T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Escherichia coli' de REKOMBİNANT EKSPANZİN (PROTEİN) ÜRETİMİ

Serap GÜNEŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2016

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Escherichia coli' de REKOMBİNANT EKSPANZİN (PROTEİN) ÜRETİMİ

Serap GÜNEŞ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2016

Doç. Dr. Hasan VARDİN danışmanlığında, Serap GÜNEŞ'in hazırladığı "E*scherichia coli'* de Rekombinant Ekspanzin (protein) Üretimi" konulu bu çalışma 06/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Doç. Dr. Hasan VARDİN ……...…...

Üye : Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN …….....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hidayet SAĞLAM ……..

Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Murat KISA
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK/DPT/TÜBİTAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 14101

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

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....9
3.1. Materyal 9
3.1.1. Bitki materyali 9
3.1.2. Kimyasal maddeler.....9
3.2. Yöntem 9
3.2.1. İlgili gen 10
3.2.2. Bakteriyel ekspresyon vektörü (T17) 11
3.2.2.1. Vektörün özellikleri 12
3.2.3. Ekspresyon hücre kültürü 13
3.3. TOPO Klonlama 14
3.3.1. TOPO klonlama reaksiyonunda kullanılacak PZR ürün miktarı 14
3.3.2. TOPO klonlama reaksiyonunda tuz solüsyonu kullanımı 15
3.3.3. PZR Primer dizaynı 15
3.3.3.1. İleri Primer dizaynı için gerekli koşullar 15
3.3.3.2. Geri Primer dizaynı için gerekli koşullar 15
3.3.3.3. Kullanılan ileri ve geri primerler.....16
3.4. Kimyasal Analizler.....17
3.4.1. DNA ekstraksiyonu 17
3.4.2. Spektrofotometre kullanılarak DNA miktarının ölçülmesi 18
3.4.3. Küt uçlu PZR ürünü üretimi 18
3.4.4. Agaroz jel elektroforezi 19
3.4.5. PZR reaksiyonundan DNA' nın saflaştırılması 20
3.4.6. PZR ürününün kontrol etme 20
3.4.7. TOPO klonlama reaksiyonu 21
3.4.8. Kimyasal kompotent hücrelere transformasyon 22
3.4.9. *E. coli'* den plazmid DNA izolasyonu 23
3.4.10. Plazmitlerin ekspresyon hücrelerine transformasyonu 24
3.4.11. Ekspresyon 24
3.4.12. SDS Page.....25
3.4.12.1. Örneklerin hazırlanması 25
3.4.12.2. Çözünür/ çözünmez proteinler için örnek hazırlama.....26
3.4.13. RT-PZR 26
3.4.14. Western blot analizi.....27
3.4.15. Rekombinant Ekspanzin enziminin selülozik aktivitesinin belirlenmesi 29
3.4.16. HPLC analizi 30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 31
4.1. DNA Ekstraksiyonunun Kontrolü 31
4.2. Hedef Genin Dizayn Edilen Primerlerle Çoğaltımı 33
4.3. DNA Saflaştırılmasının Kontrolü 34
4.4. Kontrol PZR Ürünü Kontrolü 35
4.5. Plazmid DNA İzolasyonu 36
4.6. SDS Page Analizi 37
4.7. RT- PZR 38
4.8. Western Blot Analizi 39

4.9. Rekombinant Ekspanzin Enziminin Selülozik Aktivitesinin Belirlenmesi 40
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 42
5.1. Sonuçlar 42
5.2. Öneriler 42
KAYNAKLAR 44
ÖZGEÇMİŞ 47

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Escherichia coli' de REKOMBİNANT EKSPANZİN (PROTEİN) ÜRETİMİ

Serap GÜNEŞ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hasan VARDİN
Yıl: 2016, Sayfa: 47

Ekspanzin proteinleri bitki hücre duvarında bulunan bir protein ailesidir. Ekspanzin proteinleri *in vitro* ortamda hücre duvarını parçalama yeteneğine sahip yegane proteinler olarak literatürde yer almaktadırlar. Bitki hücre gelişimi, meyve yumuşaması, kök kılların çıkması, stigma ve polen tüpü gelişimi ve hücre duvarı parçalanmasındaki gelişimsel süreçlerde önemli bir role sahiptirler. Sürekli kültür, rekombinant protein ekspresyonunda hücreleri yetiştirmek için en yaygın yöntemdir. Çalışmada rekombinant Ekspanzin proteini üretimi için kültür olarak *E.coli'* nin K12 suşu kullanılmıştır. LeExp 1 geninin ilgili vektöre klonlanabilmesi için ilk olarak LeExp1 geni PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Klonlanan LeExp 1 geni uygun bir kit vasıtasıyla ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Vektör *E. coli* sıvı kültürün içerisinde bakterilere transforme edilmiştir. Böylece *E. coli* bakterisine rekombinant protein üretimi özelliği kazandırılmıştır. Elde edilen proteinin uygun protein olup olmadığı biyokimyasal ve moleküler analizlerle tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: LeExp1 proteini, rekombinant protein, *Escherichia coli*

ABSTRACT

MSc Thesis

RECOMBINANT EXPANSIN (PROTEIN) PRODUCTION IN E*scherichia coli*

Serap GÜNEŞ

Harran University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hasan VARDİN
Year: 2016, Page: 47

Expance proteins are a family of proteins found in plant cell walls. Expansion protein *in vitro* have the ability to destroy the cell walls are located only in the literature as proteins. Plant cell development, fruit softening, the emergence of the hair follicle, the stigma and pollen tube growth and cell wall fragmentation have an important role in the developmental process. Continuous culture is the most common method for growing cells in recombinant protein expression. *E. coli* K12 strains were used as culture for production of recombinant Expansin protein LeExp1 gene can be cloned into the vector was amplified by PCR method regarding the first. Leexp1 cloned gene was transferred into expression vector by a suitable kit. Vector was transformed into *E. coli* bacteria in the liquid culture. Thus the production of recombinant protein in the *E. coli* bacterium characterized in the literature. The resulting protein was detected by biochemical and molecular analyzes whether it is appropriate protein.

KEY WORDS: LeExp1 protein, recombinant protein, *Escherichia coli*

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmalarım boyunca maddi- manevi desteğinin esirgemeyen fikir ve katkılarıyla çalışmalarıma ışık tutan ve yönlendiren değerli danışman hocam, sayın Doç. Dr. Hasan VARDİN' e ve sayın hocam Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN' a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Ar. Gör. Selin Engin Alihanoğlu ve Merve Aytekin Akbaba ile diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince ve eğitim boyunca maddi ve manevi desteklerini gördüğüm değerli Ailem, eşim ve oğluma teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Rekombinant protein üretim akış şeması 10
Şekil 3.2. LeExp1 gen dizilimi 11
Şekil 3.3. LeExp1 geninin amimoasit dizilimi 11
Şekil 3.4. PZR ürünü ve TOPO vektör oranı 14
Şekil 4.1. DNA elektroforez jel görüntüsü 32
Şekil 4.2. Kullanılan DNA markerı 32
Şekil 4.3. Primer çiftlerinin kontrolü için elektroforez jel görüntüsü 34
Şekil 4.4. Saflaştırılmış DNA elektroforez jel görüntüsü 34
Şekil 4.5. Saflaştırma işleminin etkinliğinin kontrolü için elektroforez jel görüntüsü 35
Şekil 4.6. Kontrol PZR ürünü elektroforez jel görüntüsü 36
Şekil 4.7. Plazmid DNA izolasyonu elektroforez jel görüntüsü 36
Şekil 4.8. A vektörü SDS Page jel görüntüsü 37
Şekil 4.9. İndüktör eklenmiş A vektörü SDS Page jel görüntüsü 38
Şekil 4.10. LeExp1 mRNA transkripsiyonu 38
Şekil 4.11. Saflaştırma SDS Page jel görüntüsü 39
Şekil 4.12. Western blot film görüntüsü 40
Şekil 4.13. Sabit oranda (5FPU) sellobioz+hemiselüloz enzim karışımına ek olarak artan miktarda eklenen (0- 500 µg) Rekombinant Ekspanzin enziminin filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. pET100/D TOPO vektörünün haritasal özellikleri 13
Çizelge 3.2. İleri ve Geri Primerler 16
Çizelge 3.3. Küt uçlu PZR ürünü üretimi için PZR ürün karışımı 19
Çizelge 3.4. Küt uçlu PZR ürünü üretimi için PZR analiz şartları 19
Çizelge 3.5. Kontrol PZR ürün karışımı.....21
Çizelge 3.6. Kontrol PZR analiz şartları 21
Çizelge 3.7. TOPO klonlama ürün karışımı 22
Çizelge 3.8. Kontrol TOPO klonlama ürün karışımı 22
Çizelge 4.1. DNA ekstraksiyonu spektrofotometre ölçümleri 31
Çizelge 4.2. İleri ve Geri Primerlerin gen dizilimleri 31
Çizelge 4.3. Kullanılan Primer çiftlerinin gen dizilimleri 33

SİMGELER DİZİNİ

Bp	base pair
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA	Deoksiribonükleikasit
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GTE	Glucose Tris EDTA
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Kilobaz
LB	Luria Bertani
NaCl	Sodyum klorür
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimerase chain reaction
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
S.O.C	Super Optimal Catabolit Repressor
TE	Tris EDTA
TBE	Tris/Borate/EDTA
TOP10	Maya suşu
µl	mikrolitre

1. GİRİŞ

Ekspanzin proteinleri bitki hücre duvarında bulunan bir protein ailesidir. Ekspanzin proteinleri dört alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar:

1. Ekspanzin A
2. Ekspanzin B
3. Ekspanzin A benzeri
4. Ekspanzin B benzeri

Ekspanzinlerin her iki ailesi de (ExpA ve ExpB) birçok toprak bitkisinde tespit edilmiştir. Model bitki *Arabidopsis thaliana* yaklaşık olarak 26 farklı Ekspanzin A geni ve 6 ekspanzin B geni içerir. Bitkiler, işlevi kanıtlanamayan Ekspanzin benzeri genlerin küçük bir dizisine sahiptirler (Cho ve Kende, 1997). Ekspanzin proteinleri şeftali, vişne, domates, elma, üzüm, muz, gibi çok sayıda meyve-sebze de tespit edilmişlerdir ve bu proteinleri kodlayan genlerin dizilimleri tanımlanarak bilgi bankalarında depolanmışlardır.

Ekspanzin proteinleri ilk olarak 1992 yılında Daniel Cosgrove tarafından salatalık bitkisinden izole edilmiştir. Salatalıkta ortaya çıkarılan iki Ekspanzin ortalama olarak 270 aminoasite tekabül eder ve molekül ağırlıkları 29 kDa (kiloDalton) ve 30 kDa' dur. Genel olarak, A ve B Ekspanzinler ve Ekspanzin benzerleri yaklaşık olarak 300 amino asitten oluşmaktadır ve 25-28 kDa' luk molekül ağırlığına sahiptirler (Cosgrove, 2000). Ekspanzin proteinleri *in vitro* ortamda hücre duvarını parçalama yeteneğine sahip yegâne proteinler olarak literatürde yer almaktadırlar.

İşlevleri: Ekspanzin proteinleri bitki hücre gelişimi, meyve yumuşaması, kök kılların çıkması, stigma ve polen tüpü gelişimi ve hücre duvarı parçalanmasındaki gelişimsel süreçlerde önemli bir role sahiptirler (Hartley, 2006).

Mekanizması: Bitki hücre duvarı yüksek gerilme gücüne sahiptir ve hücrenin büyüyebilmesi için gevşemesi gerekmektedir (geri dönüşümsüz büyüme). Hücre duvarı içinde yüzey alanının genişlemesi, selülozun mikro-iplikçikler içinde kayması

veya hareketidir. Fiziksel açıdan, duvar genişlemesi modu, hücre duvarını germek ve gerilme altında birbiriyle bağlantılı selüloz mikro-iplikçiklerin ağ oluşturabilmesi için hücre turgor basıncı gerektirir (Ray ve ark., 2004). Selüloz mikro-iplikçiklerinin arasındaki bağlantıların gevşetilmesiyle Ekspanzinler duvar turgor baskı yoluyla duvarda oluşturulan çekme gücüne kolaylıkla izin verir. Ekspanzin hücre duvarı içindeki selülozik ağı gevşeten moleküler mekanizma henüz detaylı olarak belirlenememiştir. Bununla birlikte Ekspanzin selüloz mikro-iplikçiklerinin yüzeyinde kovalent olmayan bağları kırma veya hemi selüloz ağ yapısının parçalanmasını sağlayabilmektedir. Hemi selülozlar güçlü yük taşıma ağı oluşturmakla birlikte selüloz mikro iplikçiklerini kendi oluşturdukları ağ yapı içerisinde sabitleme yeteneğine sahiptirler. Ekspanzinin geçici olarak selüloz-hemi selüloz ilişkisini bozduğu düşünülmektedir (Veith ve ark., 2004).

