteinleri tam olarak kaplaması ve aynı hızda ayırma jeline yönlendirmesi amacı ile kullanılır. Genellikle % 4-12 oranında hazırlanır.

SDS PAGE işleminin adımları aşağıda verilmiştir.

1. Elektroforez camları kullanılmadan önce su ve alkol ile yıkanarak iyice temizlenir, sonra camlar arasında 0,75 mm olacak şekilde sistem oluşturulur. Öncelikle jelin hazırlanacağı jel dökme aparatı kurularak su ile test edilir. Sızdırma yapmıyorsa jel hazırlanmaya başlanır.
2. Ayırma jeli hazırlanır, jeli hazırlarken en son aşamada TEMED ve APS eklendikten sonra camlara dökülür.
3. Ayırma jeli döküldükten sonra polimerleşmenin sağlanması ve jelin üst kısmının düz bir şekil alması için 0,5 ml izopropanol ayırma jelinin üzerine hafifçe eklenir 30-60 dk arasında oda ısısında jel polimerleştikten sonra, jel üzerindeki izopropanol kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldıktan sonra su ile yıkanır, kurutma kâğıdıyla su uzaklaştırılır.

4. Yığma jeli, ayırma jelinin üzerine döküldükten sonra taraklar yerleştirilir. 30-45 dk arasında polimerleşme sağlanır.
5. Jel hazırlandıktan sonra; Protein örneği 1:1 oranında 2X SDS örnek tamponu ile karıştırıldıktan sonra örnekler buz üzerinde tutuldu, sonra 5 dk 95 °C'de inkübe edildi (SDS oda ısısında eklendiğinde protein örnekleri proteazlar tarafından parçalanır, bunu önlemek için buz üzerinde tutulur, proteazları inhibe etmek için kaynatılır). Kaynama işleminden sonra örnekler oda ısısında soğutuldu.
6. 10,000 rpm 'de 2 dk santrifüj edildikten sonra jelle yüklenir hale getirildi.
7. Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra kuyular 1X SDS elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen monomerler uzaklaştırıldı. Çünkü kuyularda polimerleşme olabileceğinden dolayı kuyulara örnek yükleme işlemi aksar.
8. Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç kısım 1X SDS elektroforez tamponu ile dolduruldu.
9. Örnekler kuyulara aynı miktar ve yoğunlukta eklenir yoksa yan kuyucuklara yayılma olabilir. Kuyucuklara fazla yüklendiğinde bandlarda bozulma gözlenir. Bu yüzden kuyucuklara 20 µl den fazla örnek yüklenmedi.
10. Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için belirteç olarak, Pageruler Prestained markerı (Thermo) kullanıldı.
11. Jeller önce 100 V yürütüldü, bromofenol ayırma jeline geldiğinde akım 120 V çıkarıldı. Bu işlem 2 saat sürdü. Çalışma ortamının ısısı 10-20 °C arasında olmalı ve 5 °C'den düşük olmamalıdır. Ortamın aşırı ısınması bandların eğri olmasına neden olmaktadır.

12. Yürütme işlemi bittikten sonra iç kısımdaki tamponu alttaki tampon ile karıştırmadan döküldü. Dış kısımdaki tampon bir kaç kez daha kullanılabilir.
13. Camlar açılıp jel çıkarıldıktan sonra bir köşesi işaretlenir sonrasında boyama işlemine geçildi.
14. Jel boyama çözeltisinde bir gece boyunca bırakıldı. Sonrasında fazla boyanın giderilmesi için jel yıkama çözeltisine konuldu. Bandlar belirginleşip fazla boya giderildikten sonra jel görüntülendi.

3.2.12. Diyaliz

Diyaliz işlemi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Birinci aşamada ortamdaki üre miktarının uzaklaştırılarak denatüre hale geçen rekombinant proteinin redenatüre hale gelmesini sağlandı. İkinci aşamada ise; kolondan saflaştırma işleminde elüsyon aşamasında kullanılan yüksek tuz konsantrasyonu azaltıldı. Bu sayede sumo kesim işleminin gerçekleşmesi sağlandı.

Optimal sumo proteaz reaksiyonu; < 300 mM NaCl ve < 150 mM imidazol içeren bir tampon içerisinde yapılması gerekir. Sumo proteaz enzimi; belirtilen tuz ve imidazol konsantrasyonun üzerine çıktığında inhibisyona uğramaktadır. Kolondan direk elüsyon edilmiş olan saf proteine, sumo proteaz işlemi uygulanırsa tuz ve imidazol miktarı istenilen miktarın üzerinde çıkacaktır. Bu yüzden tuz ve imidazol miktarını azaltmak için diyaliz işlemi yapıldı.

1. Diyaliz membranı içerisine; saflaştırma işlemi sırasında elüsyon fraksiyonlarından elde edilen rekombinant proteinlerden 2 ml konulup diyaliz torbası mandallarla kapatıldı.
2. Sırasıyla 500 ml $6M \rightarrow 4M \rightarrow 2M \rightarrow 1M$ üre içeren PBS tamponunda + $4^{\circ}C$ 'de manyetik karıştırıcıda 100 rpm hızda her bir gradiente 3 saat boyunca diyaliz edildikten sonra en son aşamada 1L PBS tamponunda gece boyunca diyaliz yapıldı. Diyaliz sonrası elde edilen protein çözeltisinin

konsantrasyonu sumoproteaz kesim reaksiyonda kullanılacak konsantrasyonda olduğu için, protein çözeltisinin konsantre etme işlemine gerek kalmadı.

3.2.13. Western Blot

Western blot analizi; bir dokudan veya toplam protein içerisinde istenilen proteinin belirlenmesi amacı ile kullanılır. Analiz için öncelikle proteinler denatüre edici şartlarda SDS-PAGE ile ya da 3 boyutlu yapı korunarak, denatüre etmeyen şartlarda DOĞAL-PAGE (Native) ile elektroforetik olarak ayrılırlar. Proteinler jelde ayrıldıktan sonra membrana (PVDF, nitroselüloz) aktarılırlar. Sonrasında ise uygun antikorlar ile istenilen protein renklenme veya radyoaktif yöntem ile belirlenir.

1. SDS page yapıldıktan sonra jel boyama işlemine tabi tutulmadı.
2. PVDF (poli vinilidin diflorid) membran jele uygun bir şekilde kesildi.
3. PVDF membran % 100 metanolde 1 dk yıkandıktan sonra distile suyla 3 dk yıkayıp metanol uzaklaştırıldı.
4. PVDF ve SDS page jeli transfer tamponunda 15 dk bekletildi.
5. Üçer adet whatman filtre transfer tamponu içinde ıslatıldı. Transfer sandviçini hazırlamak için, Katot (-) elektrot kısmına whatman filtre kağıdı yerleştirildi.
6. Filtre kağıdının üzerine PVDF membranı konup, havası alındı.
7. Membranın üzerine transfer tamponunda SDS page jeli yerleştirildi.
8. Jelin üzerine ikinci bir whatman filtre kağıdı yerleştirildi, hava kabarcığı kalmaması için bir cam tüp ile üzerinden geçildi.
9. Sandviçin etrafındaki sıvı kurutulduktan sonra sistem kapatılıp 150 mA 'de 1 saat transfer edildi.
10. Aktarma işleminden sonra transferin olup olmadığını kontrol etmek için, jel boyama işlemine tabi tutuldu.

11. Aktarma yapılmış olan PVDF membranı oda ısısında ya da 37 °C'de inkübe edilerek kuruması sağlandı.
12. PVDF membran 10 ml blocking buffer içerisine konulup, 1 saat oda ısısında shakerde inkübe edildi.
13. Blocking solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, membran 20 ml distile su ile 5 dk boyunca shakerde karıştırılarak yıkandı.
14. 10 ml 1:5000 oranında dilüe edilen anti-His antikorunu eklenerek, 1 saat inkübe edildi.
15. Antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, üç defa 20 ml antikor yıkama tamponu ile 5 dk yıkandı.
16. 10 ml sekonder antikor (keçi, alkalın fosfataz konjuge edilmiş IgG anti-Mouse) solüsyonu ile 30 dk inkübe edildi.
17. Sekonder antikor solüsyonu ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, üç defa 20 ml antikor yıkama tamponu ile 5 dk yıkandı.
18. Membran iki defa 20 ml distile su ile 2 dk yıkandı.
19. 5 ml kromojenik substrat (BCIP/NBT) ile renk oluşuncaya kadar inkübe edildi.
20. Renk oluştuğundan sonra, membran iki defa 20 ml distile su ile 2 dk yıkandı.
21. Membran filtre kağıdı üzerine konularak kurutulduktan sonra PVDF membran görüntüleme sitesinde (Biorad GS –800) görüntülendi.

3.2.14. Dot Blot

Dot blot testi üretilen rekombinant proteinin hızlı bir şekilde tespit edilmesini sağlar.

1. Saflaştırılan rekombinant omp28 precursor ve His-Sumo-omp28 precursor proteini içeren hücre lizatı Dot Blot tamponu ile 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 oranında dilüe edildi.
2. Nitro selüloz membran üzerine 2 µl'lik spotlar halinde eklendi.
3. Membran kurutulduktan sonra, Western Blot protokolünün 12. aşamasından devam edildi.

3.2.15. Sumo proteazla kesim işlemi

Füzyon proteini saflaştırıldıktan sonra, doğal proteini elde etmek amacıyla sumo proteaz kullanılarak N-terminal peptid kısmında bulunan 6xHis tag ve SUMO kısımları uzaklaştırıldı.

Çizelge3.8.Sumoproteazda kullanılan maddeler

Füzyon protein	400 µl
10 X tuzsuz sumo proteaz buffer	80 µl
Deiyonize su	280
Sumo proteaz(10 U)	40 µl
toplam	800 µl

1. Tabloda verilen kimyasallar, karıştırılıp + 4 °C'de gece boyunca inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında 20 µl alınıp üzerine 20 µl 2X SDS sample buffer eklenip SDS PAGE yapıldı.
3. Geriye kalan örnek çalışma tamamlanıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Hem SUMO füzyon proteini hemde sumoproteaz enzimi N- terminal kısmında polihistidin içerdiklerinden dolayı Ni-NTA affinite kromatografisi ile ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir. Kesim reaksiyon çözeltisi kolon bağlama bufferı ile seyreltilir. Kolona protokoluna göre yüklenir. Sonuçta proteinimiz kolonda çıkarken diğer yapılar kolona bağlı kalmış olur.

3.2.16. ELISA Protokol

1. Saflaştırılan omp28 precursor proteini karbonat/bikarbonat buffer içerisinde konsantrasyonu 20 µg/ml olacak şekilde dilüe edildi.
2. PVC nunc mikropolanın her kuyucuğuna 50 µl protein çözeltisi eklendikten sonra, +4 °C'de gece boyunca inkübe edilerek, proteinin kuyucuklara bağlanması sağlandı.
3. Kuyucuktaki protein örneği döküldükten sonra iki defa 200 µl PBST ile 5 dk orbital shakerde bekletilerek yıkandı.
4. Üzerine 200 µl blocking solüsyonu eklenerek +4 °C'de gece boyunca inkübe edilerek, protein bulunmayan bölgelerde çapraz bağlanmaları engellemek için bloke edildi.
5. Brucella pozitif hasta ve sağlıklı insan serum örnekleri 1:100 oranında antikor dilüsyon tamponunda dilüe edildikten sonra, 100 µl eklenerek oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
6. Kuyucuktaki antikor solüsyonu döküldükten sonra üç defa 200 µl PBST ile 5 dk orbital shakerde bekletilerek yıkandı.
7. Keçi HRP-konjuge edilmiş anti-human IgG sekonder antikorunu 1:1000 oranında antikor dilüsyon tamponunda dilüe edildikten sonra, 100 µl eklenerek orbital shakerde oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
8. Kuyucuktaki antikor solüsyonu döküldükten sonra üç defa 200 µl PBST ile 5 dk orbital shakerde bekletilerek yıkandı.

9. 100 µl TMB substrat (eşit oranda TMB A ve TMB B karıştırıldı) eklenip 15 dk oda ısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası açık mavi renk oluştu.
10. 50 µl 2 M H₂SO₄ eklenerek reaksiyon durduruldu. Renk açık sarıya dönüştü.
11. Elisa mikroplaka okuyucuda 450 nm okundu.

3.2.17. Omp28 precursor proteinin diagnostik etkinliğinin hesaplanması

Herhangi bir tarama testinin sağlık problemini belirlemedeki gücünün değerlendirilmesi bu sağlık problemi için kesin sonuç veren bir referans test ile kıyaslanması sonucu elde edilmektedir. Buda bir tarama testinin sonuçlarının referans test sonuçları ile kıyaslanması ile ortaya çıkmaktadır. Tarama testi ile referans test sonuçlarının kıyaslanmasında genellikle aşağıda verilen dört gözlü tablodan yararlanılmaktadır.

Çizelge 3.9. omp28 precursor proteinin diagnostik etkinliğinin hesaplanmasında kullanılan tablo

TARAMA TESTİ SONUCU	REFERANS TEST SONUCU		
	Sağlık Problemi (+)	Sağlık Problemi (-)	TOPLAM
Sağlık Problemi (+)	GP (Gerçek Pozitif)	YP (Yalancı Pozitif)	GP+YP
Sağlık Problemi (-)	YN (Yalancı Negatif)	GN (Gerçek Negatif)	YN + GN
TOPLAM	GP+YN	YP+GN	GP+YP+YN+GN

Bu tablodaki değişkenleri tanımlayacak olursak;

Gerçek Pozitif: Gerçekte hasta olan bireyler içinde testin’de hasta bulunduğu bireyler

Yalancı Pozitif: Gerçekte sağlıklı olan bireyler içinde testin hasta bulunduğu bireyler

Yalancı Negatif: Gerçekte hasta olan bireyler içinde testin sağlam bulunduğu bireyler

Gerçek Negatif: Gerçekte sağlıklı olan bireyler içinde testin’de sağlıklı bulunduğu bireyler şeklindedir.

Bu dört gözlü tablodaki değişkenler kullanılarak tarama testinin gücü ve yeterliliği ile ilgili çeşitli epidemiyolojik ölçütler bulunmaktadır. Bu ölçütler sırası ile

Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif prediktif değer, Negatif prediktif değer ve testin gücü gibi ölçütler olup bu ölçütler aşağıda formülleri verilerek tanımlanmıştır.

Duyarlılık (Sensitivite) : Gerçekte hasta olan bireyler içinde tarama testinin hastaları bulabilme özelliği olarak tanımlanmaktadır.

Duyarlılık (Sensitivite) = $(GP / (GP+YN)) * 100 = \%$ olarak ifade edilir.

Duyarlılık kısaca bir tarama testinin hasta bulma yeteneği olarak da tanımlanabilir.

Özgüllük (Spesifite) : Gerçekte sağlıklı olan bireyler içinde tarama testinin sağlıklı bireyleri bulabilme özelliği olarak tanımlanmaktadır.

Özgüllük (Spesifite) = $(GN / (YP+GN)) * 100 = \%$ olarak ifade edilir.

Özgüllük kısaca bir tarama testinin sağlıklı bireyleri bulma yeteneği olarak da tanımlanabilir.

Pozitif Prediktif Değer: Tarama testinin hasta olarak bulduğu bireyler içinde gerçekten hasta olanların yüzdesidir.

Pozitif Prediktif Değer = $(GP / (GP+YP)) * 100 = \%$ olarak ifade edilir.

Negatif Prediktif Değer: Tarama testinin sağlıklı olarak bulduğu bireyler içinde gerçekten sağlıklı olanların yüzdesidir.

Negatif Prediktif Değer = $(GN / (YN+GP)) * 100 = \%$ olarak ifade edilir.

Testin Genel Gücü (Test Geçerliliği) : Tarama testinin doğru tanı koyabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır.

Test Geçerliliği = $((GP+GN) / (GP+GN+YP+YN)) * 100 = \%$ olarak ifade edilir.

Testin gücü veya geçerliliği tarama testinin doğru olarak tanı koyduğu hastalık veya sağlıklı kişilerin sayısının tüm sonuçlar içindeki yüzdesi olarak tanımlanmaktadır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

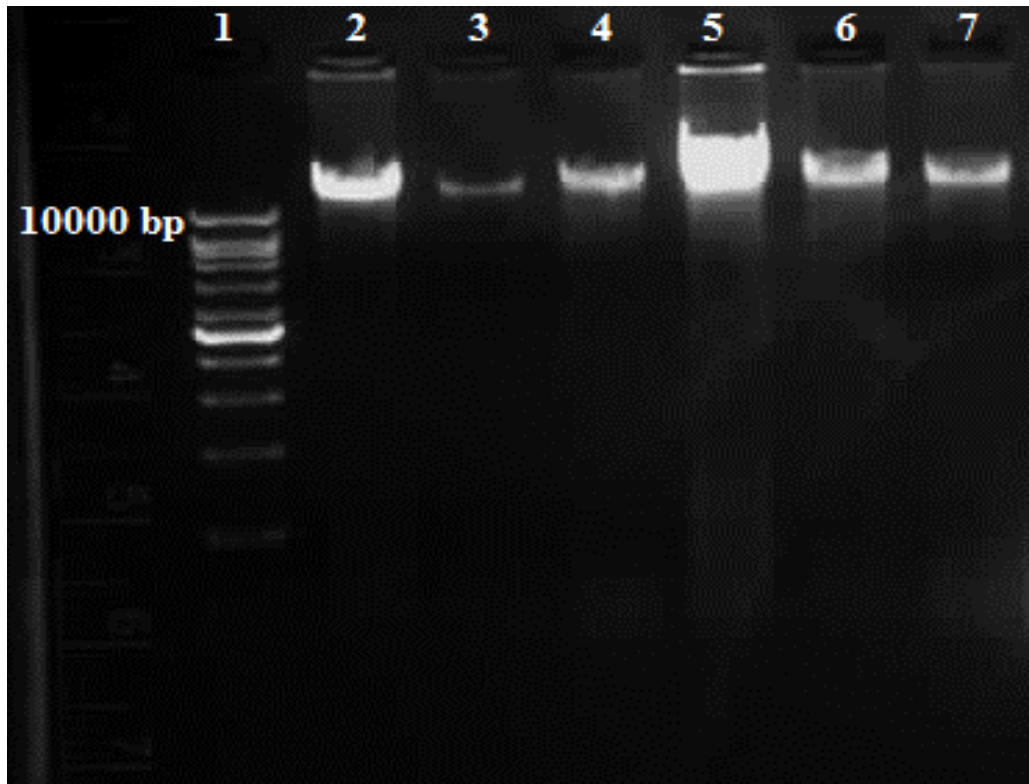
Brucella melitensis Rev1 omp28 precursor proteini rekombinant DNA teknikleri ile üretildikten sonra, affinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Çalışma kısaca aşağıda verilen aşamalardan oluşmaktadır;

1. *Brucella melitensis* Rev1 bakterisinden genomik DNA izolasyonu.
2. Omp28 precursor gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması
3. PCR ürününün (omp28 precursor gen bölgesi) pETSUMO plazmidine ligasyonu
4. Ligasyon ürününün klonlama konağı olan *E.coli* One Shot® Mach1 TMT1R hücrelerine transformasyonu
5. Transformasyon sonucu *E.coli* One Shot® Mach1 TMT1R hücrelerinin seçici besiyerine (50 µg/ml kanamisin) konularak pozitif kolonilerin seçilmesi ve PCR ile (çapraz pcr ve omp28 primerleri ile) kontrol edilmesi.
6. Plazmid izolasyonu ve PCR ile kontrol edilmesi
7. Sekans analizinin yapılması
8. Plazmidlerin protein ekspresyon konağı olan *E.coli* BL21 (D3) hücrelerine transfer edilmesi
9. Transformasyon hücrelerinin seçici besiyerine ekilmesi ve pozitif kolonilerin PCR ile kontrol edilmesi
10. Pozitif rekombinant omp28 precursor gen bölgesini içeren BL21 (D3) hücrelerinin çoğaltılması ve optimum protein ekspresyon süresinin tespit edilmesi için farklı inkübasyon sürelerinin uygulanması.
11. Eksprese edilen protein çözünürlüğünün tespit edilmesi.
12. BL21 (D3) hücrelerinin ekstraksiyonu ve Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırılması ve protein miktarının tayin edilmesi

- 13.** Saflaştırılan rekombinant omp28 precursor proteinin Western Blot ve Dot Blot ile karakterizasyonunun yapılması.
- 14.** Saflaştırılan rekombinant His-Sumo-omp28 precursor proteinin, Sumoproteaz uygulanarak His-Sumo kısmının, omp28 precursor proteininden ayrılması.
- 15.** Nativ omp28 precursor proteinin ELISA testi yapılarak diagnostik ve antijenik özelliğinin tespit edilmesi.

4.1.1. *Brucella melitensis* Rev1 total genomik DNA izolasyonu

Brucella melitensis Rev1 bakterisinden genomik DNA, DNA izolasyon kiti (Vivantis GF-BA-100) kullanılarak izole edildi. Kültür ortamında çoğaltılıp, 1 ml'lik tüplerde liyofilize edilerek -20°C 'de saklanan *Brucella melitensis* Rev1 bakterilerinden DNA izolasyonu yapmak için farklı miktarlarda (1- 6 ml kültür ortamı) bakteri alınarak yapılan DNA izolasyonu %1 lik agaroz jel elektroforezinde incelendi.

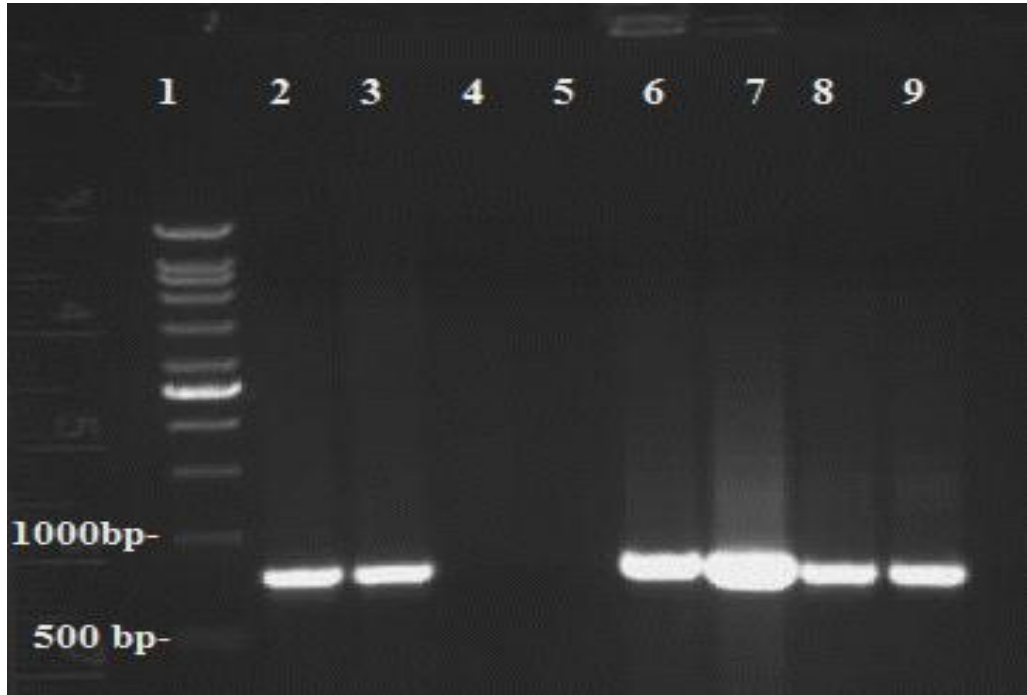


Şekil 4.1. *Brucella melitensis* Rev1 den total genomik DNA izolasyonu;1: Marker, 2: 1ml'lik *Brucella* kültür ortamı ile yapılan DNA izolasyonu, 3: 2 ml *brucella* kültür ortamı ile yapılan DNA izolasyonu, 4: 3 ml *Bucella* kültür ortamı ile yapılan DNA izolasyonu, 5: 4 ml *Brucella* kültür ortamı ile yapılan DNA izolasyonu, 6: 5 ml *Brucella* kültür ortamı ile yapılan DNA izolasyonu, 7: 6 ml *Brucella* kültür ortamı ile yapılan DNA izolasyonu

Agaroz jel elektroforezi görüntüsünden optimum DNA miktarının 4 ml'lik kültür ortamından izole edildiği tespit edildi. İzole edilen DNA'lar kullanılmaya kadar -20°C 'de saklandı.

4.1.2. Omp 28 precursor gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması

İzole edilen *Brucella melitensis Rev1* genomik DNA'sı ve omp28 precursor gen bölgesi için dizayn edilen primerler kullanılarak PCR işlemi yapıldı. PCR işleminde optimum ürün elde etmek için, en uygun Tm sıcaklığını (primerlerin bağlanma ısısı) tespit etmek için farklı Tm sıcaklığı ve sürelerde (annealing süresi) PCR işlemi yapıldı. PCR sonucu % 1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. PCR işlemi sonucunda 753 bp büyüklüğünde farklı yoğunlukta ürün elde edildiği tespit edildi. En iyi ürünün 7. Band'da elde edildiği tespit edildi. Bunun sonucunda sonraki PCR işlemlerinde annealing aşaması için optimum şartlar 60 °C'de 45 sn olarak tespit edildi.



Şekil 4.2. *Brucella melitensis Rev1* omp28 precursor geninin PCR sonucu; 1: Marker , 2-3: 59 °C de 30 sn PCR sonucu, 4-5: Negatif kontrol, 6-7: 60 °C 'de 45 sn PCR sonucu, 8-9: 58 °C 'de 1 dk PCR sonucu

Optimize edilen PCR programı kullanılarak elde edilen ürün, %1'lik agaroz jelde görüntülendikten sonra kalan PCR ürünü ligasyon işleminde kullanıldı.

4.1.3. Ligasyon

Omp28 precursor gen bölgesinin PCR işlemi esnasında, PCR programının extension aşamasında (72 °C’de 10 dk) ekzonükleaz aktivitesi olmayan taq polimeraz enzimi kullanıldığı için, gen bölgesinin uç kısımlarına poli A (adenin) nükleotidleri eklenir. Bu sayede uç kısımlarında T (timin) nükleotidleri eklenerek lineer hale getirilmiş pETSUMO vektörüne, omp28 precursor gen bölgesinin bağlanması sağlandı. Ligasyon işlemiyle; ortama ilave edilen T4 ligaz enzimi gen bölgesinin pETSUMO vektörüne sağlam bir şekilde entegre olmasını sağladı. Ligasyon işlemi sonrasında PCR ürününün, pETSUMO vektörüne yerleştiği ve lineer bir yapıya sahip olan pETSUMO vektörünün omp28 precursor gen bölgesinin eklenmesiyle sirküler bir yapıya dönüştüğü varsayıldı.