Alerjenliği: Çimen poleni yapısal olarak B Ekspanzinlere benzer ve majör alerjenler olarak sınıflandırılabilirler. Ekspanzinler, çim stili ve stigma duvarlarında kendi güçlü reolojik etkisini gösterdiği gibi stigma ve stil içindeki polen tüpünün penetrasyonu sırasında maternal dokuların hücre duvarlarını gevşeterek tozlaşma olayını kolaylaştırabilmektedirler. Ekspanzin benzeri proteinlerin grup-1 e göre daha az önemli olan grup-2 ve grup-3 çim alerjenleri içerisinde yer aldığı bilinmektedir. Bu üç grup alerjenlerin IgE antikoruna bağlanmasından sorumlu olabilecek bir karbonhidrat-bağlayıcı modülünü (MBP) ortak kullanırlar (Flamm, 1991).

Hücre duvarı parçalanması: Parçalanma işlemi meyvelerde olgunlaşmayı sağlamaktadır. Yani sert olan meyve hücre duvarının parçalanmasıyla yumuşar, olgunlaşır ve yenilebilir kıvama gelir.

Hücre duvarının yapısı temel olarak üç bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler: selüloz, hemi- selüloz ve pektindir. Bu bileşenleri parçalayan enzimler ise selülaz, hemi-selülaz ve pektolitik enzimlerdir (Duvall, 1978).

Hücre duvarını parçalayan bu enzimler birçok endüstride kullanılmaktadır. Örneğin; biyo yakıt üretimi ve selüloz endüstrisi. Gıda endüstrisinde örnek verilecek olursa meyve suyu endüstrisinde bu enzimlerin kullanımıyla birlikte üretimde randıman artar ve bulanık olmayan berrak bir meyve suyu elde edilir.

Ekspanzin protein miktarı azaltılan meyvelerde yumuşama gecikmektedir, hücre duvarı parçalanması ve hücre duvarı modifikasyonunda azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ekspanzin protein miktarının arttırıldığı meyvelerde ise yumuşama hızlanmaktadır, hücre parçalanması ve hücre modifikasyonunda artış meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Sürekli kültür, rekombinant protein ekspresyonunda hücreleri yetiştirmek için en yaygın yöntemdir. Çalışmada kültür olarak *E.coli'* nin K12 suşu kullanılmıştır. LeExp 1 geninin ilgili vektöre klonlanabilmesi için ilk olarak gen PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Klonlanan LeExp 1 geni uygun bir kit vasıtasıyla ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. İnşa edilen vektör sıvı kültürün içerisinde bakterilere transforme edilmiştir ve LeExp1 *E. coli* genomuna aktarılmıştır. Rekombinant LeExp1 proteinin varlığı biyokimyasal ve moleküler analizlerle tespit edilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Rekombinant protein üretimi hem biyokimyasal hem de yapısal araştırmalarda kullanılabilecek olan proteinlerin sayısını arttırmıştır. Daha önceleri protein üretimi zor ve zaman alıcı bir yöntemle doğal kaynaklardan (örneğin, bitkiler, tavşan, inek...) saflaştırma yoluyla gerçekleştiriliyordu. Ancak, ileri protein saflaştırma teknikleri ile kombine edilmiş rekombinant protein ekspresyonu için yeni ticari sistemlerin kullanılabilirliğiyle biyolojik ve biyomedikal bilimler genelinde rekombinant protein üretimi yaygın hale gelmiştir. Bu durum binlerce organizma çeşitleri ve yeni proteinlerin incelenmesi için yeni araştırma konularının gündeme gelmesine yol açmıştır. Özellikle otuz bir adet rekombinant protein 2003 ve 2006 yılları arasında terapötik kullanım amacıyla ilgili kuruluşlar tarafından onaylanmıştır (Walsh, 2006). Bugün rekombinant protein üretim teknolojisiyle özellikle ilaç endüstrisi için çok sayıda protein üretilmekte ve ilgili yöntemler optimize edilmiştir. Zira protein sentezinin yüksek maliyeti nedeniyle, en verimli şekilde ilgili genlerin ve bu genlerin gen ifadelerinin tanımlanması gerekmektedir (Woods, 1995).

Üretim koşullarının değiştirilmesiyle rekombinant protein üretiminde artış sağlanabilir. Hücre inkübasyon sıcaklığının düşürülmesiyle rekombinant proteinlerin üretiminde artış sağlanır. Daha düşük sıcaklıklar, hücre prosesleri, transkripsiyon, translasyon ve hücre bölünmesini yavaşlatır. Genel olarak protein üretimi 15- 25 °C de gerçekleşmektedir. (Ray ve ark., 2004).

Üretim sıcaklığının düşürülmesinin yanı sıra transkripsiyon oranında ki azalma da indüksiyon maddenin konsantrasyonunun değiştirilmesiyle düzenlenebilir. İndüktör madde protein üretimini teşvik eden kimyasal bir maddedir. İndüktör madde olarak IPTG (Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside) kullanılır. Protein üretimi için uygun konsantrasyonlar 0.1- 1.0 mM arasında değişmektedir. (Messing, 1985).

Yapılan bir çalışmada Ekspanzin proteinlerinin hücre duvarını parçalayan enzimler üzerine etkisi araştırılmıştır. Ekspanzin proteinleri bu enzimlerle sinerjistik etki göstererek enzimlerin parçalama aktivitesini artırmıştır (Hazelden, 1993).

Rhizobium leguminosarum ile etkileşim sırasında bezelye [Pisum sativum L.] kök nodüllerinin apoplastındaki ekspanzin benzeri proteinin lokalizasyonu adlı yapılan çalışmada Ekspanzin proteininin birikimi, çeşitli bitki organlarının büyümesiyle korele olduğundan bu protein, nodülün genişleyen hücrelerinde birikmiş olsun olmasın, PsEXP1'e karşı antikor ile Western Blot ve immüno-yerelleştirme çalışmaları ile araştırılmıştır. İmmünotsuz sonuçlar, bezelye kökü nodüllerine özgü 30 kDa' luk bir bandın varlığını göstermiştir. Ekspanzin proteinlerinin içeriği, bezelye kökü nodülleri büyümesi sırasında yükselmiştir. Ekspanzin (ler) proteini, enfeksiyon ipliği duvarlarında olduğu gibi nodül apoplastide lokalizedir. Nodül, kök ve sürgünün meristematik bölümünde Ekspanzin benzeri proteinlerin artan miktarı gösterilmiştir. Bezelye kök nodülü gelişim sürecinde Ekspanzinlerin olası katılımı da tartışılmıştır (Sujkowska ve Borucki, 2007).

Salatalık α-Ekspanzin, fungal endoglukanaz ve pektin liyaz arasındaki sinerji adlı yapılan çalışmada birkaç rekombinant fungal enzimin (endoglukanaz ve pektinaz), hücre duvarı uzantısı ve polisakkarid bozunmasında α-Ekspanzin ile etkileşimleri açısından incelenmiştir. Hem Cel12A hem de Cel5A, selüloz CMC-Na ve karışık bağlantılı β-glukanı hidrolize etmiştir. Cel12A, Cel5A'nın aksine, ksiloglukanı hidrolize etmiştir ve in vitro bir deneyde salatalık hipokotillerinin duvar genişlemesine neden olmuştur. α-Ekspanzini yüksek konsantrasyonlarda bile Cel12A ile birleştirmek, Cel12A'nın tek başına indüklediği maksimum / son duvar uzatma oranını arttırmamıştır. Pektinaz (Pel1, bir pektin ligaz), konsantrasyona bağlı bir şekilde α-Ekspanzin ile indüklenen duvar uzantısını güçlendirmiştir; bu da pektin ağının Ekspanzinin ksiloglukan-selüloz kompleksine erişilebilirliğini normal olarak düzenleyebileceğini düşündürmüştür. α-Ekspanzin Cel12A'nın selüloz CMC-Na üzerinde hidrolitik aktivitesini arttırmıştır, ancak ksiloglukan ve β-glukan üzerindeki etkiyi arttırmamıştır. Ekspanzin Cel5A'nın hidrolitik aktivitesini etkilememiştir. İlginç bir şekilde, Ekspanzin, Pell'in yüksek esterifiye pektin bozundurma aktivitesini

de arttırmıştır. Ayrıca hücre duvarı şişmesinin, Ekspanzin ve hidrolazların hareketi sırasında önemli bir olay olmayacağını da önermiştir (Wei ve ark., 2010).

Selülozun geliştirilmiş enzimatik hidrolizi için Bacillus subtilis' ten bir bakteri genişlemesinin fonksiyonel karakterizasyonu adlı yapılan çalışmada Ekspanzin benzeri proteinler, diğer ökaryotlarda, örneğin nematodlar ve funguslarda da bulunmuştur. Bakteriler tarafından üretilen bir Ekspanzin ararken, Bacillus subtilis' ten BsEXLX1 proteininin mısır tarafından üretilen b-Ekspanzin' e benzer bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle BsEXLX1 genini klonlanmıştır ve işlevini değerlendirmek için *Escherichia coli*' de ekspres edilmiştir. Selülaz ve bakteri Ekspanzinin karışımının aktivitesinin tek tek proteinlerine katkı etkinliğine kıyasla sinerjik aktivitenin, filtre kağıdı, selülaz ve BsEXLX1 ile inkübe edildiğinde % 240 kadar yüksek olduğu bulunmuştur; bu oran 5.7 kat daha fazladır. Bununla birlikte, bu sinerjistik etki yalnızca düşük bir selülaz dozu kullanıldığında gözlenmiştir (Kim ve ark., 2008).

Çilek meyvesinin olgunlaşması sırasında meydana gelen bir Ekspanzin geninin ekspresyonu adlı yapılan çalışmada olgunlaşmayı sağlayan Ekspanzinlerin tüm olgunlaşan meyvelerde mevcut olup olmadığını değerlendirmek için çilek meyvesinde (Eragaria × ananassa Duch.) gen ekspresyonu incelenmiştir. Çilek, domatesin meyvelerin yumurtalık dokusu yerine hazondan türetildiği ve meyvenin klimakterik olmaması açısından önemli ölçüde farklıdır. Olgunlaşma sağlayan bir Ekspanzini (FaExp2) kodlayan tam uzunlukta bir cDNA çilek meyvesinden izole edilmiştir. Çilekte daha önce tanımlanmış olan olgunlaştırma düzenleyen genlerin hemen hemen hepsi oksin tarafından negatif olarak düzenlenmiştir. FaExp2 ekspresyonu büyük ölçüde oksin tarafından etkilenmemiştir. Genel olarak, sonuçlar olgunlaşmanın ortak bir bileşenini ve oksin haricindeki klimakterik olmayan sinyallerin çilekte olgunlaşmanın başlangıcını koordine edebileceğini düşündürmektedir (Civello ve ark., 1999).

Mikroplardaki Ekspanzin benzeri proteinlerin biyokimyasal analizi adlı yapılan çalışmada patojen bakteri ve bir mantardan gelen Ekspanzinlerin, hücre

duvarlarının *in vitro* uzantısına neden olduğunu ve litik aktivite olmaksızın filtre kağıdı ağlarını zayıflattığına dair kanıtlar sunulmuştur. Genişlik yapanlar, selülozu zayıflatabildiklerinden ağlar selülozun hidrolizinde birkaç selülaz aktivitesini sinerjik olarak arttırıp arttırmadığına bakılmaksızın ıslatılmıştır. Mikrobiyal genleşmeler, sığır serum albümininin spesifik olmayan ötesinde sinerjik etki göstermemiştir. Bulgular, çeşitli patojen mikroplarda mevcut olan Ekspanzinlerin zayıf duvar-gevşetici aktiviteye sahip olduğunu ve bitki patogenezinde bu Ekspanzinlerin inferarolunu gösterdiğini göstermiştir (Georgelis ve ark., 2012).

Mango yumuşaması duyarlı erken etilen ekspresyonu ile ilişkilidir, olgunlaşma ile ilişkili Ekspanzin geni, MiExpA1 adlı yapılan çalışmada mangoda ki olgunlaşma sürecini anlamak için çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte diğer mango çeşitleri ile ilgili genlerin moleküler analizleri hakkında bugüne kadar önemli bir veri yoktur. Burada mango yumuşaması ile bağlantılı olan bir α-Ekspanzin geni olan MiExpA1'in izolasyonu ve karakterizasyonu bildirilmektedir. Protein seviyesi Ekspanzin ekspresyonunun ikinci günün de kendisinden saptanabilir ve yumuşama sürecinde devam etmektedir. 1-MCP ile yapılan muamele hem olgunlaşmayı / yumuşatmayı hem de MiExpA1 transkriptini ve protein birikimini engellemektedir. MiExpA1 ekspresyonunun etilen ile bağımlı olduğu ve ekspresyonun olgunlaşma progresyonuyla birlikte arttığı öne sürülmektedir. Bu gen, mango olgunlaşmasını manipüle etmek için iyi bir aday olabilmektedir (Sane ve ark., 2005).

Şeftali de yemeklik gelişimi ile birlikte Ekspanzin protein seviyesinin düşüşü adlı yapılan çalışmada Ekspansin mRNA'sı ve şeftali protein ekspresyonu, Ekspanzinlerin etli et dokusunun gelişimine karışabileceği olasılığını araştırıldı. Bir Ekspanzin antikoru kullanılarak immünoblot analizi, olgunlaşmanın ilerleyen aşamalarında ekspanzinlerin tahmin edilen moleküler kütlesine karşılık gelen ancak tam yeşil olmayan meyvede bir 27 kDa protein tespit etmiştir ve Ekspanzinin şeftalilerde olgunlaşmanın ilerlemesi ile ilişkili olduğunu belirtilmiştir. Şeftali çeşitleri 'O'Henry' ve 'Summer Lady' 5 °C' de depolanmıştır. Başlangıçta, depolanan meyveler sulu (%50-60 serbest su), ancak depolama ilerledikçe 'O' Henry' için % 30,

'Summer Lady' içinde % 46 oranında serbest su gözle görülür hale gelmiştir. Her iki çeşitte meyvede de Ekspanzin protein bolluğu azalmıştır. Immünoblot analizi, unlu bölgelerinin sulu bölgelerden çok daha az Ekspanzin içerdiğini göstermiştir. Şeftalide olgunlaşma ile ilişkili olan Ekspanzin cDNA probu kullanılarak yapılan Ekspanzin mRNA bolluğunun analizi, Ekspanzin mRNA ekspresyonunun unlu dokularda belirgin şekilde azaldığını göstermiştir (Obenland ve ark., 2003).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmada ilgili genin bulunduğu sebze olarak genç domates fideleri kullanılmıştır. Domates fideleri özel kapaklı plastik kutularda hava almadan yetiştirilmiştir. Fidelerin gelişmesi için ilk olarak kutulara hazırlanan MSO besiyeri konulmuştur. Besiyeri katılaştıktan sonra üzerine domates tohumu ekimi yapılmıştır ve fidelerin yetişmesi için 15 gün kadar beklenilmiştir.

3.1.2. Kimyasal maddeler

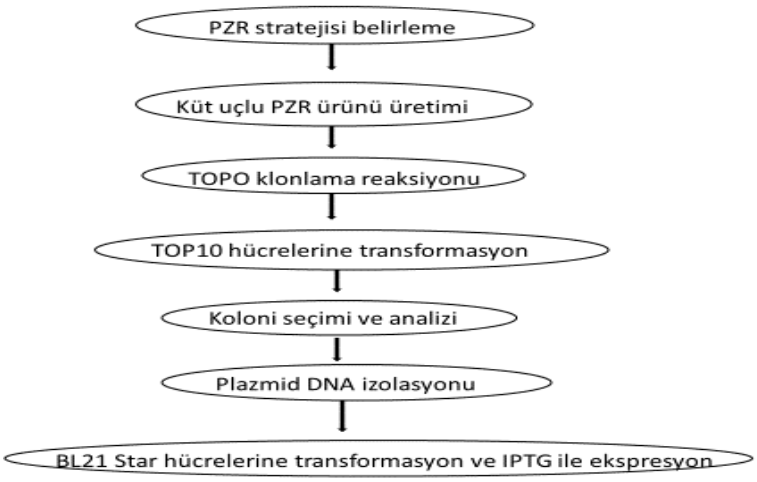
E. coli K12 suşu ticari olarak Invitrogen firmasından temin edilmiştir. T17 vektörü de Invitrogen firmasından temin edilmiştir. Klonlama için gerekli olan DNA restriksiyon ve DNA ligaz enzimleri New England Biolabs firmasından temin edilmiştir. IPTG induceri ve gerekli besiyeri Sigma firmasından temin edilmiştir. İlgili gen ise NCBI (National Center of Biotechnology Information, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) bilgi bankasında depolanmış olan gen dizilimleri temel alınarak seçilmiştir.

3.2. Yöntem

Rekombinant protein üretiminin gerçekleşmesi için dört temel unsura ihtiyaç vardır. Bunlar:

1. İlgili gen
2. Bakteriyel ekspresyon vektörü
3. Ekspresyon hücre kültürü
4. Fermentasyon için gerekli ekipmanlar

Şekil 3.1.' de rekombinant protein akış şeması gösterilmektedir:



Şekil 3.1. Rekombinant protein üretim akış şeması

Şekil 3.1.' de görüldüğü gibi ilk olarak LeExp1 geni ilgili vektöre klonlanabilmesi için PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Klonlanan LeExp1 geni Champion kit aracılığıyla ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Vektör *E. coli* sıvı kültürün içerisinde bakterilere transforme edilmiştir. Böylece *E. coli* bakterisine rekombinant protein üretimi özelliği kazandırılmıştır. Daha sonra sıvı besiyerinden alınan bakteri katı besiyerine ekilmiştir ve klonların gelişmesi beklenilmiştir. Elde edilen klonların uygun proteini ifade edip etmediği ise biyokimyasal ve moleküler analizlerle tespit edilmiştir (Taimisto, 1994).

3.2.1. İlgili gen

Çalışmada ilgili gen olarak domatesten (Lycopersicon esculentum) izole edilen LeExp1 geni kullanılmıştır. LeExp1 geni NCBI bilgi bankasında depolanmış olan gen dizilimleri temel alınarak seçilmiştir. Genin dizilimi aşağıda gösterilmektedir:

```
1    gaacttcaat tccattaaat cttaagaatg ggtatcataa ttttcatcct tgttcttctt
61   tttgtagact catgtttcaa cattgttgaa ggaagaatcc ctggtgttta ctctggtggt
121  tcatgggaaa ctgcacatgc tacattttac ggcggaagtg atgcttctgg aacaatgggc
181  ggtgcgtgtg gttatggaaa tttatacagc caaggatacg gagttaacac agcagcactg
241  agtactgctt tgtttaacaa tggattaagt tgtggagcct gttttgaact taaatgtaca
301  aatactccta attggaaatg gtgtcttcct ggaaaccctt ccattttaat cacagctacc
361  aatttctgcc caccaaatta cgcgttgcca aatgacaatg gtggctggtg taaccctcct
421  cgccctcact ttgacctcgc tatgcctatg tttctcaaac ttgctcagta ccgcgctggc
481  attgttcctg taacttatcg caggatccca tgccgaaagc aaggaggaat cagatttacc
541  atcaatggat tccgttactt caacttagtg ttgatcacga atgtagcagg tgcaggggat
601  attattaagg tttgggtaaa aggaacaaag acaaattgga ttccattgag ccgtaattgg
661  ggacaaaatt ggcaatcaaa tgcggtttta actggtcaat cactctcttt cagagttaaa
721  gctagtgacc atcgatcttc tacctcatgg aatatggttc cttctcattg gcaatttggc
781  caaactttca tcggaaagaa tttcaaaata taaaattagt aagggtattg ttatttttaa
841  tttgtgggaa aactaggata tttcagagtg ttgttcacct taggaaaaga aatcgagtcc
901  tcactgaaaa ttcagataga taattaatta aattactaaa atttttcgat atttttgagt
961  gtgtatcaac attttaacct aagtatggtt aaatggagag aaaggttgaa gtggctgcaa
1021 aatcatgcag cccgcagctg ttttttttt tttacaatat acatcacaag
```

Şekil 3.2. LeExp1 gen dizilimi

LeExp1 geni yaklaşık olarak bin nükleotitten oluşmaktadır. Bu genin protein dizilimi ise şu şekildedir.

```
"MGIIIFILVLLFVDSCFNIVEGRIPGVYSGGSWETAHATFYGGSDASGTMGGA
CGYGNLYSQGYGVNTAALSTALFNNGLSCGACFELKCTNTPNWKWCLPGN
PSILITATNFCPPNYALPNDNGGWCNPPRPHFDLAMPMFLKLAQYRAGIVPVTYRR
IPZRKQGGIRFTINGFRYFNLVLITNVAGAGDIIKVWVKGTKTNWIPLS
RNWGQNWQSNAVLTGQSLSFRVKASDHRSSTSWNMVPSHWQFGQTFIGKNFKI".
```

Şekil 3.3. LeExp1 geninin aminoasit dizilimi

3.2.2. Bakteriyel ekspresyon vektörü (T17)

Bakteriyel ekspresyon vektörü olarak rekombinant protein üretiminde sık olarak kullanılan T17 vektörü (T7 RNA polimeraz sistemi) kullanılmıştır.

3.2.2.1. Vektörün özellikleri

pET TOPO vektörleri küt uçlu PZR ürünün *E. coli* içerisinde düzenli sentezlenmesi ve yönlü TOPO klonlamasını kolaylaştırmak için tasarlanmıştır.

- *E. coli* içinde ilgili genin IPTG ile uyarılabilir sentezlemesi için yüksek düzeyde T7lac promoteri (Dubendorff ve Studier, 1991; Studier et al., 1990)
- Küt uçlu PZR ürünlerinin hızlı ve verimli doğrudan klonlanması için yönlü TOPO klonlama bölgesi
- Rekombinant füzyon proteinlerinin tespiti ve saflaştırılması için N ya da C terminal füzyon etiketleri
- İlgili rekombinant proteinin füzyon etiketinin parçalanması için proteaz tanıma bölgesi
- pET TOPO® vektöründeki T7lac promoterinden ve *E. coli* konakçı kromozomdaki lacUV5 promoterinden bazal transkripsiyon azaltmak için lac represör kodlayan lacI geni
- *E. coli* içinde seçim için antibiyotik direnç işareti
- *E. coli* içinde düşük kopyalama replikasyonu ve bakımı için pBR322 orijini içerir (Anonim, 2010).

Aşağıdaki Çizelge 3.1.' de ise pET100/D TOPO vektörünün haritasal özellikleri yani gen dizilimindeki yerleri belirtilmiştir. Böylece Çizelge 3.1.' e bakarak LeExp1 geninde yapılan analizlerde bağlantı noktaları belirlenir.

Çizelge 3.1. pET100/D TOPO vektörünün haritasal özellikleri

	pET100/D- TOPO
T7 promoter	209-225
T7 promoter/ bağlanma bölgesi	209-228
lac operator (lacO)	228-252
Ribozom bağlanma bölgesi (RBS)	282-288
ATG başlangıcı	297-299
Polihistidin (6xHis) bölgesi	309-326
Xpress epitop	366-389
EK tanıma bölgesi	375-389
TOPO Klonlama bölgesi (yönlü)	396-409
T7 geri bağlanma bölgesi	466-485
T7 transcription termination site	427-555
bla promoter	856-954
Ampicillin (bla) direnç geni	955-1815
Kanamycin direnç geni	---
pBR322 kaynağı	2022-2757
ROP ORF (komplementer zincir)	3001-3192
lacI ORF (komplementer zincir)	4507-5595

3.2.3. Ekspresyon hücre kültürü

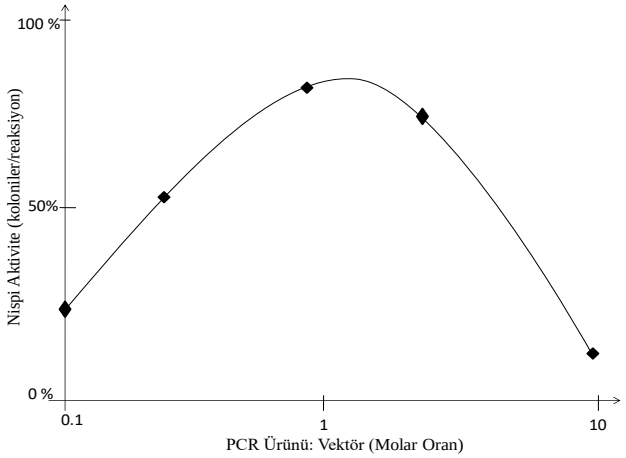
Fermantasyonun açık avantajları olmasına rağmen sürekli kültür, rekombinant protein ekspresyonunda hücreleri yetiştirmek için en yaygın yöntemdir. Kültür olarak *E.coli'* nin BL21 suşu kullanılmıştır. Bu kültürün tercih edilmesinin sebepleri, genetik olarak işlenmesi kolaydır, kültürü maliyetli değildir, ekspresyonu hızlıdır ve proteinler rutin olarak bir gün içerisinde üretilebilirler.

3.3. TOPO Klonlama

İstenilen PZR ürünü üretildikten sonra bu ürün pET TOPO vektörüne klonlanmıştır. TOPO klonlama sonucu elde edilen rekombinant vektör TOP10 *E. coli* One Shot içerisine transforme edilmiştir.

3.3.1. TOPO klonlama reaksiyonunda kullanılacak PZR ürün miktarı

Yönlü TOPO klonlama gerçekleştirilirken reaksiyonun başarılı olması için PZR ürünü ve TOPO vektör arasındaki molar oran kritik bir öneme sahiptir. TOPO klonlamada yüksek verim elde edebilmek için PZR ürünü: TOPO vektör oranı 0.5:1 ile 2:1 arasında bir oran olmalıdır (Şekil 3.4.' de görüldüğü gibi).



Şekil 3.4. PZR ürünü ve TOPO vektör oranı

Eğer PZR ürünü TOPO vektör oranı 0.1: 1 den küçük veya 5: 1 den büyük olursa TOPO klonlama verimliliği önemli oranda azalır (Şekil 3.4.' de görüldüğü gibi). PZR ürününün de çok az veya çok fazla kullanılması sonucu verimsiz sonuçlar elde edilir.

Çalışmada kullanılan oran PZR ürünü: TOPO vektör= 1:1 dir.