4.1.4. E. coli One Shot® Mach1™ T1R hücrelerine transformasyon ve pozitif transformant hücrelerin tespit edilmesi

Omp 28 precursor gen bölgesi yerleştirilen pETSUMO vektörünün çoğalması ve stabil bir yapıya kavuşması için *E. coli* One Shot® Mach1™T1R hücrelerine transfer edildi. Transformasyon ısı şoku uygulanarak yapıldı. Transformasyon işleminden sonra; 50 µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine ekim yapıldı. Transformasyon sonrasında plazmid içeren koloniler, kanamisine dirençli olduklarından dolayı kanamisinli besiyerinde çoğalıp koloni oluştururken, plazmid içermeyen bakteriler direnç gösteremediklerinden yok olurlar.

Kanamisinli besiyerinde oluşan koloniler, plazmid içerebilirler fakat omp28 precursor gen bölgesini içerip içermediklerinin kontrol edilmesi gereklidir. Bu yüzden oluşan kolonilerden on dört tanesi seçildi. Koloniler seçilirken; iyi gelişmiş, tek ve diğer kolonilerden biraz uzakta bulunan koloniler seçildi. Kolonilerin uzakta olması; koloniden örnek alınırken, koloniler arasında muhtemel kontaminasyonu önlemek için yapıldı.

Steril bir kürdan ucuyla kolonilere dokunularak örnek alındı. Örnek alınan her koloni daha önceden işaretlenmiş olan 50 µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine kopyalandıktan sonra PCR yapıldı.

Kontrol PCR işlemi iki farklı şekilde yapıldı.

- 1- Omp28 precursor gen bölgesinin primerleri (omp28 forward, omp28 reverse) kullanılarak yapılan kontrol PCR
- 2- Çapraz PCR; çapraz PCR iki farklı şekilde yapıldı:
 - a) **Çapraz PCR-A:** pETSUMO plazmidinin sumo Forward ve omp28 Reverse primerleri ile yapıldı. PCR işlemi sonrasında elde edilen ürün 858 bp büyüklüğünde olacaktır.
 - b) **Çapraz PCR-B:** pETSUMO plazmidinin T7 Reverse ve omp28 Forward primerleri ile yapıldı. PCR işlemi sonrasında elde edilen ürün 903 bp büyüklüğünde olacaktır.

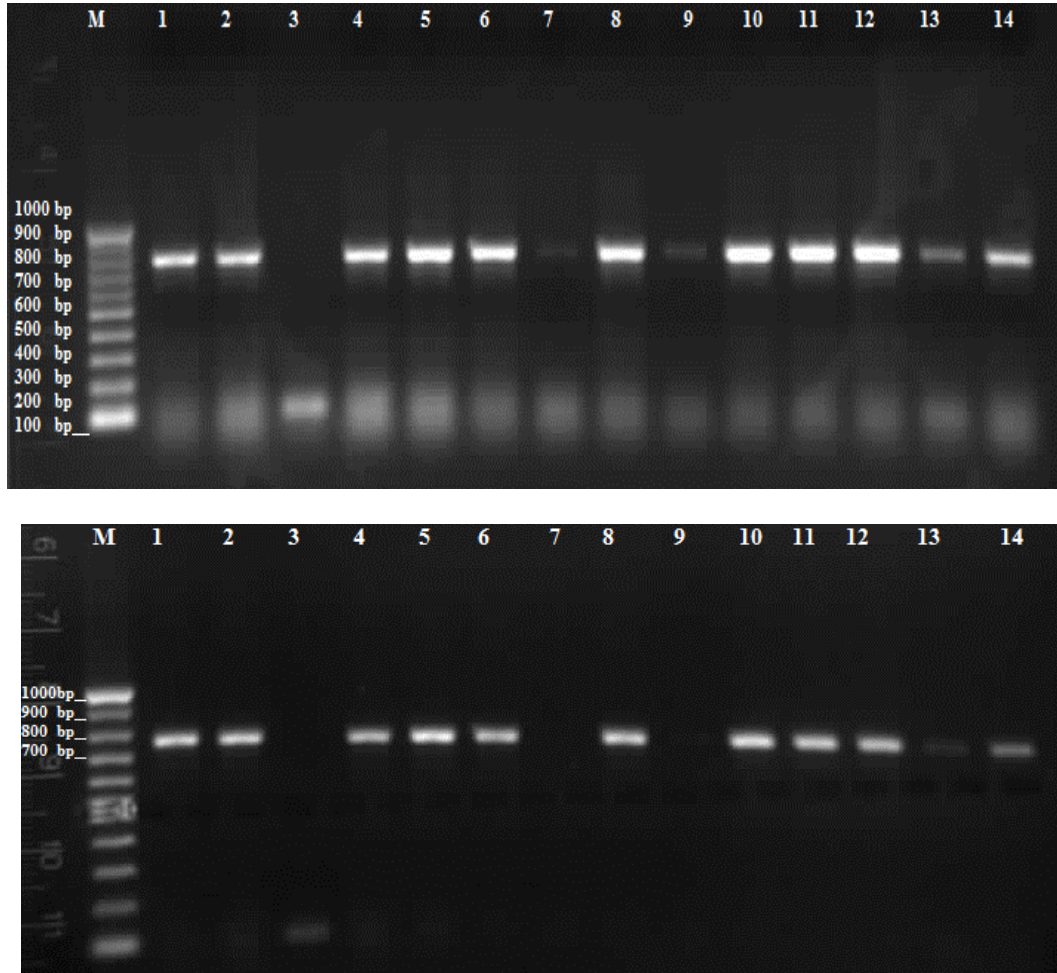
Çapraz PCR işleminde iki farklı primer kullanıldığından dolayı (sumo forward, omp28 reverse) ortak bir Tm sıcaklığının tespit edilmesi için, PCR programı optimize edildi. Optimizasyon sonucunda en uygun anneling programı 55 °C'de 1 dk 35 siklus olarak tespit edildi.

4.1.4.1. Omp28 precursor primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR sonucu

Omp28 precursor gen bölgesinin primerleri ile yapılan PCR işlemi; pozitif kolonilerin içerdiği plazmidlerde omp28 precursor gen bölgesinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla yapıldı. Eğer mevcut koloni içerisinde omp28 precursor geni varsa PCR işlemi sonucunda, 753 bp büyüklüğünde ürün elde edilmesi gerekir.

Bu işlem için toplam 14 koloniden örnek alınarak PCR yapıldı. PCR ürünü % 1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Sonuçta 14 koloninin 10'unda omp28 precursor gen bölgesinin olduğu tespit edildi.

Aşağıdaki şekilde omp28 precursor primerleri kullanılarak yapılan PCR sonucu görülmektedir. Bu iki şekilde aynı jele aittir, üsteki jel 1 saatlik elektroforez, alttaki ise 2 saatlik elektroforez sonrasındaki resimdir. Sonuçta seçilen 14 koloniden 10 'nunda 753 bp büyüklüğündeki omp28 precursor gen bölgesinin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Transformasyon sonrası Omp28 precursor primerleri kullanılarak yapılan koloni PCR sonucu; 3, 7, 9 ve 13. bandlar transformasyon sonunda omp28 precursor genini içermeyen koloniler 1., 2., 4., 5., 6., 8., 10., 11., 12. bandlarda omp28 precursor genini içeren pozitif koloniler.

4.1.4.2. Çapraz PCR sonucu

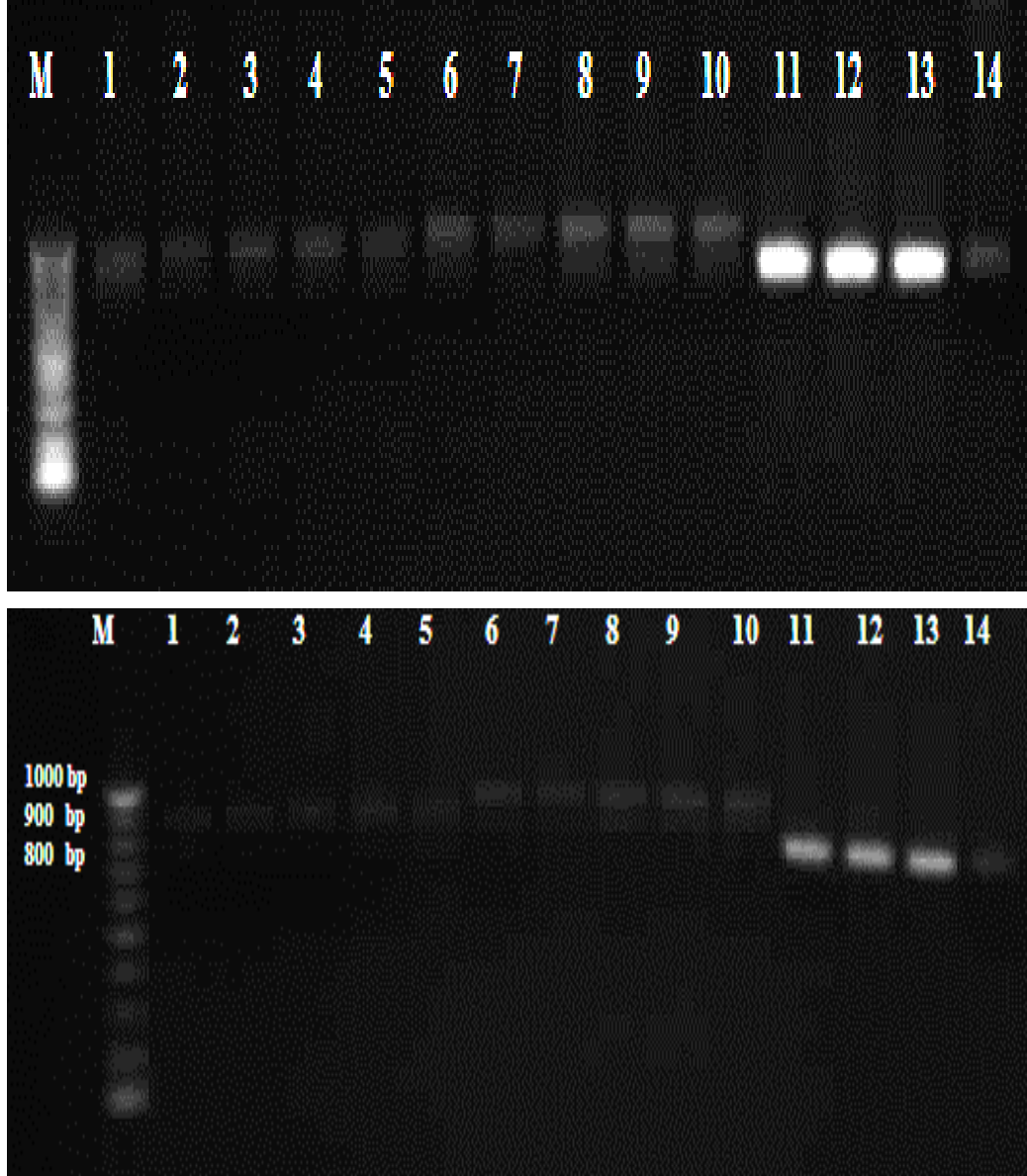
Çapraz PCR işlemi; omp28 precursor gen bölgesini içeren plazmitlere sahip *E. coli* One Shot® Mach1™T1R bakterilerinde, omp28 gen bölgesinin doğru bir şekilde plazmide yerleşip yerleşmediğini test etmek amacıyla yapıldı. His-sumo-omp28 precursor rekombinant proteinin sentezlenebilmesi için, plazmidin sumo kısmından hemen sonra, omp28 precursor gen bölgesinin başlangıç kodonunun gelmesi gerekir, aksi durumda omp28 precursor gen bölgesinin stop kodunu N-terminal kısma geleceğinden, His-sumo-omp28 precursor rekombinant proteinin yerine, yalnızca His-sumo proteini üretilir.

Omp28 precursor gen bölgesini içerdiği tespit edilen 10 koloniden 5 tanesi alınarak çapraz PCR-A ve PCR-B işlemi yapıldı. Çapraz PCR işlemi sonunda seçilen 5 koloninin tamamında pozitif sonuç elde edildi.

Aşağıdaki agaroz jel resminde farklı büyüklükte 3 farklı band gözlenmektedir;

1-5. bandlar 858 bp uzunluğunda çapraz PCR-A sonucu, 6-10. bandlarda 903 bp uzunluğunda çapraz PCR B sonucu ve 11-14.bandlarda ise kontrol amacıyla konulan 753 bp büyüklüğündeki omp28 precursor PCR sonucu gözlenmektedir.

Aşağıdaki şekilde çapraz PCR işlemi sonucunda oluşan ürün miktarı az olduğundan, görüntünün daha iyi görülmesi için % 1'lik agaroz jelinin 2. ve 3. saatlerdeki görüntüleri yer almaktadır.



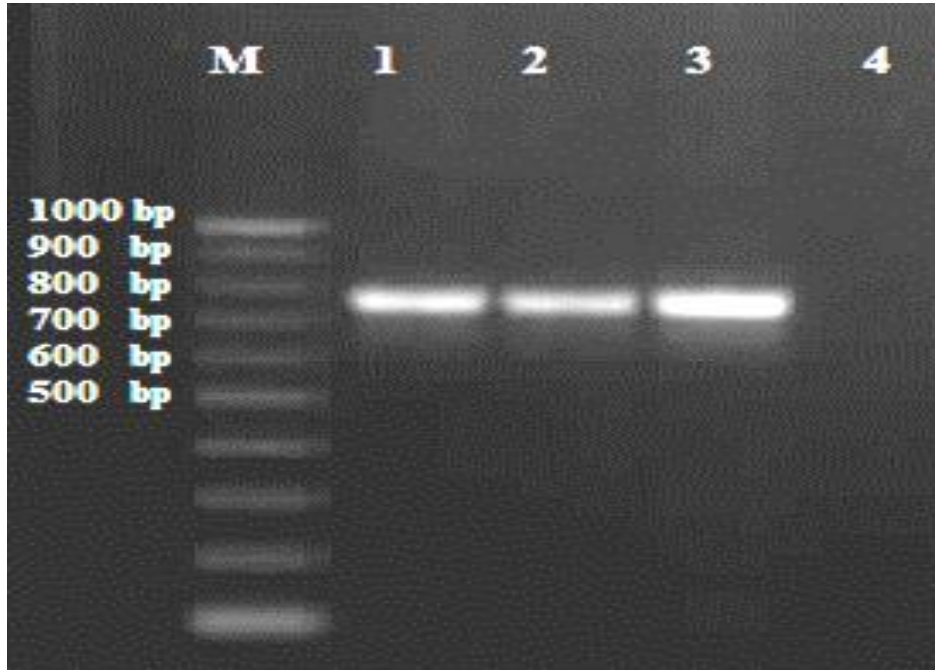
Şekil 4.4. Koloni çapraz ve omp28 precursor kontrol PCR sonucu; 1-5. bandlar; çapraz PCR-A (sumo Forward ve omp 28precursor reverse primeri) 6-10. bandlar; çapraz PCR-B (T7 reverse ve omp28 precursor) primerleri ile yapıldı. 11-14. bandlar; omp28 precursor primerleri ile yapıldı.

Çapraz PCR sonucunda pozitif olan 5 koloniden bir tanesi alınarak çalışmaya devam edildi. PCR işleminden önce LB agar ortamına ekimi yapılan bu koloniye kürdan ucuyla dokunularak, yeni bir 50 µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine ekimi yapıldı. Bu sayede seçilen koloninin tekleştirilmesi sağlandı. Plazmid izolasyonu için; inkübasyon süresinden sonra besiyerinden bir koloni alınarak 10 ml, 50 µg/ml kanamisinli LB sıvı besiyerine ekimi yapıldı.

4.1.5. Plazmid izolasyonu ve kontrol PCR

Çoğalan rekombinant *E. coli* One Shot® Mach1™ T1R hücrelerinden plazmid izolasyonu yapılarak 100 µl plazmid elde edildi. Plazmidlerin 10 µl'si, agaroz jel elektroforezinde izole edilen plazmidi görüntülemek için kullanılırken, bir kısımda çapraz PCR ve omp28 precursor PCR işlemlerinde kullanıldı. Geriye kalan plazmidler ise sekans analizi ve BL21 (D3) hücrelerine transfer etmek için – 20 °C 'de saklandı.

İzole edilen plazmidler BL21 (D3) hücrelerine transfer edilmeden önce kontrol ve çapraz PCR işlemlerine tabi tutuldu. Bu işlemler sayesinde transfer işleminden önce plazmidlerin omp28 precursor gen bölgesini içerip içermediği ve omp28 precursor gen bölgesinin plazmide doğru yönde yerleşip yerleşmediği test edildi.

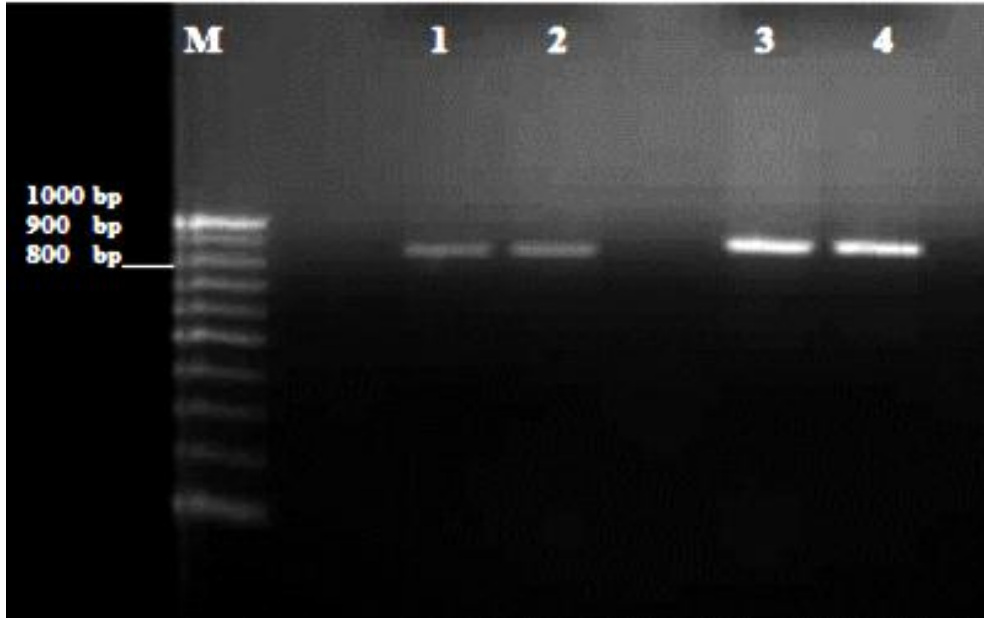


Şekil 4.5. İzole edilen plazmidlerin omp28 precursor kontrol PCR sonucu;

1-3: omp28 primeri ile yapılan PCR sonucu (753 bp), 4: Negatif kontrol

Yukarıda verilen (Şekil 4.5) incelendiğinde; Omp28 precursor primerleri kullanılarak yapılan plazmid PCR sonucunda 753 bp ürün olduğu gözlemlendiğinden dolayı, izole edilen plazmidlerde omp28 precursor gen bölgesinin olduğu tespit edilmiştir.

Aşağıda verilen şekil 4,6'da ise; omp28 precursor gen bölgesinin pETSUMO plazmidine doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediğini test etmek amacıyla yapıldı. Yapılan çapraz PCR sonucunda gen bölgesinin plazmide doğru bir şekilde yerleştiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Plazmid çapraz PCR sonucu;1-2: Çapraz PCR-A , 3-4: Çapraz PCR-B sonucu

4.1.6. Sekans analizi

İzole edilen plazmidlerin 50 µl'si sekans analizi için kullanıldı. Sekans analizi gen aktarımı yapılan plazmitte, genin doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği ve PCR işlemleri sırasında eklenen gen bölgesinde herhangi bir mutasyonun olup olmadığını test etmek amacıyla yapıldı.

Sekans analizi çift yönlü Sumo Forward ve T7 reverse primerleri kullanılarak yapıldı. Sekans sonucu <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> adresinden clustal w2 programı kullanılarak karşılaştırıldı, sonuçta sekans analizi yapılan bölgenin, omp28 precursor gen bölgesiyle % 97 oranında benzerlik gösterdiği, farklılık oluşturan kısmın ise plazmide ait bölgede olduğu tespit edilmiştir. Sekans dizisi, clustalw2 programıyla, omp28 precursor gen bölgesi ile karşılaştırıldığında sekans sonucunun gen bölgesiyle tamamıyla benzerlik gösterdiği tespit edildi. Ayrıca sekans sonucu <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinden blastlama yapılarak sonuçların doğruluğu teyit edildi.

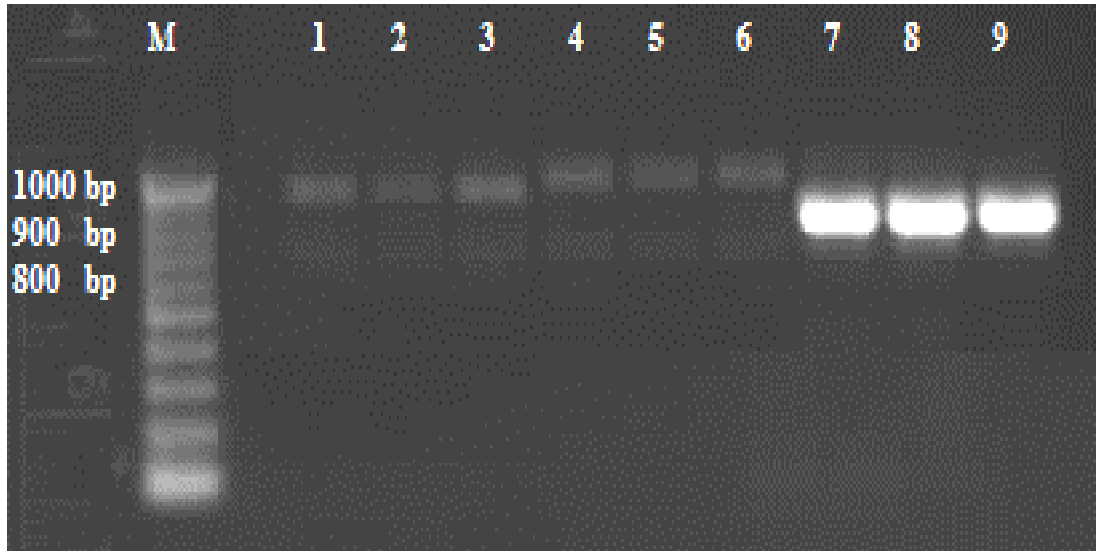
sekans omp28	AGATTCTTGACGACGGTATTAGAATTCAGAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATG -----	60
sekans omp28	GAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTATGAACACTCGTGCT -----ATGAACACTCGTGCT *****	120 15
sekans omp28	AGCAATTTTCTCGCAGCCTCATTTTCCACAATCATGCTCGTCGGCGCTTTCAGCCTGCC AGCAATTTTCTCGCAGCCTCATTTTCCACAATCATGCTCGTCGGCGCTTTCAGCCTGCC *****	180 75
sekans omp28	GCTTTCGCACAGGAGAATCAGATGACGACGAGCCGCGCGCATCGCCGTCACCGGGGAA GCTTTCGCACAGGAGAATCAGATGACGACGAGCCGCGCGCATCGCCGTCACCGGGGAA *****	240 135
sekans omp28	GGCATGATGACGGCCTCGCCGATATGGCCATTCTCAATCTCTCGGTGTACGCCAGGCA GGCATGATGACGGCCTCGCCGATATGGCCATTCTCAATCTCTCGGTGTACGCCAGGCA *****	300 195
sekans omp28	AAGACCGCGCGGAAGCCATGACCGGAATAATGAAGCCATGACAAAAGTGCTCGATGCC AAGACCGCGCGGAAGCCATGACCGGAATAATGAAGCCATGACAAAAGTGCTCGATGCC *****	360 255
sekans omp28	ATGAAGAAGGCCGCATCGAAGATCGCGATCTCCAGACAGGCGGCATCAATATCCAGCCG ATGAAGAAGGCCGCATCGAAGATCGCGATCTCCAGACAGGCGGCATCAATATCCAGCCG *****	420 315
sekans omp28	ATTTATGTCTACCCTGACGACAAGAACAACCTGAAAGAGCCTACCATCACCGGTATTCT ATTTATGTCTACCCTGACGACAAGAACAACCTGAAAGAGCCTACCATCACCGGTATTCT *****	480 375
sekans omp28	GTATCCACAGTCTCACGGTTCGCGTGCAGGAACTGGCCAATGTTGGAAAAATTTGGAT GTATCCACAGTCTCACGGTTCGCGTGCAGGAACTGGCCAATGTTGGAAAAATTTGGAT *****	540 435
sekans omp28	GAATCCGTCACGCTCGGTGTTAATCAGGGCGGTGATTTGAACCTGGTCAATGATAATCCC GAATCCGTCACGCTCGGTGTTAATCAGGGCGGTGATTTGAACCTGGTCAATGATAATCCC *****	600 495
sekans omp28	TCCGCCGTGATCAACGAGGCGCGCAAGCGCGCAGTGGCCAATGCCATTGCCAAGGCGAAG TCCGCCGTGATCAACGAGGCGCGCAAGCGCGCAGTGGCCAATGCCATTGCCAAGGCGAAG *****	660 555
sekans omp28	ACGCTTGCCGACGCTGCAGGCGTGGGGCTTGGCCGTGTGGTGGAAATCAGTGAACAGC ACGCTTGCCGACGCTGCAGGCGTGGGGCTTGGCCGTGTGGTGGAAATCAGTGAACAGC *****	720 615
sekans omp28	CGCCCGCCATGCCGATGCCAATTGCGCGCGGACAGTTCAGAACCATGGTAGCAGCCGCA CGCCCGCCATGCCGATGCCAATTGCGCGCGGACAGTTCAGAACCATGGTAGCAGCCGCA *****	780 675
sekans omp28	CCGGACAATTCGGTGCCGATTGCCGAGGCGAAAAACAGCTATAACGTATCGGTCAATGTC CCGGACAATTCGGTGCCGATTGCCGAGGCGAAAAACAGCTATAACGTATCGGTCAATGTC *****	840 735
sekans omp28	GTTTTTGAATCAAGTAA GTTTTTGAATCAAGTAA *****	858 753

Şekil 4.7. pETSUMO sekans analiz sonucu

4.1.7. E. coli One Shot® BL21 (DE3) bakterilerine transformasyon ve pozitif transformant hücrelerin tespit edilmesi

Plazmid PCR ve sekans analizi işlemlerinden sonra, kalan plazmidler protein ekspresyonu sağlayan *E.coli* One Shot® BL21(DE3) hücrelerine ısı şoku uygulanarak, transfer edildi.

Transformasyon sonucunda, plazmidlerin BL21(DE3) hücrelerine transfer edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla, transformasyon sonrasında, transformant hücreler 50 µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine ekilerek inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan üç koloni alınarak kontrol PCR işlemleri yapıldı.