3.3.2. TOPO Klonlama Reaksiyonunda Tuz Solüsyonu Kullanımı

Klonlama reaksiyonu tuz içeren reaksiyon tamponu ile yapılmalıdır. TOPO klonlama reaksiyonunda eklenen tuz miktarı *E. coli'* ye transformasyonun kimyasal bileşen *E.coli* veya elektro bileşen olmasına bağlıdır.

Çalışmada kullanılan tuz ve oranları: 300 mM NaCl, 15 mM $MgCl_2$ dir.

3.3.3. PZR Primer Dizaynı

İlgili geni çoğaltmak için kullanılan PZR primerlerinin tasarlanması ekspresyon için oldukça kritik bir basamaktır. pET TOPO vektör kullanımına bağlı olarak PZR primer dizaynı yaparken aşağıdaki maddeler dikkate alınmıştır:

- Yönlü klonlamayı kolaylaştırmak için dizilim gereklidir.
- PZR ürününün klonlanması için uygun N terminal ve/veya C terminal peptid etiketleri bilinmelidir (Anonim, 2010).

3.3.3.1. İleri Primer dizaynı için gerekli koşullar

Yönlü klonlamanın sağlanması için ileri PZR primeri, primerin 5' ucunda CACC dizilimi içermek zorundadır. CACC olan bu dört nükleotid pET TOPO vektöründeki GTGG dizilimi ile baz çifti oluşturur. Örnek olarak aşağıda teorik bir proteinin ve önerilen ileri primer diziliminin N terminal DNA dizilimi verilmiştir:
DNA dizilimi: 5′-ATG GGA TCT GAT AAA
Önerilen İleri PZR Primer: 5′-CACC ATG GGA TCT GAT AAA

3.3.3.2. Geri Primer dizaynı için gerekli koşullar

Genel olarak, PZR ürününü klonlamak için arzu edilen herhangi bir C-terminal etiketiyle geri PZR primeri dizaynı yapılır. PZR ürünün yönlü klonlanmasının yüksek verimlilik ile yapılabilmesi için geri PZR primeri 5' ucundaki

GTGG dizilimi için tamamlayıcısı bir dizilim içermemelidir. Bir tek baz çifti uyuşmazlığı yönlü klonlamanın verimliliğini %90 dan %75' e düşürür ve bu durum ters doğrultuda ORF klonlamanın olasılığını artırabilir.

Örnek: Aşağıda teorik proteinin C-terminal dizilimi verilmiştir. C-terminali etiketiyle klonlama yapılabilir. Durdurma kodonunun altı çizilmiştir.

DNA dizilimi: AAG TCG GAG CAC TCG ACG ACG GTG TAG-3′

Durdurma kodonunun hemen üst akışındaki kodon ile başlamak için ters PZR primeri dizayn etmek bir çözümdür, ancak son iki kodon çıkıntının dizilimi ile aynı olan GTGG (aşağıdaki örnekte altı çizilmiştir) dizilimi içermelidir. Bu durumun sonucu olarak, geri primer PZR ürününün ters oryantasyondaki klon olasılığını artırarak çıkıntı dizisinin tamamlayıcı olmalıdır. Ancak bu durum önlenmek istenilir.

DNA dizilimi: AAG TCG GAG CAC TCG ACG ACG GTG TAG-3′
Önerilen Geri PZR Primer Dizilimi: TG AGC TGC TGC CAC-5′

Başka bir çözüm, durdurma kodonunun aşağı akışı hibridize olacak şekilde geri primeri tasarlamaktır, ama yine de ORF bölgesi C-terminalini içerir. Glisin veya alanin gibi zararsız bir amino asit kodonu ile durdurma kodonu değiştirilmesi gerekmektedir.

3.3.3.3. Kullanılan İleri ve Geri Primerler

Kullanılan ileri ve geri primerlerin özellikleri Çizelge 3.2.' de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. İleri ve Geri Primerler

Primer adı	Uzunluk	Erime sıcaklığı (ºC)	GC%	Dizilimi (5'-3')
TOF1	24	62,2	33,3	CACCATGGGTATCATAATTTTCAT
LeExpR1	20	63,3	50	GCAGCCACTTCAACCTTTCT

3.4. Kimyasal Analizler

3.4.1. DNA ekstraksiyonu

DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990)'un belirttiği şekilde yapılmıştır. Kullanılan yöntem CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) bazlı bir eksraksiyon işlemidir.

0,5 g genç bitkinin sadece yapraklarından tartılmıştır. Yapraklar havana alınmıştır ve üzerine sıvı nitrojen konulmuştur. Havana ekstraksiyon tamponu eklenmeden önce yapraklar iyice öğütülerek toz haline getirilmiştir. Havana 5 ml ekstraksiyon tamponu eklenmiştir ve karışım iyice homojen hale getirilmiştir. Karışım 15 ml lik falkona alınmıştır. Havan ve dibek 1 ml ekstraksiyon tamponu ile yıkanmıştır ve bu da falkondaki karışıma ilave edilmiştir. Karışım 60 ºC de 25 dakika inkübe edilmiştir ve tekrar oda sıcaklığına getirilmiştir. Karışıma 6 ml kloroform:isoamil alkol (24:1) ilave edilmiştir ve tüp nazikçe karıştırılmıştır. Emülsiyon faz oluşması için tüp 20-25 kez ters düz edilmiştir. Tüp oda sıcaklığında 6000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpteki sulu faz (üst fazı) pipetle numaralandırılmış yeni mikrosantrifüj tüplerine 400 µl olacak şekilde bölünmüştür. Mikrosantrifüj tüplerine 0,5 er hacim (200 µl) 5 M NaCl eklenmiştir ve iyice karıştırılmıştır. Ardından mikrosantrifüj tüplerine 2 şer hacim (400*2= 800 µl) %95 lik soğuk (-20 ºC) etanolden eklenmiştir (bir mikrosantrifüj tüpündeki toplam hacim 1400 µl olmuştur). Tüpler DNA iplikçikleri görünene kadar buzdolabında (4-6 ºC) yaklaşık 1 saat kadar bekletilmiştir (bu süre bir gece olabilir). İplikçikler göründükten sonra tüpler oda sıcaklığında 3000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpler yeniden oda sıcaklığında 5000 rpm de 3 dakika daha santrifüj edilmiştir. (bu iki hız arasındaki fark DNA nın dibe çökmesi sağlanmıştır). Sıvı fazlar uzaklaştırılmıştır ve peletler % 76 lık (0-4 ºC) etanol ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından 5000-6000 rpm de 4-5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. Etanol tamamen uzaklaştırılmıştır ve tüplerdeki etanoller (oda sıcaklığında) kurutulmuştur. Pelet 200 µl TE (Tris-EDTA) içerisinde çözülmüştür ve elde ettiğimiz DNA nın A260 ve A280 de ölçümü yapılmıştır. Ölçüm kılcal küvetlerde yapılmıştır. Küvete 5 µl DNA

+ 995 µl TE eklenmiştir ve TE ye karşı okuma yapılmıştır. Sonuçlar ~1.8-2.0 arasında olmalıdır. Ölçümden sonra DNA -20 ºC de saklanmıştır.

3.4.2. Spektrofotometre kullanılarak DNA miktarının ölçülmesi

Örnek DNA' sı deiyonize su ile 1/200 oranında sulandırılarak 1 ml lik kuvartz küvete yerleştirilmiştir. 260 nm ve 280 nm' de DNA' nın UV absorpsiyonu okunmuştur. A260/ A280 oranı hesaplanarak örnek saflığı hesaplanmıştır. İdeal oran yaklaşık olarak 1.8- 2.0 aralığında olmalıdır. Oran 2.0' dan büyük ise RNA kontaminasyonunu gösterirken, 1.6' dan küçük ise protein kontaminasyonu varlığına işaret etmektedir. DNA konsantrasyonu µg/ml olarak hesaplanmıştır. DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılan formül aşağıdaki gibidir.

DNA Konsantrasyonu = OD 260 x Katsayı (50) x Seyreltme Faktörü

OD260, A260' da ki optik yoğunluğu temsil eder. 1 optik dansite (O.D) çift iplikli DNA için 50 µL/ mL olduğundan, katsayı olarak 50 kullanılmıştır.

3.4.3. Küt Uçlu PZR Ürünü Üretimi

Çalışmada kullanılan küt uçlu PZR ürünü üretimi temel moleküler biyoloji kurallarına uyularak yapılmıştır (Maniatis ve Sambrook, 1989). LeExp1 geni Biorad markalı thermocycler kullanılarak çoğaltılmıştır.

Çizelgede 3.3.' te verilen bileşenler PZR tüpünde karıştırılmıştır ve hazırlanan PZR karışımı için çizelge 3.4.' teki şartlar dikkate alınarak çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra PZR karışımı agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

Çizelge 3.3. Küt uçlu PZR ürünü üretimi için PZR ürün karışımı

Bileşenler	Miktar (µl)
Su	16,50
Buffer	2,5
$MgCl_2$	1,5
dNTP	1,25
DNA	1
Primer-F	1
Primer-R	1
Taq enzyme	0,30

Küt uçlu PZR ürünü üretimi için PZR analiz şartları Çizelge 3.4.' te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Küt uçlu PZR ürünü üretimi için PZR analiz şartları

Step	Zaman	Sıcaklık	Döngü
Başlangıç denatürasyon	3 dakika	94 ºC	1x
Denatürasyon	30 sn	94 ºC	
Bağlanma		60 ºC	35x
Uzama		72 ºC	
Son uzama	10 dakika	72 ºC	1x

3.4.4. Agaroz jel elektroforezi

%0.8' lik agaroz 1X TBE (EKC) içeren erlenmayere aktarılmıştır. Erlenmayerde ki agaroz çözülünceye kadar mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Karışım 50-60 ºC' ye kadar soğutulduktan sonra 10 mg/mL ethidium bromide stok solüsyonundan son konsantrasyon 0.3-5 µg/mL olacak şekilde ilave edilip, iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım jel tepsisine dökülmüş ve katılaşıncaya kadar beklenilmiştir. Jel iyice katılaştıktan sonra jel tepsisi dikkatlice elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

Advance Mupid-One markalı elektroforez tankına jelin yüzeyini 2-5 mm kalınlığında kaplayacak şekilde 1XTBE tampon çözeltisi eklenmiştir. Elektroforez 100 voltta 50 dakika çalıştırılmıştır. Elde edilen jel dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.4.5. PZR reaksiyonundan DNA' nın saflaştırılması

PZR reaksiyonundan DNA' nın saflaştırılması işlemi GE Healthcare GFX PCR DNA and Gel Band Purificiation Kit aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

Tüpteki 100 µl örneğin üzerine 500 µl capture buffer type 3 eklenip iyice karıştırılmıştır. Örnek ile buffer karıştıktan sonra rengi kontrol edilmiştir. Renk sarı ya da soluk turuncu olmalıdır. GFX Microspin kolonu biriktirme tüpüne yerleştirilmiştir. Karışım GFX Microspin kolonundan geçirilerek biriktirme tüpüne akıtılmıştır. Tüp 1 dakika boyunca 16 000xg da santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası biriktirme tüpündeki sıvı uzaklaştırılmıştır. Aynı Microspin kolonu sıvının uzaklaştırıldığı aynı biriktirme tüpüne tekrar yerleştirilmiştir ve 500 µl wash buffer type 1 eklenmiştir. Tüp 1 dakika boyunca 16 000xg da santrifüj edilmiştir. İşlem sonrası biriktirme tüpü atılmıştır. Kolon ise temiz 1,5 ml lik DNAse free ependorf tüpüne yerleştirilmiştir. Ependorf tüpüne 50 µl elution buffer type 4 ya da type 6 eklenmiştir. Tüp 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 1 dakika boyunca 16 000xg da santrifüj edilmiştir. Elde edilen sıvı faz -20 ºC de saklanmıştır.

3.4.6. PZR ürününün kontrol edilmesi

750 bp lik kontrol PZR ürünü üretimi için Çizelge 3.5.' teki karışım hazırlanarak çizelge 3.6.' daki şartlar dikkate alınmıştır.