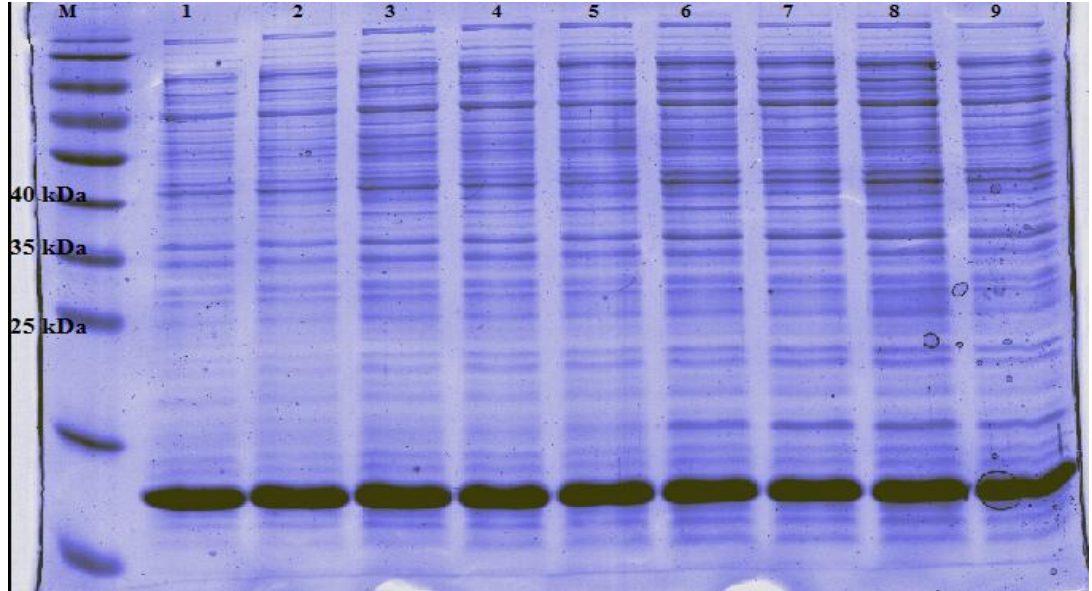
Şekil 4.8. Transformasyon sonrası *E.coli* One Shot® BL21(DE3) hücrelerinin çapraz ve omp28 kontrol PCR sonucu; M: marker, 1-3: çapraz PCR A sonucu, 4-6: Çapraz PCR B sonucu, 7-9: Omp28 kontrol PCR sonucu

PCR işlemi sonucunda seçilen tüm kolonilerde plazmidlerin BL21 (DE3) hücrelerine transfer edildiği tespit edildi. Bu işlemten sonra hücreler 50 µg/ml kanamisinli LB sıvı besiyerine ekilerek, protein ekspresyon işlemine geçildi.

4.1.8. Protein Ekspresyon Bulguları

Protein ekspresyonu için 40 µl rekombinant *E.coli* BL21 (D3) kültür ortamı, 20 ml 50 µg/ml kanamisinli LB sıvı ortama eklenip, 37 °C, 200 rpm’de yaklaşık olarak 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında spektrofotometrede 600 nm’de absorbansın 0.5 olduğu tespit edildikten sonra kültür ortamı 10 ml lik iki tüpe ayrıldı. Tüplerin birine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendikten sonra 1. saatten başlanarak saat başı 7.saate kadar kültür ortamından 1 ml ‘lik kültür ortamı alınarak SDS page yapıldı.

Optimum protein ekspresyonun yapıldığı ortam şartlarını tespit etmek amacıyla çeşitli denemeler yapıldı. Öncelikle His-Sumo-omp28 precursor füzyon proteinin inklüzyon taneciklerine dönüşmeden üretilmesi için 1 mM IPTG ile 30 °C’de farklı sürelerde inkübe edilerek 1-5. saatlerde örnek alınıp, protein ekspresyon seviyesi SDS PAGE yapılarak incelendi. Farklı inkübasyon sürelerinde örnek alınarak protein ekspresyon seviyesine bakıldı. Her saat başı alınan örnek IPTG ilave edilmiş grup, IPTG ilave edilmemiş grup ile karşılaştırılarak incelendi.

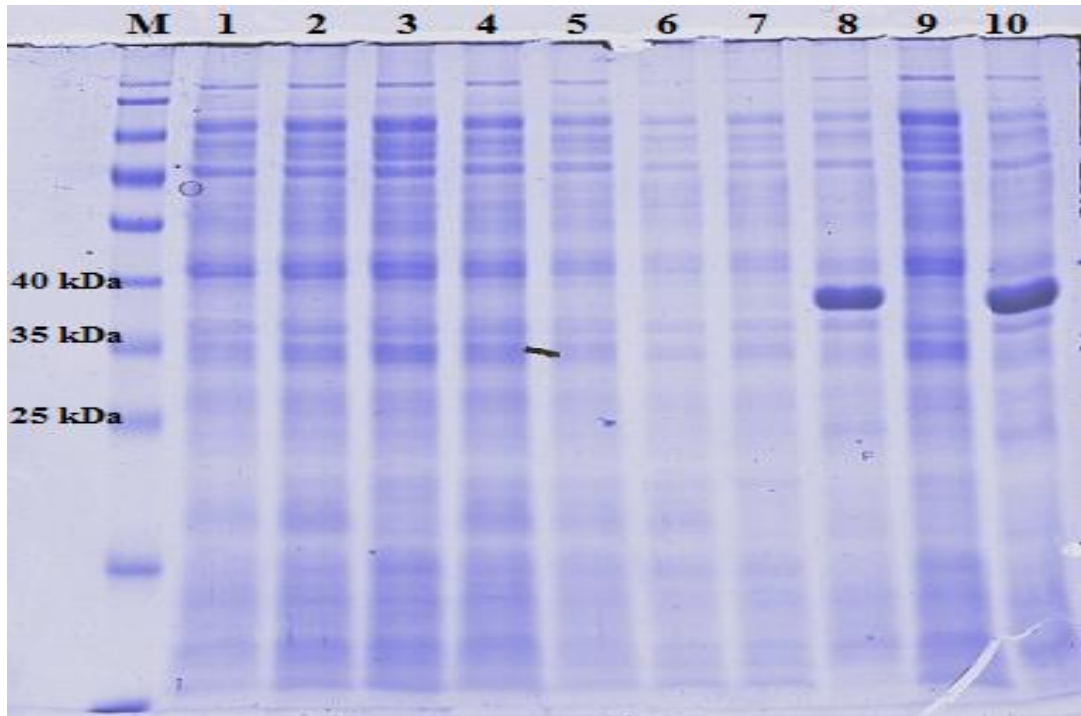


Şekil 4.9. 30 °C , 1 mM IPTG ortamındaki protein ekspresyon seviyesinin SDS page görüntüsü:

M: marker, 1.band: 1. saat IPTG (-), 2.band: 1. saat IPTG (+), 3.band: 2. saat IPTG (-), 4.band: 2. saat IPTG (+), 5.band : 3. saat IPTG (-), 6.band : 3. saat IPTG (+), 7.band : saat IPTG (-), 8.band : 4. saat IPTG (-), 9.band : 4. saat IPTG (+), 10.band : 5. saat IPTG (+).

Sonuçta; His-Sumo-omp28 precursor füzyon proteinin çok az miktarda bazal ekspresyon seviyesinde üretildiği tespit edildi. Yapılan denemeler sonucunda protein ekspresyonu için optimum ortam sıcaklığının 37 °C, protein ekspresyon indükleyici IPTG konsantrasyonunun 1 mM olduğu tespit edildi.

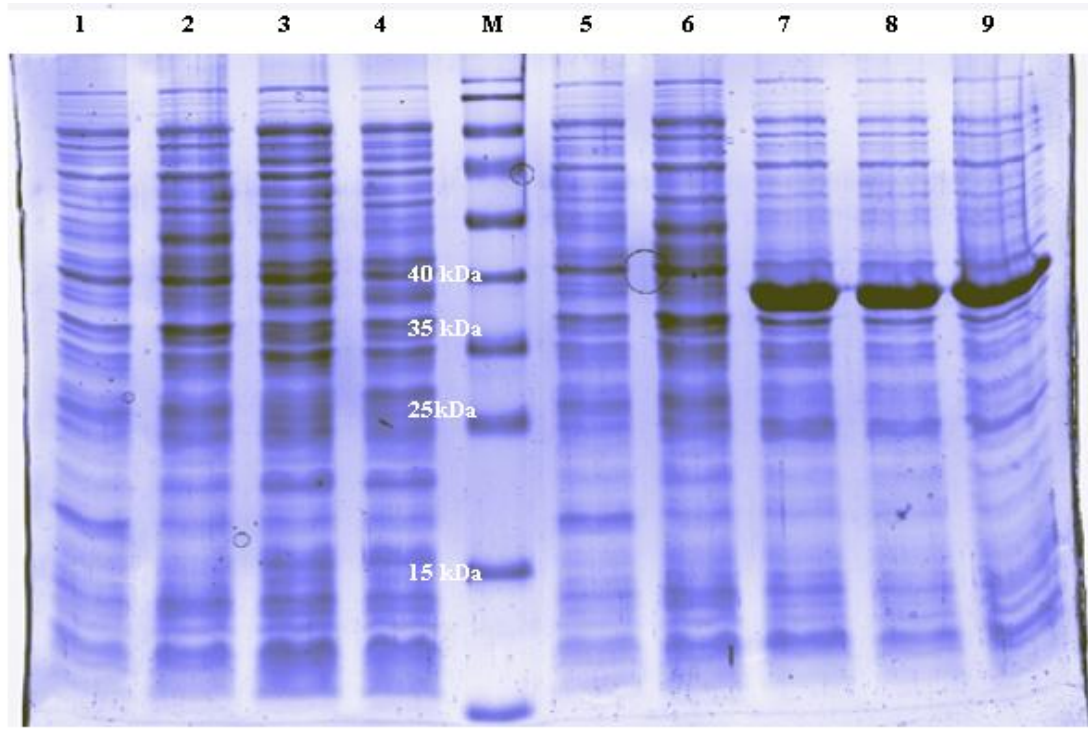
Protein ekspresyonun hangi inkübasyon süresinde optimum olduğunu tespit etmek için, farklı inkübasyon sürelerinde, protein ekspresyon seviyeleri SDS PAGE yapılarak gözlemlendi.



Şekil 4.10. 37 °C de 3-7. saatler arasındaki protein ekspresyon seviyesinin SDS page görüntüsü: M: marker, 1.band: 3. saat IPTG (-), 2.band: 3. saat IPTG (+), 3.band: 4. saat IPTG (-), 4.band: 4. saat IPTG (+), 5.band: 5. saat IPTG (-), 6.band: 5. saat IPTG (+), 7.band: 6. saat IPTG (-), 8.band: 6. saat IPTG (+), 9.band: 7. saat IPTG (-), 10.band: 7. saat IPTG (+)

Şekil 4.10'da verilen; 3-7. saatlik inkübasyon sonrası kültür ortamı kullanılarak yapılan SDS PAGE sonucuna göre; protein ekspresyonun 3-5. saatler arasında çok az olduğu, 6. saatte başladığı ve 7. saate kadar devam ettiği tespit edildi.

Sonraki aşamada; elde edilen toplam protein miktarının hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artacağı varsayılarak, daha uzun inkübasyon sürelerindeki protein ekspresyon seviyesine bakıldı. Bu amaçla 6-8.saatlerde inkübasyon yapılarak protein ekspresyon seviyelerine bakıldı. Ayrıca bu denemede IPTG eklendikten hemen sonra (0. saat) ve 1. saatte'de örnek alınarak düşük inkübasyon süresindeki ekspresyon seviyesi'de kontrol edildi.

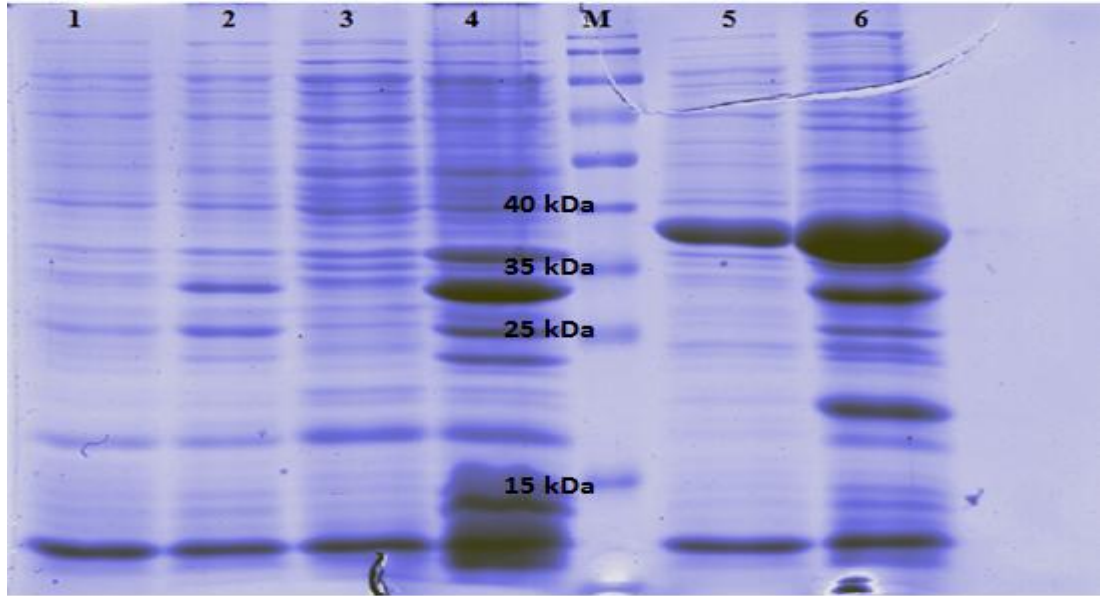


Şekil 4.11. 0-1. ve 6-8. saatlik inkübasyon sürelerindeki protein ekspresyon seviyesinin SDS PAGE görüntüsü:M: marker, 1.band: 0. saat inkübasyon IPTG(-), 2. band: 6. saat inkübasyon IPTG(-), 3. band: 7.saat inkübasyon IPTG(-), 4.band: 8.saat inkübasyon IPTG(-), 5.band: 0.saat inkübasyon IPTG(+), 6.band: 1.saat inkübasyon IPTG(+), 7.band: 6.saat inkübasyon IPTG(+), 8.band: 7.saat inkübasyon IPTG(+), 9.band: 8 .saat inkübasyon IPTG(+).

SDS PAGE sonucuna göre; 0. ve 1.saatlerde protein ekspresyonunun olmadığı, 6 saatlik inkübasyondan sonraki sürelerde ekspresyon seviyesinde azda olsa azalma olduğu tespit edildi. Sonuçta yüksek miktarda protein ekspresyonu için optimum inkübasyon süresi 6 saat olarak tespit edildi. Protein ekspresyonunda kültür ortamının inkübasyon süresi tespit edildikten sonra, protein saflaştırma aşamasında yüksek verim elde etmek için, protein çözünürlüğünün test edilmesi gerekir. Bu yüzden kültür ortamından elde edilen hücre peleti, nativ lizis metodu ile lize edildikten sonra süpernatant kısmı SDS PAGE yapılarak görüntülendi. Sonuçta

süpernatant kısmında His-sumo-omp28 precursor füzyon proteinin olup olmadığı tespit edildi. Bu sonuç His-sumo-omp28 precursor füzyon proteinin inklüzyon tanecikleri halinde depolandığını göstermektedir. İnküzyon tanecikleri halinde depolanan proteinin açığa çıkması (çözünür yapı kazanması) denatüre lizis metoduyla sağlandı.

Rekombinant *E.coli* BL21 (D3) hücreleri, denatüre metoduyla lize edildikten sonra, SDS PAGE yapılarak gözlemlendiğinde (şekil 4.12) 40 kDa civarında rekombinant proteinin belirgin bir şekilde ekspres edildiği tespit edildi. Elde edilen proteinin verimliliğini artırmak amacıyla farklı metodlar denendi. Yapılan denemeler sonucunda; hücrelerin öncelikle nativ metoduyla lize edildikten sonra, elde edilen peletin inklüzyon tanecikleri açısından zengin olduğu tespit edildi. Nativ lizis sonucu oluşan pelet içindeki inklüzyon tanecikleri denatüre lizis yapıldıktan sonra SDS PAGE yapılarak incelendiğinde (Şekil 4.12) protein verimliliğinin belirgin şekilde arttığı tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda protein saflaştırma işlemi sırasında öncelikle nativ lizis işlemi, ardından denatüre lizis uygulanması uygun görüldü.



Şekil 4.12. Denatüre ve nativ metodlarla yapılan protein ekstraktlarının SDS PAGE görüntüsü
M: marker, 1-2.band: Nativ lizis metoduyla elde edilen *E.coli* BL21 (D3) hücre ekstraktının süpernatant kısmı, 3-4.band: Nativ lizis metoduyla elde edilen *E.coli* BL21 (D3) total hücre lizati, 5.band: Denatüre lizis metodu ile elde edilen BL21 (D3) total hücre lizati, 6.band: nativ lizis sonucu elde edilen peletin, denatüre metoduyla lizis edilmesi sonucu elde edilen ekstrakt.

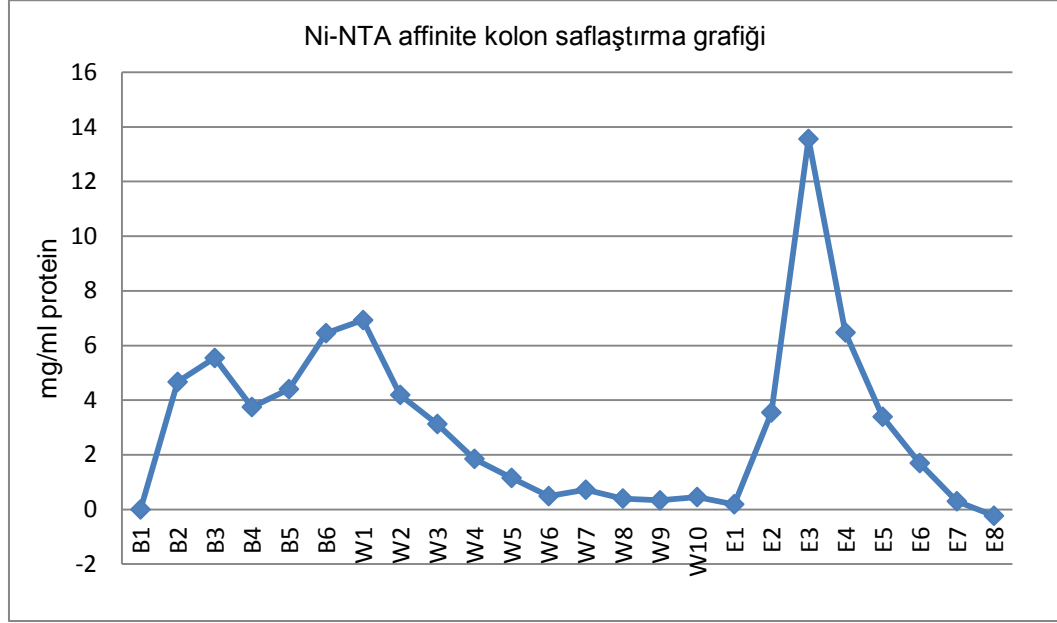
Yukarıdaki SDS PAGE görüntüsünde nativ lizis sonrası elde edilen pelete, denatüre lizis uygulandığında yüksek verimde protein elde edildiği tespit edildi. Sonraki protein saflaştırma işlemlerinde bu ikili yöntem uygulandı.

4.1.9. Protein saflaştırma sonucu

His-Sumo-Omp28 precursor proteini rekombinant olarak üretildikten sonra protein üretim konakçısı olan *E. coli* BL-21 (DE3) oneshot hücrelerinden toplam protein izolasyonu yapıldı. Üretilen rekombinant protein, N- terminal kısmında His-tag kısmına sahip olduğu için histidin'e (His) affinite gösteren Ni-NTA agarose partiküllerinden oluşan affinite kromatografisi ile toplam protein içerisinde rekombinant protein saflaştırılarak, SDS PAGE jelinde görüntülendi.

E.coli BL21 (D3) hücreleri, 37 °C'de, 50 ml kültür ortamında 6 saat 1 mM IPTG ile indüklenerek protein ekspresyonu gerçekleştirildi. Protein ekspresyonundan sonra, elde edilen hücre peleti (0,68 mg) ekstraksiyon yapılarak lize edildi. Elde edilen hücre lizati, Ni-NTA affinite kolonuna yüklenerek protein saflaştırma işlemine tabi tutuldu.

Affinite kolonunda; örnekler binding buffer (dengeleme tamponu) içerisinde dilüe edilerek kolona yüklendi, binding buffer yükleme sonucu öncelikle, kolona bağlanmayan proteinler kolondan ayrıldı, washing buffer (yıkama tamponu) kolona yüklendiğinde ise kolona zayıf bağlanan proteinlerin kolondan ayrılması sağlanarak, yalnızca His-tag kısmı içeren His-sumo-omp28 precursor rekombinat proteinin kolona bağlı olarak kalması sağlandı. En son aşamada ise; imidazol konsantrasyonu yüksek elüsyon tamponu kolona yüklenerek, kolona bağlı olan rekombinant His-sumo-omp28 precursor proteinlerinin kolondan ayrılması sağlandı. Bu şekilde total hücre lizati içerisinde bulunan yaklaşık 3200 protein içerisinde rekombinant His-Sumo-omp28 precursor proteini saflaştırıldı. Saflaştırma esnasında toplanan fraksiyonların protein miktarı Bradford metoduyla ölçülerek saflaştırma grafiği elde edildi.



Şekil 4.13. Protein saflaştırma grafiği: B; binding fraksiyonu, W; washing fraksiyonu, E; elüsyon fraksiyonu

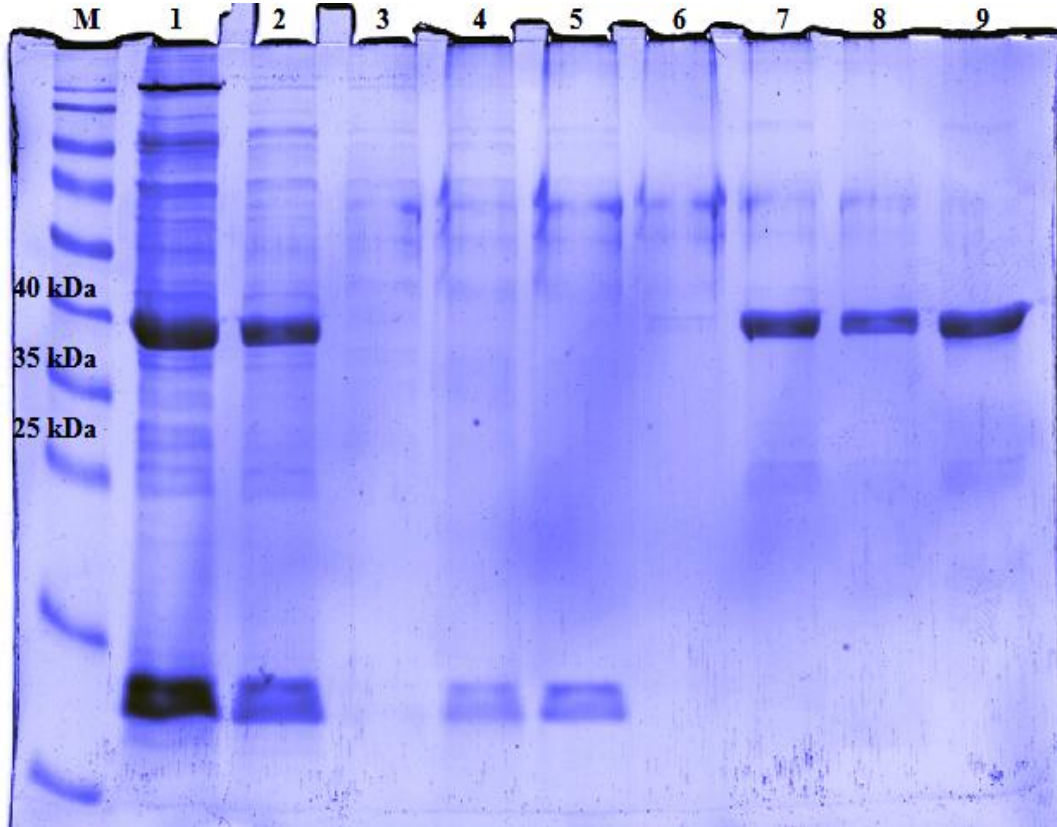
Saflaştırma grafiği (Şekil 4.13) incelendiğinde dengeleme (binding) tamponun kolondan geçirilmesiyle elde edilen fraksiyonlarda kolona bağlanmayan protein olduğu tespit edilmiştir. Yıkama (washing) tamponunun kolondan geçirilmesiyle elde edilen fraksiyonlarda ise kolona zayıf olarak bağlı olan proteinlerin, artan imidazol konsantrasyonuna bağlı olarak kolondan ayrıldığı tespit edilmiştir. Yıkama tamponu uygulamasına, elde edilen fraksiyonlardaki protein miktarı sıfır oluncaya kadar devam edildi. Bu sayede elde edilen His-sumo-omp28 precursor proteininin saflık derecesi artırılmış oldu.

Yıkama tamponu uygulaması bittikten sonra, elüsyon tamponu kolondan geçirildi. Elüsyon tamponu yüksek konsantrasyonda imidazol (300 mM) içerdiğinden dolayı, kolon matriksine bağlı olan His-sumo-omp28 precursor proteini, imidazol ile yer değiştirerek kolondan kopar. Bu şekilde elüsyon fraksiyonlarında yüksek saflıkta His-sumo-omp28 precursor proteini elde edildi. Elüsyon işlemine fraksiyondaki protein miktarı sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon işlemi sonucunda protein miktarı fazla olan fraksiyonlar bir araya getirilerek depolandı.

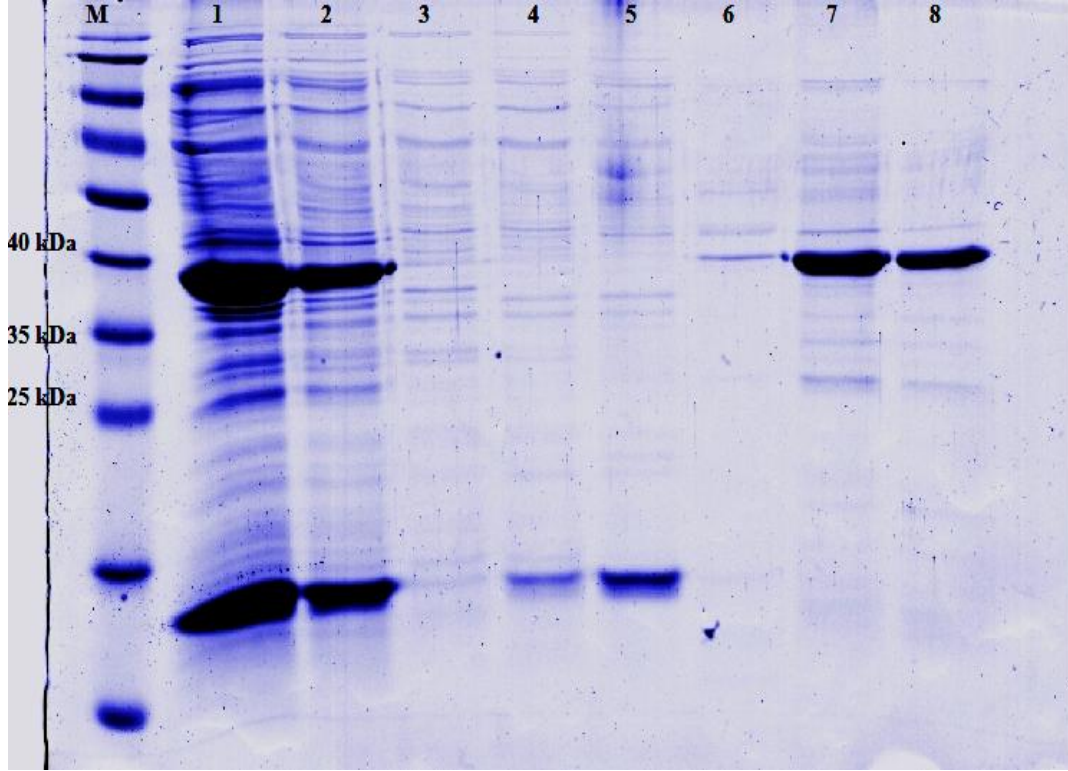
Çizelge.4.1. Omp28 precursor saflaştırma tablosu

	Total protein (mg)	% verim	% saflık
Ni-NTA affinite kromatografisi	30	10	96

Ni-NTA affinite kolonu ile yapılan saflaştırma işlemi sonucunda, 5 ml elüsyon fraksiyonu toplandı. Saflaştırma sonucunda elde edilen fraksiyonlardaki protein miktarı Bradford metodu ile tespit edildikten sonra, saflaştırma tablosu oluşturuldu. (çizelge 4.1). Elüsyon fraksiyonlarında elde edilen His-Sumo-omp28 precursor rekombinant proteinlerin saflığı SDS PAGE yapılarak incelendi.



Şekil 4.14. Ni-NTA affinite kolonu ile protein saflaştırma aşamalarının SDS-PAGE görüntüsü;1.band: Rekombinant *E.coli* BL21 (DE3) lizis edilmeden yürütülen total hücre lizati, 2 : Lizis yapılarak jele yüklenen *E.coli* BL21 (DE3) total hücre lizati, 3: Binding fraksiyonu, 4: 1. washing fraksiyonu, 5: 2.washing fraksiyonu, 6: 3. washing fraksiyonu, 7: 1. elüsyon fraksiyonu, 8: 2. elüsyon fraksiyonu, 9: 3. elüsyon fraksiyonu.



Şekil 4.15. Ni-NTA affinite kolonu ile protein saflaştırma aşamalarının SDS-PAGE görüntüsü;1.band: Rekombinant *E.coli* BL21 (DE3) lizis edilmeden yürütülen total hücre lizati, 2 : Lizis yapılarak jele yüklenen *E.coli* BL21 (DE3) total hücre lizati, 3: Binding fraksiyonu, 4: 1. washing fraksiyonu, 5: 2.washing fraksiyonu, 6: 3. washing fraksiyonu, 7: 1. elüsyon fraksiyonu, 8: 2. elüsyon fraksiyonu,

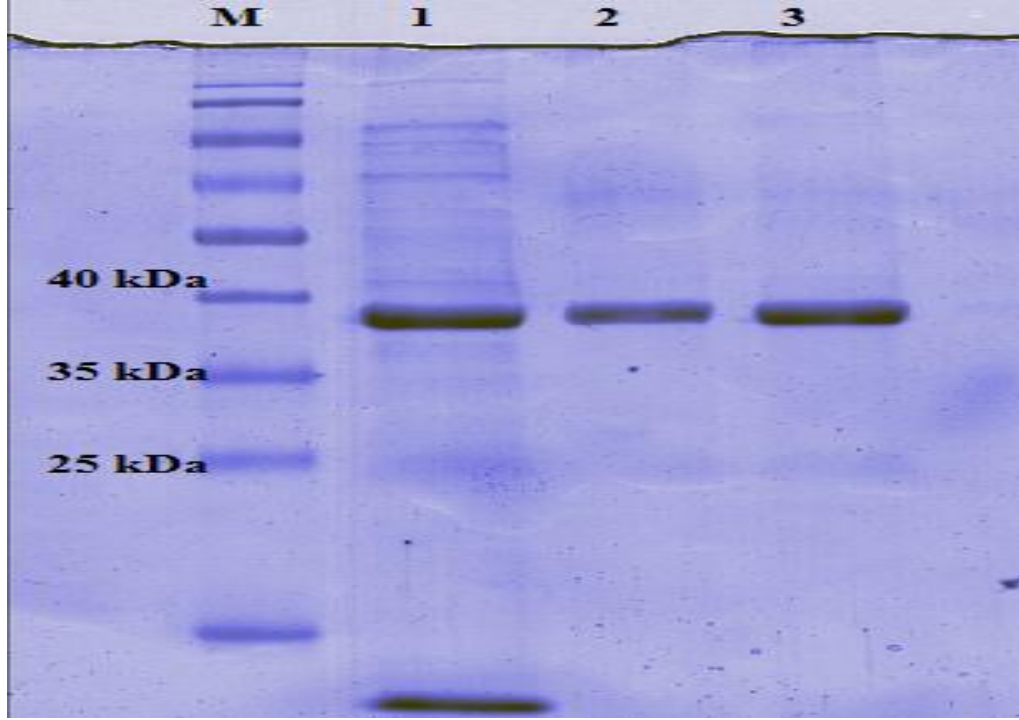
SDS PAGE resminde (Şekil 4.14 ve 4.15) total hücre lizati ve saflaştırma işlemi basamaklarında toplanan farksiyonlardaki proteinler görülmektedir. Binding fraksiyonundan elüsyon fraksiyonuna kadar kadar protein bandlarının sayıca azaldığı tespit edildi. Elüsyon fraksiyonunda ise 40 kDa civarında yalnızca bir band olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar; Ni-NTA affinite kolonunun elüsyonu sonucunda tek bir band olarak elde edilen proteinlerin His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteininin saf olarak elde edildiğini göstermektedir.

4.1.10. Diyaliz sonucu

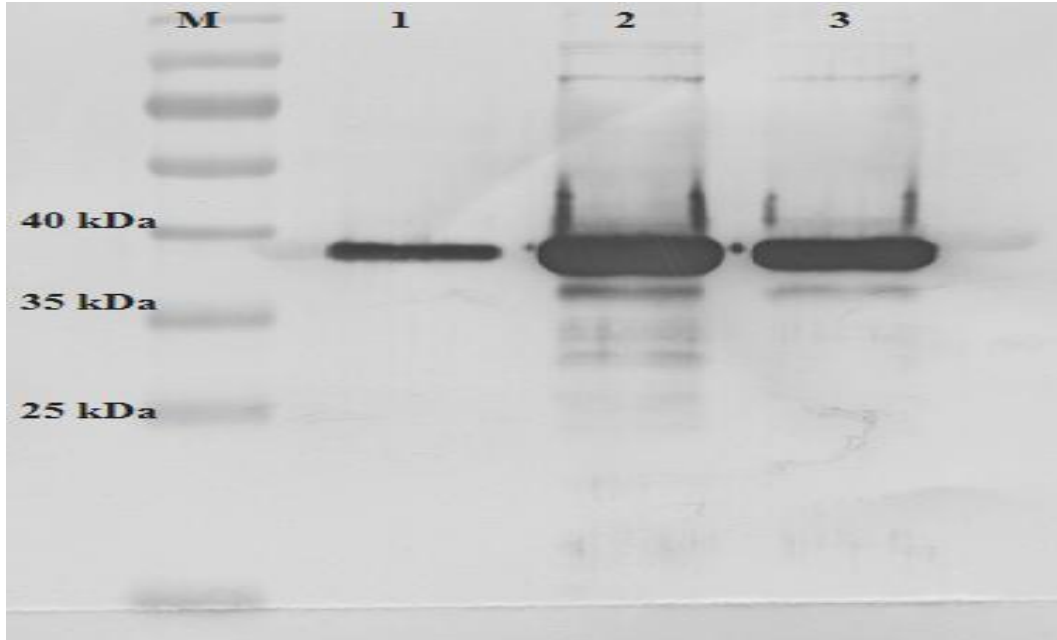
Kolondan denatüre şartlar altında saflaştırılan His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteinin, refolding (Native hale gelmesi) olması için diyaliz edildi. Diyaliz işleminde gradientli diyaliz işlemi uygulandı. Gradientli diyaliz işlemi: aşamalı olarak üre miktarı azaltılmış diyaliz tamponlarında (6M, 4M, 3M, 1M üre içeren) diyaliz yapılarak sağlandı, bu sayede ortamda bulunan üre aşamalı olarak azaltıldı. En son aşamada ise; His-Sumo-Omp28 precursor füzyon protein çözeltisinin içerdiği imidazol ve NaCl konsantrasyonunu azaltmak için, protein çözeltisi 20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl tamponunda bir gece boyunca diyaliz edildi. Bu sayede sumoprotezin aktivite göstermesi için gerekli optimum ortam sağlanmış oldu.

4.1.11. Western Blot sonucu

Saflaştırma işleminden sonra yaklaşık 40 kDa büyüklüğünde olan proteinin His-Sumo-Omp28 precursor proteinin olup olmadığı, anti-his antikoru kullanılarak yapılan western blot analizi ile teyit edildi. Western blot yapmadan önce aynı şekilde iki SDS PAGE jeli hazırlandı, bu jellerden biri Comassie Brilliant Blue ile boyanırken diğeri, boyama işlemine alınmadan Western Blotlamada kullanılmak üzere PVDF membrana transfer edildi.



Şekil 4.16. Western blot için hazırlanan SDS PAGE jel görüntüsü; M; marker, 1: Total hücre lizati, 2: birinci elüsyon fraksiyonu, 3: ikinci elüsyon fraksiyonu

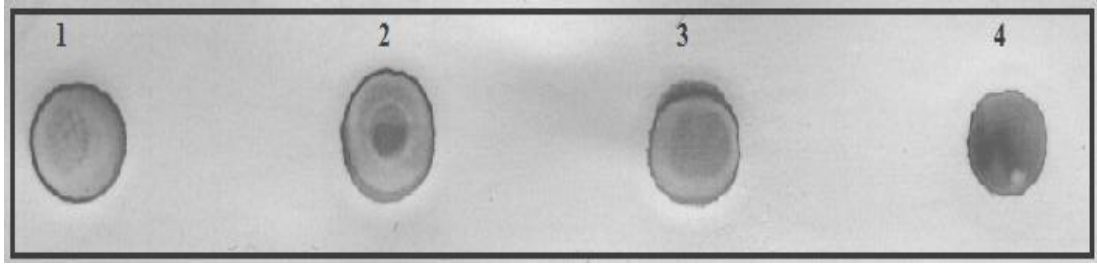


Şekil 4.17. His-Sumo-Omp28 precursor füzyon Proteininin Western Blot görüntüsü;Western blot analizinde birincil antikor olarak Mouse Monoklonal Anti-HisG IgG (invitrogen); ikincil antikor olarak Anti Mouse (goat) IgG HRP-conjugated (invitrogen) kullanılmıştır. M: marker, 1: total hücre lizati, 2: birinci elüsyon fraksiyonu, 3: ikinci elüsyon fraksiyonu

Western blot analizi; saflaştırma sonucunda elde edilen yaklaşık 40 kDa büyüklüğündeki proteinin; His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteini olduğu kesinlik kazanmıştır.

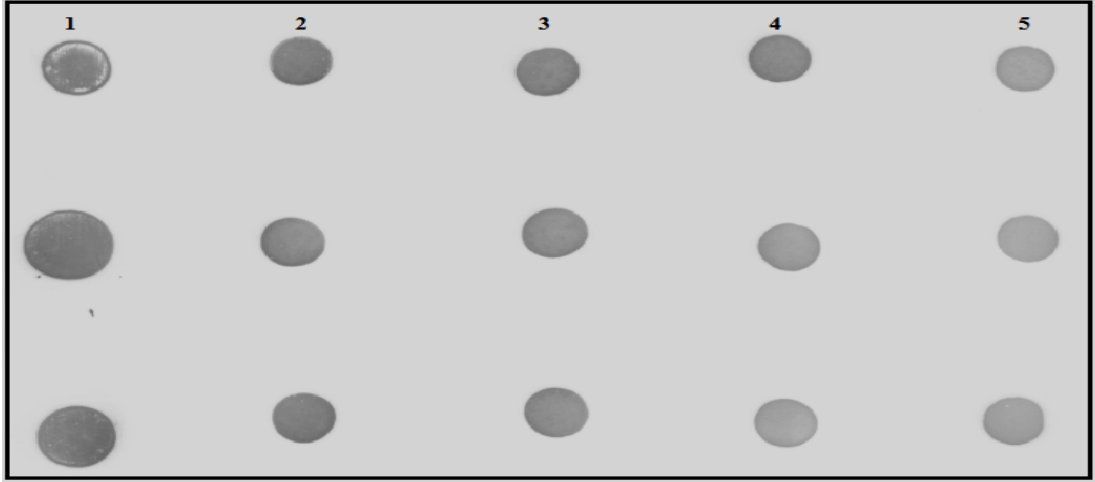
4.1.12. Dot Blot Sonucu

Dot blot analizi; 1- protein saflaştırma işlemi ve western blot analizinden önce elde edilen hücre ekstraksiyonunda His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteininin olup olmadığını, 2- saflaştırılan His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteininin farklı dilüsyonlardaki anti-His reaksiyonunu test etmek amacıyla yapıldı. Bu sayede saflaştırma ve üretim aşamasında meydana gelebilecek aksaklıklar önlenmiş oldu.



Şekil 4.18. Rekombinant BL21 (D3) total hücre lizatı ile yapılan dot blot görüntüsü:
1: 1/200 dilüsyon, 2: 1/100 dilüsyon, 3: 1/50 dilüsyon, 4: 1/25 dilüsyon

Hücre ekstraksiyonu sonucu elde edilen lizat kullanılarak yapılan dot blot sonucunda, rekombinant *E.coli* BL21 (D3) hücreleri içerisinde His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteininin yüksek miktarda eksprese edildiği tespit edilmiştir.

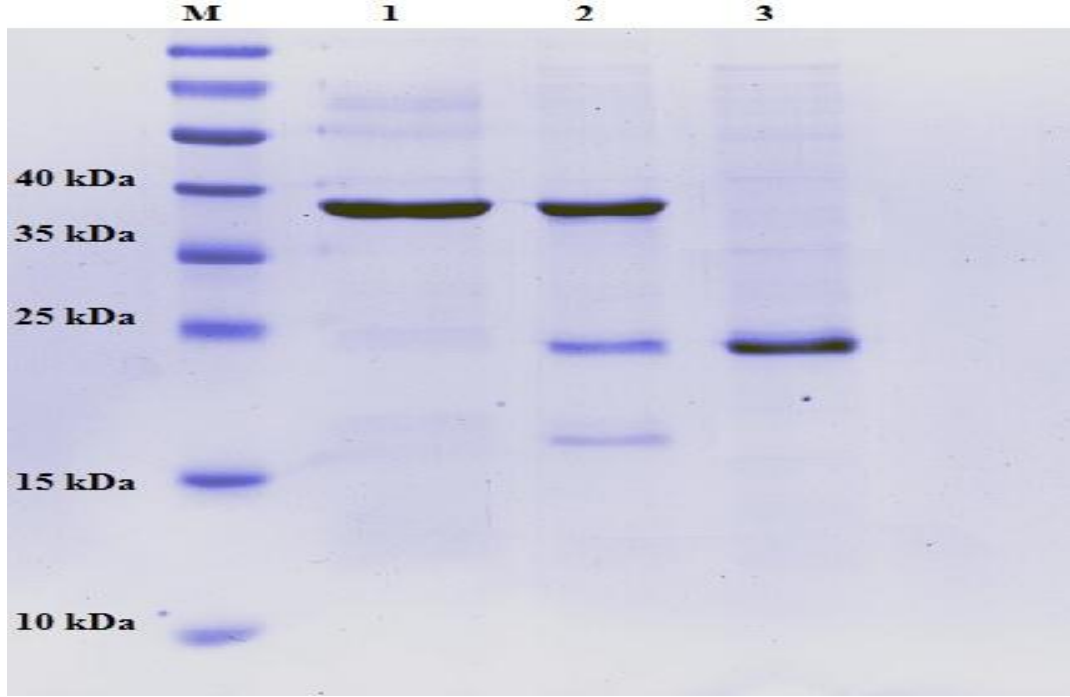


Şekil 4.19: Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırma sonrası elde edilen His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteinin dot blot görüntüsü; 1: 1/100 dilüsyon, 2: 1/200 dilüsyon, 3: 1/400 dilüsyon 4: 1/800 dilüsyon, 5: 1/1000 dilüsyon sonucu

Ni-NTA affinite kolonu ile yapılan saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen fraksiyonlarda His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteininin yüksek miktarda saf olarak elde edildiği tespit edilerek sonraki aşamalara güvenilir bir şekilde geçilmiştir.

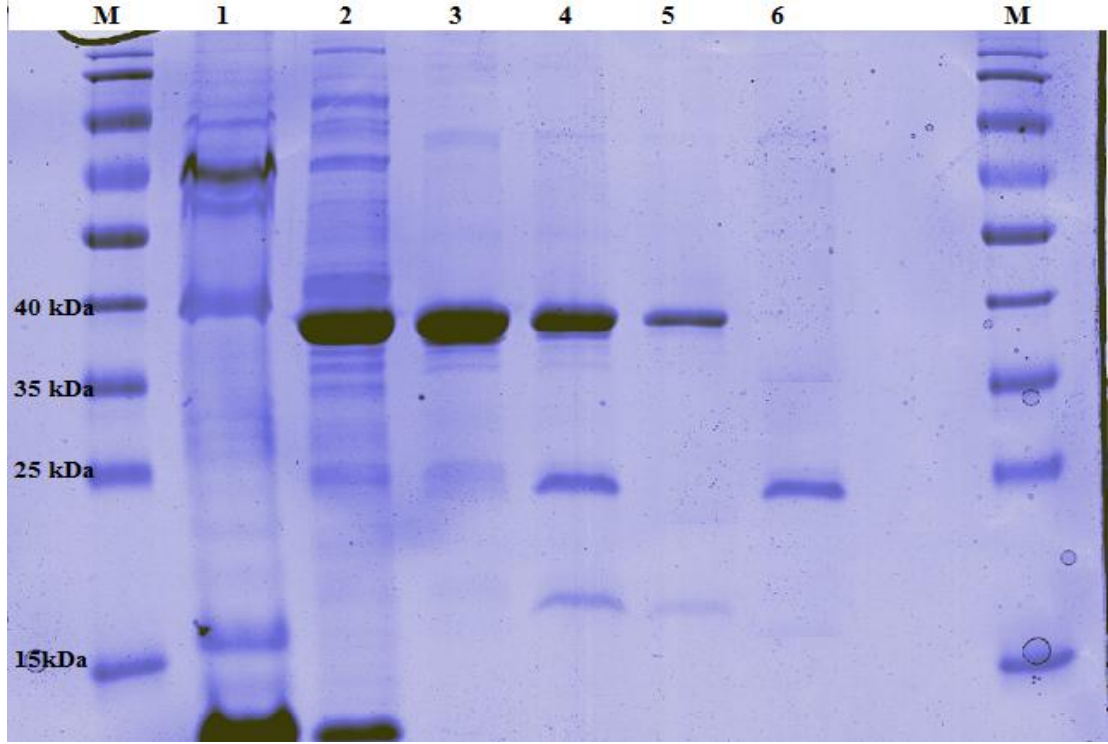
4.1.13. Sumo proteazla kesim sonucu

Sumo proteaz enzimi; His-Sumo-Omp28 precursor proteininin His-Sumo-kısmını keserek nativ omp28 precursor proteinin elde edilmesini sağlar. Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırma işleminden sonra elde edilen His-Sumo-Omp28 precursor füzyon proteini diyaliz edildikten sonra, proteaz işlemine tabi tutuldu. Sumo proteazla kesim sonucu SDS PAGE yapılarak görüntülendi.



Şekil 4.20.: Sumo protezla kesim sonucu elde edilen SDS PAGE görüntüsü; M: Marker, 1. band: Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırılan rekombinant His-Sumo-omp28 füzyon proteini, 2.band: rekombinant His-Sumo-omp28 proteinin kesim sonucu oluşan ürünler; en üste 40 kDa civarında kesilmemiş recombinant His-Sumo-omp28 füzyon proteini, ortada 25 kDa civarında omp28 precursor proteini ve altta His-Sumo proteini, 3.band: Sumo proteaz kesim sonucu oluşan ürünün , Ni-NTA affinite kolonuna yüklendikten sonra elde edilen nativ omp28 proteini.

Sumo proteaz kesim sonucunda üç band gözlemlendi. Bunlar 1- Kesim sonucunda kesilmeden kalan 40 kDa büyüklüğünde olan His-Sumo-omp28 precursor füzyon proteini, 2- yaklaşık 25 kDa büyüklüğündeki omp28 precursor proteini 3- His-Sumo proteini. Kesim sonucu elde edilen karışım Ni-NTA kolonuna yüklendikten sonra kesilmeden kalan His-Sumo-omp28 precursor füzyon proteini ve kesim sonucu oluşan His-Sumo proteini kolona bağlanırken omp28 precursor proteini kolona bağlanmadan ayrılır. Kolondan elde edilen fraksiyonlar toplanarak saf, nativ omp28 precursor proteini elde edildi.



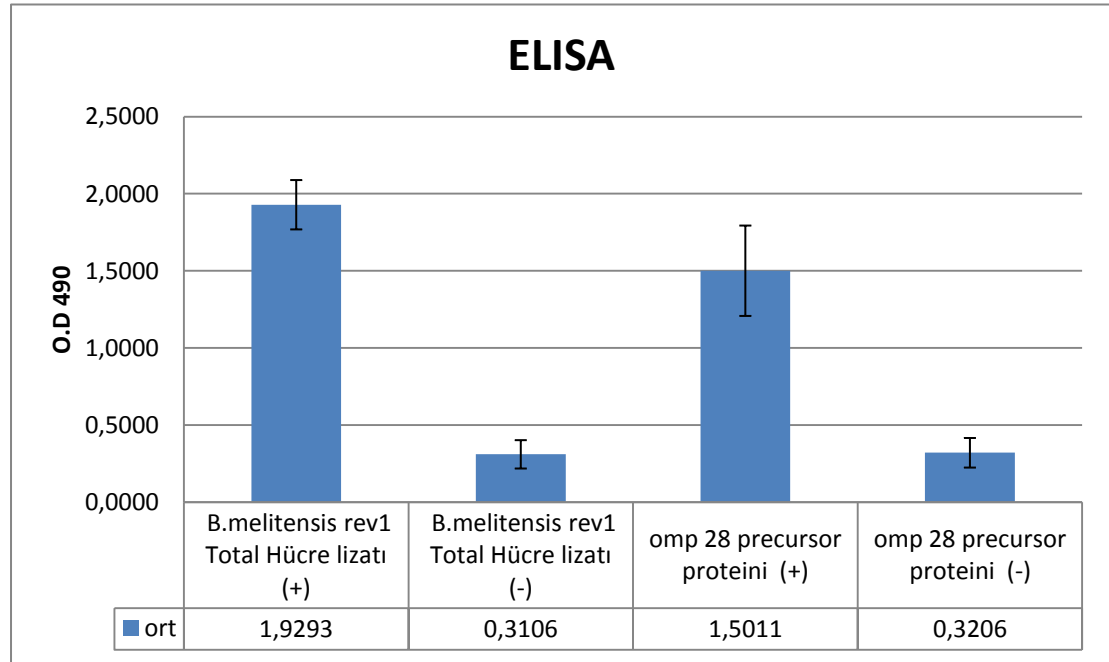
Şekil 4.21. omp28 precursor proteinin saflaştırma ve protezla kesim aşamaları sonucu elde edilen SDS PAGE görüntüsü; M: marker, 1. band: *Brucella melitensis* Rev1 total hücre lizati, 2. band: rekombinant *E.coli* BL21(D3) total hücre lizati, 3.band: Ni-NTA affinite kolonuyla saflaştırılan His-Sumo-Omp28 füzyon precursor proteini, 4.band: His-Sumo-Omp28 füzyon precursor proteinin sumo proteazla kesim sonucu oluşan ürünler, 5.band: Sumo proteaz kesim sonucu Ni-NTA affinite kolonuna yüklendikten sonra toplanan elüsyon fraksiyonu (His-Sumo-Omp28 füzyon precursor proteini ve His-Sumo) 6.band: Kesim sonra elde edilen saf Nativ omp28 precursor proteini.

SDS PAGE görüntüsünde omp28 precursor proteinin *E.coli* BL21(D3) deki yapısından, saf nativ omp28 precursor elde edilinceye kadar ki aşamalar izlenmektedir.

4.1.14. ELISA sonucu

Tüm saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen nativ omp28 precursor proteinin, diagnostik etkinliğinin tespit edilmesi için ELISA testi yapıldı. ELISA testi için; saflaştırılan omp28 precursor proteini mikropleytlere yapıştırılarak indirect ELISA testi oluşturuldu. İndirekt ELISA testinde 30 brucella enfeksiyonlu hasta ve 30 sağlıklı kişinin serumları kullanılarak yapıldı.

Omp28 precursor proteinin antijenik aktivitesini karşılaştırmak amacıyla, *Brucella melitensis* Rev1 total hücre lizatı kullanıldı. Sonuçta omp28 precursor proteinin *Brucella melitensis* Rev1 total hücre lizatına yakın bir seviyede antijenik özellik gösterdiği tespit edildi. Negatif kontrol olarak sağlıklı insanlardan alınan, kan serumlarının kullanıldığında ise total hücre lizatında 0,31, omp28 precursor proteinde ise 0,32 absorbans verdiği tespit edildi.



Şekil 4.22. *Brucella melitensis* Rev1 total hücre lizatı ve omp28 precursor proteinin ELISA sonucu

ELISA test sonuçları, rose bengal test sonuçları ile kıyaslanarak omp28 precursor proteinin diagnostik etkinliği araştırıldı. Bu amaçla ELISA sonuçları SPSS 15 programı kullanılarak ROC analizi yapıldı. ROC analizi sonucu cut off değeri 0,446 olarak tespit edildikten sonra elde edilen veriler kullanılarak, aşağıda verilen tablo hazırlandı.