Çizelge 3.5. Kontrol PZR ürün karışımı

Bileşenler	Miktar (µl)
Kontrol DNA template (100 ng)	1
10X PZR Buffer (enzim için uygun olmalı)	5
dNTP Mix	0.5
Kontrol PZR Primerleri (0.1 µg/µl her biri)	1
Saf su	41.5
Termostabil polimeraz (1-2.5 birim/µl)	1
Toplam hacim	50

Çizelge 3.6. Kontrol PZR analiz şartları

Step	Zaman (dakika)	Sıcaklık (ºC)	Döngü
Başlangıç denatürasyon	2	94	1x
Denatürasyon	1	94	
Bağlanma	1	55	25x
Uzama	1	72	
Son uzama	7	72	1x

Çizelge 3.5.' te belirtilen bileşenler PZR tüpünde karıştırılmıştır ve hazırlanan PZR karışımı yukarıda belirtilen şartlar ayarlanarak çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra PZR karışımı agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

3.4.7. TOPO klonlama reaksiyonu

Çizelge 3.7.' de belirtilen ürünler sırasıyla temiz bir ependorf tüpüne konulup nazikçe karıştırılmıştır. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında (22-23 ºC) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüp buz üzerine alınıp transformasyon aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 3.7. TOPO klonlama ürün karışımı

Ürünler	Bileşenler
PZR ürünü	1 µl
Sulandırılmış tuz solüsyonu	1 µl
Steril su	Toplam hacim su ile 5 µl ye tamamlanır
TOPO vektör	1 µl
Toplam hacim	6 µl

TOPO klonlama sonrası klonlamanın etkinliğini kontrol etmek amacıyla yapılan analizde kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.8.' de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Kontrol TOPO klonlama ürün karışımı

Bileşenler	Miktar (µl)
Steril su	3
Tuz solüsyonu	1
Kontrol PZR ürünü	1
pET TOPO vektör	1
Toplam hacim	6

Karışım 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra buz üzerine alınmıştır. Ayrı ayrı 3 er µl One Shot TOP10 hücrelerine alınmıştır. Her bir tüp için 2 tane uygun antibiyotik içeren LB plate hazırlanmıştır. İlk petriye 100 µl ikinci petriye ise 200 µl ekim yapılmıştır (ekim dragalski spatülü ile yayma yöntemine göre yapılmıştır). Kolonilerin gelişmesi için petriler gece boyunca 37 ºC de inkübasyona bırakılmıştır (Anonim, 2010).

3.4.8. Kimyasal Kompotent Hücrelere Transformasyon

Bir tüp OneShot TOP10 kimyasal kompotent hücresi ile hazırlanan 3 µl PZR ürünü+ vektör ü karıştırılmıştır. Tüp buz üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Tüp 30 sn 42 ºC lik su banyosunda bekletilerek hücrelere ısı şoku uygulanmıştır. Su banyosundan alınan tüp hemen sonra tekrar buza konulup 1 dakika bekletilmiştir. Tüpte bulunan hücrelerin üzerine 250 µl oda sıcaklığında S.O.C. (Super Optimal Catabolit Repressor) eklenmiştir. S.O.C Eklendikten sonra ağzı sıkıca kapatılan tüp

yatay vaziyette 1 saat boyunca 200 rpm de 37 ºC de çalkalayıcı da inkübe edilmiştir. Birinci LB agar petrisine pipet ile 100 µl hücre eklenmiştir, ikinci LB agar petrisine ise 200 µl hücre eklenmiştir ve steril dragalski spatül ile yayarak ekim yapılmıştır. Petriler parafilm ile sarılmıştır ve etüvde gece boyunca 37 ºC de inkübe edilmiştir. Ertesi gün her bir petriden steril bir kürdan ya da öze ile 5 koloni alınmıştır ve içerisinde 5 ml LB medium içeren 15 ml lik falkona ekim yapılmıştır. Bir gece daha 37 ºC lik etüv de inkübe edilmiştir ve plazmit izolasyonuna geçilmiştir.

3.4.9. *E. coli'* den Plazmid DNA İzolasyonu

Ertesi gün bir gece inkübasyona bırakılan falkon tüpü 3000xg da 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı faz pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Falkona 100 µl GTE (Glucose Tris EDTA) buffer eklenmiştir ve bakteri peleti pipetle çekip bırakılarak tekrar süspansiyon hale getirilmiştir. Çözülen pelet temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır ve üzerine 200 µl taze hazırlanmış 0,2 N NaOH/ 1% SDS eklenmiştir. İşlem sonrası tüp 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Tüpe 150 µl Potasyum asetat (pH 4,8 olmalıdır) eklenmiştir ve zaman kaybetmeden 4-6 defa ters düz edilerek karıştırılmıştır. Tekrar 15 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra tüp 11 000 rpm de 10 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Sıvı faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne pipet yardımıyla transfer edilmiştir. Sıvı faz içeren tüpe 600 µl isopropanol eklenmiştir ve tüpler ters düz edilerek karıştırılmıştır. Tüpler buz üzerinde 2 dakika bekletilmiş ve 11 000 rpm de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpe (pelete) 500 µl %95 etanol eklenmiştir ve bir kere dikkatlice sallanmıştır. Maksimum hızda 3,5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra etanol pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Peletin çok kurumamasına dikkat edilmelidir. Etanol kuruyunca tüpe 50 µl DNAse/ RNAse içermeyen su eklenmiştir ve elde edilen DNA -20 ºC de saklanmıştır (Anonim, 2010).

3.4.10. Plazmitlerin Ekspresyon Hücrelerine Transformasyonu

Transformasyon başına bir tüp BL21 (DE3) One Shot hücresi çözündürülmüştür. 1-5 µl hacim içeren her bir BL21 One Shot hücresi tüpüne 5-10 ng plazmid eklenmiştir ve pipet ucu ile nazikçe karıştırılmıştır. Tüpler buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler çalkalanmadan 42 ºC de 30 saniye ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Isı sonrası tüpler hızlı bir şekilde hemen tekrar buza alınmıştır ve 1-2 dakika bekletilmiştir. Her bir tüpe oda sıcaklığında 250 µl S.O.C medium eklenmiştir. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılmıştır ve parafilmle sarılmıştır. Tüpler yatay bir şekilde çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve 30 dakika boyunca 37 ºC lik çalkalıyıcıda 200 rpm de inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpteki karışımın tamamı uygun antibiyotik içeren 10 ml LB ye eklenmiştir. Karışım çalkalamalı inkübatörde 37 ºC de gece boyunca inkübe edilmiştir.

3.4.11. Ekspresyon

Gece boyu inkübe edilen kültürden 500 µl alınmıştır ve uygun antibiyotik içeren 10 ml lik LB ye inoküle edilmiştir. OD 0.5-0.8 e ulaşıncaya dek 37 ºC lik çalkalayıcıda da bekletilmiştir (yaklaşık 4 saat sürmektedir). Bakteri yoğunluğu istenilen düzeye ulaştığı zaman kültür iki tane 5 ml lik tüplere ayrılmıştır. Kültürlerden birine son konsantrasyonu 0.5-1 mM (0.0005-0.001 M) olacak şekilde IPTG eklenmiştir. Diğer kültüre ise hiçbir şey eklemeden kontrol olarak bırakılmıştır. Her bir kültürden 500 µl alınmıştır ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj edilmiştir ve pipet yardımıyla sıvı fazı uzaklaştırılmıştır. Peletler -20 ºC de dondurulmuştur. Bunlar sıfır zaman noktası örnekleridir. 37 ºC lik çalkalayıcıda inkübasyona devam edilmiştir. Her bir kültür için 4-6 saat aralığında zaman işaretlemesi yapılmıştır. Her zaman işaretlemesinde inducer içeren ve içermeyen kültürlerden 500 µl ayrılmıştır ve maksimum hızda 30 saniye santrifüj edilmiştir. Sıvı fazı uzaklaştırılan pelet -20 ºC de saklanmıştır (Anonim, 2010).

3.4.12. SDS Page

SDS Page analizi temel moleküler biyoloji kurallarına uyularak yapılmıştır (Maniatis ve Sambrook, 1989). Bu yöntemle proteinler molekül ağırlıklarına göre birbirinden ayrıştırılmıştır.

SDS-Page analizlerinde 10x10 cm'lik jel kalıpları kullanılmıştır. 'Running' ve 'Stacking' olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlanmıştır. Jel bileşenleri TEMED ve APS bileşenleri hariç sırasıyla iki jel karışımına da eklenmiştir. TEMED ve APS akrilamid ve bis-acrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için jel dökülmeden hemen önce eklenerek jeller hızlı bir şekilde dökülmüştür. Önce running jel dökülmüştür ve bunun hemen ardından running jelin üst yüzeyinde herhangi bir pürüzlü yapı ve hava kabarcığı kalmaması için jel üzerine %20'lik izopropanol eklenmiştir. Jelin polimerize olması beklenmiştir ve running jelin polimerize olduğu gözlemlendikten sonra stacking jele de TEMED ve APS eklenerek bu jelde running jelin üzerine dökülmüştür. Daha sonra jel üzerine 10'lu taraklar yerleştirilmiştir. Taraklar yerleştirildikten sonra jel dikey jel elektroforezi sistemine yerleştirilmiştir ve tank 1X SDS tampon çözeltisi ile doldurulmuştur. Önceden hazırlanan bakteri peletleri 80 µl 1X SDS tamponu içinde çözülmüştür. Örnekler 5 dakika 100 °C derecede inkübe edilmiştir ve en fazla 20 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklenmiştir. Protein yükleme işlemi tamamlanan jeller 75 ila 100 V arasında 1.5-3 saat yürütülmüştür. SDS jellerin yürümesi de tamamlandıktan sonra jeller comassi blue boya içerisine alınarak 1 saat boyunca boyama işlemine bırakılmıştır. Ertesi gün destain (durulama) çözeltisi ile berrak hale gelinceye kadar muamele edilen jeller daha sonra uygun ışıklar altında analiz edilmiştir.

3.4.12.1. Örneklerin hazırlanması

Başlamadan önce SDS Page jeli hazırlanmıştır. Ekspresyon örneklerinin buzu çözülmüş ve her bir hücre peleti 80 µl 1x SDS Page örnek bufferinde süspense edilmiştir. Örnekler 5 dakika kaynatılmıştır ve kısa bir süre santrifüj edilmiştir.

Örneklerden 5-10 µl SDS Page jeline yüklenmiş ve elektroforezde analiz edilmiştir. Kalan örnekler -20 ºC de saklanmıştır.

3.4.12.2. Çözünür/ Çözünmez proteinler için örnek hazırlama

Örneklerin buzu çözülmüştür ve her hücre peleti 500 µl Lysis Buffer da süspens edilmiştir. Örnekler kuru buz veya sıvı nitrojenle dondurulmuştur ve daha sonra 42 ºC su banyosunda çözündürülmüştür. Bu işlem 2-3 kez tekrarlanmıştır. Çözünmez protein peleti için örnekler mikrosantrifüjde 16 000xg de 1,5 dakika 4 ºC de santrifüj edilmiştir. Sıvı faz yeni bir tüpe alınmıştır ve buz üzerinde bekletilmiştir. Eşit miktarda sıvı faz ve 2x SDS Page bufferı karıştırılmıştır ve 5 dakika kaynatılmıştır. Daha önce elde edilen peletlerin her birine 500 µl 1x SDS Page bufferından eklenmiştir ve 5 dakika kaynatılmıştır. SDS Page jeline 10 µl sıvı faz örneğinden ve 5 µl pelet örneğinden yüklenerek elektroforez edilmiştir.

3.4.13. RT-PZR

RNA molekülü PCR ile çoğaltılamadığından PCR aşamasından önce RNA ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi kullanılarak cDNA (komplementer DNA)'ya çevrilir. Ardından DNA, PCR ile çoğaltılır. Bu sentezler aşaması RT-PCR olarak adlandırılır.

RT-PCR sensitivitesi yüksek bir deteksiyon tekniktir. Düşük kopya sayısı içeren az miktarda RNA bile bu yöntemle detekte edilir. mRNA'yı cDNA'ya çevirmenin amacı mRNA'yı daha dayanıklı cDNA sayesinde daha kolay ve ayrıntılı inceleyebilmektir. Genlerin incelenen hücredeki ekspresyon seviyesi belirlenir. mRNA sekansları cDNA formunda klonlanır ve bir hücrede eksprese edilen tüm genleri içeren cDNA arşivleri oluşturulur. RT-PCR ile klonlanan cDNA sayesinde genlerin ekspresyonu RNA ve protein seviyesinde daha ayrıntılı incelenir.

Transkripsiyon sonrası artık primerlerin, bağlanmamış dNTP' lerin PCR ürününden uzaklaştırılması için saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işlemi

Amonyum sülfat çöktürmesi ve amicon hücresi kullanılarak, ultrafiltrasyon, diyaliz ve kromatoğrafik teknikler ile yapılmıştır.

Amonyum sülfat ile çöktürme yöntemi proteinlerin ayrılmasında ve saflaştırılmasında kullanılan en eski yöntemlerden birisidir. Ayırma işlemi sırasında proteinlerin denatüre olmaması için çöktürme soğukta yapılır. Çözünmüş proteinlerin amonyum sülfat gibi nötral tuzların etkisiyle çökmelerinin nedeni, protein moleküllerindeki bağlı suyun çekilmesidir.

Diyaliz, proteinleri daha küçük molekül ağırlıklı moleküllerden ayırmak için kullanılır. Bu yöntem, yarı geçirgen bir membran içerisine konulan protein çözeltisi içerisinden küçük moleküllerin membran gözeneklerinden suyla veya tamponla dış ortama geçirilmesi temeline dayanır.

Ultrafiltrasyon, diyaliz temelinde çalışır; aradaki fark küçük moleküllerin ortamdan ayrılması için hidrostatik basınç veya santrifüj gibi kuvvetlerin etkisiyle proteinleri molekül ağırlıklarına göre diyalize oranla daha hızlı ve daha yüksek verimle ayrılmalarını sağlamasıdır.

Kromatografi, çeşitli moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması ve miktar tayininde kullanılan ve bir tekniktir. Kromatografi de bir hareketli faz (sıvı veya gaz) ve bu hareketli fazı geçirerek ayrımın yapılmasını sağlayan bir sabit/durağan faz (katı veya sıvı) vardır.