Çizelge 4.2. ELISA ve RBT test sonuçları

Omp28 precursor ELISA SONUCU	Rose Bengal Test sonucu		TOPLAM
	Brucelloz (+)	Brucelloz (-)	
Brucelloz (+)	29	1	30
Brucelloz (-)	4	26	30
TOPLAM	33	27	60

Tablo bilgileri kullanılarak omp28 precursor proteininden elde edilen indirect ELISA testinin diagnostik etkinliğini gösteren veriler hesaplandığında; sensitivite %87,8 spesifite %96,2 pozitif prediktif değer %96,6 negatif prediktif değer % 78,7 ve testin geçerliliği %91,66 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3.omp28 precursor ELISA testinin diagnostik parametreleri

Antijen	cutoff	Sensivite %	Spesifite %	Pozitif Prediktif Değer %	Negatif Prediktif Değer %	Test Geçerliliği %
Rekombinat Omp28 precursor ELISA testi	0,446	87,8	96,2	96,6	78,7	91,66

4.2.Tartışma

Bruselloz; Brucella türlerinin enfeksiyonu nedeniyle dünya çapında yayılış gösteren, bakterisidal fagositik etkilerden korunma özelliğine sahip olması ve makrofaj içerisinde çoğalma özelliğinden dolayı, konakçı canlıda kronik enfeksiyonlara neden olan zoonotik bir hastalıktır (Enright, 1990; Renukaradhya ve ark., 2001).

İnsanlarda; dalgalı ateş, artrit ve osteomyeli sepmoları gösteren (Young, 1995) hastalık, başta gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkeler olmak üzere, tüm dünyada ciddi bir ekonomik kayba neden olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bruselloz en yaygın şekilde pastörize edilmemiş süt ve süt ürünleri tüketimi ile bulaşır, fakat aynı zamanda doğrudan temas yoluyla da bulaşır. Brucella organizmaları içeren aerosollerde yüksek derecede enfekte edici etkiye sahiptir. Her yıl 500.000'den fazla yeni insan bruselloz vakası rapor edilmektedir. Dünya sağlık örgütüne göre; bu sayı gerçek insidans oranını büyük ölçüde, düşük tahminde bulunduğundan, vaka sayısı dahada fazladır (WHO, 1997).

Heterojen ve zayıf spesifik klinik belirtileri nedeniyle Bruselloz tanısı, laboratuvar onayı gerektirmektedir. Laboratuvar tanı ise ya patojenin izole edilmesi ile yada spesifik antikorların bulunması ile konur. Bu hastalığın tanısı çoğunlukla kan örneklerinden bakteri izolasyonu ve karakterizasyonu ile konulmaktadır. Fakat sadece brucella izolasyonuna dayalı brucella tanısının birçok sakıncaları mevcuttur. Brucella kültür ortamında çok yavaş büyüdüğünden, büyüme süresi minimum 3-8 gün ve bazende 45 gün sürmektedir. Brucellanın kültür ortamında yavaş büyümesi tanı ve tedaviyi günlerce geciktirmektedir. Ayrıca brucella kültür tekniğinin duyarlılığı çok düşük olup, hastalığın evresi, kültür ortamı, kan örneğinden elde edilen canlı bakteri durumu ve aynı zamanda kan kültür tekniğini uygulayan personelin niteliği gibi pek çok faktöre bağlıdır. Bununla birlikte; Brucella türleri 3. sınıf patojen olduğundan, bu mikroorganizmaların kullanımı, laboratuvar personeli için yüksek risk oluşturmaktadır. Dolayısıyla, bakteri izolasyonu bruselloz teşhisi için uygun bir tanı aracı değildir (Mantur, 2007; Yagupsky, 2000; Young, 1995).

Brucella tanısında kültür testlerinin yanısıra serolojik ve PCR temelli testlerde kullanılmaktadır. PCR; hastalığın odak komplikasyonlarının yanı sıra, ilk enfeksiyon veya nüks durumlarında teşhis için kullanılmaktadır (Fekete, 1990; Queipo-Ortuño, 1997; Morata, 1999; 2001; 2003; Matar, 1996). PCR tekniği, genellikle zaman alıcı olması, uygulanması için yeterli sayıda mikroorganizmanın sağlanması, DNA izolasyonu gibi ön aşamalara sahip olması ve genel teşhis laboratuvarlarının kullanımı için uygun olmaması gibi durumlardan dolayı kullanım alanı oldukça kısıtlıdır (Fredricks, 1999; Luk, 1994; Zhong, 1999).

Kendi içerisinde kısıtlamaları olmasına rağmen, insan ve hayvan brucelloz teşhisinde çoğunlukla aglütinasyon testleri başta olmak üzere çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Bu serolojik testlerde tanı genellikle S-LPS'ye karşı oluşmuş olan spesifik antikorların saptanması temeline dayanır (Alton, 1988; Wright, 1990). Brucelloz tayininde serolojik olarak; complement fixation test, rose bengal plate test, standard tube agglutination test, milk ring test ve enzyme-linked immunosorbent assay gibi testler kullanılmaktadır. Bu testler ELISA hariç, genel olarak brucella hücre membranı üzerinde bulunan LPS'ye karşı oluşmuş antikorların tespitine dayanmaktadır. Ancak, genellikle köken olarak aynı LPS yapısına sahip olan; *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* o-157 gibi gram negatif bakterilerle çapraz reaksiyon verdiklerinden dolayı yanlış pozitif sonuç verme gibi güvenilir tanı koyma sorunları bulunmaktadır (Corbel, 1995). LPS'ye dayalı serolojik testlerden en çok rutin olarak, rose bengal testi kullanılmaktadır. RBPT bir nokta aglütinasyon tekniği olup, testin duyarlılığı ve özgüllüğü antijenin pH'sı, ortam sıcaklığı, antijen ve test serumunun sıcaklığı gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden hem yanlış hem de doğru pozitif sonuçlar verebilmektedir (Corbel, 1997).

Brucella için tek bir tanı testi geliştirilmesi; toplumda brucella kaynaklı bir enfeksiyonun önlenmesinde önemli bir rol oynayacağından dolayı, alanında bugünkü araştırmaların en önemli önceliğini oluşturmaktadır. Şuandaki serolojik testler çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar verdiği için günümüzde güvenilirliğini kaybetmiştir. Ayrıca LPS antijeninin üretimi sırasında yaşanan zorluklar ve biyolojik

risk oluşturmada, bu nedenler arasında sayılabilir. Bu tür nedenler LPS antijeni yerine, alternatif antijen geliştirme ihtiyacına yol açmaktadır. Bu nedenle, bruselloz tanısında; LPS yapısında olmayan aday antijenlerin araştırılması yönünde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde, çeşitli *Brucella* proteinlerinin humoral bağışıklık sistemini tetiklediği tespit edilmiştir (Baldi, 1996; Zygmunt, 1994; Cloeckaert, 2001; Hemmen ve ark., 1995; Letesson, 1997; Goldbaum, 1993; Limet, 1993; Cassataro, 2002; Contreras-Rodriguez, 2006).

Bu sonuçlara göre bazı bakteri bileşenlerinin immünojen, immün sistemi aktifleştirici ve koruyucu etkilerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Bu antijenlerin çoğu tam hücreler, sonike edilmiş hücre ekstratları, LPS, ya da sonikasyon ile elde edilmiş hücrelerden elde edilmiş protein ekstraktlarından oluşmaktadır. Tüm bu formlar farklı *Brucella* türleri arasındaki ortak antijenleri paylaşmaktadır. Bu antijenlere karşı geliştirilen serolojik testler *Brucella canis* ve *Brucella ovis* dışındaki tüm *brucella* türlerini algılayabilme özelliğine sahiptir (Al Dahouk ve ark., 2003).

Bu bakteriyel bileşenler içerisinde özellikle yüzey membran proteinleri; aşı ve tanı kiti geliştirmek için cazip görülmektedir. Bakterilerdeki dış membran proteinleri *brucella* enfeksiyonun'da konak hücrenin indüksiyonu ve immün yanıt oluşturmada önemli rol oynamaktadır. Genellikle başarılı aşı ve diagnostik reaktifler öncelikle antikor oluşumu sağlayan mikroorganizmaların yüzeyindeki yapılardır. Bu yüzden bakterilerdeki yüzey proteinlerinin, aşı ve diagnostik reaktiflerin geliştirilmesi için önemli antijenler olduğu düşünülmektedir.

Bu amaçla; gen kütüphanesinin olmadığı zamanlarda *Brucella melitensis* 20 kDa (Denoel, 1995), 28 kDa (Lindler, 1996) ve 31 kDa (Vizcaino, 1996) membran proteinleri ile *B. Abortus* ait 16.5 kDa (Tibor, 1994), 22 kDa (Tibor, 1996), 25 kDa (Wergifosse, 1995), 36 kDa (Ficht, 1989), ve *B. Ovis*'in 25 kDa omp (Cloeckaert, 1996), proteinleri geleneksel yöntemlerle klonlanarak üretilmiştir. Sentezlenen bu omp'ler düşük molekül ağırlığında olup, rekombinant kütüphane verileri ve spesifik diagnostik ajanlar kullanılarak yapılan immün reaksiyon sonuçlarına göre üretilmiştir.

B.melitensis ve *B.suis* genom sekansının 2002 yılında yayınlanması (Paulsen, 2002) sonucu elde edilen verilere göre; *Brucella melitensis*'in iki kromozomu üzerinde 3197 ORF gen bölgesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu biyoinformatik bilgi *Brucella* dış membran proteinlerinin klonlanması ve üretimi için son derece yararlı bir fırsat sağladı. Ayrıca, rekombinant proteinlerin geliştirilmesi için bütün genom dizileme veri uygulama programının ilk olarak, *Neisseria meningitidis* (Tettelin, 2000) ve *Streptococcus pneumoniae* için ortaya konması (Wizemann., 2001), *brucella* genom bilgilerinin kullanılarak; herhangi bir genin klonlanması ve protein üretimi için önemli bir fırsat sağladı. Bu şekilde genom verilerine dayanarak geliştirilen immünojenik ve antijenik bakteriyel bileşenler aşı ve diagnostik kit gelişimi için önemli bileşenlerin elde edilmesini sağlamıştır.

Brucella için gelişmiş bir tanı testi geliştirmek; *Brucella* enfeksiyonunun önemli bir şekilde önlenmesine yardımcı olup önemli bir toplumsal amaca hizmet edecektir. Bundan dolayı immünojenik veya antijenik bakteriyel bileşenlerin bulunması tanı geliştirme sürecinin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, bruselloz tanısı için kullanılabilir testler karşılaştırıldığında, kronik ve karmaşık durumlarda ELISA testlerinin *brucella* tespiti için en uygun tanı testi olduğu teyit edilmiştir (Araj, 2005). ELISA testlerinin geliştirilmesi için genomik bilgi kullanılarak çeşitli *brucella* proteinleri rekombinant olarak üretilerek, diagnostik özellikleri tespit edilmiştir (Karina ve ark., 2009; Eoh ve ark., 2010; Yangy ve ark., 2011; Farahi ve ark., 2012).

Bizde bu çalışmamızda yeni bir ELISA testi geliştirmek amacıyla; daha önce çalışılmamış *Brucella melitensis Rev1*'e ait omp28 precursor proteinini rekombinant tekniklerle üreterek, ilk defa tag kısmı içermeyen *brucella*ya ait bir membran proteinini nativ bir şekilde üretmeyi hedefledik.

Brucella'ya ait rekombinant protein üretimi ile ilgili yapılmış olan önceki çalışmalarda *Brucella abortus* (Eoh ve ark., 2010; Karina ve ark., 2009; Gonzalez ve ark., 2009; Sanjay ve ark., 2008), *Brucella melitensis* 16M (Cassataro ve ark., 2005; Pallab ve ark., 2010) ve diğer *brucella* türleri kullanılmıştır. Çalışmamızda ise

günümüzde hayvanlarda atenue aşısı olarak çok yaygın bir şekilde kullanılan, *Brucella melitensis*'in *Rev1* suşuna ait omp28 precursor proteini üretmeyi hedefledik. Günümüzde *Brucella melitensis*'in *Rev1* suşu çok yaygın bir şekilde aşısı olarak kullanılmasına rağmen aşı ve aşısız hayvan ayırımının yapılamaması en büyük dezavantajını oluşturmaktadır. Ayrıca bu ayırım yapılamadığından dolayı aşılama sonrası sağlıklı olduğu varsayılan hayvanlardan elde edilen ürünlerden, brucella insanlara bulaşmaktadır. Bu tür sorunlar ile bölgemizde; brucelloz enfeksiyonunun fazla görülmesi ve bu aşının çok kullanılmasından dolayı çalışmamızda *Brucella melitensis*'in *Rev1*'e ait proteini üretip, bu sorunlara çözüm bulmayı hedefledik.

Brucella suşu tespit edildikten sonra; *Brucella melitensis*'in *Rev1*'e ait proteomiks verileri; protein bankasında (ncbi.nlm.nih.gov ve uniprot.org) incelendiğinde, 3200 protein içerdiği ve bu proteinlerin 23'ünün yüzey membran proteini olduğu tespit edildi. Bu proteinlerden immünojen yapıda olan membran proteinleri daha önceden yapılmış olan immuproteomiks verileri incelenerek tespit edildi. Literatür taraması sonucunda; rekombinant omp28'in; brucellaya ait grup 3 membran proteinleri sınıfına ait, hücre periplazmasında bulunan immünojen bir protein olup, mikrobiyoloji kültür testi sonucunda, *B. abortus* ve *B. melitensis* enfeksiyonu olduğu tespit edilmiş insan serumlarıyla yapılan çalışmada, humoral immun yanıt ürettiği tespit edilerek, brucella için bir aşısı adayı olarak kullanılabileceği ileri sürülen bir membran proteindir (Lindler, 1996).

Brucella melitensis *Rev1*'e ait omp28 precursor proteini, NCBI genom bankasındaki ORF gen dizisi (GenBank: AY634231.1) kullanılarak üretildi. ORF gen bölgesinin tamamı PCR yapıldıktan sonra pETSUMO ekspresyon vektörüne klonlanarak üretildi. pETSUMO ekspresyon sistemi içerisinde omp28 precursor geninin klonlanması sonucu, yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığında rekombinant protein elde edildi. pETSUMO sistemi içerisine klonlama sonucu; omp28 precursor proteinine yaklaşık 13 kDa büyüklüğünde 6xhis ve sumo tag kısımları eklenerek, His-Sumo-omp28 precursor proteinin sentezlenmesi sağlandı. Klonlanmış ürünün dizisi, gen bankasındaki omp28 precursor gen dizisi ile teyit edilerek tamamen uygun olduğu tespit edildi.

Yapılan önceki çalışmalarda klonlama ve ekspresyon vektörü olmak üzere iki farklı vektör kullanılmıştır (Renukaradhya ve ark., 2001; Zygmunt ve ark., 2002; Cassataro ve ark., 2005; Xuan ve ark., 2005; Gonzalez ve ark., 2009). Bu çalışmalarda; PCR ile çoğaltılan gen bölgesinin, klonlama vektörüne aktarılması, genin vektör içerisinde olup olmadığının teyit edilmesi ve tekrardan klonlama vektöründen kesilerek ekspresyon vektörüne aktarma işlemleri restriksiyon enzim kullanımı gerektirerek, rekombinant protein üretim işleminin uzamasına neden olmuştur. Çalışmamızda ise hem klonlama, hemde ekspresyon özelliği gösteren pETSUMO vektörü kullanıldı. Bu sayede PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri kullanılmadan direk olarak A/T klonlama yöntemiyle vektöre eklenmesi ve protein ekspresyonunun yapılması sağlandı. Bu yöntem sayesinde, rekombinant protein ekspresyon işlemini zorlaştıran bir kaç aşama azaltılarak, yöntemin daha da kullanışlı bir hale gelmesi sağlanmış oldu.

E.coli BL21 (D3) hücrelerine transformasyon yapıldıktan sonra, rekombinant protein ekspresyon seviyesi farklı IPTG konsantrasyonları, inkübasyon sıcaklığı ve süreleri kullanılarak optimize edildi. Elde edilen sonuçlar neticesinde 1mM IPTG konsantrasyonunda 37 °C'de 6 saat inkübasyon süresinin protein ekspresyonu için optimum olduğu tespit edildi.

Protein ekspresyonu sonucu oluşan proteinlerin saflaştırılması için farklı ekstraksiyon tamponları kullanılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında protein ekstraksiyonu nativ ekstraksiyon yöntemlerle sağlanırken (Xuan ve ark., 2005; Cassataro ve ark., 2005; Zygmunt., 2002; Sanjay ve ark., 2008), bir kısmında ise denatüre ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır (Pallab ve ark., 2010). Çalışmamızda ise; daha önceki çalışmaların aksine (Xuan ve ark., 2005; Cassataro ve ark., 2005; Zygmunt, 2002; Sanjay ve ark., 2008) eksprese edilen rekombinant proteinin çoğunluğunun sitoplazmada, inklüzyon tanecikleri halinde depolandığını tespit ettiğimizden dolayı denatüre lizis yöntemini kullandık.

İnklüzyon tanecikleri; protein ekspresyon seviyesinin yüksek olması neticesinde oluşan yaygın bir özelliktir. Hücre içerisindeki protein ekspresyonu

sonucunda, inklüzyon taneciklerinde, protein agregatları halinde depolanan rekombinant proteinlerin proteaz aktivitelerinden korunması sağlanarak, stabilitelerinin artmasına neden olmaktadır. Protein ekspresyonu sonucu oluşan rekombinant proteinin inklüzyon taneciklerine dönüşümü protein saflaştırma işlemlerini zorlaştırdığı ve elde edilen protein verimini düşürdüğü için, *E.coli* hücrelerinde inklüzyon taneciklerinin oluşumunu engellemek için çeşitli çalışmalar yaptık. Bu çalışmalarda; proteini nativ şartlar altında üretmek amacıyla hücrenin protein ekspresyon seviyesini düşüren, düşük sıcaklık ortamlarında (15°C-30°C), uzun sürelerde (6-24 saat) inkübasyon ve farklı IPTG konsantrasyonları (0,5-2,0 mM) gibi denemeler neticesinde proteinin inklüzyon taneciklerine dönüşümü engellenemedi. Ayrıca eksprese edilen omp28 precursor proteinin tag kısmında bulunan sumo kısmının; protein çözünürlüğünü artırarak, inklüzyon taneciklerinin oluşumu engelleme özelliğine sahip olabilirliği olmasına rağmen, yinede inklüzyon tanecik oluşumu engellenemedi. Sonuçta üretilen proteinin membran proteini olması ve ekspresyon seviyesinin çok fazla olmasından dolayı inklüzyon tanecikleri halinde depolandığı sonucuna vardık.

Ekspresyon sonucu hücre içinde inklüzyon tanecikleri halinde bulunan rekombinant proteinlerin denatüre lizis ortamıyla (8M üre) inklüzyon taneciklerinden ayrılması sağlanarak, saflaştırılması sağlandı. Saflaştırma işlemi; His gruplarıyla affinite gösteren Ni-NTA affinite kolonu (Thermo) kullanılarak yapıldı. Eksprese edilen omp28 precursor rekombinant proteini, N-terminal bölgesinde His tag ve sumo proteini olacak şekilde tasarlandığı için Ni-NTA affinite kolonuyla tek aşamada saflaştırıldı. Saflaştırma işleminden sonra ortamdaki denatüre ajan olan üre gradientli diyaliz işlemiyle ortamdaki uzaklaştırılarak, proteinin katlanması sağlanarak nativ forma dönüştürüldü.

Kumar Ashu ve ark., 2012; *Brucella melitensis* 16M omp28 protein ekspresyonu için farklı vektör ve ekspresyon şartlarında yaptıkları saflaştırma sonrasında; nativ şartlarda 1,2 mg/l ile 12 mg/l arasında recombinant protein elde ederken, denatüre şartlar altında ise 90 mg/l-150 mg/l protein elde etmişlerdir. Protein verimindeki artışın en önemli etmeni ise kuvvetli bir redükleyici olan β -

mercaptoetanölün kullanılmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise 30 mg/l protein elde ettik. Bu çalışmaya göre elde ettiğimiz protein veriminin az olmasının nedeni, denatüre ortamda β -mercaptoetanöl kullanmamızdan kaynaklandı. β -mercaptoetanöl; kullandığımız Ni-NTA affinite kolonuna zarar verdiği için kullanılmadı. Sonraki çalışmalarda β -mercaptoetanolden etkilenmeyen kolon kullanılırsa daha yüksek verim elde edilebilir.

Brucellaya ait rekombinat protein üretimiyle yapılan önceki çalışmalarda (Pasquevich ve ark., 2009; Eoh ve ark., 2010; Yangy ve ark., 2011, Farahi ve ark., 2012) üretilen rekombinant proteinler N- veya C- terminal kısmında poli histidin grupları olacak şekilde üretilmiştir. Bu şekilde üretilen proteinler; N veya C terminal kısımlarında bulunan His tag gibi gruplarından dolayı doğal form özelliğine sahip değildir. Çalışmamızda ilk defa rekombinant olarak ürettiğimiz proteinin N-terminal kısmında bulunan His-sumo tag kısımları sumo proteazla uzaklaştırılarak nativ rekombinant protein elde edilmiştir. Bu sayede His-tag gruplarından kaynaklanan protein modifikasyonları engellenerek, rekombinant proteinin doğal formunda elde edilmesi sağlanmıştır.

Çalışmamız sonucunda % 96 saflık oranında doğal bir formda saflaştırdığımız omp28 precursor proteinin immünoagnostik ve immünojen etkilerini tespit etmek amacıyla indirect ELISA yöntemini kullandık. Proteinin immünojen etkinliği *Brucella melitensis* Rev1 total hücre lizati ile karşılaştırıldığına *Brucella melitensis* Rev1 total hücre lizati 1,92 absorbas verirken, omp28 precursor proteini 1,5 absorbas vererek total lizata yakın antijenik özellikte olduğu tespit edildi. Ayrıca çalışmamızda omp28 precursor antijenine karşı, brucella enfeksiyonlu insanlarda oluşmuş olan antikorların tespit edilmesi sağlandı. Omp28 precursor antijenine dayalı indirect ELISA testi, Brucella total LPS yapısına dayalı RBT testi ile karşılaştırıldı. Bunun için hastanelerden toplanan brucella enfeksiyonlu hasta serumları kullanıldı. Bu sayede brucellozlu hastalarda, brucellaya karşı oluşmuş olan antikorların tespit edilmesi sağlandı.

Faklı burcella türlerinin farklı proteinleri ile yapılan ELISA çalışmalarında; Renukaradhya ve ark., (2001); Hindistanda sığır brucelozunu teşhis etmek için *Brucella abortus* 99 suşunun düz lipopolisakaritlerini kullanarak avidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay (A-B ELISA) kiti yapmışlardır. Testin etkinliğini belirlemek amacıyla 500 hasta ve 500 sağlıklı sığır serumu kullanarak yaptıkları ELISA sonucunda, üretilen kitin % 98.8 spesifite ve % 98.2 sensivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Cassataro ve ark (2005); *Brucella melitensis* 16M bakterisinin omp31 proteinini Pet22+ vektörüne klonlayıp ürettikten sonra, indirek ELISA yöntemiyle immundiagnostik etkisini araştırmışlardır. ELISA işlemi için, brucella enfeksiyonlu 74 insan, 57 koyun ve 47 köpek serumu kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda; rekombinant omp31 proteinin, insan serumu ile % 47, koyun % 59, köpekte ise % 67 pozitif sonuç verdiği tespit etmişlerdir.

Contreras ve ark., (2006); *Brucella melitensis* 16M'in 97 kDa'luk aminopeptidaz N enzim (pepN) genini pCR2.1 vektörüne klonlayarak ekprese ettikten sonra, Ni-NTA affinite kolonuyla saflaştırıp, diagnostik etkinliğini ELISA testi ile araştırmışlardır. ELISA testini 25 hasta, 53 sağlıklı insan serumu kullanarak yapmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda % 100 spesifite, % 100 sensivite tespit etmişlerdir.

Pallab ve ark (2010); *Brucella melitensis* 16 M bakterisinin romp28 proteinini pPROExHTb vektörüne klonladıktan sonra, N terminal kısmında His bulunacak şekilde üretmişlerdir. Üretilen bu proteinin diagnostik etkisi brucella enfeksiyonlu koyun, keçi, inek ve domuz serumları kullanılarak, ELISA ile tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda recombinant proteinin; % 88,7 sensivite, % 93,8 spesifite ve % 92,9 doğruluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Eoh ve ark (2010); *B. abortus* S2308 bakterisinin D-erythrose 1-phosphate dehydrogenase (EryC), Omp16, PP26 ve CP39 proteinlerini pT7 blue klonlama vekörü ve ardından pQE30 vektörüne klonladıktan sonra elde ettikleri rekombinant

proteinleri ELISA testi yaparak diagnostik değerlerini araştırmışlardır. ELISA için 100 hasta ve 200 sağlıklı büyükbaş hayvan serumu kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarakta *B. abortus* S2308 total hücre lizatı kullanılmış. Çalışma sonucunda Omp16, PP26, CP39 ve EryC proteinlerinin % 96 spesifite gösterirken, total hücre lizatının % 95 spesifite gösterdiği, Omp16, PP26, CP39 ve EryC proteinlerinin sırasıyla % 10, % 51, % 64 ve % 43 sensitivite gösterirken, total hücre lizatının % 53 sensitivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Jinlang Qiu. ve ark., (2012); Yalnız 2010 yılında 35.000 yeni brucella vakasının meydana geldiği Çinde koyun ve keçilerin aşılanmasında kullanılan *B. melitensis* aşı suşu M5-90 bakterisinin BP26 proteini üretip saflaştırıldıktan sonra, BP26 proteinin karakterizasyonu ve epitop bölgelerinin fare ve koyun antikorlarıyla reaksiyonunu incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada BP26 proteinine karşı 29 monoklonal antikor sentezlemişlerdir. Elde edilen antikorlar BP26 proteinin farklı büyüklükteki peptid kısımları ile reaksiyona konulup epitop bölgeleri incelendi. Bu peptidlerden linear epitop özelliği gösteren rBP26 ve NMP peptidlerinin antikorla reaksiyonu ELISA ile test edildi. ELISA'da 137 koyun serumu kullanıldı. Lineer peptidlerden ikisinin % 70-65, NMP ise % 90 spesifite gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise rekombinant olarak ürettiğimiz omp28 precursor proteini ile yapılan indirect ELISA testinin; sensitivitesi % 87,8 spesifitesi % 96,2 pozitif prediktif değeri % 96,6 negatif prediktif değeri % 78,7 ve geçerliliği % 91,66 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde ettiğimiz bu veriler; daha önce anti-brucella antikorları saptamak için farklı hayvan türleriyle yapılan çalışma sonuçlarıyla tutarlılık göstermektedir (Debbarih, 1996; Sanjay ve ark., 2008; Pasquevich ve ark., 2009; Eoh ve ark., 2010; Yangy ve ark., 2011; Farahi ve ark., 2012). Bu sonuçlar neticesinde Omp28 precursor proteinin diagnostik açıdan yararlı olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda, rekombinant omp28 precursor proteini kullanarak yapılan indirect ELISA testi, brucellozlu insan serum örneklerindeki anti-Brucella antikorlarının tespiti için yüksek sensitivite ve spesifite göstererek, omp28 precursor proteininin bruselloz teşhisi için önemli bir reaktif olduğu ve bruselloz teşhisi için

yapılacak olan bir indirekt ELISA kiti için potansiyel bir aday olduğunu tespit ettik. Aynı antijen koyun, keçi gibi hayvanlar içinde potansiyel bir tanı ajanı olarak hizmet verebilir. Ayrıca bu çalışma; *B. melitensis Rev1*'in immunoreaktif omp28 precursor proteinin *E. coli* sistemi çerisinde yüksek düzeyde üretilebileceğini ve tek bir adımda hemen homojen bir hale getirilip, saflaştırılabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar, çok kısa bir süre içinde antijenlerin toplu olarak, yüksek miktarda üretimi için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Brucella teşhisine yönelik yapılan diğer çalışmalar ise şu şekildedir;

Zygmunt ve ark., (2002); *B. ovisteki* BP26 proteininin immüdiagnostik değerini test etmek için yaptıkları çalışmada; BP26 genini, pCP2800 vektörüne klonlandıktan sonra *E. coli*'de üretilen rekombinant proteini, anyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırdılar. Saflaştırılan rekombinant proteinin, *B. ovis* enfeksiyonlu ineklerden toplanan serulamlarla indirect ELISA yapılarak antijenik özelliği tespit edildi. ELISA sonucunda rekombinant BP26 proteinin % 90 pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda rekombinant BP26 proteinin ineklerde serolojik diagnosis için uygun bir antijen olduğu tespit edilmiştir.

Xuan ve ark., (2005); *B. susis*'e ait yedi dış membran proteinini, pENTR/SD/D-TOPO klonlama vektörüne klonladıktan sonra, pETDEST42 ekspresyon vektörüne klonlayarak C terminal kısmında 6-His ve V5 epitop tag kısmı bulunan rekombinant füzyon protein ekspresyonu yapmışlardır. Saflaştırılan rekombinant membran proteinlerini, *B. melitensis* mutant WRR51 hücre lizatı ile immünize edilmiş tavşan serumu ve bu serumdan izole edilen IgG antikorları ile western blot analizi yaparak antijenik özellikleri incelenmiştir. Analiz sonucunda sentezlenen yedi omp proteinin reaksiyon verdiği tespit edilerek, bu proteinlerin immüdiagnostikte ve aşı reaksiyonlarında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Sanjay ve ark., (2008); Günümüzde Anti-LPS antikorlarını tespit etmeye yönelik olan serolojik testler yerine alternatif antijen geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; *Brucella abortus*'a ait periplasmik Bp26 proteinini, pQE30 UA

vektörüne klonlayarak ürettikten sonra, üretilen proteinin antikor bağlama kapasitesi, *B.abortus* total hücre lizatı ile intramuskular olarak immünize edilen tavşan serumu kullanılarak tespit edildi. Diagnostik özelliği ise 25 brucella enfeksiyonlu ve 50 sağlıklı sığırdan alınan serumlar ELİSA testi yapılarak incelendi. Çalışma sonucunda Bp26 proteinin diagnostik etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Gonzalez ve ark., (2009); *Brucella abortus* ait initiation factor 3(IF3) protein gen bölgesini pUC19 klonlama vektörüne klonlandıktan sonra, Pet-15b protein ekspresyon vektörüne klonlayıp N terminal kısmında His rezidü buluna rekombinant (IF3) proteini ürettiler. Üretilen proteinle yapılan invitro çalışmalarda, proteinin lenfosit hücrelerini güçlü bir şekilde sitümüle ettiğini, lenfosit sayısında artış meydana getirdiğini ve gamma interferon düzeyinde artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Pasquevich ve ark., (2009); *Brucella abortus*'a ait Omp16 ve Omp19 proteinlerini rekombinant olarak ürettiler. Üretilen lipoprotein yapıdaki Omp16 ve Omp19 proteinlerinin bir kısmı lipit kısmından arındırıldı. Bu şekilde elde edilen 4 farklı proteinin; balb/c farelerde brucella enfeksiyonuna karşı koruyucu aşı etkinliğini test etmişlerdir. Bu çalışmada rekombinant Omp16 ve Omp19 proteinleri Freund's adjuvant (IFA) ile karıştırarak balb/c farelere inoküle edildi. Pozitif kontrol olarakta *Brucella abortus* S19 suşu kullanıldı. İmmün sitem yanıtı Flow sitometrik analiz yapılarak incelendi. Sonuçta rekombinant olarak üretilen dört proteinin; antijene spesifik CD4⁺, CD8⁺ hücre sayıları ve ürettikleri gamma interferon seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğu, lipid kısmı giderilmiş Omp16 ve Omp19 proteinlerinin daha iyi immün yanıt oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Vahedi ve ark., (2011); *Brucella melitensis* Rev1 bakterisinin omp31 proteinini pET32b(+) vektörüne klonlayıp, His-tag içeren rekombinant omp31 proteinin immünojen etkisini etkisi araştırmışlardır. Bu çalışmada üretilen rekombinant proteinin immünojen özelliği 5 brucella enfeksiyonlu ve 5 sağlıklı kişinin serumu

kullanılarak yapılan western blot analizi ile tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda rekombinant omp31 proteinin immüjen olduğu ileri sürülmüştür.

Büyüktanır ve ark., (2011); Sitozolik immunoreaktif *B. abortus* P17 proteini, pCold I soğuk şok ekspresyon vektörüne p17 geni klonlanarak *Escherichia coli*'de 6xHistidin kuyruklu rekombinant protein (rP17) şeklinde üretilip, Ni-NTA affinite kromatografisi ve SDS-PAGE sonrası poliakrilamid jelden elusyonu içeren iki aşamada saflaştırılıp Western blot yöntemi ile inceleme sonucunda, rekombinant rP17 proteininin immün reaktifliğini koruduğunu tespit etmişlerdir.

Yangy ve ark., (2011); *Brucella melitensis* 16M 'e karşı koruyucu subunit aşı geliştirmek için yaptıkları bu çalışmada; *Brucella melitensis*'in LC-MS/MS ile ayrılan çözünür proteinlerini 2-D elektroforez ve immünblotlama yaptıktan sonra, çözünür proteinlerden 27'sinin immünojen olduğunu tespit etmişlerdir. Bu proteinlerden homocysteine hidrolase proteini pMD18-T klonlama vektörüne klonlayıp sekansladıktan sonra, pET28a ekspresyon vektörüne klonlayıp, rekombinant homocysteine hidrolase proteinini üretmişlerdir. Üretilen rekombinat proteinin balb/c farelerde antikor üretimini yüksek miktarda arttırdığı, gamma interferon ve interlökin-2 oluşumunu sitümüle ettiğinden dolayı *B.melitensis* 16 M karşı koruyucu olduğunu tespit etmişlerdir.

Farahi ve ark., (2012); *Brucella abortus* karşı aşı geliştirmek için yaptıkları çalışmada; *Brucella abortus* S19 outer membrane protein 19 proteinini pET28a(+) vektörüne klonlayıp, ürettikten sonra saflaştırdılar. Üretilen rekombinant omp19 proteini balb/c farelere enjekte edilip, fareler immünize edildikten sonra dalak hücreleri izole edilerek, kültür ortamına konuldu. İn-vivo ortamda izole dalak hücreleri romp19 ile muamele edilerek, romp19 proteinin dalak hücreleri üzerindeki sitümülasyonu incelenmiştir. Çalışma sonucunda romp19'un hücreleri stimüle ettiği ve eklenen hücrelerde sayıca artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre omp19'un ilerleyen zamanlarda, *Brucella abortus* eradikasyonunda etkili bir aşı olacağı sonucuna varılmıştır.

Simei ve ark., (2012); *B. abortus* karşı subunit aşısı geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; *B. abortus* 544'e ait 12 adet proteini Gateway klonlama sistemi ile pDONR201 klonlama ve PHXGWA ekspresyon vektörüne klonlayarak, 35 rekombinant protein üretmişlerdir. Üretilen rekombinant proteinlerin immün sistem üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla öncelikle; kültür ortamında dalak hücreleri ile muamele edilerek, dalak hücrelerindeki stimülasyon etkileri ve üretilen IFN- γ (gama interferon) seviyeleri ölçülmüş sonrasında balb/c fareler rekombinant proteinlerle immünize edildikten sonra farelere *B. abortus* enfekte edilerek, üretilen proteinlerin koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda üretilen 35 rekombinant proteinden 7 proteinin IFN- γ üretimini güçlü bir şekilde stimüle ettiği ve yalnızca BAB1_1316 (CobB) ve BAB1_1688 (AsnC) proteinlerinin *B. abortus* enfeksiyonuna koruyucu etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu iki proteinin subunit aşısı adayı olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

Lei Zhang ve ark., (2012); *Brucella melitensis* 16M 'in BCSP31 proteinin rekombinant olarak üretilmesi ve bu proteine karşı monoklonal antikor üretilerek brucella diagnosisindeki potansiyel kullanımını tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada; BCSP31 proteinini rekombinat olarak ürettikten sonra bu proteine karşı 2 monoklonal antikor geliştirmişlerdir. Elde edilen monoklonal antikorların *E.coli*, *Mycobacterium tuberculosis* gibi bakterilerle etkileşim kurmadığı yalnızca *B.melitensis* BCSP31 ile reaksiyon verdiğini tespit ettikleri için gelecekte brucella tanısında etkin rol oynayacağını belirtmişlerdir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Dünyada önemli halk sağlığı problemlerinden biri sayılan brusellozun etkeni olan *Brucella* cinsi bakteriler fakültatif hücre içi bakterilerdir. Dünya sağlık örgütü (WHO) ve diğer uluslararası sağlık kuruluşları (OIE ve FAO) tarafından dünyadaki en yaygın zoonoz olarak kabul edilen bruselloz, hayvanlarda meydana getirmiş olduğu ekonomik kayıpların yanı sıra, bu hayvanlarla direkt temasta bulunan veya bunlara ait kontamine süt ve süt ürünlerini tüketen insanları da etkileyerek önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır.

İnsanlarda gastrointestinal sistem, deri veya solunum yoluyla vücuda alınan brucellalar, hematojen yolla RES organlarına yayılmakta ve özellikle karaciğer, dalak, kemik iliği, böbrek, santral sinir sistemi, endokard, testis ve overler ile büyük eklem ve vertebralara yerleşim gösterebilmektedir (Cengiz, 2007; Yılmaz, 2007). Vücuttaki tüm organlarda bruselloza bağlı tutulum meydana gelebileceğinden dolayı, hastalık çok çeşitli klinik tablolarla ortaya çıkabilmektedir. Klinik belirtiler nonspesifik olup; yüksek ateş, terleme, titreme, sırt ve eklem ağrıları, miyalji ve atralji gibi bulgularla kendini göstermektedir (Cengiz, 2007). Brusellozun seyrine göre gastrointestinal sistem, iskelet sistemi, sinir sistemi veya kardiyovasküler sistem gibi çeşitli organ ve sistem tutulumları meydana gelebildiği; bununla beraber ülkemizdeki olgu serileri klinik yönden incelendiğinde özellikle gastrointestinal sistem ve kas iskelet sistemi tutulumlarının ön plana çıktığı ifade edilmektedir (Yüce ve Çavuş, 2006).

Brusellozda genel enfeksiyon belirtilerinin yanında özgül klinik belirtilerinin olmamasından dolayı laboratuvar tanı yöntemleri ön plana çıkmıştır. Mikroorganizmanın izolasyonundaki güçlüklerden dolayı serolojik yöntemlerden daha fazla yararlanılmaktadır. Brusellozun tanısında kültür yöntemlerinden daha hızlı ve duyarlı olan bu yöntemler hastalığın tanısında yaygın olarak kullanılmaya

başlanmıştır. İnsanlarda görülen bruselloz vakalarında tanı; alınan anamnez, fizik muayene bulguları ve laboratuvar testleri neticesinde ortaya konmaktadır. Teşhiste başlıca Rose-Bengal testi (hızlı tarama testi), Serum Tüp Aglutinasyon testi (STA), 2-Merkaptoetanol testi, Brucella Coombs testi, Komplemant Fiksasyon testi gibi serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Yetkin ve Iraz, 2006).

Bu serolojik testler çapraz reaksiyonlar nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar verdiği için günümüzde güvenilirliğini kaybetmiştir. Ayrıca LPS antijeninin üretimi sırasında yaşanan zorluklar ve biyolojik risk oluşturması da, bu nedenler arasında sayılabilir. Bu tür nedenler LPS antijeni yerine, alternatif antijen geliştirme ihtiyacına yol açmaktadır. Bu yüzden Brusellozun immünolojik çalışmalarında temel gaye, LPS yapısında olmayan yeni antijenlerin tespit edilmesi ve LPS antijenlerinin neden olduğu sakıncaları ortadan kaldırmaktır (Lindler, 1996; Debarh, 1996; Cloeckert, 2001).

Bu yüzden LPS yapısında olmayıp, insan ve hayvanlar için immünojenik ve antijenik özellik gösteren bakteriyel bileşenlerin tespit edilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, daha hızlı ve spesifik tanı yöntemleri geliştirmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Biz bu çalışmayı; *Brucella melitensis* Rev1 suşuna ait immünojenik yapıda olduğunu düşündüğümüz yüzey membran omp28 precursor proteini rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen affinite kromatografisi ile saflaştırdıktan ve karakterizasyonunu yaptıktan sonra, saflaştırılan proteinleri ELISA ile diagnostik etkinliğini tespit edip, rutin tanı testi olarak uygulanabilecek, kısa zamanda sonuç alınabilen, pratik, sensitivitesi ve spesifitesi yüksek immunodiagnostik bir test geliştirmek amacıyla yaptık.

Bu amaçla; *Brucella melitensis* Rev1 omp28 precursor proteini rekombinant DNA teknikleri ile üretilerek affinite kromatografisi ile saflaştırıldı. Çalışma kısaca aşağıda verilen aşamalardan oluşmaktadır;

1. *Brucella melitensis* Rev1 bakterisinden genomik DNA izolasyonu;

Rekombinant omp28 precursor proteinin gen bölgesini PCR ile çoğaltmak için *B. melitensis* Rev1'in genomik DNA'sı izole edildi. Elde edilen DNA sonraki aşama olan PCR işleminde kullanılacağından dolayı mümkün olduğunca saf bir şekilde izole edildi. İzole edilen DNA; konsantrasyonu agaroz jel elektroforezinde görüntülenerek tespit edildi.

2. Omp28 precursor gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması:

Klonlama işleminin gerçekleştirilmesi için omp28 precursor proteinine ait gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması gerekmektedir. PCR işlemi gerçekleştirilmek için; kaynak DNA olarak *B. melitensis* Rev1'den izole edilen genomik DNA ve genomik DNA'da omp28 precursor gen bölgesini tanıyıp, çoğaltılmasını sağlayacak olan primerler dizayn edildi.

Primerler; NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/49090354> sitesindeki *B. melitensis* Rev1'e ait genom DNA sekans verileri kullanılarak lightsycler (roche) primer dizayn programı kullanılarak dizayn edildi. Elde edilen genomik DNA ve primerler kullanılarak PCR işlemi yapıldı. PCR sonucu elde edilen ürünler %1 agaroz jel elektroforezinde görüntülediğinde 753 bp büyüklüğünde olan omp28 precursor gen bölgesinin istenilen miktarda elde edildiği tespit edildi.

3. PCR ürününün pETSUMO plazmidine ligasyonu:

PCR işlemi sonrasında elde edilen omp28 precursor gen bölgesinin *E.coli*'ye transfer edilebilmesi ve bu gen dizisinin kullanılarak protein ekspresyonun gerçekleştirilmesi için bir vektöre eklenmesi gerekmektedir.

PCR sonrasında elde edilen ürünlerin vektöre eklenmesi farklı yöntemlerle yapılabilmektedir, bu çalışmada A/T klonlama yöntemini kullandık. Bu yöntemde kullanılan pETSUMO vektörü, klonlamanın yapılacağı bölgenin iki ucuna T (timin

nükleotidi) eklenerek lineer bir hale getirilmiştir. Ayrıca iki uç kısmın sonradan birleşerek sirküler yapıya dönüşmesini engellemek için uç kısımlardaki fosfat gurupları defosforilasyon işlemiyle çıkarılmıştır.

PCR işleminde ise ekzonükleaz aktivitesi olmayan taq polimeraz enzimi kullanıldı. Bu enzim PCR işleminin extension aşamasında PCR ürününün 3' kısmına Poli adenin (A) gurupları eklemektedir. Bu işlemin istenilen düzeyde gerçekleşmesi için PCR'ın extension aşaması 10 dk olarak ayarlandı. omp28 precursor gen bölgesinin PCR sonrası elde edilen ürünlerinde uç kısımlarında Poli A bulunan genler elde edildi.

Ucunda T bulunan pETSUMO vektörü ile ucunda A bulunan PCR ürünleri 1:1 oranında karıştırılarak ligasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlem sonucunda omp28 precursor gen bölgesinin pETSUMO vektörüne yerleştirilerek, transformasyonu yapabilecek rekombinant sirküler plazmidler elde edildi.

4. Ligasyon ürününün klonlama konağı olan kompetent *E.coli* One Shot® Mach1 TMT1R hücrelerine transformasyonu

Ligasyon sonrası elde edilen plazmidler kompetent *E.coli* One Shot® Mach1 TMT1R hücrelerine 42 °C' lik ısı şoku uygulanarak transfer edildi. Çalışmamızda kullandığımız pETSUMO vektörü; hem klonlama hem de protein ekspresyon plazmidi özelliğine sahiptir. Ligasyon aşaması sonrasında elde edilen plazmidler protein ekspresyonu özelliğine sahip bakterilere transfer edilmeden önce, One Shot® Mach1 hücrelerine aktarılarak, omp28 precursor gen bölgesini doğru bir şekilde içeren plazmidlerin tespit edilmesi ve plazmidlerin çoğaltılması sağlandı.

5. Transformasyon sonrası pozitif kolonilerin seçilmesi

Transformasyon sonrası omp28 precursor gen bölgesini içeren hücrelerin tespit edilmesi gerekmektedir. Bunun için aşağıda verilen yöntemler kullanıldı;

1- Hücreler 50 µg/ml kanamisinli besiyerine ekilerek pETSUMO plazmidini içeren hücrelerin ayırt edilmesi sağlandı. pETSUMO plazmidi üzerinde kanamisine direçlilik gösteren gen bölgesi olduğundan, yalnızca plazmidi içeren bakteriler antibiyotikli ortamda çoğalabilmektedir.

2- Besiyerinde oluşan kolonilerden 14 tanesi seçilerek omp28 precursor gen bölgesinin primerleri kullanılarak PCR işlemi yapıldı. PCR işlemi sonucunda, 10 koloni pozitif sonuç verdi.

3- Omp28 precursor gen bölgesi içeren koloniler tespit edildikten sonra, pozitif olan 5 koloni çapraz PCR işlemi yapılarak, omp28 precursor gen bölgesinin plazmide doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği incelendi. Sonuçta seçilen tüm kolonilerde genin plazmide doğru yönde yerleştiği tespit edildi.

6. Plasmid izolasyonu ve PCR ile kontrol edilmesi

Kontrol işlemlerinden sonra pozitif olduğu tespit edilen koloni seçici besiyerinde çoğaltarak, plasmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmidler protein ekspresyon konakçısı olan *E.coli* BL21 (D3) hücrelerine transfer edilmeden önce kontrol PCR işlemi yapıldı. PCR işlemi sonucunda plazmidin 723 bp'lik omp28 precursor gen bölgesini içerdiği tespit edildi.

7. Sekans analizinin yapılması

PCR işlemi sonucunda omp28 precursor gen bölgesi içeren pETSUMO plazmidinde herhangi bir mutasyon olup olmadığı ve genin plazmid içerisinde doğru yönde yerleşip yerleşmediği sekans analizi yapılarak incelendi.

Sonuçta pETSUMO plazmidi içerisinde omp28 precursor gen bölgesinin mutasyonsuz, doğru bir şekilde yerleştiği tespit edildi.

8. Plazmitlerin protein ekspresyon konakçısı olan *E.coli* BL21 (D3) hücrelerine transfer edilmesi

Yapılan kontrol işlemlerinden sonra izole edilen pETSUMO plazmidi, T7 polimeraz özelliğinden dolayı protein ekspresyon konakçısı olan kompotent *E.coli* BL21 (D3) hücrelerine ısı şokuyla transfer edildi.

9. Transformasyon hücrelerinin seçici besiyerine ekilmesi ve pozitif kolonilerin PCR ile kontrolü

Transformasyon işlemi sonrasında, hücreler seçici besiyerine ekilerek çoğaltıldı. Besiyerinde oluşan pozitif koloniler, kontrol PCR işlemleri yapılarak plazmid içeren BL21 hücreleri tespit edildi.

10. Protein ekspresyonu ve protein verimi için optimum ortam şartlarının tespit edilmesi

E.coli BL21 (D3) hücrelerinde protein ekspresyonunun gerçekleşebilmesi için ortam şartlarının iyi ayarlanması gerekmektedir. Bu şartlar; 1-Protein ekspresyon indükleyici madde olan IPTG konsantrasyonu 1mM olarak tespit edildi. 2- BL21 hücrelerinde optimum protein ekspresyonu için inkübasyon şartları; 37 °C 'de 6 saat olarak tespit edildi. 3- Protein çözünürlüğü; hücrelerde üretilen His-sumo-omp28 precursor proteinin inklüzyon tanecikleri halinde depolandığı tespit edildi. Inklüzyon tanecikleri içerisindeki proteinin açığa çıkartılması için denatüre lizis yöntemi uygulandı. Bu sayede rekombinant proteinin açığa çıkması sağlandı.

11. BL21 (D3) hücrelerinin ekstraksiyonu, Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırılması ve protein miktarının tayin edilmesi

Protein saflaştırılması için her aşamada 50 ml kültür ortamı hazırlandı. 50 ml kültür ortamı protein ekspresyonu sonrası santrifüj edilerek 0,70 mg hücre peleti elde edildi. Elde edilen pelet 8 ml nativ lizis buffer ile lize edildikten sonra inklüzyon

tanecikleri açısından zengin olan pelet kısmı, 5 ml denatüre lizis buffer ile ekstraksiyon yapılarak His-sumo-omp28 precursor proteinin çözünür bir yapı kazanması sağlandı. Protein miktar tayini Bradfor metoduyla ölçüldü.

Nativ lizis sonrası lizat ortamında toplam 160 mg (20 mg/ml) protein tespit edildi. Nativ lizis sonrası kalan peletin denatüre lizis sonucunda 70 mg protein (14 mg/ml) tespit edildi. Denatüre lizis sonucu elde edilen lizat 1:1 oranında binding buffer ile karıştırıldıktan sonra Nİ-NTA affinite kolonuna yüklenerek saflaştırıldı. Saflaştırma işleminde elüsyon fraksiyonları toplanarak His-sumo-omp28 precursor proteini saflaştırıldı.

12. Saflaştırılan proteinin western blotlama ve dot blotlama ile karakterizasyonunun yapılması.

Saflaştırma işlemi sonrasında elde edilen proteinin molekül ağırlığı her ne kadar 40 kDa civarında olsa da, proteinin istediğimiz protein olup olmadığını tespit etmemiz gereklidir. Tespit işlemini western blotlama ve dot blot metodlarıyla yaptık. Bu işlemde saflaştırdığımız His-sumo-omp28 precursor proteinin uç kısmında bulunan, His guruplarına özgü anti-His primer antikoru kullanılarak yapıldı. Western ve Dot blot işlemi sonrasında His-sumo-omp28 precursor proteinin karakterizasyonu yapılarak, üretilen proteinin istediğimiz protein olduğu tespit edildi.

13. Saflaştırılan rekombinant His-Sumo-omp28 precursor proteinin Sumo proteaz ile kesilmesi

Nativ omp28 precursor proteinini üretmek ve tek safhada saflaştırmak için geni pETSUMO plazmidine klonladık. Bu özellikler petsumo vektörünün uç kısmında His-Sumo protein bölgeleri sayesinde sağlandı. His kısmı sayesinde Ni affinite kolonu ile proteini saflaştırdık. Sumo kısmı ise nativ proteini elde etmemizi sağladı.

Rekombinant olarak ürettiğimiz His-Sumo-omp28 precursor proteini sumo proteazla reaksiyona konulduğunda proteaz enzimi sumo ile omp28 precursor

arasında bulunan gly-gly peptid bağlarını keserek; His-Sumo ve omp28 precursor proteinlerini birbirinden ayrılmasını ve omp28 precursor proteinin elde edilmesini sağladı.

Meydana gelen bu protein karışımı Ni-NTA affinite kolonuna yüklendiğinde His gruplarına sahip olan His-Sumo ve sumoproteaz proteinleri kolona bağlı kaldığı, nativ omp28 precursor proteinin ise kolondan ayrıldığı tespit edildi. Bu sayede saf nativ omp28 precursor proteini elde edildi.

14. Nativ omp28 precursor proteinin ELISA ile diagnostik özelliğinin tespit edilmesi.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen nativ omp28 precursor proteinin, antijenik ve diagnostik özelliğinin tespit edilmesi için indirect ELISA yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için elde edilen proteinler polistrein nunc marka pleytlere bağlandı.

Diagnostik ve antijenik özelliğinin tespit edilmesi için Rose bengal testi (+) ve tüp aglütinasyon sonucu 1/320 olan brucella enfeksiyonlu 30 hasta ile Rose bengal testi (-) olan 30 sağlıklı insan serumu kullanıldı.

Sonuçta; antijenik özellik olarak; *B.melitensis* rev1 total hücre lizatu pozitif hastalarda 1,929 abs gözlenirken omp28 precursor proteininde ise 1,501 absorbans tespit edildi. Bu sonuç elde edilen rekombinat proteinin antijenik özellik gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Diagnostik özelliğinin tespit edilmesi için ELISA' dan elde edilen sonuçlar 1- ROC analizi yapılarak cut off değeri 0,446 olarak tespit edildi. 2-Rose bengal sonuçları ile kıyaslanarak; sensivite % 87,8 spesifite % 96,2 pozitif prediktif değer % 96,6 negatif prediktif değer % 78,7 ve testin geçerliliği % 91,66 olarak tespit edilmiştir.

5.2. Öneriler

1. Çalışmamızda elde ettiğimiz nativ omp28 precursor proteini ile elde edilen indirect ELISA testi; daha fazla brucella enfeksiyonlu insan ve hayvan serumları kullanılarak diagnostik etkinliği geniş bir sahada tespit edildikten sonra indirect ELISA kiti elde edilebilir.
2. Çalışmamızda rekombinant olarak ürettiğimiz nativ omp28 precursor proteinin kuvvetli antijenik özellik gösterdiğini tespit ettik. Günümüzde brucellaya karşı, insanlarda kullanılan bir aşı yok, hayvanlarda ise atenüe *B. melitensis* Rev1 aşı olarak kullanılmaktadır. Fakat bu aşı canlı bakterilerden oluştuğu için, bazı durumlarda sağlıklı hayvanı enfeksiyonlu hala getirebilmekte, aşılama sonrasında hayvanlarda abortusa sebebiyet vermekte, sütüyle insanlara enfeksiyonu bulaştırabilmektedir. *B. melitensis* Rev1 aşısı bu tür dezavantajlara sahip olmasına rağmen, günümüzde en etkili aşı olarak kullanılmaktadır. Bundan dolayı, brucellaya karşı zararsız aşı adayları geliştirme üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların en önemli kısmını ise subunit aşılar oluşturmaktadır. Subunit aşılar ise genellikle brucella ait yüzey membran proteinleri ve sitozolik yapılardan oluşmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz omp28 precursor proteini’de bir subunit aşı adayı olarak kullanılabilir. Proteinin bu özelliği invivo ve invitro ortamlarda, interlökin indükleyici aktivite gibi antijeniteyi ortaya çıkaran çalışmalar yapılarak tespit edilebilir. Elde edilecek bir subunit aşı; başta bölgemizde olmak üzere dünyanın çeşitli bölgelerinde *Brucella mellitensis*’in neden olduğu hastalıklara karşı bağışıklık sağlayarak, oluşacak vaka sayının azalmasını sağlayacaktır.
3. Nativ omp28 precursor proteinin antijenik özelliği olduğundan dolayı, omp28 precursor proteini hibridoma ya da faj display tekniklerinde kullanılarak anti-omp28 precursor monoklonal antikorları elde edilebilir. Elde edilen bu antikorlar kullanılarak brucella enfeksiyon şüphesi olan insan veya

hayvanlarda, kan veya vücut sıvılarında hızlı ve hassasiyeti yüksek bir şekilde brucella etkeninin varlığı tespit edilerek, hastalığın erken tanısını sağlayacak immünohistokimya ya da direct ELISA kitleri elde edilebilir.

4. Günümüzde tıp ve diğer arge çalışmalarında kullanılan tanı kitleri, enzimler, aşılarda ve terapötik ajanlar rekombinant DNA teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Bu kadar geniş yelpazede ürün oluşturma potansiyeli olan rekombinant DNA teknolojisi, ne yazık ki ülkemizde çok geniş bir yer bulamamıştır. Bu tezde kullanılan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak protein üretimi ve saflaştırma tekniklerinin tüm aşamaları mümkün olduğunca ayrıntılı olarak verilmeye çalışılmıştır. Bu sayede, bu tekniklerin ülkemizde daha çok kullanılarak, ülke ekonomisine katma değer sağlayarak, dışa bağımlılığı azaltacak hali hazırda kullanılan çeşitli tanı kitlerinin üretilmesinin yanı sıra, yeni tanı kitlerinin, (kanser, markırları v.b) ortaya çıkarılması sağlanabilir.
5. Bu çalışmada ürettiğimiz, antijenik özellik gösteren, omp28 precursor proteini immünaffinite kolon matrikslerinde bir ligand rolü alarak brucella enfeksiyonlu hayvan ya da insan kanında, brucellaya karşı oluşan antikorların daha kolay bir şekilde saflaştırılması için kullanılabilir. İzole edilen bu antikorlar ise brucella tedavisinde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- ADIGÜZEL, A., 2001. Erzurum'a Bağlı Köylerden Toplanan Süt Örneklerinde Brucella abortus antikorlarının ELISA ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum,35s.
- ADIGÜZEL, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum,45s.
- AL-DAHOUK, S., TOMASO, H., NÖCKLER, K., NEUBAUER, H., and FRANGOULİDİS, D., 2003. Laboratory Based Diagnosis Of Brucellosis A Review Of The Literature. Part II: Serological Tests For Brucellosis. Clin Lab.49 (11-12):577-89.
- ALAİN, A.O.S., JESUS, A.B., and JUAN, M.G.L., 2005. Development of a new PCR assay to identify Brucella abortus biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. Veterinary Microbiology, 110: 41-51.
- ALTAY, G., 2008. Kültür Pozitif 70 Bruselloz Hastasının Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi ve Antibiyotik Duyarlılıklarının E-Test Yöntemi İle İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul,50s.
- ALTON, G.G., JONES, L.M., ANGUS, R.D., and VERGER, J.M., 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, France.
- AMES, I., 2007. Brusellozis. College of Veterinary Medicine, Iowa State University. Iowa.
- ANCORA, M., DE SANTİS, P., Dİ GIANNATALE, E., and ALESSIANİ, A., 2005. Molecular typing of Brucella field strains isolated in italy. Veteriana italiana, 41(1): 51-55.
- ANONİM, 2010. www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm.
- ANONİM., 2011. <http://en.wikipedia.org/wiki/Brucellosis>
- ANONİM., 2012. http://tr.wikipedia.org/wiki/Rekombinant_DNA_teknolojisi
- ANONİM., 2012. http://www.iba-lifesciences.com/Custom_Protein_Production.html
- ANONİM., 2012. www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260103475.ppt
- ARAJ, G.F, KATTAR, M.M., FATTOUH, L.G, BAJAKİAN., K.O., and KOBEİSSİ, S.A., 2005. Evaluation Of The Panbio Brucella İmmunoglobulin G (Igg) and Igm Enzyme-Linked İmmunosorbent Assays For Diagnosis Of Human Brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol. 12(11):1334-5.
- ARASOĞLU, TÜLİN., 2010. Erzurum ve Çevresindeki İnek Sütlerinde PCR Yöntemiyle Brucella Abortus'un Belirlenmesi.Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum,20s.
- ARI, Ş., 1999. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniv., Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM), 1: 57-68.
- AYAZ, C., 2005. Brusellozun Türkiye'deki Durumu. KLİMİK dergisi, 18: 100-101.
- BADDOUR, M.M. and ALKHALİFA, D. H., 2007. Evaluation of PCR techniques for detection of Brucella DNA in peripheral human blood. Thesis, Faculty

- of Medicine, Alexandria University, Current Affiliation, King Saud University, Saudi Arabia, 50s.
- BALDÌ, P.C., GIAMBARTOLOMEI, G.H., GOLDBAUM, F.A., ABDON, L.F., VELIKOVSKY, C.A., and KITTELBERGER, R., 1996. Humoral Immune Response Against Lipopolysaccharide And Cytoplasmic Proteins Of *Brucella abortus* In Cattle Vaccinated With B. abortus S19 Or Experimentally Infected With *Yersinia enterocolitica* Serotype O:9. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3:472-6.
- BOSCHIROLI, M.L., FOULONGNE, V., and O' CALLAGHAN, D., 2001. Brucellosis: A Worldwide Zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4: 58-64.
- BOUNAADJA, L., ALBERT, D., CHENAÏS, B., HENAULT, S., ZYGMUNT, M.S., POLIAK, S., and GARIN-BASTUJÍ, B., 2009. Real-Time PCR For Identification Of *Brucella* Spp.: A Comparative Study Of IS711, bcs31 and Per Target Genes. *Veterinary Microbiology*, 137:156–164.
- BRICKER, B.J., 2002. Diagnostic Strategies Used For Identification Of *Brucella*. *Veterinary Microbiology*, 90: 433-434.
- BRICKER, B.J., and HALLING, S.M., 1995. Differentiation Of *Brucella abortus* Bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, And *Brucella suis* Bv. 1 By Pcr. *Journal Of Clinical Microbiology*, 32(11): 2660-2666.
- BRICKER, B.J., EWALT, D.R., MACMILLAN, A.P., FOSTER, G., and BREW, S., 2000. Molecular Characterization of *Brucella* Strains Isolated from Marine Mammals. *Journal Of Clinical Microbiology*, 38: 1258–1262.
- BROWER, A., OKWUMABUA, O., MASSENGILL, C., MUENKS, Q., VANDERLOO, P., DUSTER, M., HOMBA, K., and KURTH, K., 2007. Investigation Of The Spread Of *Brucella canis* Via The U.S. Interstate Dog Trade. *Int. J. Infect. Dis.*, 11(5): 454-458.
- BÜYÜKTANIR, ÖZLEM., GENÇ, OKTAY., and YURDUSEV, NEVZAT., 2011. Production, Purification and Characterization of the Recombinant *Brucella abortus* rP17 Protein. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 17 (1): 135-140.
- CASSATARO, J., DELPINO, M.V., VELIKOVSKY, C.A., BRUNO, L., FOSSATI, C.A., and BALDÌ, P.C., 2002. Diagnostic Usefulness Of Antibodies Against Ribosome Recycling Factor From *Brucella melitensis* In Human Or Canine Brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9: 366-9.
- CASSATARO, JULIANA., KARINA, PASQUEVICH., LAURA, BRUNO., JORGE, C., WALLACH, CARLOS., A, FOSSATI., and PABLO, C, BALDÌ., 2005. Antibody Reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in Human and Animal Infections by Smooth and Rough *Brucellae*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11 (1): 111–114.
- CENGİZ, L., 2000. Gebelik ve Bruselloz. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 50-53s.
- CLOECKAERT, A., and VIZCAÏNO, N., 2004. DNA Polymorphism and Taxonomy of *Brucella* Species. *Brucella Molecular and Cellular Biology*. Ed: Ignacio Lopez-Goni and Ignacio Moriyon. Horizon Bioscience, England, 21-43.
- CLOECKAERT, A., BAUCHERON, S., VIZCAÏNO, N., and ZYGMUNT, M.S., 2001. Use Of Recombinant BP26 Protein In Serological Diagnosis Of *Brucella melitensis* Infection In Sheep. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8:772-5.
- CLOECKAERT, A., J.M. VERGER, M. GRAYON., M.S. ZYGMUNT., and O. GREPINET., 1996. Nucleotide Sequence And Expression Of The Gene

- Encoding The Major 25-Kda Outer Membrane Protein Of Brucella Ovis: Evidence For Antigenic Shift, Compared With Other Brucella Species, Due To A Deletion In The Gene, *Infect. Immun*, 64: 2047–2055.
- CLOECKAERT, A., VERGER, J.M., GRAYON, M., PAQUET, J.Y., GARİN-BASTUJİ, B., FOSTER, G., and GODFROİD, J., 2001. Classification Of Brucella Spp. İsolated From Marine Mammals By DNA Polymorphism At The Omp2 Locus. *Microbes And Infection*, 3: 729–738.
- CLOECKAERT, A., VİZCAİNO, N., PAQUET J.Y., BOWDEN, R.A., and ELZER, P.H., 2002. Major Outer Membrane Proteins of Brucella spp.: Past, Present and Future. *Veterinary Microbiology*, 90: 229-247.
- CONTRERAS-RODRİGUEZ, A., SALEEM, M.N., SCHURİG, G.G., SRİRANGANATHAN, N., BOYLE, S.M., and LOPEZ-MERİNO, A., 2006. Cloning, Expression And Characterization Of İmmunogenic Aminopeptidase N Form Brucella Melitensis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48:252-6.
- CORBEL, M. J., 1995. Recent Advances İn The Study Of Brucella Antigens And Serological Cross Reactions. *Vet Bull*, 55: 927–942
- CORBEL, M.J., 1997. Brucellosis: an Overview. *Emerging Infectious Diseases*, (2):213-221.
- CUTLER, S.J., 2006. Brucellosis The Most Common Bacterial Zoonosis?. *The Biomedical Scientist*, 63:336-341.
- ÇELEBİ, Ş.U., MUTLU, G., İMİR, T., CENGİZ, A.T., USTAÇELEBİ, Ş., TÜMBAY, E., METE, Ö., 1999. Brucella. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi Ltd. şti., Ankara, 571-579.
- DEBBARH, H.S, CLOECKAERT, A, BEZARD, G., DUBRAY, G., ZYGMUNT MS., 1996. Enzyme linked İmmunosorbent Assay With Partially Purified Cytosoluble 28-Kilodalton Protein For Serological Differentiation Between Brucella Melitensisinfected and B. Melitensis Rev.1-Vaccinated Sheep. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3:305-8.
- DENOEL, P.A., M.S. ZYGMUNT, V., WEYNANTS, A., TİBOR, B., LİCHTFOUSE, P., BRİFFEUİL, J.N., LİMET, J.J., LETESSON., 1995. Cloning And Sequencing Of The Bacterioferritin Gene Of Brucella Melitensis 16M Strain, *FEBS Lett.* 361: (2-3) 238–242.
- DİZER, U., 2004. Brucelloz. GATA Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Bilimler Ders notları. www.gata.edu.tr/dahilibilimler/infeksiyon/Ders_Notlari/BRUSELLOZ.htm.
- ELFAKİ, M.G., UZ-ZAMAN, T., AL-HOKAİL, A.A., and NAKEEB, S.M., 2005. Detection of Brucella DNA in Sera from Patients With Brucellosis by Polymerase Chain Reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 53: 1-7.
- ENRİGH, F. M., K. Nielsen., and J. R. Duncan., 1990. The pathogenesis and pathobiology of Brucella infection in domestic animals, In *Animal Brucellosis*, (Eds.), pp. 301-320. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- EOH, HYUNGJİN., BO-YOUNG, JEON., ZHİYEOL, KİM., SEUNG-CHEOL KİM, SANG-NAE, CHO., 2010. Expression And Validation Of D-Erythrulose 1-Phosphate Dehydrogenase From Brucella Abortus: A Diagnostic Reagent For Bovine Brucellosis. *J Vet Diagn Invest*, 22:524–530.

- ERDENLİĞ, S., 2003. Türkiye’de Brucella Kökenleri. KLİMİK dergisi, 16: 21-23
- FARAHİ, FATEMEH,, ESMAEİL, ASLİ., ASHRAF, MOHABATİ., MOBAREZ, NİMA KHORAMABADİ., and AMİR, BAKHTİARİ., 2012. Recombinant Brucella Abortus Outer Membrane Protein 19 (Romp19) Significantly Stimulates Splenic Lymphocytes Of Immunized BALB/C Mice. African Journal Of Microbiology Research Vol., 6(19): 4128-4131.
- FEKETE, A., BUNDLE, J.A, HALLİNG, S.M., SANBORN, M.R., 1990. Preliminary Development Of A Diagnostic Test For Brucella Using Polymerase Chain Reaction. J Appl Bacteriol, 69(2):216–227.
- FİCHT, T.A., HUSSEİNEN, H.S., DERR, J., and BEARDEN, S.W., 1996. Species-Specific Sequences At The Omp2 Locus Of Brucella Type Strains. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 329–331.
- FİCHT, T.A., S.W. BEARDEN, B.A., and SOWA, L.G. ADAMS., 1989. DNA Sequence And Expression Of The 36-Kda Outer Membrane Protein Gene Of Brucella Abortus, Infect. Immun. 57:3281–32891.
- FREDRİCKS, D.N., RELMAN, D.A., 1999. Application Of Polymerase Chain Reaction To The Diagnosis Of Infectious Diseases. Clin Infect Dis, 29(3):475–488.
- GARİN-BASTUJİ, B., BLASCO, J.M., MARİN, C., and ALBERT, D., 2006. The Diagnosis Of Brucellosis İn Sheep And Goats, Old And New Tools. Small Ruminant Research, 62: 63–70.
- GARRİDO- ABELLAN, F., DURAN- FERRER, M., MACMİLLAN, A., MİNAS, A., NİCOLETTİ, P.,and VECCHİ, G., 2001. Brucellosis in sheep and goats (Brucella melitensis). Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, ed: R.Ahl. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General.
- GOLDBAUM, F.A, LEONİ, J., WALLACH, J.C., and FOSSATİ, C.A., 1993. Characterization Of An 18-Kilodalton Brucella Cytoplasmic Protein Which Appears To Be A Serological Marker Of Active İnfection Of Both Human And Bovine Brucellosis. J Clin Microbiol, 31:2141-5.
- GONZÁLEZ, M., ANDREWS, E., FOLCH, H., SÁEZ, D., CABRERA, A., SALGADO and P, OÑATEA.,2009.Cloning, Expression And Immunogenicity Ofthe Translation İnitiation Factor 3 Homologue Of Brucella Abortus. Immunobiology., 214(2):113-20.
- GUPTA, V.K., VERMA, D.K., ROUT, P.K., SİNGH, S.V., and VİHAN, V.S., 2006. Polymerase chain reaction for detection of Brucella melitensis in goat milk. Small Ruminant Research, 65:79-84.
- GÜLLÜCE, M., 1993. Kars Ve Çevresinde, Sığırlarda, B. Abortusa Karşı Oluşan Antikorların ELİSA Ve Diğer Serolojik Yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) Saptanması Ve Sonuçlarının Karşılaştırılması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Kars.76-77s.
- HALLİNG, S.M., PETERSON-BURCH, B.D., BRİCKER, B.J., ZUERNER, R.J., QİNG, Z., Lİ, L.L., KAPUR, V., ALT, D.P., and OLSEN, S.C., 2005. Completion Of The Genome Sequence Of Brucella Abortus And Comparison To The Highly Similar Genomes Of Brucella Melitensis And Brucella Suis. Journal Of Bacteriology, 187 (8): 2715–2726.

- HAMDY, M. E. R., and AMİN, A. S., 2002. Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. *The Veterinary Journal*, 163: 299-305.
- HASANJANĪ, ROUSHAN, M.R., MOHRAZ, M., HAJIAHMADI, M., RAMZANĪ, A., and VALAYATI, A.A., 2006. Efficacy Of Gentamicin Plus Doxycycline Versus Streptomycin Plus Doxycycline In The Treatment Of Brucellosis In Humans. *Clin. Infect. Dis.*, 42 (8): 1075–1080.
- HEMMEN, F, WEYNANTS, V., SCARCEZ, T., LETESSON, J.J., and SAMAN, E., 1995. Cloning And Sequence Analysis Of A Newly Identified Brucella Abortus Gene And Serological Evaluation Of The 17-Kilodalton Antigen That It Encodes. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 2(3):263–267.
- HERNANDEZ- CARO, P., FERNA'NDEZ-LAGO, L., MĪGUEL, M. J., MARTIN-MARTIN, A. I., CLOECKAERT, A., GRĪLLO, M. J. and VĪZCAINO1, N., 2007. Role Of The Omp25/Omp31 Family In Outer Membrane Properties And Virulence Of Brucella Ovis. *Infection And Immunity*, 75:4050–4061.
- HEYMANN, D.L., 2004. Control of Communicable Diseases Manual. Washington DC, USA: American Public Health Association, 18th (edn) , pp. 700.
- IMAOKA, K., KĪMURA, M., SUZUKĪ, M., KAMIYAMA, T., and YAMADA, A., 2007. Simultaneous Detection of The Genus Brucella by Combinatorial PCR. *Jpn.J. Infect. Dis.*, 60: 137-139.
- JĪNLANG, QĪU., WENJĪNG, WANG., JĪNGBO, WU., HUI, ZHANG., YUANZHĪ, WANG., JUN, QĪAO., CHUANGFU, CHEN., GOEGE, F., GAO, JEAN-PIERRE, ALLAIN., and CHENGYAO, LĪ., 2012. Characterization Of Periplasmic Protein BP26 Epitopes Of Brucella Melitensis Reacting With Murine Monoclonal And Sheep Antibodies. *Plos ONE*, 7(3): E34246. Doi:10.1371/Journal.Pone.0034246
- KILIÇ, S., 2007. Brusellozun Laboratuar Tanısı. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum.
- KUMAR, A., TĪWARI, S., THAVASELVAM, D., SATHYASEELAN, K., PRAKASH, A., BARUA, A., ARORA, S., and KAMESWARA, RAO, M., 2012. Optimization And Efficient Purification Of Recombinant Omp28 Protein Of Brucella Melitensis Using Triton X-100 and B-Mercaptoethanol. *Protein Expr Purif.*, 83(2):226-32. Doi: 10.1016/J.
- LEAL-KLEVEZAS, D.S., MARTI NEZ-VAZQUEZ, I.O., LOPEZ-MERINO, A., and MARTI NEZ-SORĪANO, J.P., 1995. Single-Step PCR For Detection Of Brucella Spp. From Blood And Milk Of Infected Animals. *Journal Of Clinical Microbiology*, 33:3087-3090.
- LEAL-KLEVEZAS, D.S., MARTOANEZ-VAAZQUEZ, I.O., GARCOAA-CANTUA, J., LOAPEZ-MERĪNO, A., and MARTOANEZ-SORĪANO, J.P., 2000. Use Of Polymerase Chain Reaction To Detect Brucella Abortus Biovar 1 In Infected Goats. *Veterinary Microbiology.*, 75:91-97.
- LETESSON, J.J, TĪBOR, A., VANEYNDE, G., WANSARD, V., WEYNANTS, V., and DENOEL, P., 1997. Humoral Immune Responses Of Brucella-Infected Cattle, Sheep, And Goats To Eight Purified Recombinant Brucella Proteins In An Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 4:556-64.
- LĪ, S.-J., and HOCHSTRASSER, M., 1999. A New Protease Required for Cell-Cycle Progression in Yeast. *Nature*, 398:246-251.

- LIMET, J.N, CLOECKAERT, A., DEZARD, G., VAN, BROECK J., DUBRAY, G., 1993. Antibody Response to The 89 Kda Outer Membrane Protein Of Brucella In Bovine Brucellosis. *J Med Microbiol.*, 39:403-7.
- LINDLER, L.E., HADFIELD, T.L., TALL, B.D., SNELLINGS, N.J., RUBINS, F.A., and VAN DE, VERG L.L., 1996. Cloning Of Brucella Melitensis Group 3 Antigen Gene Encoding Omp28, A Protein Recognized By The Humoral Immune Response During Human Brucellosis. *Infect Immun*, 67:2490-9.
- LOPEZ-GONÍ, I., and MORIYON, I., 2004. *Brucella Molecular and Cellular Biology*. Horizon Bioscience, 443 s, England
- LUK, J.M. C., 1994. A PCR Enzyme Immunoassay For Detection Of Salmonella Typhi. *Biotechniques*, 17:138-141.
- MANTUR, B.G., AMARNATH, S.K., and SHINDE, R.S., 2007. Review of Clinical and Laboratory Features of Human Brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 25 (2):188-202.
- MATAR, G.M., KHNEISSER, I.A., ABDELNOOR, A.M., 1996. Rapid Laboratory Confirmation Of Human Brucellosis By PCR Analysis Of A Target Sequence On The 31-Kilodalton Brucella Antigen DNA. *Journal Of Clinical Microbiology*. ;34(2):477-478
- MCLEAN, D.R., RUSSELL, N., and KHAN, M.Y., 1992. Neurobrucellosis: Clinical And Therapeutic Features. *Clin. Infect. Dis.*, 15 (4): 582-590.
- MORATA, P, QUEIPO-ORTUÑO, M.I., REGUERA, J.M., GARCÍA-ORDOÑEZ, M.A., PÍCHARDO, C., and COLMENERO, J.D., 1999. Posttreatment Follow-Up Of Brucellosis by PCR Assay. *J Clin Microbiol.*, 37:4163-4166.
- MORENO, E. and MORIYO, I., 2006. The Genus Brucella. *Prokaryotes*, 5: 315-456.
- MOSESSEVA, E., and LIMA, C. D., 2000. Ulp1-SUMO Crystal Structure And Genetic Analysis Reveal Conserved Interactions And A Regulatory Essential For Cell Growth In Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 2367-2377.
- MUKHERJEE, F., JAİN, J., PATEL, V., and NAİR, M., 2007. Multiple Genus-Specific Markers In Pcr Assays Improve The Specificity And Sensitivity Of Diagnosis Of Brucellosis In Field Animals. *Journal Of Medical Microbiology*, 56:1309-1316.
- NAVARRO, E., ESCRIBANO, J., FERNANDEZ, J.A., and SOLERA, J., 2002. Comparison Of Three Different PCR Methods For Detection Of Brucella Spp. In Human Blood Samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34: 147-151.
- NICOLETTI, P., and MILWARD, F.W., 1985. Efficacy Of Long-Acting Oxytetracycline Alone Or Combined With Streptomycin In The Treatment Of Bovine Brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 187: 493-495.
- PALLAB, CHAUDHURI, RAJEEV, PRASAD, VINOTH, KUMAR., ARUNA., and KUMAR, G. BASAVARAJAPPA., 2010. Recombinant OMP28 Antigen-Based Indirect ELISA For Serodiagnosis Of Bovine Brucellosis. *Molecular And Cellular Probes*, 24; 142-145.
- PASQUEVICH, KARINA A., SILVIA, M. ESTEIN, CLARA, GARCÍA SAMARTINO, ASTRID., ZWERDLING, LORENA, M., CORIA, PAULA., BARRIONUEVO, CARLOS, A. FOSSATI, GUILLERMO H.

- GIAMBARTOLOMEI and JULIANA CASSATARO., 2009. Immunization With Recombinant Brucella Species Outer Membrane Protein Omp16 Or Omp19 In Adjuvant Induces Specific CD4+And CD8+T Cells As Well As Systemic And Oral Protection Against Brucella Abortus Infection. *Infection And Immunity*, Jan. P. 436–445
- PAULSEN I.T., R. SESHADRI, K.E. NELSON, J.A. EISEN, J.F. HEIDELBERG, T.D. READ, R.J. DODSON, L. UMayAM, L.M. BRINKAC, M.J. BEANAN, S.C. DAUGHERTY, R.T. DEBOY, A.S. DURKIN, J.F. KOLONAY, R. MADUPU, W.C. NELSON, B. AYODEJI, M. KRAUL, J. SHETTY, J. MALEK, S.E. VAN AKEN, S. RIEDMULLER, H. TETTELIN, S.R. GILL, O. WHITE, S.L. SALZBERG, D.L. HOOVER, L.E. LINDLER, S.M. HALLING, S.M. BOYLE., and C.M. FRASER., 2002. The Brucella Suis Genome Reveals Fundamental Similarities Between Animal And Plant Pathogens And Symbionts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13148–13153.
- Q LEARY, S., SHEAHAN, M., SWEENEY, T., 2006. Brucella Abortus Detection By PCR Assay In Blood, Milk and Lymph Tissue Of Serologically Positive Cows. *Research In Veterinary Science*, 81:170–176
- QUEIPO-ORTUÑO M.I, MORATA, P., OCÓN, P., MANCHADO, P., COLMENERO, J.D.,1997. Rapid Diagnosis Of Human Brucellosis By Peripheral Blood PCR Assay. *J Clin Microbiol*, 35:2927–2930.
- RADWAN, A.I., BEKAIRI, S.I., AL-BOKMY, A.M., PRASAD, P.V., MOHAMMAD, O.M., HUSSAIN, S.T., 1993. Successful Therapeutic Regimens For Treating Brucella Melitensis And Brucella Abortus Infections In Cows. *Rev. Sci. Tech.*, 12(3): 909-922.
- RENUKARADHYA, G.J., ISLOOR, S., CROWTHER, J.R., ROBINSON, M., REJASEKHAR, M., 2001. Development and Field Validation Of An Avitinebiotin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit For Bovine Brucellosis. *Rev Sci Tech*, 20:749-56
- RIJPENS, P.N., JANNES, G., ASBROECK, M.V., ROSSAU, R., and HERMAN, L.M.F., 1996. Direct Detection Of Brucella Spp. In Raw Milk By PCR And Reverse Hybridization With 16S-23S Rna Spacer Probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5):1683–1688.
- ROMERO, C., GAMAZO, C., PARDO, M., and LOPEZ-GONI, I., 1995. Specific Detection Of Brucella DNA By PCR. *American Society For Microbiology*, 33: 615-617.
- RUPESH, V., 2003. Seroprevalence of brucellosis in cattle, buffalo and human being in central Gujarat. Master Thesis, College of Veterinary Science and Animal Husbandry (AnandAgriculturalUniversity).http://openmed.nic.in/2260/01/Dr._Varsada_Rupesh_M.V.Sc._Thesis.pdf
- SALEHI, M., PISHVA, E., SALEHI, R., and RAHMANI, M., 2006. Isolation Of Brucella Abortus Using PCR-RFLP Analysis. *Iranian J. Publ. Health.*, 35 (4): 22-27.
- SAMARTINO, L., GALL, D., GREGORET, R., and NIELSEN, K., 1999. Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the diagnosis for bovine brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 70:193-200.
- SANJAY, KUMAR, URMIL, TUTEJA., ASHOK, KUMAR., and HARSH, VARDHAN BATRA., 2008. Expression And Purification Of The 26 Kda

- Periplasmic Protein Of *Brucella Abortus*: A Reagent For The Diagnosis Of Bovine Brucellosis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 49:213–218 (Printed In Great Britain) Doi:10.1042/BA20070111
- SCHOLZ, H.C., HUBALEK, Z., SEDLACEK, I., VERGNAUD, G., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., MELZER, F., KAMPFER, P., NEUBAUER, H., CLOECKAERT, A., MAQUART, M., ZYGMUNT, M.S., WHATMORE, A.M., FALSEN, E., BAHN, P., GOLLNER, C., PFEFFER, M., HUBER, B., BUSSE, H.J., and NOCKLER, K., 2008. *Brucella Microti* Sp. Nov., Isolated From The Common Vole *Microtus Arvalis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58: 375-382.
- SCOTT, J. C., KOYLASS, M. S., STUBBERFIELD, M. R., and WHATMORE, A. M., 2007. Multiplex Assay Based On Single-Nucleotide Polymorphisms For Rapid Identification Of *Brucella* Isolates At The Species Level. *Applied And Environmental Microbiology*, 73:7331–7337.
- SIMEI, FU., JIE XU., XIANBO, LI., YONGFEI, XIE., YEFENG, QIU., XINYING, DU., SHUANG, YU., YAOXIA, BAI., YANFEN, CHEN., TONGKUN, WANG., ZHOUIA WANG, YAQING YU, GUANGNENG PENG, KEHE HUANG, LIUYU HUANG., YUFEI, WANG., and ZELIANG, CHEN., 2012. Immunization Of Mice With Recombinant Protein Cobb Or Asnc Confers Protection Against *Brucella Abortus* Infection. *Plos ONE*, 7(2): E29552. Doi:10.1371/Journal.Pone.0029552
- SMITS, H.K., ABDOEL, T.H., SOLERA, J., CLAVIJO, E., and DIAZ, R., 2003. Immunochromatographic *Brucella*-Specific Immunoglobulin M And G Lateral Flow Assays For Rapid Serodiagnosis Of Human Brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10 (6):1141–1146
- SOHN, A.H., PROBERT, W.S., GLASER, C.A., GUPTA, N., BOLLEN, A.W., WONG, J.D., GRACE, E.M., MCDONALD, W.C., 2003. Human Neurobrucellosis With Intracerebral Granuloma Caused By A Marine Mammal *Brucella* Spp. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 485-488.
- STUDIER, F. W., and MOFFATT, B. A., 1986. Use Of Bacteriophage T7 RNA Polymerase To Direct Selective High-Level Expression Of Cloned Genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-130.
- TAŞCI, F., 2004. Gıda Kaynaklı Brucellosis ve Önemi. *J. Fac. Vet. Med.*, 23,:137-142.
- TEMİZ, H., 2006. Rose Bengal testi (+), Serum Aglutinasyon testi(-) ve Coombs testi (-) olan ve klinik olarak Bruselloz şüpheli hastaların serumunda *Brucella* DNA'sının Real-Time PCR yöntemiyle aranması. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, 23s.
- TETTELIN, H., SAUNDERS, N.J., HEIDELBERG, J., JEFFRIES, A.C., NELSON, K.E., EISEN, J.A., KETCHUM, K.A., HOOD, D.W., PEDEN, J.F., DODSON, R.J., NELSON, W.C., GWINN, M.L., DEBOY, R., PETERSON, J.D., HICKEY, E.K., HAFT, D.H., SALZBERG, S.L., WHITE, O., FLEISCHMANN, R.D., DOUGHE, R.T.Y. B.A., MASON, T., CIECKO, A., PARKSEY, D.S., BLAIR, E., CITTONE, H., CLARK EB, COTTON MD, UTTERBACK TR, KHOURI H, QIN H, VAMATHEVAN J, GILL J, SCARLATO V, MASIGNANI V, PIZZA M, GRANDI G, SUN L, SMITH HO, FRASER CM, MOXON ER, RAPPUOLI R, and VENTER

- JC., 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. 10;287(5459):1809-15.
- THORNES, R.D., 1977. Chronic Human Brucellosis And Anti-Anergic Treatment With Levamisole. *Vet. Rec.*, 101: 27-30.
- TÍBOR, A., E. SAMAN, P. DE WERGÍFOSSE, A., CLOECKAERT, J.N. LÍMET, J.J. LETESSON., 1996. Molecular Characterization, Occurrence, And Immunogenicity In Infected Sheep And Cattle Of Two Minor Outer Membrane Proteins Of *Brucella Abortus*, *Infect. Immun.* 64: 100–107.
- TÍBOR, A., V. WEYNANTS, P. DENOEL, B. LICHTFOUSE, X. DE BOLLE, E. SAMAN, J.N. LÍMET, and L.J.J. LETESSON., 1994. Molecular Cloning, Nucleotide Sequence, And Occurrence Of A 16.5-Kda Outer Membrane Protein Of *Brucella Abortus* With Similarity To Pal Lipoproteins, *Infect. Immun.* 62:3633–363.
- VAHEDÍ, F., TALEBÍ, A., F. GHORBANÍ, E. BEHROOZÍKHAH, A. M. SHAHRÍARÍ AHMADÍ, F. and MAHMOUDÍ, M., 2011. Isolation, Cloning And Expression Of The *Brucella Melitensis* Omp31 Gene. *Iranian Journal Of Veterinary Research, Shiraz University*, Vol. 12, No. 2, Ser. No. 35.
- VERGER, J.M., GRÍMONT, F., GRÍMONT, P.D.A., and GRAYON, M., 1987. Taxonomy Of The Genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol*, 138: 235-238.
- VÍZCAÍNO N., A. CLOECKAERT, M.S. ZYGMUNT., and G. DUBRAY., 1996. Cloning, Nucleotide Sequence, And Expression Of The *Brucella Melitensis* Omp31 Gene Coding For An Immunogenic Major Outer Membrane Protein, *Infect. Immun.* 64: 3744–3751.
- VÍZCAÍNO, N., CLOECKAERT, A., VERGER, J.M., GRAYON, M., FERNANDEZ-LAGO, L., 2000. DNA Polymorphism In The Genus *Brucella*. *Microbes And Infection*, 2: 1089-1100.
- WERGÍFOSSE P. DE, LÍNTERMANS P., J.N. LÍMET., and A. CLOECKAERT., 1995. Cloning And Nucleotide Sequence Of The Gene Coding For The Major 25-Kda Outer Membrane Protein Of *Brucella Abortus*, *J. Bacteriol*, 177: 1911–1914.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANÍZATÍON)., 1997. Fact sheet N173, July 1997. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, (WORLD HEALTH ORGANÍZATÍON), 2006. *Brucellosis In Human And Animals*.
- WÍZEMANN, T.M, HEÍNRÍCHS, J.H, ADAMOU, J.E, ERWÍN, A.L, KUNSCH, C, CHOÍ GH, BARASH, S.C, ROSEN, C.A, MASURE, H.R, TUOMANEN, E, GAYLE A, BREWAH, Y.A, WALSH, W, BARREN, P, LATHÍGRA, R., HANSON M., LANGERMANN S, JOHNSON S, and KOENÍG S., 2001. Use Of A Whole Genome Approach To Identify Vaccine Molecules Affording Protection Against *Streptococcus Pneumoniae* Infection. *Infect Immun.* 69(3):1593-8.
- WRÍGHT P.F, NÍELSEN K.H., 1990. Current And Future Serological Methods. In: Adams LG, Editor. *Advances In Brucellosis Research*. College Station, Texas: Texas A&M University Press; 305-20.
- XUAN, Z. DÍNGA., APURBA, BHATTACHARJEEA., MÍKELJON, P., NÍKOLÍCHA, IAN T., PAULSEN, GARY, MYERSB., REKHA, SESHADRÍB., DAVID, L. and HOOVER., 2005). Cloning, Expression,

- And Purification Of Brucella Suis Outer Membrane Proteins. *Protein Expression And Purification*, 40:134–141
- YAGUPSKY, P., PELED, N., RIESENBEY, K., and SANAI, M., 2000. Exposure Of Hospital Personnel To Brucella Melitensis and Occurrence Of Lab Acquired Disease In An Endemic Area. *Scand. J. Infect. Dis*, 32:31–35
- YANGY, YINJ., GUOD, LANGX., and WANGX., 2011. Immunization Of Mice With Recombinant S-Adenosyl-L-Homocysteine Hydrolase Protein Confers Protection Against Brucella Melitensis Infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 61(2):159-67.
- YILMAZ, G.R., 2007. Türkiye’de Zoonozların Durumu ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum
- YOUNG, E.J., 1995. An Overview Of Human Brucellosis. *Clin Infect Dis*, 21: 283-290.
- ZHANG, L., WU, XA, ZHANG, FL, AN CH, SUN, YX, BAI, WT., and XU, ZK., 2012. Soluble Expression And Purification Of Brucella Cell Surface Protein (BCSP31) Of Brucella Melitensis And Preparation Of Anti-BCSP31 Monoclonal Antibodies. *Mol Biol Rep.*, 39 (1):431-8. Doi: 10.1007/S11033-011-0755-9.
- ZHONG, K. J. Y., and K. C. KAIN., 1999. Evaluation Of A Colorimetric PCR-Based Assay to Diagnose Plasmodium Falciparum Malaria In Travellers. *J. Clin. Microbiol.*, 37:339-341.
- ZYGMUNT, M.S, DEBBARH, H.S, CLOECKAERT, A., and DUBRAY, G., 1994. Antibody Response To Brucella Melitensis Outer Membrane Antigens In Naturally Infected And Rev1 Vaccinated Sheep. *Vet Microbiol*, 39:33-46
- ZYGMUNT, M.S, BAUCHERON, S, VIZCAINO, N., BOWDEN, R.A, and CLOECKAERT, A., 2002. Single-Step Purification And Evaluation Of Recombinant BP26 Protein For Serological Diagnosis Of Brucella Ovis Infection In Rams. *Vet Microbiol.*, 9;87(3):213-20.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1982'de Şanlıurfa'nın Siverek ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Siverek'te orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa'da tamamladı. 2005 yılında Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2006'da Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atandı. 2008 yılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında (Moleküler biyoloji alanında) yüksek lisansını tamamladı. 2009 yılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında (Moleküler biyoloji alanında) doktora başladı.

ÖZET

Brusella; özellikle gelişmekte olan ülkelerde, hem insan hemde hayvanlarda yaygın bir şekilde yayılış gösteren önemli bir zoonotik hastalıktır. Brusellozun ciddi ekonomik ve tıbbi sonuçlarından dolayı, aşı kullanımını yoluyla hastalığı önlemek için büyük çabalar sarfedilmektedir. Benzer şekilde brucellozun kontrolü, insanlarda ve hayvancılıkta brucella teşhisini güvenilir bir şekilde ortaya koyan yöntemlere bağlıdır.

Düz Brucella türlerinin lipopolisakkarid (LPS) yapısı diğer antijenik moleküller ile kıyaslandığında bugüne kadarki en güçlü antijenlerdir. Sonuç olarak, Brucella LPS; bruselloz immün yanıtı sırasında en önemli antijen olarak kabul edilmiştir. LPS hem aşılı hem de enfekte hayvanların uzun ömürlü serolojik yanıt vermesine neden olur. Hayvan brucelloz tanısında Komplement Fiksasyon Test, Rose Bengal Plate test, Standard Tüb aglütinasyon test, süt ring test ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gibi serolojik testler kullanılmaktadır.

Bu testler, esas olarak, hücre zarının lipopolisakkarid (LPS) yapısına karşı oluşmuş antikörlerin tespitine dayanmaktadır. Bu nedenle LPS tabanlı serolojik testler kullanılarak aşılı ve enfekte hayvanlar arasında ayırım yapmak zordur. Buna ek olarak, anti- LPS antikörlerinin dayalı testler; *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* ve *Salmonella sp.* türleri gibi diğer gram negatif bakterilerle çapraz reaksiyon verdiklerinden dolayı yanlış pozitif sonuçlar vermektedir. Bu nedenle, bruselloz immünolojik çalışmalarının en önemli hedefi; LPS antijenlerinin sakıncalarını aşmak için yararlı olabilecek, lipopolisakkarit yapısında olmayan antijenlerin tanımlanması olmuştur.

Brucella melitensis Rev1 omp28 precursor proteini; brucellaya ait grup 3 membran proteinleri sınıfına ait olup, hücre periplazmasında bulunan immünojen bir protein olup, anti-brucella antikörlerinin tespit edilmesi için hedef bir proteindir. Bu çalışmada *B. Melitensis Rev1* omp28 precursor proteinin, *E.coli* sistemi içerisinde ekspresyonu ve saflaştırılması sağlandı. Ayrıca saflaştırılmış, *B. Melitensis Rev1*

omp28 precursor'un diagnostik etkinliği, Şanlıurfanın çeşitli hastanelerinden toplanan insan serumları ile incelendi.

B. melitensis Rev1 suşu omp28 precursor geninin klonlanması ve ekspresyonu için kullanıldı. *E. coli* One Shot® Mach1 ve *E. coli* One Shot® BL21(DE3) hücreleri konakçı olarak ve pETSUMO plazmidi ise klonlama ve ekspresyon vektörü olarak kullanıldı.

Bu çalışma, *B. Melitensis Rev1*'in tam-uzunluktaki rekombinant omp28 precursor proteinin immünoaktivitesini karakterize etmek için yapıldı. *Brucella melitensis* Rev1 omp28 precursor proteinin amplifikasyonu, gen bankasındaki AY634231.1 nolu sekans dizisi kullanılarak dizayn edilen primer çifti kullanılarak PCR ile yapıldı. *B. melitensis* Rev1'den genomik DNA izole edilerek, omp28 precursor geninin amplifikasyonu için template olarak kullanıldı. Amplifikasyon, 753 bp'lik DNA fragmanının PCR ürünü gözlenmesiyle teyit edilmiştir. PCR ürünü ATG başlangıç kodonu ve TAA stop kodonunu içerecek şekilde omp28 precursor gen bölgesinin (ORF) tamamını içermektedir. Omp28 precursor ORF gen bölgesi 250 aminoasiti kodlamaktadır. *B. Melitensis* Rev1 omp28 precursor proteinin üretilmesi için, ampifiliye edilen DNA, pETSUMO ekspresyon vektörüne klonlandı.

PCR işlemi; 94 °C'de 3 dakika ön denatürasyon işleminden sonra, 94 °C 'de 3 dakika denatürasyon, 65 °C'de 45 saniye annealing ve 72 °C'de 1 dakika extension olacak şekilde 30 siklus olarak yapıldı. Final extension aşaması ise 72 °C 'de 10 dk olarak uygulandı. PCR ürünü TAE buffer ile hazırlanan % 1'lik agaroz jel ile analizi yapıldıktan sonra etidium bromide ile U.V transilluminatör ile görüntülendi.

PCR ürünleri, saflaştırma işlemlerinin kolaylaştırılması ve sumoproteaz aktivitesinin gerçekleşmesi için N- terminal kısmında altı histidin ve sumo bulunan pETSUMO plazmidine klonlandı. Omp28 precursor gen bölgesi eklendikten sonra elde edilen pETSUMO plazmidi kompetent One Shot® Mach1 E. Coli hücrelerine transfer edildi. Kanamisin dirençli koloniler, 50 µg/ml kanamisin içeren LB medium ortamında 37°C çalkalamalı inkübatörde OD 600 = 0,5 oluncaya kadar çoğaltıldı.

Transformasyon sonucu oluşan pozitif One Shot® Mach1 *E. coli* hücreleri, önceki PCR işleminde kullanılan primerler kullanılarak PCR ile tespit edildi.

Plazmidler saflaştırılıp, PCR ile kontrol edildi. Saflaştırılan plazmidler % 1'lik agaroz jelde görüntüledikten sonra sekans analizi yapıldı. Omp28 precursor proteinin üretilmesi için, pETSUMO Omp28 precursor plazmid *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transfer edilip, LB kanamisin içeren pleytlere ekilerek pozitif koloniler tespit edildi. Seçilen kolonilerdeki plasmitlerin istenilen gen bölgesi içerip içermediği kontrol etmek için, plasmitler saflaştırılıp, PCR ile kontrol edildi.

Bakteri kültür ortamı OD 600= 0,5 olduğunda, protein sentezlemesi için ortama 1 mM IPTG ilave edilerek hücreler indüklendi. Bakteriler 37 °C'de 6 saat inkübe edildikten sonra, santrifüj edilerek -80°C'de depolandı. Omp28 precursor proteinin ekspresyonun yüksek seviyede gerçekleşmesi sağlandı. Rekombinant omp28 precursor proteini transformant *E. Coli* hücreleri içerisinde çoğunlukla sitoplazmada inklüzyon tanecikleri halinde depolandı. Hedef proteinin çözünürlüğünün belirlenmesi için hücreler lizozim ve nativ buffer içerisinde buz üzerinde sonikasyon ile lize edildi. Hücre lizatı 10.000 rpm 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant çözünür proteinleri içerirken, pelet kısmı çözünmeyen proteinleri içermektedir. Üretilen proteinlerin çoğunluğunun çözünmez fraksiyonlar halinde olduğunu tespit ettik. Üretilen proteinler, yalnızca 8M üre içeren denatüre şartlarda ekstrakte edilebilen inklüzyon tanecikleri olarak adlandırılan protein agregatları halinde depolandı. İndüklenmiş bir litre kültür ortamından yaklaşık olarak 30 mg protein saflaştırıldı.

Eksprese edilen rekombinant protein Ni-agaroz kromatografisi ile saflaştırıldı ve anti-His antikoru kullanılarak yapılan westernblot ve dot blotla doğrulandı. Saflaştırılan proteinin konsantrasyonu bradford metoduyla tespit edildi. Proteinler laemmlı metoduna göre SDS-PAGE elektroforezine tabi tutulduktan sonra, semi-dry transblot sistemde nitroselüloz membrana aktararak, membran blok solüsyonu ile bloke edildi. Transfer edilen proteinler 1:5000 oranında dilüe edilen anti-His antikoru

ile muamele edildikten sonra, alkalın fosfataz konjuge edilmiş sekonder antikor ile işaretlendi. Reaksiyon ortama BCIP/NBT eklenerek tamamlandı.

Saflaştırılmış omp28 precursor proteinin brusella teşhisindeki etkinliği, Şanlıurfada çeşitli hastanelerden toplanan serumlarla indirect enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) yapılarak çalışıldı. Pozitif ve negatif olduğu bilinen serum örnekleri kullanıldığında omp28 precursor proteinin brusella enfekte insan serumlarında immünreaktif olduğu tespit edildi. Altmış insan serumu; omp28 precursor antijen tabanlı ELISA testi ile tarandı ve sonuçlar Rose Bengal Plate aglütinasyon testi (RBPT) karşılaştırıldı. Rekombinant omp28 precursor temelli ELISA testinin; sensitivitesi % 87,8, spesifitesi % 96,2, pozitif prediktif değer % 96, negatif prediktif değer % 78,7 ve test geçerliliği % 91,6 olarak tespit edildi. Rekombinant *B. Melitensis Rev1* omp28 precursor proteinin insan bruselloz tanısı için bir protein antijeni olarak kullanılabilceği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, bizim çalışmamızda rekombinant omp28 precursor proteini kullanarak yapılan indirek ELISA testi; Şanlıurfanın farklı hastanelerinden toplanan klinik insan serum örneklerinde anti-Brucella antikorlarının tespiti için yüksek duyarlılık ve özgüllükte olduğunu göstermiştir. Aynı antijen koyun, keçi ve inek gibi diğer hayvan türlerinde de diagnostik ajan olarak kullanılabilir Bu çalışma aynı zamanda *B. melitensis* Rev1 immunoreaktif omp28 precursor proteinin *E. coli* sisteminde yüksek düzeyde üretilebileceği ve ayrıca hemen tek bir adımda homojen bir şekilde saflaştırılabileceğini göstermiştir.

SUMMARY

Brucellosis is a major zoonotic disease widely distributed in both animals and humans, especially in developing countries. Because of serious economic and medical consequences of brucellosis, efforts have been made to prevent the disease through the use of vaccines. Similarly, control of brucellosis is dependent upon reliable methods for the identification of *Brucella* in livestock and humans.

The lipopolysaccharide (LPS) of smooth *Brucella* species is by far the strongest antigen when compared to other antigenic molecules. Consequently, *Brucella* LPS has been considered the most important antigen during immune response in brucellosis. LPS elicits long lasting serological response in both vaccinated and infected animals. The serological procedures being used in the diagnosis of animal brucellosis are complement fixation test, rose Bengal plate test, standard tube agglutination test, milk ring test and enzyme-linked immunosorbent assay.

These tests are mainly based on the detection of antibodies directed against the lipopolysaccharide (LPS) portion of the cell membrane. Therefore it is difficult to differentiate between vaccinated and infected animals using LPS-based serological tests. In addition, tests based on anti-LPS antibodies give false positives because of cross-reactivity with other Gram-negative bacteria like *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella* species, *Escherichia coli*. Therefore, a major goal in immunological studies of brucellosis has been the identification of non-lipopolysaccharide antigens, which could be useful to circumvent drawbacks of LPS antigen.

The omp28 precursor protein of *Brucella melitensis* Rev1 belongs to group III antigens. omp28 precursor is an immunodominant antigen localized in the periplasm and this protein has been a target molecule for detection of anti-*Brucella* antibodies. In the present study we described expression and purification of *B. Melitensis* Rev1 omp28 precursor protein in *E. coli* system. We further evaluated the diagnostic potential of purified recombinant omp28 precursor of *B. melitensis* Rev1 for

screening human sera collected from hospitals in Şanlıurfa. *B. melitensis Rev1* strain was used in the present study to clone and express omp28 precursor gene. *E. coli* One Shot® Mach1 and *E. coli* One Shot® BL21(DE3) were used as host and Petsumo plasmid was used as cloning and expression vector.

This study was performed to characterize the immunoreactivity of the full-length recombinant omp28 precursor protein of *B. Melitensis Rev1*. The amplification omp28 precursor from *B. melitensis Rev1* was achieved by polymerase chain reaction using a set of primers which were designed based on the sequence with accession no AY634231.1. Genomic DNA from *B. melitensis Rev1* strain was extracted and used as template for amplification of omp28 precursor gene. On amplification, a product of 753 bp DNA fragment was observed which was further confirmed PCR. The PCR product contained complete open reading frame (ORF) of omp28 precursor gene with ATG as start codon and TAA as stop codon. The omp28 precursor ORF encodes 250 amino acids. In order to over produce the omp28 precursor protein of *B. melitensis Rev1* the amplified DNA was cloned into expression vector, pETSUMO .

PCR was performed; hot start at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 3 min, annealing at 65°C for 45 s and extension at 72°C for 1 min. Then a final extension step of 10 min at 72°C was performed. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel in TAE buffer and visualized by ethidium bromide staining on UV transilluminator.

PCR product was cloned into the pETSUMO plasmid, in which the recombinant protein includes a six-histidine and sumo tag at the N-terminal end for easier purification and sumoproteaz activation. The resulting construct, pETSUMO Omp28 precursor, was transformed into competent One Shot® Mach1 *E. coli* cells. Kanamycin-resistant colonies were grown until OD 600 = 0,5 in LB medium containing 50 µg/ml of Kanamycin, at 37°C with agitation. The fidelity of One Shot® Mach1 *E. coli* transformants was verified by PCR reaction using specific primers of Omp28 precursor that had been previously used for amplification.

The plasmids were purified and analyzed by PCR. After evaluation on agarose gel 1%, the purified plasmids were subjected to sequencing. For expression of Omp28 precursor, the purified pETSUMO Omp28 precursor construct was transformed in *E. coli* BL21 (DE3) cells and selected on LB kanamycin plates. To ensure the integrity of the plasmids in the selected colonies, the plasmids were purified and then subjected to PCR.

Protein synthesis was induced with 1 mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside) in a culture of bacteria with an OD 600 of 0.5. Bacteria were incubated for 6 h at 37°C then harvested by centrifugation and stored at -80°C. High level expression of omp28 precursor was achieved. Recombinant omp28 precursor was mostly accumulated in the cytoplasm of *E. coli* transformant as inclusion bodies. To determine the target protein solubility, the cells were lysed by treating native buffer and with lysozyme, on ice followed by sonication. The cell lysate was centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. The supernatant contains the soluble protein whereas the pellet contains insoluble proteins. We could detect majority of the expressed protein in the insoluble fraction. The expressed protein was accumulated as insoluble aggregates, termed as inclusion bodies, which could only be extracted and purified under denaturing condition using 8M urea. Approximately 30 mg protein could be purified from 1 L of induced culture.

The expressed recombinant protein was purified by chromatography through Ni-agarose and confirmed with Western blot and Dot blot analysis using anti-His antibody. The concentration of purified protein was determined by Bradford method. The proteins were subjected to electrophoresis on SDS-PAGE according to Laemmli and transferred to nitrocellulose membranes in a semi-dry transblot system (sigma). The membranes were blocked with blocking solution. Transferred proteins were immunostained with anti-His at a dilution of 1:5000. Secondary antibodies conjugated to alkaline phosphatase and were used in the assays. The reactions were developed with BCIP/NBT.

The efficacy of purified omp28 precursor was studied in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of brucellosis in field sera collected from different hospital in Şanlıurfa. Using known negative and positive serum samples. it was found that omp28 precursor is immunoreactive to Brucella infected human sera. Sixty human sera were screened by omp28 precursor antigen-based ELISA and the results were compared to rose Bengal plate agglutination Test (RBPT). Recombinant omp28 precursor antigen based ELISA has shown sensitivity of 87.8%, specificity of 96.2% , positive predictive value 96,6 % , negative predictive value 78,78 % and accuracy of 91.6%. It was concluded that recombinant *B. melitensis* omp28 precursor could be used as a protein antigen for diagnosis of brucellosis in human

In conclusion, our study has shown that indirect ELISA, using recombinant omp28 precursor protein, yielded high sensitivity and specificity for detection of anti-Brucella antibodies in the clinical serum samples of human collected from different hospital of Şanlıurfa. The same antigen could also serve as potential diagnostic agent for other species of animals like, sheep, goat and raw. This study has also shown that immunoreactive omp28 precursor protein of *B. melitensis Rev1* could be expressed at a high level in *E. coli* system and further purified to almost homogeneity in a single step.