3.4.14. Western Blot Analizi

Western Blot herhangi bir örnekten elde edilen ve çok sayıda protein içeren bir karışımın içinde istenen tek bir proteini özgün bir şekilde saptamak için moleküler biyolojide en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu şekilde ilgilenilen bir proteinin örnekte bulunup bulunmadığı ve bulunuyorsa göreceli olarak (yarı kantitatif) farklı gruplar arasındaki miktarı hesaplanabilir.

Western Blot analizi Biorad Transblo Turbo Transfer System isimli Western blot cihazıyla gerçekleştirildi. İşlem sırasında Amersham ECL Western Blotting Detection Kiti kullanıldı.

Western blot işlemi birbirini takip edecek şekilde, proteinlerin membrana aktarımı, bloklama, birincil antikor uygulanması, ikincil antikor uygulanması ve görüntüleme olmak üzere temel olarak beş basamaktan oluşur. İlk aşamada, jelde ayrılan proteinler membrana aktarılır ve diğer tüm işlemler bu membran üzerinde gerçekleştirilir (Wiltfang ve ark., 1991).

Proteinlerin membrana aktarımı pasif (kapiler) emdirim ve elektro-emdirim (electro-blotting) olmak üzere temelde iki yöntemden biriyle yapılabilir. Pasif emdirimde membran ile jel üst üste koyulur ve aktarma tamponuyla ıslatılmış kalın filtre kağıtları arasına yerleştirilir. Daha sonra bunların üzerine ağırlık koyularak jeldeki bantların, ıslak filtre kâğıtlarındaki tamponun kılcal etkisiyle membran tarafından emilmesi sağlanır. Ancak bu işlem birkaç gün sürdüğünden genellikle daha hızlı ve etkin olan elektro-emdirim yöntemi kullanılır.

Elektro emdirim ıslak (wet blotting, tank aktarım sistemiyle) veya yarı kuru (semi-dry blotting, uygun cihazlarla) olarak yapılabilir. Islak emdirimde yine jel ve membran üst üste koyulur ve filtre kağıtlarıyla sandviç şeklinde hazırlanıp anot ve katot taraflarına dikkat ederek içinde transfer tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilir. Bu işlem 45 dk-1 sa gibi çok kısa bir sürede tamamlanır.

Yarı kuru emdirimde ise yine sandviç şeklinde hazırlanmış jel ve membran uygun cihazlarla yatay olarak elektrik akımı verilir (Kurien ve Scofield, 1997).

Western blot yönteminde ikinci basamak olan bloklama işleminde amaç membrana aktarılan proteinlerin dışındaki boşlukların kapatılmasıdır. Bu sayede yine protein yapısında olan antikorların membranın boş kısımlarına bağlanması en aza indirgenmiş olur ve proteinlere bağlanma oranı da en üst seviyeye çıkarılır. Bu amaçla, kullanılan membranın özelliğine ve uygulanan protokole göre çeşitli

bloklama tamponları/çözeltileri kullanılabilir. Bloklama için genellikle protein ajanlar tercih edilir. Bunlardan en çok kullanılanlar sığır serum albümini (BSA), yağsız süt tozu ve jelatindir

Bu aşamadan sonra membran öncelikle, ilgilenilen proteine özgü birincil antikor (IgG) ile muamele edilir ve membrandaki proteinlerin antikor ile reaksiyona girmesi sağlanır. Birincil antikor seçilirken hedeflenen proteine karşı üretilmiş ve üzerinde çalışılan organizmaya uygun olmasına dikkat edilmelidir. Ancak herhangi bir organizmada üretilen bir antikor diğer canlılarda da çapraz reaksiyon göstererek çalışabilir. Bu bilgiler antikorların sağlandığı ticari firmaların bilgi kağıtlarında yer almaktadır.

Daha sonrada, renkli bir ürün oluşturabilen bir enzim [alkalin fosfataz ya da yabanturpu peroksidazı (HRP)] bağlı veya radyoaktif işaretli ikincil antikor (anti-IgG) ile muamele ederek ikincil antikorun, hedef proteine bağlanmış olan birincil antikorlarla etkileşime girmesi sağlanır (Sharma ve Carew, 2002).

Son olarak da membran görüntülenir ve ardından bilgisayar ortamında kaydedilir veya film olarak basılır. İkincil antikora bağlanmış enzimler için geliştirilen kemilüminesans özellikteki substratlar (luminol gibi) duyarlılığı önemli ölçüde arttırmaktadır.

3.4.15. Rekombinant Ekspanzin Enziminin Selülozik Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu amaçla altı farklı deney tüpü kullanılmıştır. Deney tüplerinin her birine 50 mg filtre kağıdı (Whatman No1) parçalanarak yerleştirilmiş ve üzerine sitrat buffer (0,05M, pH 4,8) eklenmiştir. Tüplerin üzerlerine artan oranlarda Ekspanzin enzimi konularak 50 °C de 60 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda santrifüjle ayrılan sıvı faz HPLC ile analiz edilmiştir (Chu ve ark., 2012).

3.4.16. HPLC Analizi

Glikoz, sellobioz, ve diğer şeker bileşimlerinin belirlenebilmesi için numuneler 0.45 µm'lik filtreden (Sartorius RC, Goettingen, Almanya) geçirilmiştir. Örnekler ve hazırlanan standartlar Shimadzu Prominence LC-20A marka HPLC cihazına manuel olarak (1µl) enjekte edilmiştir. Şekerler Biorad Aminex HPX 87P karbonhidrat kolonu (300 x 7.8 mm) ve Refraktif indeks dedektör'ü (RID) kullanılarak analiz edilmiştir. Mobil faz olarak HPLC grade su (izoktratik) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 80 °C, akış hızı ise 0.6 mL/dk olarak belirlenmiştir (Ma, 2015).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması çoğu moleküler biyolojik çalışmada ve rekombinant DNA tekniklerinin tümünde ilk adımdır. Nükleik asit ekstraksiyonunun amacı PZR analizini kullanarak spesifik analizler için farklı kaynaklardan nükleik asit saflaştırılmasını sağlamaktır.

4.1. DNA Ekstraksiyonunun Kontrolü

DNA ekstraksiyonu yapılırken 11 ependorf tüpü kullanılmıştır. Her bir tüp için spektrofotometrede 260 ve 280 nm de ayrı ayrı ölçüm yapılmıştır. Elde edilen değerler Çizelge 4.1.' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. DNA ekstraksiyonu spektrofotometre ölçümleri

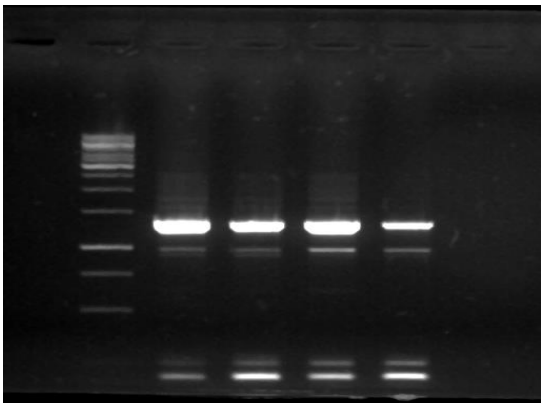
Örnek	260 nm	280 nm	260/280
1	0,027	0,014	1,93
2	0,039	0,016	2,4
3	0,033	0,012	2,75
4	0,029	0,012	2,4
5	0,032	0,017	1,88
6	0,033	0,022	1,5
7	0,033	0,020	1,65
8	0,030	0,018	1,66
9	0,029	0,017	1,7
10	0,036	0,019	1,89
11	0,033	0,018	1,83

Çizelge 4.1.' de görüldüğü gibi 1, 5, 10, 11 numaralı örnekler istenilen aralıktadır. Bu örnekler ve uygun primerler kullanılarak PZR örnekleri hazırlanmıştır. Kullanılan primerler: TOF1 ve LeExp 1. Primerlerin dizilimleri Çizelge 4.2.' de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. İleri ve geri primerlerin gen dizilimleri

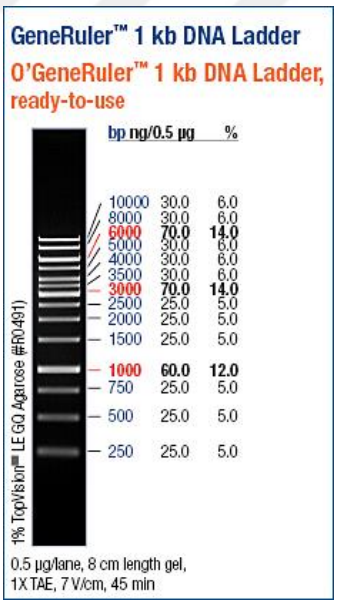
Primer adı	Gen dizilimleri
TOF1	CACCATGGGTATCATAATTTTCAT
LeExpR1	GCAGCCACTTCAACCTTTCT

Analiz sonucu elde edilen örnekler agaroz jelde yürütülmüştür ve sistemde görüntülenmiştir. Elde edilen sonuç Şekil 4.1.' deki gibidir.



Şekil 4.1. DNA elektroforez jel görüntüsü

Şekil 4.1.' e göre örneklerin sırası 1, 5, 10, 11 numaralı örneklerdir. Kullanılan primerlerin çoğalttığı bölge 991 bp dir. Ancak sonuçlara göre DNA boyutları yaklaşık olarak 1,3 kb çıkmıştır. Bunun nedeni anlamlı ve anlamsız bölgelerin birarada bulunmasıdır. Şekil 4.2.' de kullanılan DNA markerı gösterilmiştir. DNA markerının kodu SM0311 dir.



Şekil 4.2. Kullanılan DNA markerı

4.2. Hedef Genin Dizayn Edilen Primerlerle Çoğaltımı

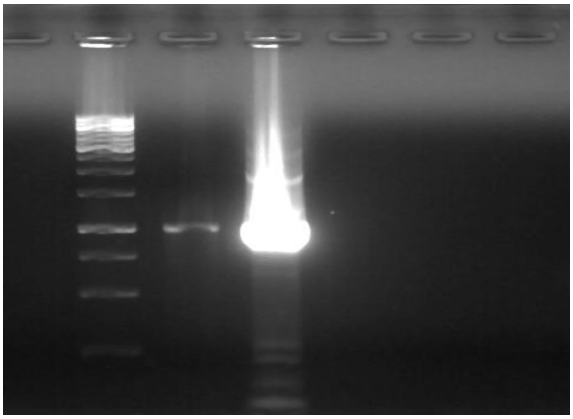
Primer çiftlerinin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amaçlı cDNA kullanılarak farklı primer çiftleriyle PZR analizi tekrarlanmıştır. Kullanılan primer çiftleri: TOF1 ve TOR1, TOF1 ve LeExp1R1 dir. Bu primer çiftlerin dizilimi ise Çizelge 4.3.' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Kullanılan Primer çiftlerinin gen dizilimleri

Primer çiftleri	Gen dizilimleri
TOF1	CACCATGGGTATCATAATTTTCAT
TOR1	CTAATTTTATATTTTGAAAC
TOF1	CACCATGGGTATCATAATTTTCAT
LeExp 1R1	GCAGCCACTTCAACCTTTCT

Analiz sonucu elde edilen sonuç Şekil 4.3.' te görülmektedir. İlk kuyucuktaki PZR ürününde TOF1 ve TOR1 primer çiftleri kullanılmıştır. İkinci kuyucuktaki PZR ürününde ise TOF1 ve LeExp 1R1 primer çiftleri kullanılmıştır. Primer çiftlerinin çoğalttığı bölge hesaplandığında birinci kuyucuktaki bant boyutu yaklaşık olarak 786 bp olmalıdır. İkinci kuyucuktaki bant boyutu ise yaklaşık olarak 991 bp olmalıdır. Kullanılan DNA markerının kodu SM0311 dir.

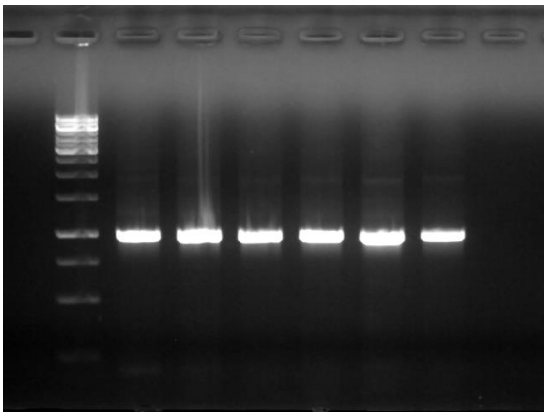
Şekil 4.3.' te görüldüğü gibi birinci kuyucuktaki bant boyutu yaklaşık olarak 1000 bp dir. İkinci kuyucuktaki bant boyutu ise 1000 bp den daha az olarak görülmektedir. Yapılan analizlerde kullanılan primer çiftlerinin çoğalttığı bölgeler dikkate alındığında TOF1 ve LeExp 1R1 primer çiftinin doğru sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır.



Şekil 4.3. Primer çiftlerinin kontrolü için elektroforez jel görüntüsü

4.3. DNA Saflaştırılmasının Kontrolü

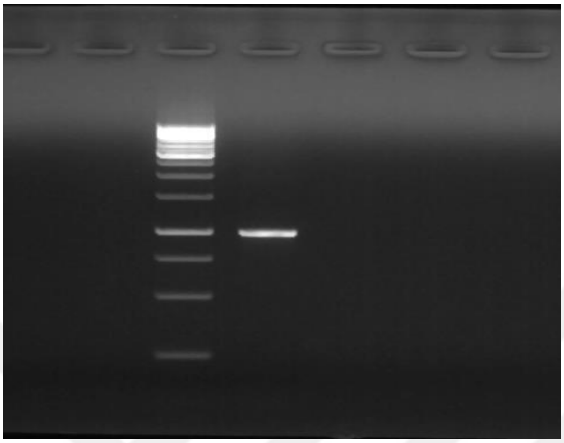
Elimizde olan DNA yı çoğaltmak ve saflaştırmak için PZR analizlerine devam edildi. Analiz başarılı olunan primer çiftleri kullanılarak aynı şartlar altında yapıldı. Analiz için 6 tüp örnek hazırlandı. Ancak görüntüleme için jele yükleme yapılırken PZR ürünün sadece bir kısmı kullanıldı. Geriye kalan kısımlar sonuçlar çıkana kadar +4 ºC de muhafaza edildi. Görüntüleme sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.4.' te görülmektedir.



Şekil 4.4. Saflaştırılmış DNA elektroforez jel görüntüsü

Şekildeki 4.4.' teki örneklerin bant boyutları yaklaşık olarak 991 bp olarak tespit edilmiştir. İstenilen sonuca başarılı bir şekilde ulaşıldığı için tüplerde geriye kalan örneklerin hepsine saflaştırma işlemi uygulanmıştır.

Saflaştırma işlemi GFX PCR DNA and Gel Band Purificiation Kit aracılığıyla prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Saflaştırma işleminin etkin olup olmadığını kontrol etmek amacıyla elde edilen DNA agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Elde edilen görüntü Şekil 4.5.' te verilmiştir.

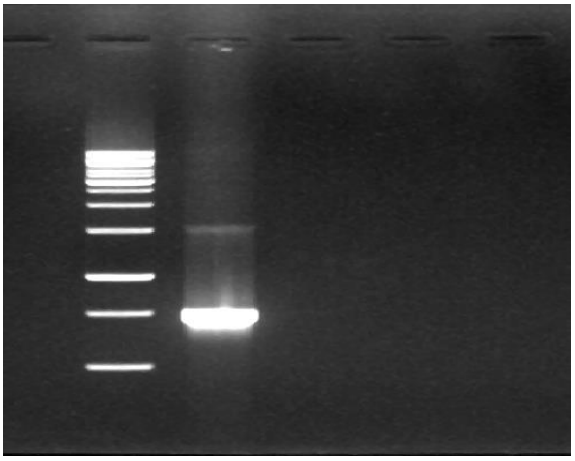


Şekil 4.5. Saflaştırma işleminin etkinliğinin kontrolü için elektroforez jel görüntüsü

Şekil 4.5.' te görülen bant boyutu 991 bp civarındadır. Şekilde saflaştırma işleminin başarılı bir şekilde yapıldığı tespit edilmiştir.

4.4. Kontrol PZR Ürünü Kontrolü

Kontrol PZR ürünün bant boyutu 750 bp olmalıdır. Bant boyutunu belirlemek için Kontrol PZR ürünü agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 4.6.' da görülmektedir.

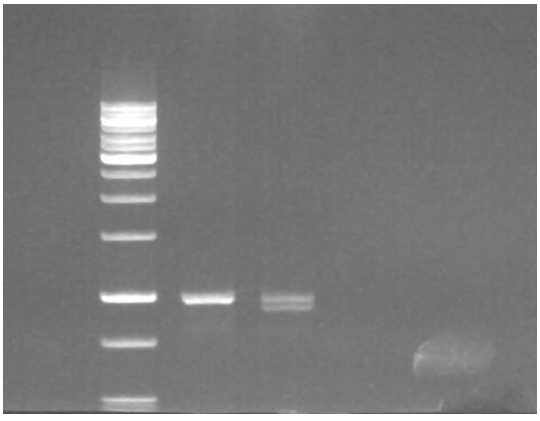


Şekil 4.6. Kontrol PZR ürünü elektroforez jel görüntüsü

Şekil 4.6.' da görüntülenen bant boyutunun 750 bp civarında olduğu ve istenilen sonuçlara ulaşıldığı gözlenmiştir.

4.5. Plazmid DNA İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonunun etkin bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini, DNA nın vektör içerisine yerleşip yerleşmediğini kontrol etmek amacıyla PZR analizi yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.7.' de görülmektedir.



Şekil 4.7. Plazmid DNA izolasyonu elektroforez jel görüntüsü

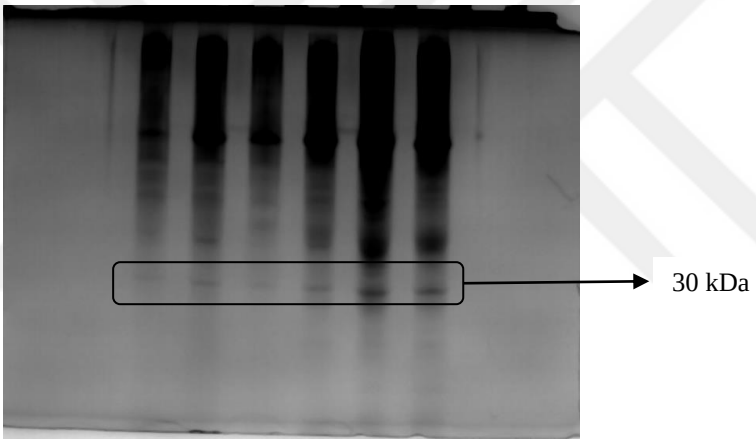
Jeldeki görüntüde ilk kuyucukta DNA markerı, ikinci kuyucukta ise A100 vektörü, üçüncü kuyucukta ise A200 vektörü bulunmaktadır. Kullanılan marker a göre vektörlerin boyutu yaklaşık 1000 bp olarak belirlenmiştir. Çünkü kullanılan özel primerler vektör içerisindeki DNA yı çoğaltmışlardır. Kullandığımız DNA nın

boyutu yaklaşık olarak 1000 bp olduğu için her iki kuyucukta da sonuç olumludur, yani DNA vektörün içerisine yerleşmiştir. A100 vektörünün bandı daha keskin görüntülendiği için bundan sonraki analizlere bu vektör ile devam edilmiştir.

4.6. SDS Page Analizi

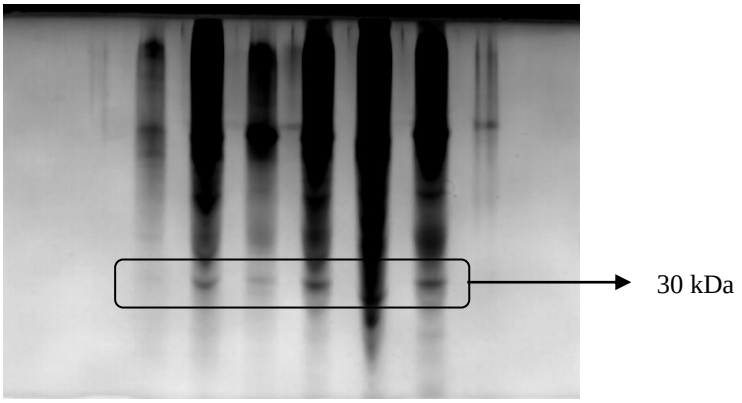
Ekspresyona bırakılan ependorf tüplerindeki örneklerden her 5 saatte bir alım yapılmıştır. Örnek alımları yaklaşık olarak iki gün sürmüştür. Örneklerin analizleri yapılmak üzere -20 ºC de saklanmıştır.

Bu analiz -20 ºC de saklanan örneklerdeki protein varlığını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen jel görütüleri Şekil 4.8.' de verilmiştir.



Şekil 4.8. A Vektörü SDS Page jel görüntüsü

Şekilde 4.8.' de görülen jel görüntüsü indüktör eklenmeyerek protein sentezi yapılan plazmide ait bir görüntüdür. Kuyucuklardaki örnekler sırasıyla 0. 10. 20. 30. 40. ve 45. saatlere aittir. LeExp 1 proteinin boyutu yaklaşık olarak 30 kDa boyutundadır. Resimde işaretli olarak gözlenen bantlar yaklaşık olarak 30 kDa a denk gelmektedir.

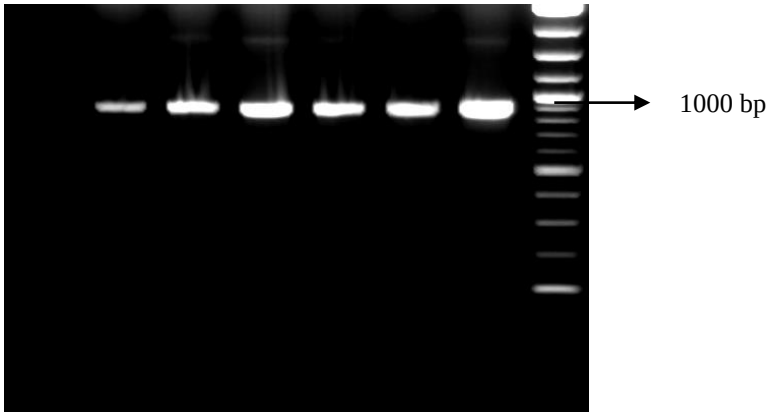


Şekil 4.9. İndüktör eklenmiş A vektörü SDS Page jel görüntüsü

Şekilde 4.9.' da görülen jel görüntüsü IPTG indüktörü eklenerek protein sentezi yapılan plazmide ait bir görüntüdür. Kuyucuklardaki örnekler sırasıyla 0. 10. 20. 30. 40. ve 45. saatlere aittir. LeExp 1 proteinin boyutu yaklaşık olarak 30 kDa boyutundadır. Resimde işaretli olarak gözlenen bantlar yaklaşık olarak 30 kDa a denk gelmektedir. Protein sentezinde 0.1 M konsantrasyonda IPTG kullanılması sonucu protein sentezinin olumlu yönde geliştiği gözlemlenmiştir.

4.7. RT- PZR

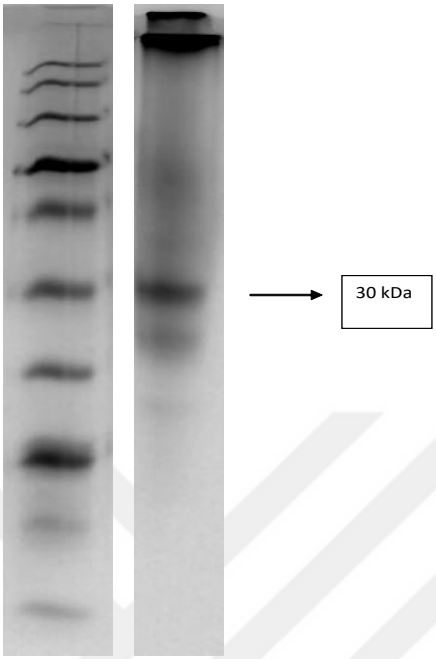
Şekil 4.10.' da görülen jel görüntüsü RT-PZR analizi sonucu elde edilen bir görüntüdür. Elde edilen jel görüntüsünde LeExp1 geninin mRNA transkripsiyonu sonucu elde edilen bantlar görülmektedir.



Şekil 4.10. LeExp1 mRNA transkripsiyonu.

Kuyucuklardaki örnekler sırasıyla 6. 10. 20. 30. 40. Ve 45. saatlere aittir. LeExp1 geninin boyutu yaklaşık olarak 1000 bp dir. Şekil 4.10.' da görüldüğü gibi

elde edilen bantların boyutları yaklaşık olarak 1000 bp dir ve bantların keskinliği zamanla artmıştır. Elde edilen sonuç LeExp1 geninin varlığını göstermektedir.

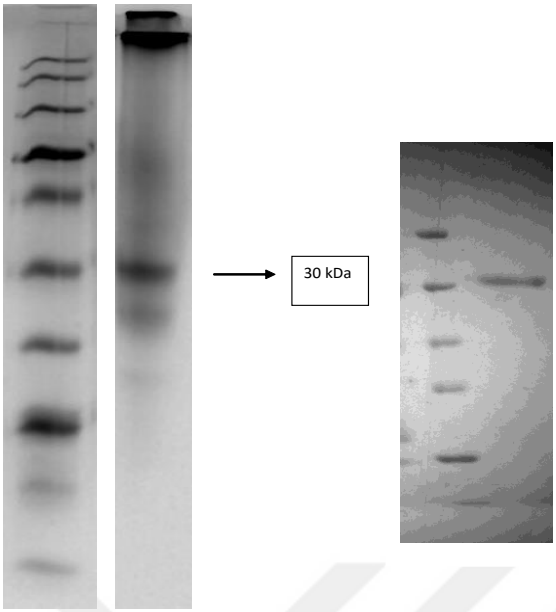


Şekil 4.11. Saflaştırma SDS Page jel görüntüsü

Saflaştırma işlemi sonunda enzimin saflığını göstermek amacıyla SDS-PAGE yöntemi uygulandı. Elde edilen jel görüntüsü Şekil 4.11.' de görülmektedir. LeExp1 geni yaklaşık olarak 30 kDa boyutundadır. Şekil 4.11.' de görülen bant boyutu 30 kDa dur. Görülen bant LeExp1 geninin varlığını doğrulamaktadır.

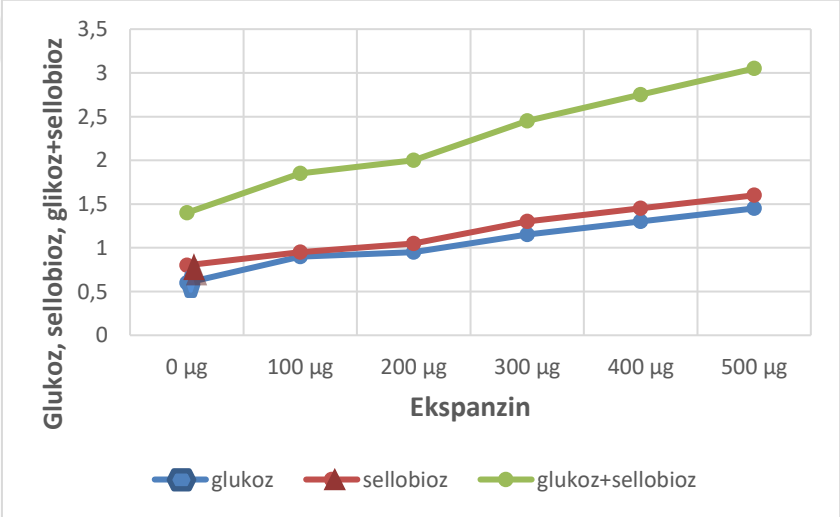
4.8. Western Blot Analizi

Yapılan Western blot analizi sonucu elde edilen film görüntüsü şekil 4.12.' de görülmektedir. LeExp1 geninin boyutu yaklaşık olarak 30 kDa dur. Şekil 4.12.' de görülen bant boyutu da 30 kDa civarındadır. Film görüntüsü LeExp1 geninin varlığını doğrulamaktadır. Western blot analizi istenilen proteini özgün bir şekilde tespit ettiği için analiz sonucu elde edilen bandın LeExp1genine ait olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 4.12. Western Blot film görüntüsü

4.9. Rekombinant Ekspanzin Enziminin Selülozik Aktivitesinin Belirlenmesi



Şekil 4.13. Sabit oranda (5FPU) sellobioz+hemiselüloz enzim karışımına ek olarak artan miktarda eklenen (0- 500 µg) Rekombinant Ekspanzin enziminin filtre kağıdı üzerine hidrolizinin etkisi

Şekil 4.13.' te artan oranlarda Ekspanzin enziminin etkisi ile kağıdın hidroliziyle oluşan Glukoz ve Sellobioz miktarları görülmektedir.

Uygulamada tüplerdeki Ekspanzin enzim oranı arttıkça parçalanmanın arttığı gözlemlenmiştir. Bu uygulama ile rekombinant Ekspanzin proteinlerinin selülozik etkilerinin de olduğu ve bitkisel dokularda hidrolizi artırdığı görülmüştür. Aynı zamanda ticari selülozik enzimlerle de paralel olarakta kullanılabileceği gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Günümüzde azalan doğal kaynaklar nedeniyle mikroorganizmalar ve bakteriler birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu birçok enzim çeşidi üretilebilmekte ve üretilen bu enzimler ülke ekonomisine büyük oranda katkı sağlamaktadır. Endüstriyel gelişmenin göstergesi olarak da bu enzimlerin %60'ı rekombinant ürünlerdir. Bu da endüstriyel uygulamaların önemi açısından vurgulanmaktadır. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir.

Gıdaların işlenmesi için birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Enzimler de gıdaların işlenmesinde ve gıda katkı maddelerinin üretiminde oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar. Enzimler mikroorganizmalardan olduğu kadar bitkilerden ve hayvan dokularından da elde edilmektedirler. Fakat genellikle klasik yöntemlerle elde edilen bu enzimler günümüzde kullanılan modern gıda üretim yöntemlerine uyum sağlayamamaktadırlar. Rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ile gıdalarda rekombinant mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin kullanılması fikri önem kazanmıştır. Rekombinant mikroorganizmaların kullanılması düşük maliyet ve yüksek verimlilikle enzim eldesi sağlamaktadır. Kimya, tekstil ve gıda endüstrisinde enzimler yaygın olarak proses geliştirme ve ürün eldesin de kullanılmaktadır. Spesifik olarak meyve suyu sanayisinde sözü edilen bu enzimler durultma, berraklaştırma, randıman artırma gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadırlar.

5.2. Öneriler

Ekspansin proteinleri bitkilerde çok az miktarda bulunmaktadır ve mikrobiyal olarak üretimleri yoktur. Ekspansinler saf kültürde üretilemezler ve bitkilerden izole edilmesi de oldukça maliyetlidir. Ekspansin proteinleri rekombinant protein

formatında üretilerek bu problemler ortadan kaldırılabilir. Rekombinant Ekspansin proteinin üretilmesiyle hücre duvarını parçalayan enzimlere alternatif potansiyel bir protein elde edilmiştir. Ekspansin proteinin izole edilmesi ve üretimi maliyetli olduğu için ilgili gen (LeExp 1) rekombinant protein olarak üretilmiştir. Bu protein rekombinant olarak üretildiği için hücre duvarını parçalayan yeni bir biyolojik ajan elde edilmiş oldu. Bu proteinin diğer enzimlerle kullanıldığında sinerjist etki sağlayıp sağlamadığı ise bir sonraki aşamada incelenebilir.

Dünya genelinde mevcut endüstriyel enzim pazarı, belirli bir tutarla egemen iken, yılda %10'un üzerinde pazar ağı artısı ve %4-5 dolayında satış artısı ile en yaygın tüketim alanlarındandır (James ve Simpson, 1996). Dolayısıyla Türkiye' de rekombinant enzim üretim teknolojisi yeterli oranda geliştirilebilirse ekonominin enzim ithalatındaki yurtdışı bağımlılığı dengelenebilecektir. Son zamanlarda, bilim ve teknoloji sistemimizin iyileştirilmek üzere ele alınması ile birlikte, rekombinant enzim üretimi öncelikli araştırma alanlarının ön sıralarında yerini almalıdır. Öte yandan, enzim üretim yatırımları teşvikte öncelikli yatırımlar kapsamında bulunması hem ülke ekonomisinin gelişimine hem de bilimsel literatüre önemli katkıda bulunabilecektir.

KAYNAKLAR

ANONİM., 2010. Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits. Five minute, directional TOPO® Cloning of blunt-end PCR products into vectors for high-level, inducible expression in *E. coli.* Catalog nos. K100-01, K101 01, K102-01, K151- 01, K200-01.

CHENG, C. and SHUMAN, S., 2000. Recombinogenic Flap Ligation Pathway for Intrinsic Repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand Breaks. Mol. Cell. Biol., 20: 059-8068.

CHO, H. T. and KENDE, H., 1997. Ekspansins in deep water rice internodes. Plant Physiol, 113: 1137-1143.

COSGROVE, D. J., 2005. Growth of the plant cell wall. Nature Review Molecular & Cell Biology, 6: 850-861.

CHU, D., DENG, H., ZHANG, X., ZHANG, J. and BAO, J., 2012. A simplified filter paper assay method of cellulose enzymes based on HPLC analysis. Appl. Biochem. Biotechnol., 167: 190-196.

CİVELLO, P. M., POWELL, A. L. T., SABEHAT. A. and BENNETT, A. B., 1999. An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit, 121: 1273 1279.

COSGROVE, D. J., 2000. Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 1-1

DOYLE JJ. and DOYLE JL., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

DUBENDORFF, J. W. and STUDİER, F. W., 1991. Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with lac Repressor. J. Mol. Biol., 219: 45-59.

DUVALL, E. J., KEGGINS, K. M. and LOVETT, P. S., 1978. Molecular cloning or genetically active fragments of Bacillus DNA in Bacillus subtilis and properties of the vector plasmid pUB110. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 1423–1427.

FLAMM, E. L., 1991. How FDA approved chymosin: a case history. Bio/Technology, 9: 349-351.

GEORGELİS, N., NİKOLAİDİS, N. and COSGROVE, D. J., 2012. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes, 100:, 17–23.

GRUNBERG-MANAGO, M., 1999. Messenger RNA Stability and its Role in Control of Gene Expression in Bacteria and Phages. Annu. Rev. Genet, 33: 193-227.

HARTLEY, J. L., 2006. Cloning technologies for protein expression and purification, Current Opinion in Biotechnology, 17: 359-366.

HAZELDEN, K., de BOER, A. S., MARSHALL, R. and BROADMEADOW, A., 1993. Toxicological evaluation of acetolactate decarboxylase. J. Food Prot, 56:510-517.

JAMES, J. and SIMPSON, B.K., 1996. Applications of enzymes in food processing. Critical rewievs in food science and nutrition, 36(5): 437-463.

KİDO, M., YAMANAKA, K., MİTANİ, T., NİKİ, H., OGURA, T. and HİRAGA, S., 1996. RNase E Polypeptides Lacking a Carboxyl-terminal Half Suppress a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. *178*: 3917-3925.

KİM, E. S., LEE, H. J., BANG, W. G., CHOİ, I. G. and KİM, K. H., 2008. Functional Characterization of a Bacterial Expansin From Bacillus subtilis for Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, 102: 1342-1353.

KURİEN, B. T. and SCOFİELD, R. H., 1997. Multiple immunoblots after non electrophoretic bidirectional transfer of a single SDS-PAGE gel with multiple antigens. J. Immunol. Methods, 205: 91–94.

LOPEZ, P. J., MARCHAND, I., JOYCE, S. A. and DREYFUS, M., 1999. The C-terminal Half of RNase E, Which Organizes the *Escherichia coli* Degradosome, Participates in mRNA Degradation but not rRNA Processing *in vivo*. Mol. Microbiol., 33: 188-199.

MA, B., CHEN, J., ZHENG, H., FANG, T., OGUTU, C., Lİ, S. and WU, B., 2015. Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples. Food chemistry, 172: 86-91.

OBENLAND, D. M., CRİSOSTO, C. H. and ROSE, J. K. C., 2003. Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches, 29: 11-18.

RAY, M. W. et al., 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium Bacillus licheniformis and comparisons with closely related Bacillus species. Genome Biol., 5: 1-12

ROSENBERG, A. H., LADE, B. N., CHUİ, D.-S., LİN, S.-W., DUNN, J. J. and STUDİER, F. W., 1987. Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase. Gene, 56: 125-135.

SANE, V. A., CHOURASİA, A. And NATH, P., 2005. Softening in mango *(Mangifera indica cv. Dashehari)* is correlated with the expression of an early ethylene ressponsive, ripening related expansin gene, *MiExpA1*, 38: 223-230.

SHARMA. S. K. and CAREW, T. J., 2002. Inclusion of phosphatase inhibitors during Western blotting enhances signal detection with phospho-specific antibodies. Anal. Biochem., 307: 187–189.

SHUMAN, S., 1994. Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. J. Biol. Chem., 269: 32678-32684.

STUDİER, 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.

STUDİER, F. W., ROSENBERG, A. H., DUNN, J. J. and DUBENDORFF, J. W., 1990. Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes. Meth. Enzymol., 185: 60-89. Rev., 57: 109–137.

SUJKOWSKA, M., BORUCKİ, W., GOLİNOWSKİ, W., 2007. Localization of expansin-like protein in apoplast of pea [Pisum sativum L.] root nodules during interaction with Rhizobium legumin osarum bv. Viciae, 248: 159-776.

TAIMISTO, K., NEVALAINEN, H., SUOMINEN, P., 1994. On the safety of Trichoderma reesei . J. Biotechnol. 37, 193–200.

VEITH, B. et al., 2004. The complete genome sequence of Bacillus licheniformis DSM13, an organism with great industrial potential. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 7: 204–211.

WALSH, G., 2006. Biopharmaceutical benchmarks 2006. Nat Biotechnol., 24: 769 771.

WOODS L. F. J. and TUCKER, G. A., 1995. Enzymes in food processing. Blacie Academic & Professional, Glasgow, U. K., 25: 750-755.

WEİ W., YANG C., LUO J., LU C., WU Y., YUAN S., 2010. Synergism between cucumber α-expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase, 167: 1204-1210.

WİLTFANG, J. et al., 1991. A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. Electrophoresis, 12: 352-366.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serap KAYAHAN (GÜNEŞ)
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Çayıralan/ 22.09.1990
Telefon : 0507 863 63 28
e-mail : serapkayahan@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl		Bitirme Yılı
Lise :	Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi	Kayseri	2008
Üniversite :	Harran Üniversitesi	Şanlıurfa	2012
Yüksek Lisans:	Harran Üniversitesi	Şanlıurfa	2017

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2012	Özselamoğlu LTD. ŞTİ.	Kalite Kontrol Sorumlusu

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoteknoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce