

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek TEKDAL

***Spirulina platensis* (CYANOPHYTA)'e ELEKTROPORASYON YOLU İLE
GEN AKTARIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Spirulina platensis (CYANOPHYTA)*'e ELEKTROPORASYON YOLU İLE
GEN AKTARIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**Dilek TEKDAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği /
Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza
Prof.Dr.Numan ÖZCAN
DANIŞMAN

İmza
Prof.Dr.Oya IŞIK
2. DANIŞMAN

İmza
Prof.Dr.Sevim POLAT
ÜYE

İmza
Yrd.Doç.Dr.Makbule BAYLAN
ÜYE

İmza.....
Yrd.Doç.Dr.Bahri Devrim ÖZCAN
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF/2007/BAP35**

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

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Spirulina platensis* (CYANOPHYTA)'e ELEKTROPORASYON YOLU İLE
GEN AKTARIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dilek TEKDAL

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışmanlar: Prof.Dr.Numan ÖZCAN
Prof.Dr.Oya IŞIK
Yıl : 2009, **Sayfa:** 80
Jüri : Prof.Dr.Numan ÖZCAN
Prof.Dr.Oya IŞIK
Prof.Dr.Sevim POLAT
Yrd.Doç.Dr.Makbule BAYLAN
Yrd.Doç.Dr.Bahri Devrim ÖZCAN

Yapılan bu çalışma ile *Streptococcus bovis* bakterisine ait likenaz geni ve *Spirulina platensis*'e ait serin esteraz genlerini taşıyan pBR325SLik rekombinant vektörü, *Spirulina platensis* M2 (düz form) ve *Spirulina platensis* N-39 (spiral form) suşlarına elektroporasyon tekniği ile aktarılmıştır. Rekombinant *S. platensis*/pBR325SLik kloramfenikol (Cm) içeren *Spirulina* ortamında ürerken, plazmid aktarılmamış olan *S. platensis* beklenildiği üzere aynı besi ortamında ürememiş, buna karşılık Cm içermeyen *Spirulina* ortamında üremiştir. pBR325SLik vektöründe ve *S. platensis*/pBR325SLik rekombinant organizmalarında likenaz geninin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile gösterilmiştir. pBR325SLik plazmidini taşıyan *E. coli* hücreleri hem LB/Likenan/Agar besi yerinde hem de SDS-Likenan-PAGE'de likenaz aktivitesi gösterirken rekombinant *S. platensis*/pBR325SLik organizmaları LB/Likenan/Agar besi yerinde düşük enzim aktivitesi göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, Likenaz, PZR, Gen Transferi, SDS-PAGE

ABSTARCT

MSc THESIS

<p style="text-align: center;">INVESTIGATION FACILITIES OF GENE TRANSFER TO <i>Spirulina platensis</i> (CYANOPHYTA) VIA ELECTROPORATION</p>
--

Dilek TEKDAL

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA**

Supervisors: Prof.Dr.Numan ÖZCAN
Prof.Dr.Oya IŞIK
Year : 2009, **Page:** 80
Jury : Prof.Dr.Numan ÖZCAN
Prof.Dr.Oya IŞIK
Prof.Dr.Sevim POLAT
Assist.Prof.Dr.Makbule BAYLAN
Assist.Prof.Dr.B. Devrim ÖZCAN

In this study, the recombinant pBR325SLik vector carrying lichenase gene from *Streptococcus bovis* and serin esterase gene from *Spirulina platensis* was transformed into *Spirulina platensis* M2 (lineer form) and *Spirulina platensis* N-39 (spiral form) by electroporation technique. Recombinant *S. platensis*/pBR325SLik observed in the *Spirulina* medium with Cm while there was no non-transformant *Spirulina* in the same medium but intensive non-transformant growth was observed in the medium without Cm. The presence of lichenase gene was demonstrated into *S. platensis*/pBR325SLik recombinant organisms by PCR. Although *E. coli* cells carrying pBR325SLik were showed lichenase activity on both LB/Lichenan/Agar plates and SDS-Lichenan-PAGE, recombinant *S. platensis*/pBR325SLik organisms were slightly showed enzyme activity on LB/Lichenan/Agar plate .

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, Lichenase, PCR, Gene Transfer, SDS-PAGE

TEŞEKKÜR

Öncelikle bu tez çalışmasında bana büyük emeği geçen, beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam sayın Prof.Dr.Numan ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmanın yapılmasında her türlü desteği ve Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndaki bütün imkanları sağlayan, daima gülen yüzünü esirgemeyen ve sorunlarıma içtenlikle yardımcı olan ikinci danışmanım Prof.Dr.Oya IŞIK'a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Yüksek Lisans eğitimi akademik hayatın ilk ve en önemli basamağını oluşturmaktadır. Bu eğitim boyunca edinilen her türlü sosyal, kültürel ve bilimsel deneyimler başarının özünü oluşturmaktadır. Bu eğitim hayatımda edindiğim en büyük deneyimlerden birtanesi birbirinden değerli genç bilim insanları ile aynı ortamı paylaşmam olmuştur. Daima desteklerini esirgemeyen, her koşulda yardımcı olan bu genç bilim insanlarından, yoğun uğraşlar arasında dahi eğitici ve öğretici kimliğimizin korunabileceğini öğrendiğim hocam Yrd.Doç.Dr.Bahri Devrim ÖZCAN'a, bir hoca olmanın aynı zamanda iyi iletişim kurabilmek olduğunu öğrendiğim hocam Yrd.Doç.Dr.Makbule BAYLAN'a ve bir çalışmanın kurulan program ve oluşturulan plan içinde yürütülmesinin önemli olduğunu öğrendiğim hocam Yrd.Doç.Dr.Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamda kullandığım pBR325SLik plazmidini birlikte tasarlayan ve bunu kullanmama izin veren Yrd.Doç.Dr.Makbule BAYLAN'a ve Yrd.Doç.Dr.Meltem AŞAN ÖZÜSAĞLAM'a bunun için ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Bilimde başarılı olmak dahası bilime layık olmak için bilgi ve beceriyi paylaşmak kuşkusuz seçilmesi gereken en büyük yoldur. Bana bu yolu gösteren, her zaman yardımını esirgemeyen manevi abim dediğim Dr.Ali İrfan GÜZEL'e teşekkür ederim.

Çalışmanızı sürdürürken bulunduğunuz ortamdaki paylaşımlarınız çalışmanızın seyrini etkilemektedir. Çalışmam süresince kendim olabildiğim bir ortam sunan, sorunlarımı tartışabildiğim dahası tartışırken gülebildiğim, yardımlarını

hiç esirgemeyen ve zor dönemde benimle birlikte olan çalışma arkadaşlarım Yüksek Lisans öğrencileri Ali COŞKUN'a ve Atilla ÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Uğraştığınız alanın önemini anlamanızı sağlayan en önemli şeylerden biri bu alanda her türlü fedakarlığı gösteren insanları tanımanızdır. Algal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda her daim çalışan, sürekli gülebilmeyi başaran, bilgilerine ve yardımlarına başvurduğum ve çalışmamda büyük katkıları olan Ar.Gör.Leyla HIZARCI'ya ayrıca Yüksek Lisans öğrencileri Müzeyyen KÖKSAL'a ve Yasemin BULUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında e-mail aracılığı ile sorularıma yanıt veren ve ihtiyaç duyduğum makalelerini e-mail ile gönderen ve bu davranışlarını örnek aldığım bilim adamları Dr.Yoshikazu KAWATA'a ve Dr.Wang GAUGE'e teşekkürlerimi arz ederim.

Çalışmanız süresince yaptığımız işe olan inancınız var olan çalışma azmini ve sabrını arttırmaktadır. Çalışmama duyduğum inancın sürdürülmesinde sahip olduğu yüksek pozitif enerjisi ile bana kılavuzluk eden, tanımaktan dolayı büyük mutluluk duyduğum dostum Uzman Vecihe DÜZEL'e teşekkür ederim.

İlerlediğiniz ve büyük çaba harcadığınız yolda en zor olanı daima size ışık tutan birini bulmaktır. Bana her zaman beklentisiz yardımcı olan, sorunlarımı dinleyen, çalışmamı tamamlamamda büyük katkısı olan ve her zaman yanımda olmasını isteyebileceğim ender insanlardan olan manevi destekçim Ziraat Yüksek Mühendisi ve Doktora öğrencisi Yıldız DOĞAN'a ayrıca teşekkür ederim.

Kendimi çok şanslı bulmamı sağlayan, bugünlere gelmeme vesile olan, huzurun, sevginin ve güvenin yüceliğini, ben yerine biz demenin değerini öğreten ve şimdiye kadar edindiğim ve biliyorum ki gelecekte de edineceğim başarılarımın tek vesilesi olan, hayatta kaybedildiğinde yerini hiçbirşeyin dolduramayacağını bildiğim, beni ben yapan aileme özellikle kızkardeşim Didem TEKDAL'a çalışmam boyunca gösterdikleri destek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIII
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Spirulina platensis</i>	2
1.1.1. <i>S. platensis</i> 'in Canlılarda Kullanımının Faydaları.....	5
1.2. β -(1,3-1,4)-Glukanaz (Likenaz) Enzimi.....	6
1.3. Araştırmanın Amacı.....	8
1.4. Araştırmanın Kapsamı.....	9
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
2.1. <i>Spirulina platensis</i> ile Yapılan Fizyolojik ve Moleküler Çalışmalar.....	10
2.2. β -(1,3-1,4)-Glukanaz (Likenaz) Enzimi İle İlgili Yapılan Bazı Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar.....	16
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. <i>Spirulina platensis</i> , Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları.....	18
3.1.2. Kimyasallar.....	20
3.1.3. Aletler.....	20
3.2. Metod.....	20
3.2.1. <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF/pBR325SLik Bakterisinden Plazmid DNA İzolasyonu.....	20
3.2.2. pBR325SLik Entegratif Vektöründe Serin Esteraz Geninin Belirlenmesi.....	22

3.2.3. <i>E.coli</i> /pBR325SLik Rekombinant Bakterisinde Likenaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	26
3.2.4. pBR325SLik Entegratif Vektörünün <i>Spirulina platensis</i> Hücrelerine Elektrotansformasyonu.....	26
3.2.5. <i>Spirulina platensis</i> Kültüründen Kromozomal DNA İzolasyonu.....	28
3.2.6. <i>Spirulina platensis</i> Kromozomal DNA'sında Likenaz Enzim Geninin Tespiti.....	31
3.2.6.1. <i>S. platensis</i> DNA'sından Likenaz Geninin PZR ile Çoğaltılması İçin Gerekli Primerlerin Belirlenmesi.....	31
3.2.7. Rekombinant <i>S. platensis</i> /pBR325SLik ile Kontrol Grubu olan Düz-Spiral form <i>S. platensis</i> ve <i>E. coli</i> /pBR325SLik Organizmalarına ilişkin SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri.....	34
3.2.7.1. Organizmalardan Proteinlerin İzolasyonu.....	35
3.2.7.2. Elektroforez Aletinin Çalıştırılması.....	36
3.2.7.3. Organizmalara Ait Toplam Proteinlerin SDS-PAGE'de Karşılaştırılması.....	36
3.2.7.4. Organizma Proteinlerin SDS-Likenan-PAGE'de Karşılaştırılması.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Bulgular.....	38
4.1.1. pBR325SLik Plazmidi İçin Likenaz Enzim Geni Varlığının Tespiti.....	38
4.1.2. <i>E. coli</i> XL1 Blue MRF/pBR325SLik Bakterisinden Plazmid DNA İzolasyonu.....	38
4.1.3. pBR325SLik Entegratif Vektöründe Serin Esteraz Geninin Belirlenmesi.....	39

4.1.4. pBR325SLik Entegratif Vektörünün <i>Spirulina platensis</i> Hücrelerine Elektrotransformasyonu.....	39
4.1.5. <i>Spirulina</i> /pBR325SLik'den Kromozomal DNA İzolasyonu.....	46
4.1.6. Orijinal ve Rekombinant Hatlara Ait SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri.....	47
4.2. Tartışma.....	55
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	70
EKLER.....	71
Ek 1. BESİ YERLERİ.....	71
Ek 2. SOLÜSYONLAR.....	72
Ek 3. PROTOKOLLER.....	78

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 1.1. <i>S. platensis</i> 'in besin madde içeriği.....	4
Çizelge 3.1. Serin esteraz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini.....	24
Çizelge 3.2. pBR325SLik DNA'sı kullanılarak serin esteraz genini elde etmek için hazırlanan PZR reaksiyonu bileşenleri.....	25
Çizelge 3.3. Serin esteraz geni elde etmek için thermal cycler'a verilen program.....	25
Çizelge 3.4. <i>S. platensis</i> 'e pBR325SLik rekombinant plazmidinin elektroporasyon tekniği ile aktarılmasında kullanılan sonikasyon hızları ve elektriksel alan değerleri	28
Çizelge 3.5. Likenaz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini.....	32
Çizelge 3.6. <i>S. platensis</i> DNA'sı kullanılarak likenaz genini elde etmek için hazırlanan PZR'u bileşenleri.....	34
Çizelge 3.7. Likenaz geni elde etmek için thermal cycler'a verilen program.....	34
Çizelge 4.1. Farklı elektriksel alan ve sonikasyon değerleri kullanılarak yapılan elektrotransformasyondan sonra sıvı besi yerlerine ekilen düz form <i>S. platensis</i> /pBR325SLik'in üreme durumu.....	40
Çizelge 4.2. Farklı elektriksel alan ve sonikasyon değerleri kullanılarak yapılan elektrotransformasyondan sonra sıvı besi yerlerine ekilen spiral form <i>S. platensis</i> /pBR325SLik'in üreme durumu.....	40
Çizelge 4.3. Düz form <i>Spirulina</i> için uygulanan protein eldesi yönteminde farklı aşamalarda elde edilen süpernatant kısımlardaki DNA ve proteinlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçları (DNA: A_{260nm} ; protein: A_{280nm}).....	48

Çizelge 4.4.	Spiral form <i>Spirulina</i> için uygulanan protein eldesi yönteminde farklı aşamalarda elde edilen süpernatant kısımlardaki DNA ve proteinlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçları (DNA: $A_{260\text{nm}}$; protein: $A_{280\text{nm}}$).....	49
--------------	--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1	<i>Spirulina platensis</i> 'in X-Ray mikroskopundaki görünümü	2
Şekil 1.2	Arpa β -glukanının β -(1,3-1,4)-glukanazlar ile enzimatik depolimerizasyonu	6
Şekil 1.3	pBR325 plazmidi'nin yapısı	9
Şekil 3.1 (A).	Spiral form <i>S. platensis</i> hücresinin (N-39 hattı) mikroskop altındaki görünümü	18
Şekil 3.1 (B)	Düz form <i>S. platensis</i> hücresinin (M2 hattı) mikroskop altındaki görünümü	18
Şekil 3.2	pBR325SLik vektörünün şematik modeli.....	19
Şekil 3.3	<i>S. platensis</i> kültürünün laboratuvarında üretim görüntüsü	19
Şekil 3.4	Bakterilerin LB sıvı besi yerlerinde üretilmeleri	22
Şekil 3.5	Serin esteraz geninin çoğaltılmasında kullanılan thermal cycler cihazı	25
Şekil 3.6	<i>Spirulina</i> 'dan DNA izolasyonu amacıyla hücre duvarını parçalamak için kullanılan sonikatör cihazı	27
Şekil 3.7	<i>Spirulina</i> /pBR325SLik'de kromozomal DNA izolasyonu aşamasında sarkosil ilavesi sonrası mavimsi görüntüsü.....	29
Şekil 3.8	Denatüre proteinlerin elektroforez işlemine tabi tutulması	36
Şekil 4.1	<i>E.coli</i> /pBR325SLik bakterisinin LB/Likenan/Agar besi yerinde Likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	38
Şekil 4.2	pBR325SLik DNA'sından Taq polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılan PZR ürünü Serin esteraz geni	39
Şekil 4.3	0 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm^{-1} elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form <i>S. platensis</i> 'in 30 gün sonraki görüntüsü	41

Şekil 4.4	1.5 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm ⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form <i>S. platensis</i> 'in 30 gün sonraki görüntüsü	42
Şekil 4.5	1.5 kHz sonikasyon hızı ve 5.5 kv cm ⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form <i>S. platensis</i> 'in 30 gün sonraki görüntüsü	42
Şekil 4.6	3.0 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm ⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form <i>S.platensis</i> 'in 30 gün sonraki görüntüsü	43
Şekil 4.7	3.0 kHz sonikasyon hızı ve 6.0 kv cm ⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen spiral form <i>S. platensis</i> 'in 30 gün sonraki görüntüsü	43
Şekil 4.8	1.5 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm ⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra erlene alınan düz form <i>S.platensis</i> /pBR325SLik'in ve antibiyotikli besi yerine alınan plazmid içermeyen kontrol grubunun görüntüsü	44
Şekil 4.9	Sıvı <i>Spirulina</i> ortamında üreyen düz form orijinal ve rekombinant <i>Spirulina</i> 'ların katı <i>Spirulina</i> ortamındaki 3 hafta sonundaki üreme görüntüleri	45
Şekil 4.10	Sıvı <i>Spirulina</i> ortamında üreyen spiral form orijinal ve rekombinant <i>Spirulina</i> 'ların katı <i>Spirulina</i> ortamındaki 3 hafta sonundaki üreme görüntüleri	46
Şekil 4.11	<i>S. platensis</i> kromozomal DNA'sından PZR ile çoğaltılan likenaz genlerinin % 0.8 w/v agaroz jel görüntüsü	47

Şekil 4.12	Yalnızca Sonikasyon işlemi uygulanan değişik organizmalara ait protein profillerinin SDS-PAGE’de karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.13	Değişik organizmaların (yalnızca sonikasyon işlemi uygulanmıştır) SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması	51
Şekil 4.14	<i>Spirulina</i> /pBR325SLik rekombinant organizmaların Sonikasyon+ Lizozim (10 mg/ml) + %20 v/v TCA ile muamelesi sonrası protein profillerinin SDS-PAGE’de görüntüsü	52
Şekil 4.15	Değişik organizmaların (sonikasyon+lizozim işlemleri uygulanmıştır) SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması	52
Şekil 4.16	<i>Spirulina</i> /pBR325SLik rekombinant organizmaların Sonikasyon+ Lizozim (10 mg/ml) + SDS (% 1) ve % 20 v/v TCA ile muamelesi sonrası protein profillerinin SDS-PAGE’de görüntüsü	53
Şekil 4.17	Değişik organizmaların (sonikasyon+lizozim+SDS işlemleri uygulanmıştır) SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.18	SDS-Likenan-PAGE’in Congo-red ile boyanması sonrasında Coomassie Blue boyası ile boyanması ve aktivite gözlenen <i>E.coli</i> /pBR325SLik rekombinant bakterisine ait likenaz enzim geni büyüklüğünün Marker ile karşılaştırılmalı tespiti.....	54
Şekil 4.19	<i>Spirulina</i> /pBR325SLik için likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

A, G, C, T	: Adenin, Guanin, Sitozin, Timin
Amp/Amp ^R	: Amfisilin/Amfisilin direnç geni
bç	: Baz çifti
bp	: Baz çifti (Base pair)
Cml/Cml ^R	: Kloramfenikol/Kloramfenikol direnç geni
dk	: Dakika
da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	: Ethidium Bromide
HEPES	: N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
kbç	: Kilobaz çifti
kHz	: Kilohertz
L	: Litre
LB	: Lauria Bertani
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
OD	: Optik yoğunluk (Optical Density)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
R.O.	: Replikasyon orijini
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TCA	: Trichloroacetic Acid
TE	: Tris-EDTA

Tet/ <i>Tet</i> ^R	: Tetrasiklin/Tetrasiklin direnç geni
U	: Ünite
UV	: Mor ötesi (Ultra Viole)
V	: Volt
α	: Alfa
β	: Beta
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
Ω	: Ohm
v/v	: Hacim/hacim (Volume/volume)
w/v	: Ağırlık/Hacim (Weight/volume)

1. GİRİŞ

Dünya’da hızlı nüfus artışının olması, buna paralel olarak besin ihtiyaçlarının artması, atıkların hızla doğaya salınımı, beraberinde çevre kirliliğini getirmesi, iklimsel değişiklikler ve dünyamızın küresel ısınma tehdidi ile karşı karşıya kalması gibi günümüzde karşılaşılan ve ciddi su sıkıntısı gibi gelecekte karşılaşılabilecek ihtimali olan problemlere karşı bilim adamları alternatif çözüm arayışları içerisinde. Son zamanlarda bu çözüm arayışları içerisinde fotosentetik yapılarıyla algler dikkat çekmektedirler.

Alglerin güneş enerjisi ile proteinler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler ve karotenoidler gibi önemli materyalleri üretme potansiyeline sahip olma özellikleri ve yetenekleri bulunmaktadır. Bu özellik ve yetenekleri algleri gerek tarımsal ve gerekse endüstriyel uygulamalarda önemli hale getirmiştir. Bazı alg türleri hidrokarbonlar, gliserol, hidrojen gazı, antibiyotikler, insektisitler ve toksinler gibi maddeleri üretme özelliğine sahiptir. *Chlorella* gibi bazı algler sahip oldukları ağır metal ve inorganik maddeleri bağlama özellikleri nedeniyle atık suları arıtmak için kullanılmaktadırlar (Yamada, 1994).

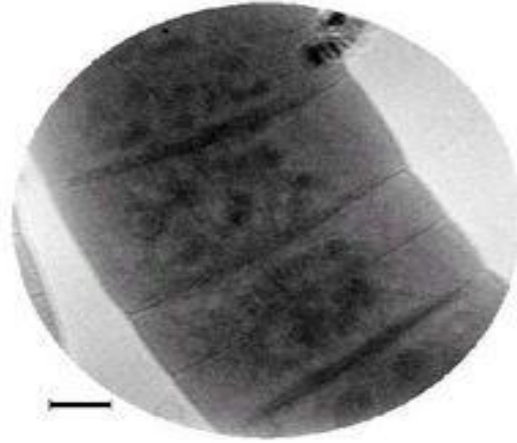
Algler fotosentetik pigment kompozisyonlarına göre; mavi-yeşil (*Cyanophyta*), kırmızı, yeşil, kahverengi algler gibi gruplara ayrılmaktadırlar. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi daha çok mavi-yeşil algler için uygulanmaktadır (Yamada, 1994).

Mavi-yeşil algler, hücrelerinin prokaryotik doğası nedeniyle ‘siyanobakteriler’ olarak da isimlendirilirler. Siyanobakterilerin fotosentez yetenekleri vardır. Fotosentetik yapıların moleküler organizasyonunu anlamak ve fotosentetik aktiviteleri geliştirmek için siyanobakteriler mükemmel bir örnektir. Birçok siyanobakteriyel tür nitrojenaz enzimine sahiptirler ve gelişimleri için atmosferik azotu fikse edebilirler (Yamada, 1994).

Siyanobakteriyel hücreler genetik ve moleküler biyoloji manipulasyonları için uygundur. Siyanobakteriler, restriksiyon-modifikasyon enzimleri için iyi bir kaynaktır. Mavi-yeşil algler’in polisakkarit, polifosfat, poli- β -hidroksibütirat gibi depo bileşikleri de bulunmaktadır. Mavi-yeşil algler içerisinde *Spirulina*,

Oscillatoria ve *Anabaena* gibi hızlı gelişen siyanobakteriyel cinsler pigmentler, yağ asitleri, karbonhidratlar, proteinler ve diğer birçok besin bileşiklerini üretmeleri nedeniyle besin ve besleme çalışmalarında sıkça kullanılmaktadırlar (Yamada, 1994). Bu cinsler içerisinde *Spirulina platensis* (Şekil 1.1) hücre kültürü için teknolojinin iyi test edilmiş olması ve üretim fiyatının daha düşük olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Li ve Qi, 1997).

Hücre duvarı % 86'sı sindirilebilir polisakkaritten oluşan *Spirulina*'nın, insanlar tarafından sindirimi kolaydır ve *Spirulina* polisakkariti bağışıklık güçlendirici olarak kullanılabilir. *Spirulina*'dan ekstrakte edilebilen mavi pigment fikosiyanin, kozmetik ve besinler için doğal bir renklendirici olarak kullanılabilir. Çin'de 1990 yılından bu yana *Spirulina* üretim işletmeleri açılmakta olup 80'dan fazla üretim yeri bulunmaktadır (Li ve Qi, 1997).



Şekil 1.1. *Spirulina platensis*'in X-Ray mikroskopundaki görünümü (Spiller ve ark, 2001).

1.1. *Spirulina platensis*

Spirulina platensis, en fazla kültürü yapılan, destek gıda, hayvan yemi, tıp, eczacılık ve kozmetik olmak üzere çeşitli sanayi alanlarında yaygın kullanılan *Cyanophyceae* (Mavi-Yeşil algler) sınıfından ipliksi, spiral şekilli prokaryotik bir organizmadır (Koru ve Cirik, 2003). *Spirulina*'nın bitki sistematigindeki yeri aşağıda verilmiştir (Yıldız, 2001).

Şube: *Cyanophyta*

Sınıf: *Cyanopyceae*

Takım: *Nostocales*

Aile: *Oscillatoriacea*

Cins: *Spirulina* Turpin (1827)

Tür: *Spirulina platensis* GOM. (1892)

Spirulina ilk kez 1927 yılında Turpin tarafından izole edilmiştir (Cifferi, 1983; Conk-Dalay, 1997). Öneminin anlaşılması ise 1962 yılında Fransız Petrol Araştırma Enstitüsü (IFP)'nün mavi-yeşil algler grubundan *Spirulina*'nın çok zengin bir gıda maddesi olduğunu belirtmesi ile olmuştur (Fox, 1983). *Spirulina*'nın koyu yeşil rengi, karotenoid (turuncu), fikosiyain (mavi) ve klorofil (yeşil) pigmentlerinden kaynaklanmaktadır. *Spirulina*, tüm temel aminoasitleri içeren dengeli bir protein yapısına sahiptir ve proteini kolaylıkla sindirilir ve asimile edilir. Çünkü *Spirulina*'nın hücre duvarı mukopolisakkaritlerden meydana gelmiştir. Birçok bitkide bulunan sert ve selüloz içeren hücre duvarı mevcut olmayıp, % 20 oranında karbonhidrat bulunmaktadır. Hücre içeriğinde en dışta müsilaj tabakası vardır. Bundan sonra hücre çeperi gelir. Bileşimi pektin'dir. Hücre içi tamamen plazma doludur. Bakterilerde olduğu gibi çekirdek zarı yoktur. Diğer alglerde görülen kromotoforlar ya da kloroplastlar da yoktur. Çekirdek stoplazmanın içine dağılmıştır. Plazmanın çevreye yakın kısmında serbest halde klorofil a bulunur. Bunun yardımı ile organizma fotosentez yapabilir. Klorofil b yoktur (Bourrelly, 1970; Yıldız, G., 2001). *Spirulina* doğal olarak yüksek alkaniteye sahip sub-tropik alanlardaki göllerde özellikle Meksika'daki Texcoco gölü ile Kenya'daki Rudolf ve Nakura göllerinde bulunmaktadır (Henrikson, 1993). Çevre kirliliğine neden olmaması ve üretiminden hasatına kadar herhangi bir katkı maddesinin kullanılmaması, bulanık durgun sular, akarsular, tatlı ve acı sular gibi çok çeşitli su ortamlarında yaşayabilen kozmopolit bir organizma olması yetiştiriciliğini çekici hale getirmektedir. *Spirulina* kültürlerinin optimum sıcaklığı, 30-35 °C'dir. Uyum gösterebildiği minimum sıcaklık 18 °C, maksimum sıcaklık ise 39 °C olarak belirlenmiştir (Fox, 1996; Richmond, 1992). *Spirulina* besin içeriğinin zengin olduğu bilinmektedir (Fox, 1996)(Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. *S. platensis*'in besin madde içeriği (Fox, 1996)

Genel Analiz Sonuçları			
Protein ve amino asit	% 55-70		
Karbonhidrat	% 15- 25		
Mineraller (kül)	% 7-13		
Yağ (lipid)	% 6-8		
Nem	% 3-7		
Vitaminler ve Mineraller			
Vitaminler	Her 10 g	Mineraller	Her 10 g
Vitamin A	23000 IU	Kalsiyum	10 mg
Vitamin E	1.0 IU	Demir	10 mg
Vitamin K	0.200 mg	Fosfor	80 mg
Biotin	0.5 µg	Magnezyum	40 mg
İnositol	6.4 mg	Çinko	0.3 mg
B1 Thiamine	0.35 mg	Selenyum	2 µg
B2 Riboflavin	0.40 mg	Bakır	0.12 mg
B3 Niacin	1.4 mg	Mangan	0.5 mg
B6 Pyridoxine	80 µg	Krom	25 µg
B12 Colobalimin	32 µg	Sodyum	90 mg
Pantothenik Asit	10 µg	Potasyum	140 mg
		Germanyum	6 µg
Doğal Bitkisel Besleyiciler			
Pigmentler	Renk	Her 10 g	% <i>Spirulina</i>
Fikosiyanin	Mavi	1400 mg	% 14.0
Klorofil	Yeşil	100 mg	% 1.00
Karotenoid	Turuncu	47 mg	% 0.47

mg: Miligram, **µg:** Mikrogram, **IU:** Uluslararası Birim

1.1.1. *S. platensis*'in Canlılarda Kullanımının Faydaları

Spirulina'nın T lenfosit hücrelerinin fonksiyonlarını arttırdığı ve bu yolla vücudun savunma mekanizmasını kuvvetlendirdiği belirlenmiştir. Ayrıca *Spirulina*'nın kanser ve AIDS hastalıklarının tedavilerinde de etkili olduğu, antitümör özellik taşıdığı, mide ve deri kanserlerinde hastalığın seyrini yavaşlatıcı hatta tedavi edici olduğu kanıtlanmıştır (Fox, 1993). İçeriğinde yüksek oranda bulunan demir sayesinde kansızlık tedavisinde kullanıldığı, yüksek tansiyon, kalp ve şeker hastalıklarına iyi geldiği bilinmektedir. Besleyici özelliğe sahip düşük kalorili bir gıda olması sebebiyle *Spirulina*'nın zayıflama diyetleri için ideal bir besin olduğu düşünülmektedir. Bazı zehirlenmelere iyi geldiği ve radyasyon düzeyini düşürücü etkisi olduğu da kanıtlanmıştır. Çernobil kazası sonucu yüksek radyasyon almış çocuklar üzerine yapılan bir deneyde *Spirulina*'nın radyasyonu düşürücü etkisi kanıtlanmıştır (Seshadri, 1992). Diğer alglerin hücre membranında selüloz bir çeper bulunmasına karşın *Spirulina*'nın mukoprotein içermesi, kolay sindirilebilmesini sağlamaktadır. Bu özelliğinden dolayı mide ameliyatlarından sonra ilk besin olarak verilmesi halinde komplikasyonların görülmediği belirlenmiştir (Fedkovic, 1993).

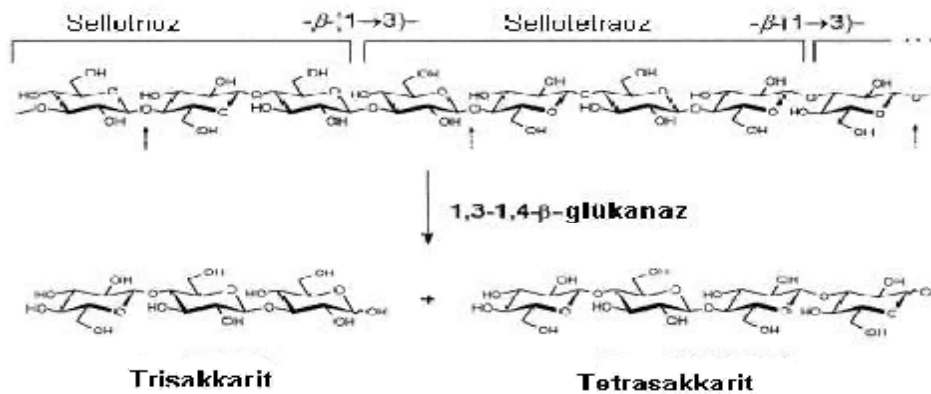
Algler, besin olarak suda bulunan nitrat, fosfat, amonyum gibi tuzları kullanırlar. Bu nedenle bu sulardaki organik kirliliğin giderilmesinde kullanılmaktadır. Alg, rasyona eklenen bir yan ürün şeklinde son yıllarda önem kazanmış protein ve renklendirici kaynağıdır (Yıldız, 2001). Tavuk yemlerinde *Spirulina* alginin en güvenli kullanım oranının % 5 olduğu belirtilmiş ve bu oranda yeme eklenen *Spirulina*'nın canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma oranını artırdığı belirlenmiştir. Büyükbaş hayvan yemlerinde yüksek miktarda alg kullanımının ekonomik açıdan imkansız olması nedeniyle, alglerin büyükbaş hayvan yemlerinde kullanımlarına ilişkin çalışmalar oldukça azdır. *Spirulina*'nın büyükbaş hayvan yemlerinde kullanımı sonucu sindirilme oranının % 73 olduğu ve damızlık boğalarda sperma miktarını, ineklerde fertilitite oranını artırdığı belirlenmiştir (Becker ve Ventkateraman, 1981). *Spirulina*'nın sentetik pigment maddeleri ile karşılaştırıldığında en çarpıcı özelliğinin doğal bir renklendirici olduğu belirtilmiştir. Sentetik pigmentlerin kanserojen özellik göstermesine karşın *Spirulina* doğal bir

renklendiricidir. Bu özelliğinden dolayı tavuk yumurtalarında ve akuakültürde balık yemlerinde doğal renklenmeyi sağlaması nedeniyle kullanıldığı bildirilmiştir (Challem, 1981).

1.2. β -(1,3-1,4)-Glukanaz (Likenaz) Enzimi

β -(1,3-1,4)-Glukanlar, *Poaceae* (buğdaygiller) familyası bitkilerinin hücre duvarı polisakkarit bileşikleri olup *Graminae* (*Poaceae*) familyasının özellikle ticari öneme sahip arpa, sorgum, çeltik, buğday ve çavdar gibi tahılların endosperm hücre duvarında bulunur (Stone ve ark., 1992). Bitkilerin yanı sıra bakteri, fungus gibi birçok organizma da önemli düzeyde β -(1,3-1,4)-glukanaz enzim kaynağıdır. Ancak bitki ve mikrobiyal kaynaklı enzimler birbirinden aminoasit sıraları ve üç boyutlu yapıları gibi birtakım farklılıklar gösterirler. Bitkisel kökenli β -(1,3-1,4)-glukanazlar glikosil hidrolaz 17 familyasına ait iken, mikrobiyal kökenli β -(1,3-1,4)-glukanazlar glikosil hidrolaz 16 familyasına aittir (Henrissat, 1991; Henrissat ve Bairoch, 1993, 1996).

Endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz (EC.3.2.1.73), nişastalı tohumların endosperm duvarında bulunan karışık bağlı β -(1,3-1,4)-glukanları hidrolize eden enzimdir (Lloberas ve ark., 1991). Arpa β -glukanının β -(1,3-1,4)-glukanaz ile hidrolizi sonucunda bir trisakkarit (3-O- β -cellobiosyl-D-glucopyranose) ve bir tetrasakkarit (3-O- β -cellotriosyl-D-glucopyranose) oluşmaktadır (Planas, 2000) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Arpa β -glukanının β (1,3-1,4)-glukanazlar ile enzimatik depolimerizasyonu (Planas, 2000)

Bakteriyel β -(1,3-1,4)-glukanazlar bira sanayinde de önemli bir yere sahiptir. Malt yapımı sırasında endogen (içsel) β -(1,3-1,4)-glukanazlar sıcaklıkla inaktif olurlar ve fazla miktardaki yüksek moleküler ağırlığa sahip β -glukanlar bira yapımının son aşamasında jelatinimsi görünümün yanı sıra düşük filtrasyon oranı ve ekstrakt veriminin düşmesi gibi önemli sorunlara neden olabilmektedirler. Bu nedenle sıcaklığa karşı dirençli bakteriyel β -(1,3-1,4)-glukanazlar mashing (bira yapımında ezilmiş arpa ile su karışımı aşaması) sırasında viskoziteyi azaltmak için oldukça sık kullanılmaktadır (Stone ve ark., 1992; Godfrey, 1983). Hayvan yemlerine, özellikle broyler ve domuz yemlerine bakteriyel β -glukanazları içeren enzimatik karışımların eklenmesiyle arpaya dayalı yemlerde sindirilebilirlik artmakta ve sağlıkla ilgili problemler (yapışkan dışkı oluşumu) azalmaktadır (Stone ve ark., 1992; White ve ark., 1983).

Bakteriyel β -(1,3-1,4)-glukanazlar *E. coli*, *Bacillus* suşları, *S. cerevisiae* ve transgenik arpa ve tütün bitkileri gibi çeşitli canlılarda eksprese edilmiştir (Planas, 2000). Bunlardan *Streptococcus bovis* β -(1,3-1,4)-glukanaz geni *E. coli* ve tekrar *S. bovis*'de klonlanarak eksprese edilmiştir (Ekinci, 1997). Başlıca enzim aktivitesinin *E. coli*'de hücre içinde, gram pozitif bakterilerde ise hücre dışında gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu gen aynı zamanda *Enterococcus faecalis*'e de aktarılmıştır (Ekinci, 1997). Ayrıca β -(1,3-1,4)-glukanaz genini taşıyan TL1R plazmidi *S. salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisine elektroporasyonla aktarılmış ve likenaz geninin bu bakteride eksprese olması sağlanmış ve böylece enzimin termostabilitesi arttırılmıştır (Aşan ve Özcan, 2007).

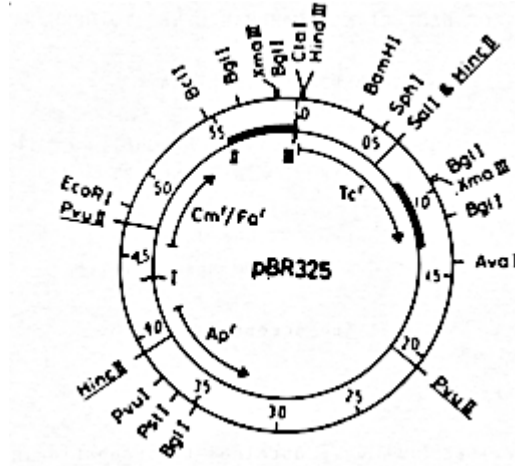
Spirulina rekombinant proteinlerin üretimi için uygun bir suş olarak kabul edilmekle birlikte, *S. platensis* üzerinde yapılan gen aktarım çalışmaları çok sınırlı düzeyde kalmıştır. Şu ana kadar *S. platensis*'e pHSG399 plazmidi (Toyomizu ve ark., 2001) ile Tn5 transpozon-transpozoz-lipozom kompleksi (Kawata ve ark., 2004) ve pBR325SL (Serin esteraz ve lizozim genleri takılı) plazmidi (Baylan, 2007) elektroporasyon tekniği kullanılarak aktarılabilmektedir. Bunun yanında dünyanın değişik laboratuvarlarında benzer çalışmalar devam etmektedir.

1.3. Araştırmanın Amacı

Spirulina'nın mikroalgal Biyoteknoloji'de fizyolojisi üzerine pek çok çalışma olmasına rağmen çok az sayıda genetik çalışma yapılmıştır. β -(1,3-1,4)-Glukanaz (likenaz) (EC.3.2.1.73) enzimi gibi endüstride yaygın olarak kullanılan bakteriyel enzimin daha ekonomik üretilmesine farklı bir yaklaşım olarak genetik mühendisliği teknikleriyle *Spirulina*'ya bu enzim geninin aktarımı düşünülmüştür.

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvar'ında hazırlanmış olan pBR325SLik (serin esteraz ve likenaz geni takılı) entegratif vektörünün *S. platensis*'e aktarılmasına çalışılmıştır. Bu çalışma doğrultusunda aşağıdaki amaçlar belirlenmiştir;

- pBR325 plazmidinin (Şekil 1.3) kloramfenikol antibiyotiğine karşı direnç geni taşımasından dolayı, bu plazmidin *S. platensis*'e aktarılması ile *S. platensis* kültüründe en çok gözlenen problemlerden biri olan bakteriyel kontaminasyonun önüne geçilmesi düşünülmüştür.
- Ticari önemi olan likenaz enzim geninin aktarılmasıyla geni alan *Spirulina*'lar birçok endüstri alanında kullanım olanağı bulacaktır. Örneğin, likenaz geni takılı vektörü alan *Spirulina*'lar arpaya dayalı kanatlı rasyonlarında yemin sindirimini artırabileceğinden dolayı önem taşımaktadır. Bu nedenle β -(1,3-1,4)-glukanaz geninin *Spirulina*'ya aktarımı amaçlanmıştır.
- *Spirulina platensis*'in hem düz hemde spiral formlarında transformasyon etkinliğini artırmaya yönelik olarak, farklı sonikasyon ve elektriksel alan değerlerinin yanında, değişik kimyasal uygulamalar denenerek *Spirulina*'nın düşük olan elektrotransformasyon etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.
- *Spirulina*'dan kromozomal DNA ve hücre içi rekombinant proteinlerin daha verimli izolasyonu için, hücrelerin daha etkin bir şekilde parçalanması amaçlanmıştır.



Şekil 1.3. pBR325 plazmidinin yapısı (Anonim, 2006)

1.4. Araştırmanın Kapsamı

Bu tez'in kapsamı,

1. *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisinden pBR325SLik plazmidinin izole edilmesi,
2. pBR325SLik vektöründe serin esteraz geninin yanısıra likenaz geninin varlığının tespit edilmesi,
3. *Spirulina platensis*'e pBR325SLik vektörünün elektrotransformasyonunun yapılması,
4. pBR325SLik vektöründe bulunan likenaz geninin varlığını göstermek için bu gene ait primerler kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) hazırlanması,
5. Geliştirilen rekombinant *S. platensis* suşlarının likenaz enzimini üretip üretmediğinin araştırılması safhalarından oluşmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Siyanobakterilerin fizyolojisi üzerine yapılan çalışmalara çok sayıda örnek vermek mümkündür. Son otuz yıl boyunca tek hücreli siyanobakteriler ile bir çok çalışmalar yapılmıştır. Fakat siyanobakterilerin genetiği üzerine yapılan çalışmalardan örnekler vermek çok daha zordur. Siyanobakterilerden elde edilen genetik bulgular; yeni genleri tanımlamak, genlerin evrimini, düzenini, yapısını araştırmak ve ekolojik rolünü anlamak için iyi bir fırsattır (Koksharova ve Wolk, 2002).

2.1. *Spirulina platensis* ile Yapılan Fizyolojik ve Moleküler Çalışmalar

Tiboni ve ark. (1984a), *Spirulina platensis*'deki ribulose-1,5 bisfosfat karboksilaz'ın büyük ve küçük alt ünitelerine ait genlerini klonlamışlardır. 4.6 kb'lik DNA parçası üzerinde birbirine yakın bir şekilde yerleşmiş olan bu iki genin eksprese olduğunu ve farklı bakteride ürettirdikleri büyük alt ünitenin miktarının toplam protein içerisindeki payının en az % 10 düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir.

Tiboni ve ark. (1984b), *E. coli*'nin *tufA* geninden elde ettikleri prob'ları kullanarak *S. platensis* DNA'sı üzerinde homolog gen dizilerini ortaya çıkartmışlardır.

Kawamura ve ark. (1986), S_{pl}I, S_{pl}II ve S_{pl}III kesme enzimlerini *S. platensis*'ten saflaştırmışlardır. S_{pl}II'in bakteriyofaj lambda DNA'sını bir yerden, Φ X 174 fajının replikatif formu (RF) DNA'sını ise iki yerden keserken, pBR322 DNA'sını kesemediğini bildirmişlerdir. S_{pl}II enziminin DNA'yı 5'-CGTACG-3' ve 3'-GCATGC-5' dizilerinden tanıyıp kestiğini bildirmişlerdir.

Tomaselli (1987), *Spirulina platensis* M2 suşunun farklı sıcaklıklardaki besin değerini incelemiş ve 42 °C sıcaklıktaki kültürün, 35 °C' deki kültüre göre protein oranının % 22 oranında düştüğünü, lipid miktarının % 43 ve karbonhidrat miktarının % 30 oranlarında arttığını kaydetmiştir.

Buttarelli ve ark. (1989), *S. platensis*'in 4.5 kb'lık str operon bölgesini içeren 5.3 kb'lık DNA bölgesinin baz dizisini okumuşlardır. Str operon bölgesinin, yapısal genler olan ribozomal protein S12 (*rpsL*), ribozomal protein S7 (*rpsG*), (*fus*)

translasyon elangasyon faktörü EF-G ve (*tuf*) translasyon elangasyon faktörü EF-Tu genlerinden oluştuğunu belirlemişlerdir.

Matsunaga ve ark. (1990), 40 siyanobakteri içerisinde 5 tanesinde 1-3 sayıda farklı plazmid izole etmişlerdir. Araştırmacılar özellikle tek hücreli olan *Synechococcus* sp. NKBG 042902'nin en az 3 plazmid (pSY09, pSY10 ve pSY11) içerdiğini bildirmişlerdir. Bunun üzerine araştırmacılar pUC18 (*E. coli* plazmid) ve pSY11'in 1.4 kb'lık *HindIII* fragmentini içeren pUSY02 hibrit plazmidini oluşturmuşlar ve bu plazmidi hem deniz algisi olan *Synechococcus* sp. NKBG042902-YG1116'na hem de tatlı su algisi olan *Anacystis nidulans* R2'ye aktarmışlardır. Fakat *A. nidulans* R2'nin plazmid DNA'sından oluşturdukları pSG111 plazmidini *Synechococcus* sp'ye aktarmayı başaramamışlardır. Son olarak araştırmacılar elektroporasyon tekniğinin tatlı su algisi *Anacystis nidulans* R2 ve deniz algisi *Synechococcus* sp üzerine de başarıyla uygulanabileceğini bildirmişlerdir.

Sanangelantoni ve ark. (1990), *S. platensis*'in genomundan 6.5 kb uzunluğundaki DNA parçasını prob olarak kullanarak klonlamışlardır. Araştırmacılar yaptıkları dizi analizinde, bu bölgede S2 ribozomal protein geninin ve uzatma faktörü Ts (EF-Ts)'nin var olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda *S. platensis*'in S2 ve EF-Ts genlerinin ortaya çıkarılan amino asit dizilerinin *E. coli* kopyası ile önemli bir benzerlik gösterdiğini de belirtmişlerdir.

Riccardi ve ark. (1991), *S. platensis*'e ait asetohidroksi asit sentaz (acetohydroxy acid synthase) geninin kodlama bölgelerinin, rekombinant lambda kütüphanesinden klonlanmış 4.2 Kb *Clal* fragmentini içerdiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu fragmentin pAT153 plazmidinin *Clal* bölgesine takıldığı takdirde, *E. coli*'nin uygun bir mutantını tamamlayabileceğini belirtmişlerdir.

Bini ve ark. (1992), *S. platensis*'in β -isopropylmalate dehidrogenase (EC 1.1.1. 85) genini (*leuB*), *Nostoc* UCD 7801 *leuB* genini prob olarak kullanarak λ EMBL3 genomik kütüphanesinden klonlamışlardır. Tüm *leuB* kodlama bölgesinin sırasını, 5' ucu 645 baz çifti ve 3' ucu 956 baz çifti olarak belirlemişlerdir.

Milano ve ark. (1992), izolösin, lösin ve valin amino asitlerinin biyosentezinde ilk ortak basamağı katalizleyen asetohidroksi asit sentetaz (AHS) enziminin *S. platensis*'de iki izoenzim formunun bulunduğunu belirlemişlerdir.

Richmond (1992), *Spirulina sp.*'nin bulanık durgun sular, akarsular, tatlı ve acı sular gibi çok çeşitli su ortamlarında yaşayabildiğini, fakat yoğun olarak Çad Göl'ünde bulunduğunu, göl suyunun yıllık ortalama sıcaklığının 27 °C civarında olduğunu bildirmiştir.

Salvi ve ark. (1994), *S. platensis*'den 23 kDa'luk serin esteraz genini şifreleyen DNA parçasını *E. coli*'de klonlamışlardır. Serin esteraz'ın amino asit sırasının, *Pseudomonas fluorescens*'in *estB* genini kodlayan karboksil esteraz (esteraz II) ile % 32 benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Yashiro ve ark. (1996), adenilat siklaz genini kodlayan *cyaA* genini *S. platensis*'den izole etmişlerdir. *CyaA* gen ürününün, adenilat siklaz'a benzer katalitik bölgeyi, membran bağlama bölgesini, *Pseudomonas solanacearum*'un *vsrA* gen ürününe benzer algılayıcı bölgeyi ve peptide benzer işaret bölgelerini içerdiğini bildirmişlerdir.

Kasahara ve ark. (1997), *S. platensis*'de adenilat siklaz genini kodlayan *cyaC* genine ait diziyi belirlemişler ve *cyaC*'nin C-terminal ucunun düşünülen amino asit dizisinin diğer siyanobakterilerde ve ökaryotlarda bulunan adenilat siklazın katalitik bölgelerine benzediğini göstermişlerdir.

Kawata ve ark. (1998), genomik DNA kütüphanesini yapılandırmak için etkili ve basit bir metodun TA klonlama vektörünü kullanarak göstermişlerdir. Bu metod genomik DNA'nın sonikatif bölünmesine ve parça (fragment) modifikasyonunun Taq DNA polimeraz enzimi ile sonlanmasına dayandığını bildirmişlerdir. Bu metodu *S. platensis*'den fiton sentaz (phytoene synthase) geni olan *crtB* geninin klonlanmasında başarılı bir şekilde uygulamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, DNA'nın metilasyon veya diğer sebeplerden dolayı kesme enzimleri tarafından fazla kesilemediği durumlarda bu metodun kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Cao ve ark. (1999), *S. platensis*'in kanamisin (Km), neomisin (Neo), genetisin (G418), amfisilin (Ap), kloramfenikol (Cm), higromisin (Hm) antibiyotiklerine ve 1 herbisit olan L-phosphinothricin (PPT)'e karşı hassasiyetini test etmişlerdir. Araştırmacılar *S. platensis*'in Hm, Cm ve PPT'ye karşı hassas olduğunu bundan dolayı Hm, Cm ve PPT'in gelecekteki *S. platensis* için

transformasyon çalışmalarında seçici markır olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

Lyra ve ark. (2000), çalıştıkları tüm siyanobakterilerin bazı DNA kesme enzimlerini içerdiğini ve tanımlanan kesme enzimlerinin, bilinen enzimlerin izoşizomeri olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca türlerin büyük çoğunluğunun tanımlanan kesme enzimleriyle benzerlik göstermediğini fakat *Nostoc* ve *Spirulina* türlerinin benzediğini ortaya koymuşlardır.

Toyomizu ve ark. (2001), *S. platensis*'de sabit zaman (2.5 ve 5 ms) ve 2, 4, 6, 8, 10, 12 kV cm⁻¹ elektrik alanlarında elektroporasyonun transformasyon yeterliliği üzerine etkilerini incelemişlerdir. *S. platensis*'in transformasyonunun 4 kV cm⁻¹ elektrik alanı ile 5.0 ms süresinde en etkili gerçekleştiğini ve yabancı genlerin bu organizmaya girebileceğini bildirmişlerdir. Fakat herhangi bir enzim geni taşımayan plasmid (pHSG399) aktardıkları için gen ekspresyonu ile ilgili bir çalışma yapamamışlardır.

Meesapyodsuk ve ark. (2001), *S. platensis*'in C1 hattının (*Arthrospira* sp. PCC 9438) *desC* geninin siyanobakteriyel $\Delta 9$ desaturaz ile katalizlenen reaksiyonunu araştırmak ve ökaryotik desaturazlar ile karşılaştırmak amacıyla ekmek mayasının desaturaz mutantında klonlamışlardır.

Yu ve ark. (2002), Çin'in Pasifik Okyanusu kıyılarından elde ettikleri *Spirulina maxima* (*Arthrospira maxima*)'nın F3 hattından fikosiyanın (phycocyanin)'nin α ve β apoprotein alt ünite genlerini klonlamışlardır. Araştırmacılar α ve β alt ünitelerine ait genleri kodlayan bölgelerin sırasıyla 489 ve 519 bp'den oluştuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *S. maxima* ve siyanobakterilere ait diğer yedi hattına ait α alt üniteleri arasındaki benzerliğin % 63 ile % 99 arasında değiştiğini, α ve β alt ünitelerindeki maksimum benzerliğin ise % 27 ile *S. maxima*'da bulunduğunu bildirmişlerdir.

Kawata ve ark. (2004), *Spirulina platensis*'i önemli mikro alg türlerinden biri olduğu için gerek yeni pratik uygulamaların gelişmesinde gerekse genetik değişimler için ilgi çekici bir tür olarak görmüşlerdir. Fakat uygun gen transfer sisteminin olmayışından dolayı, özellikle bu organizma için elde edilebilir transformasyon metodları ve uygun vektörlerin sınırlı sayıda olmasının buna engel

olduğunu bildirmişlerdir. Doğal transpozonlardan önemli elementlerin çıkarılmasıyla geliştirilen yapay transpozon sistemleri üzerinde yaygın olarak çalışıldığını ve son zamanlarda mutasyona uğramış transpoz ve transpozon sisteminin elektroporasyonu ile etkili transformasyonun geliştirildiğini söylemişlerdir. Araştırmacılar *S. platensis*'in C1 hattının (*Arthrospira* türü PCC9438) transformasyonun etkinliğini geliştirmek için elektroporasyonla katyon lipozom kompleksi, transpoz ve bir doğal Tn5 transpozon kullanarak transformasyon protokolünü modifiye etmişlerdir. Üç hafta sonunda kloramfenikollü besi yerinde hücrelerin ürediğini ve 12 aydan daha fazla sürede üremeye devam ettiğini göstermişlerdir. Geni almış olan kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) genlerini Southern blot (lekeleme) yöntemi ile genomik DNA'da göstermişler ve geni almış olan hücrelerin CAT aktivitesi gösterdiğini, almayanların ise göstermediğini ortaya koymuşlardır.

Apiradee ve ark. (2004), *Spirulina platensis*'in C1 hattında, γ -linoleik asit (GLA) sentezinde görev alan doymamış asetil-lipidlerini şifreleyen genleri (*desA*, *desC*, *desD*), *E. coli*'de başarılı bir şekilde ilk kez eksprese etmişlerdir.

Jinjie ve ark. (2004), *Arthrospira platensis* FACHB341, *A. platensis* FACHB439, *A. maxima* OUQDMS ve *Spirulina* sp. FACHB440'nın rubisco (*rbcL*) alt ünite genlerini pMD18-T vektörüne klonlamışlar ve bu hatlardan elde edilen *rbcL* proteinlerinin amino asit dizilerini karşılaştırmışlardır. Ayrıca araştırmacılar *Spirulina* sp. FACHB440 suşunun *rbcL* geninin GC içeriğinin diğer suşlardan daha yüksek olduğunu ve amino asit sırasının *Arthrospira*'nın diğer suşundan farklı olduğunu göstermişlerdir.

Li ve ark. (2005), *Spirulina platensis*'in Cr (III) alım mekanizmasını araştırmışlardır. *Spirulina platensis*'in bünyesine krom alımında sıcaklık, ışık, hücre konsantrasyonu gibi parametreler yanında pH'ın en önemli faktör olduğunu bildirmişlerdir.

Lui ve ark. (2005), in vitro PZR metodunu kullanarak *Arthrospira platensis* FACHB341'in C-fikosiyenin operonunu, pMD18-T vektörüne klonlamışlar ve operonun 427 bç *ussB* bölgesi, 519 bç *cpcB* geni, 111 bç *igsB-A* bölgesi, 489 bç *cpcA* geni, 184 bç *ussH* bölgesi ve 357 bç *cpcH* geninden oluştuğunu göstermişlerdir.

Kurdrid ve ark. (2005), *desD* geni ile şifrelenen *Spirulina-Δ⁶* desaturazı *Saccharomyces cerevisiae*'de eksprese etmişlerdir. Araştırmacılar 4 adet mutantın Δ⁶-desaturaz aktivitesini kaybettiğini, 2 adet mutantın ise iz miktarda aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu çalışmada, histidin Δ⁶-desaturaz aktivitesinde kritik bir rol oynadığının gösterildiğini de bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2005), *Arthrospira*'nın 5 ve *Spirulina*'nın 2 suşunda bulunan, nikel-demir hidrogenaz'ın geniş alt ünitesini şifreleyen *hoxH* kısmi genlerini klonlamışlardır. Bu genlerin *Arthrospira*'da 1349 ve *Spirulina*'da ise 1343 nükleotidden meydana geldiğini ve *Arthrospira*'da GC içeriğinin % 45.7-47.3, *Spirulina*'da ise % 50.4-50.9 olduğunu göstermişlerdir.

Baylan (2007), *Spirulina platensis (Cyanophyta)*'e ait serin esteraz genini primer dizileri kullanarak PZR tekniği ile çoğaltmıştır. Çoğaltılan geni, *Escherichia coli* vektörü olan pBR325 plazmid DNA'sına takmış ve böylece *S. platensis* için entegratif vektörler geliştirmiştir. Bakteriyofaj T4'e ait lizozim genini oluşturulan bu pBR325 entegratif vektörüne takarak pBR325SL (serin esteraz ve lizozim genleri takılı) vektörünü geliştirmiştir. pBR325SL'i önce kompetent *E. coli* XL1 Blue MRF, sonra da *S. platensis* hücrelerine aktarmıştır. *S. platensis*/pBR325SL'in Cm içeren *Spirulina* ortamında ürediğini, plazmid aktarılmamış olan *S. platensis*'in aynı besi ortamında üremediğini belirlemiştir. pBR325SL vektöründe lizozim geninin varlığını *E. coli* hücrelerinden izole edilen vektörlerde PZR ile gösterirken, *S. platensis*/pBR325SL hücrelerinin düşük oranda eksprese olduğu tahmin edilen lizozim enziminden dolayı lizozimin varlığını gösterememiştir.

2.2. β-(1,3-1,4)-Glukanaz (Likenaz) Enzimi İle İlgili Yapılan Bazı Moleküler ve Mikrobiyolojik Çalışmalar

Louw ve Watson (1993), *B. brevis*'e ait endo-β-(1,3-1,4)-glukanaz enzimini kodlayan geni *E. coli*'de klonlamışlardır. Enzimin optimum pH'sını 8-10, optimum sıcaklığının ise 65-70°C olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE yöntemini kullanarak 29 kDa olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, enzimi 75°C'de 1 saat inkübe ettiklerinde aktivitesinin % 75'ini koruduğunu belirlemişlerdir.

Ekinci ve ark. (1997), *S. bovis* JB1'in β -(1,3-1,4)-glukanını hidrolize eden 25 kDa'luk ekstraselüler bir enzim ürettiğini bulmuşlardır. 16 glukosid hidrolaz familyasına ait olan β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimini kodlayan bu geni izole etmişler ve pTRW10 ya da pIL253 plazmid vektörleri aracılığıyla tekrar *S. bovis* JB1'e aktarmışlardır. Araştırmacılar rekombinant *S. bovis*'in süpernatantındaki β -glukan aktivitesinin 4-10 kat arttığını bildirmişlerdir. pTRW10 plazmidine bu genin yerleştirilmesiyle oluşturulan rekombinant pTRWL1R plazmidini *L. lactis* IL2661 ve *E. faecalis* JH2-SS'e aktarmışlar ve geni eksprese etmişlerdir. Ancak enzimin ekstraselüler aktivitesinin *S. bovis*'e göre 8-50 kat daha azaldığını bildirmişlerdir.

Aşan (2002), rumen bakterilerinden biri olan *S. bovis* JB1'e ait karışık bağlı β -(1,3-1,4)-glukanaz geninin *E. coli-Streptococcus sp.* mekik vektörü pTRW10'da klonlanmasıyla oluşturulan TL1R vektörünü, termofilik bir laktik asit bakterisi olan *S. thermophilus* FI8976 ve *L. lactis* IL1403 suşlarına elektrotransformasyonla aktararak bu enzimin söz konusu bakterilerce üretildiğini bildirmiştir. SDS-Likenan-PAGE jellerinin incelenmesi sonucu 26 kDa'luk enzime ait proteinin herhangi bir proteazla parçalanmadığını belirtmiştir.

Kim ve ark. (2002), *B. circulans*'dan, endo- β -(1,3-1,4)-glukanazı kodlayan geni *E. coli*'de klonlamışlardır. Klonlanan enzim, likenan ve arpa β -glukanını hidrolize ederken karboksimetil selüloz (CMC), laminarin ve ksilan üzerinde aktif olmadığını belirtmişlerdir. Endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi amino asit dizisinin, endo- β -(1,3-1,4)-glukanaz enzimi üreten *Bacillus* N-137 ve *B. brevis* ile sırasıyla % 68 ve 51 oranında homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yongging ve ark. (2005), *B. subtilis* β -(1,3-1,4)-glukanaz genini, *E. coli* vektörü olan pUC19 vektörüne takarak *E. coli* JM101'e aktarmışlardır. Rekombinant enzim, arpa glukanını ve likenanını hidrolize ettiğini bildirmişlerdir. Toplam enzim aktivitesinin büyük bir kısmının (>% 50) selüler olduğunu, ekstraselüler kısımda % 25 β -1,3-1,4-glukanaz aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir. Enzim analizleri sonucunda *E. coli* ve *B. subtilis*'den saflaştırılan enzimlerin benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Aşan ve Özcan (2007), kanatlılar için rekombinant probiyotik geliştirmek ve likenaz enziminin termostabilitesini artırmak amaçları için β -(1,3-1,4)-glukanaz

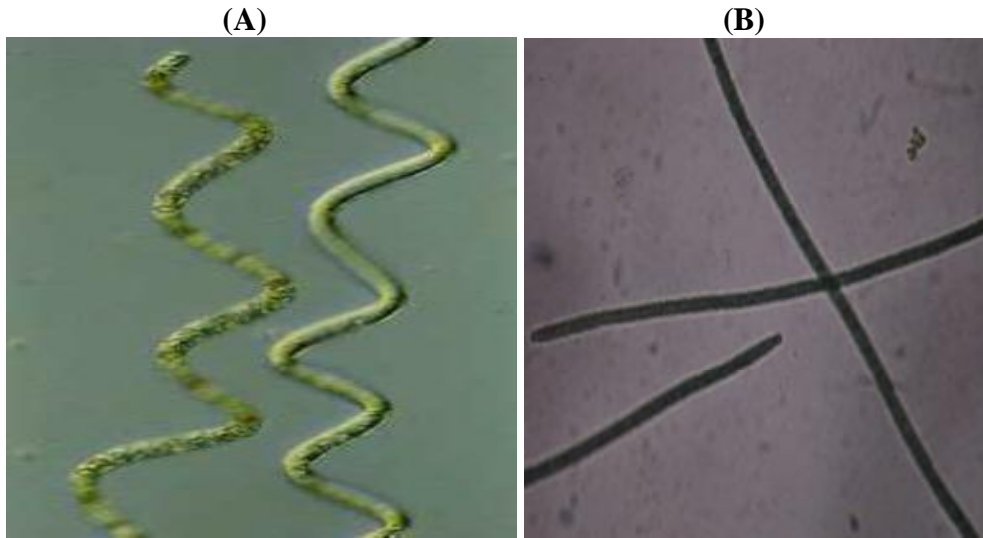
genini taşıyan TL1R plazmidini *S. salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisine elektroporasyonla aktarmış ve likenaz genini bu bakteride eksprese etmişlerdir. Bu bakterice eksprese edilen β -(1,3-1,4)-glukanaz enziminin sıcaklığa karşı direncinin arttığı ve 70°C'de 15 dakika aktivitesini sürdürebildiğini belirlemişlerdir. Fakat *L. lactis* ve *E. coli* hücrelerinin ürettiği likenaz enzimi aynı sıcaklık derecesinde kolaylıkla aktivitesini kaybettiğini de belirtmişlerdir. Bu üç rekombinant bakteri tarafından üretilen enzim denatürasyona karşı dirençli olup 37-100°C'de 15 dakika sonrasında çözünür olarak kalabildiğini böylelikle likenaz enzimi üreten rekombinant *S. salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisi kanatlının bağırsağında kolonize olmasa bile arpaya dayalı rasyonlara eklendiğinde canlılığını koruyabileceğini bildirmişlerdir. Bu bakterinin orta derecede termofil olmasının ve likenaz enziminin termostabilitesi nedenleriyle peletleme sonrası (70-90°C) enzimin renatüre olabileceğini ve kanatlının sindirim sistemindeki β -glukanları hidrolize edebileceğini de bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

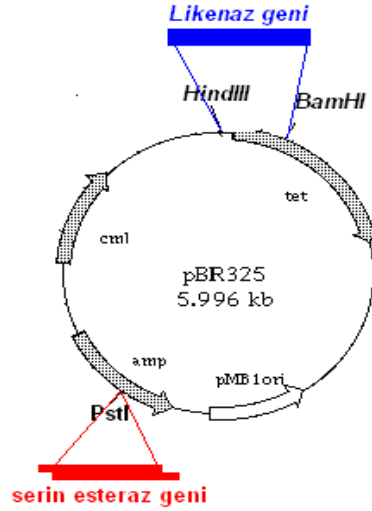
3.1. Materyal

3.1.1. *Spirulina platensis*, Bakteri, Plazmid ve Büyüme Ortamları

Bu çalışmada kullanılan spiral form *Spirulina platensis* (N-39) kültürü (Şekil 3.1 (A)) Japonya'dan (Çevre çalışmaları Milli Enstitüsü, Mikrobiyal Kültür Koleksiyonu), düz form *Spirulina platensis* (M2) kültürü (Şekil 3.1 (B)) ve *S. platensis* kültürlerinin üretilmesinde kullanılan besi yeri (*Spirulina* ortamı, Ek 1.1) Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Su Ürünleri Fakültesi Algal Biyoteknoloji Laboratuvar'ından, *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisi (Şekil 3.2) ise Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvar'ından temin edilmiştir. *S. platensis* kültürü 250 ml'lik erlenlerde 60 ml besi yeri içerisinde üretime alınarak, 30°C sabitlenmiş oda sıcaklığında ve 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki sürekli aydınlatmanın sağlandığı laboratuvar koşullarında yaklaşık 20 gün süreyle gelişimi sağlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.1. (A) Spiral form *S.platensis* hücresinin (N-39 hattı) mikroskop altındaki görünümü (x40)
(B) Düz form *S.platensis* hücresinin (M2 hattı) mikroskop altındaki görünümü (x40)



Şekil 3.2. pBR325SSlik vektörünün şematik modeli



Şekil 3.3. *S. platensis* kültürünün laboratuvarında üretim görüntüsü

E. coli bakterilerinin üretilmesinde LB (Leuria Bertani) sıvı besi yeri (Ek 1.2 (a)), katı besi yeri olarak ise LB-Agar (Ek 1.2 (b)) besi yeri kullanılmıştır. Likenz aktivitesi testleri için LB-Agar besi yerine % 0.1 w/v likenan ilave edilmiştir. Yine antibiyotik ilavesi gereken durumlarda hem LB hemde LB-Agar besi yerlerine 0.5 µg/ml kloramfenikol (Cm) antibiyotiği ilave edilmiştir. Elektrotransformasyon sonrası *S. platensis* için 0.5 µg/ml kloramfenikol içeren sıvı besi yeri (Ek 1.1) kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler DNA polimeraz (Taq polimeraz), antibiyotikler ve diğer kimyasal malzemeler, Fermentas, Sigma, Promega, Boehringer Mannheim, Merck'den temin edilmiştir. PZR çalışmaları için gerekli olan primer dizileri ise Altay Kimya (Cemal Gürsel Cad., 10 sk., Börüban Apt., no:42/1, Adana) ve Kutay (Yeni Baraj Mah., 49 sk., no:10, Adana) aracılığıyla temin edilmiştir.

3.1.3. Aletler

Bu çalışmada kullanılan PZR cihazı (thermal cycler, Techne, Progene, Eppendorf), santrifüj (Hettich, D-78532), DNA ve protein jel elektroforez aletleri ile güç kaynağı (ATTO Corporation), otoklav (Hirayama ve Nüve), su banyosu ve inkübatör (Nüve), elektroporatör (Invitrogen), spektrofotometre (Pharmacia), hassas terazi (Ohaus), UV lamba (Vilber Lourmat), vortex ve manyetik karıştırıcı (CAT), steril kabin (Bilser), çalkalayıcı (Ika), pH metre (Nel) ve jel görüntüleme cihazı (EpiChemi³, Darkroom), sonikatör (Bandelin, GM 2070-U) çalışmanın yapıldığı Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'nda bulunmaktadır.

3.2. METOD**3.2.1. *E.coli* XL1 Blue MRF'/pBR325SLik Bakterisinden Plazmid DNA İzolasyonu**

E.coli/pBR325SLik bakterisinden plazmid DNA (Şekil 3.2) izolasyonu Birnboim ve Doly (1979)'e göre aşağıda verilen protokol takip edilerek yapılmıştır.

1. Uygun antibiyotik içeren LB sıvı besi yerine (Ek 1.2. (a)) steril şartlarda ekilen *E. coli* bakterileri 37 °C'de çalkalama yöntemiyle 1 gece üremeye bırakılmışlardır (Şekil 3.4).
2. Gelişmiş olan bakteriler 10 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak buz üzerinde soğutulmuşlardır.
3. Bakteriler 4950 dev/dk'da 10 dk süreyle santrifüj yapılarak çöktürülmüştür.

Süpernatant kısım atılarak bakteri kümeleri 2.5 ml soğuk TNE solüsyonu (Ek 2.1) ile çözülmüş ve tekrar bir önceki adımda verildiği şekilde santrifüj yapılmıştır.

4. Süpernatant kısım uzaklaştırılarak bakteri kümesi 10 mg/ml lizozim içeren 100 µl lizozim solüsyonu (Ek 2.2) ile çözülmüş ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
5. Kültür üzerine 200 µl taze hazırlanmış SDS eriyiği (Ek 2.3) ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 5 dk daha bekletilmiştir.
6. Kültürün üzerine son olarak 150 µl 3 M Na-asetat solüsyonu (pH: 4.8) (Ek 2.4) ilave edilerek homojenize edilmiş ve buz üzerinde inkübasyona 15 dk daha devam edilmiştir.
7. Kültürler buz üzerinde soğutulmuş 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak 16.500 dev/dk'da 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifügasyondan sonra süpernatant kısım temiz mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.
8. Süpernatantın üzerine son konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde RNaz eriyiği (Ek 2.5) ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat bekletilmiştir.
9. Süpernatantın üzerine 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol (Ek 2.6) karışımı ilave edilerek süspansiyon haline gelene kadar alt-üst edilmiştir. Karışım 16.500 dev/dk'da 5 dk süreyle santrifüj yapılmış ve üst faz tekrar temiz bir tüpe alınmıştır.
10. Üzerine bu sefer 1 hacim kloroform: İzoamil alkaol (Ek 2.7) ilave edilerek süspansiyon haline gelene kadar tekrar alt-üst edilmiştir.
11. Karışım 16.500 dev/dk'da 5 dk süreyle santrifüj yapıldıktan sonra üst faz tekrar temiz bir tüpe alınmıştır. Üzerine 2 hacim % 99 soğuk ethanol ilave edilmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra -20 °C'de en az 2 saat tutulmuştur.
12. Süre sonunda örnekler 16.500 dev/dk'da 15 dk süreyle santrifüj edilerek plazmid DNA'nın tüpün dibinde küme oluşturması sağlanmıştır.
13. Sıvı kısım dökülerek DNA kümesi % 70'lik ethanolle yıkanmıştır.

Son olarak DNA kümesi kurutulmuş ve üzerine 30 µl TE (Ek 2.8) solüsyonu ilave edilmiş ve DNA'nın çözünmesi için +4 °C'de bekletilmiştir.



Şekil 3.4. Bakterilerin LB sıvı besi yerlerinde üretilmeleri

3.2.2. pBR325SLik Entegratif Vektöründe Serin esteraz Geninin Belirlenmesi

pBR325SLik entegratif vektörü Serin esteraz gen varlığı, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) metodu ile tespit edilmiştir.

PZR; bu metod farklı ısı derecelerinde uygulanan ve birbirini takip eden 3 işlemin belirli sayılarda tekrarlanması ile hedef nükleik asit, primerler, Taq DNA polimeraz, deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTPs), Mg⁺⁺ tampon ve su konulduktan sonra çift sarmallı DNA'nın birbirinden ayrılması (denatürasyon), primerlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing) ve hedef DNA ile hibridizasyon yapan primerlerin 3' ucuna Taq DNA polimeraz enzimi yardımıyla nükleotitler eklenerek primerlerin uzaması (extension) işlemlerinin tekrarlanması ile gerçekleşir (Durmaz, 1995).

S. platensis kromozomunda bulunan serin esteraz geninin tamamına ait nükleotid sırası internet taramaları ile bulunmuş ve Çizelge 3.1'de verilmiştir. PZR'u için gerekli olan primerler Baylan (2007)'nin çalışmasında kullanılan primerler olup bu primerler Baylan'dan temin edilmiştir. Serin esteraz amplifikasyonu için gerekli primer dizaynında, ileri ve geri primerleri oluşturulurken uç kısımlara PstI (5'-CTGCA/G-3') kesme enziminin (yapışkan uç) baz dizilerini yerleştirmişlerdir. Baylan (2007), bu sayede ileride serin esteraz geni kullanılarak başka entegratif vektörler geliştirilmek istendiğinde, serin esteraz geninin pBR325 vektöründen PstI kesme enzimi ile kesilerek çıkarılması ve diğer vektörlere ligasyonunun yapılarak

Çizelge 3.1. Serin estera z geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini

LOCUS	S70419	827 bp	DNA	linear	BCT 23-SEP-1994
DEFINITION	serine esterase [Spirulina platensis, C1, Genomic, 827 nt].				
ACCESSION	S70419				
VERSION	S70419.1 GI:546788				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Arthrospira platensis				
ORGANISM	<u>Arthrospira platensis</u>				
	Bacteria; Cyanobacteria; Oscillatoriales; Arthrospira.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 827)				
AUTHORS	Salvi,S., Trinei,M., Lanfaloni,L. and Pon,C.L.				
TITLE	Cloning and characterization of the gene encoding an esterase from Spirulina platensis				
JOURNAL	Mol. Gen. Genet. 243 (1), 124-126 (1994)				
PUBMED	8190066				
REMARK	GenBank staff at the National Library of Medicine created this entry [NCBI gibbsq 148703] from the original journal article.				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..827 /organism="Arthrospira platensis" /mol_type="genomic DNA" /db_xref="taxon:118562"				
gene	160..783 /gene="serine esterase"				
CDS	160..783 /gene="serine esterase" /codon_start=1 /protein_id="AAB30793.1" /db_xref="GI:546789"				
	/translation="MSLHSYTVKSENPENPEGLIIFLHWGANCEDLTFLAPMLRLPN YWFEPPEAPFPHQPVPGGRAWYALETQEYEGIEESREKLIDWLNIAIQTGTGIPPQRTI LGGFSQGGAMTFDVGRTMGFAGLIVLSGYLHFKPEPQQTPLPPILMAHGKQDMVPLG AAHQARDSFQKLGATVEYHEYNMGHEICPDILGLIQSFVIKTLPNNH"				
ORIGIN	5' →				
	1 aaattgtcaa tggatgtaga ctatatagct cgcccggcta tgcctggaaa tatctggcta 61 tatcagatat tattaagtg ataaatatcc ccatggcttg agtgttttt ataagtcattg 121 taggatagcg ataagcaaac caacaggtca gaattaaata tgcggttaca ctcatataca 181 gtcaaatcag aaaacccgga aaatcccga ggtttaatca tattcctgca tggttggggt 241 gcgaatttg aggatctgac ctttttggt cccatggtga gattaccgaa ttattggttt 301 gagttcccag aagctccctt tcctcaccca caagttccgg ggggtcgcgc ttggtacgcc 361 ttagaaactc aggaatatga ggaattgag gaaagccggg aaaaactaat tgattggtta 421 aacgcgatcg cccaaactac tggaaatcca ccacagcgca cgattttagg cggtttttcc 481 caggggggag ccatgacttt tgatgtcggg cggacaatgg gtttcgctgg tctgattgta 541 ctcagtggct acttacactt taaaccagaa cccaacaga ccccctacc gccgatttta 601 atggctcacg gtaaacaaga tatggctcgtc cccctcggag cggctacca ggcgcgggac 661 agtttccaga aattaggggc aacgggtgaa tatcatgagt acaacatggg tcacgagatt 721 tgtcccgata ttttggggtt aatacaaagt tttgtgatca aaacctgacc taacaacctat 781 taacctttaa atataaaaga gagcatgatt taatctcaaa ttaggtt..... ← 3'				

Not: Kutu içerisinde verilen diziler primer yapışma bölgeleridir.

Çizelge 3.2. pBR325SLik DNA'sı kullanılarak serin esteraz genini elde etmek için hazırlanan PZR reaksiyonu bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
pBR325SLik plazmid DNA'sı	200 ng/μl	1 μl	200 ng
Primer A	20 pmol/μl	1 μl	20 pmol
Primer B	20 pmol/μl	1 μl	20 pmol
dNTP karışımı	200 μM (her biri)	1 μl	200 μM (her biri)
Reaksiyon tamponu	10 X	5 μl	1X
Taq DNA polimeraz	-	1 μl	-
Saf su (dH ₂ O)	-	40 μl	-
TOPLAM	-	50 μl	-

Çizelge 3.3. Serin esteraz geni elde etmek için PZR cihazına yüklenen program

Program Grupları	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
1	95 °C	2 dk	1
2	94 °C 56 °C 72 °C	1 dk 2 dk 1.5 dk	30
3	72 °C	10 dk	1
4	4 °C	Maksimum 24 saat	1



Şekil 3.5. Serin esteraz geninin çoğaltılmasında kullanılan PZR cihazı

3.2.3. *E.coli*/pBR325SLik Rekombinant Bakterisinde Likenaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Likenaz aktivitesi bakımından test edilecek bakteri önce LB sıvı besiyerinde 37°C'de bir gece üretilmiştir. Ertesi gün üreyen bakterilerden steril öze yardımı ile LB/Likenan/Agar (0.5 µg/ml Cm) katı besiyerine çizme yöntemi ile ekim yapılmış ve bir gece daha 37°C'de inkübasyona bırakılarak koloni oluşturması sağlanmıştır. Bakteri kolonileri geliştikten sonra fenotipik tayinleri yapılmıştır. Bunun için bakteri plağına, yüzeyi kaplayacak miktarda % 0.2 w/v kongo kırmızısı (Congo-red) boyası (Ek 2.9) dökülmüş, 15 dakika bekledikten sonra fazla boya uzaklaştırılarak plağın üzerine bu sefer 1M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha beklenerek katı besiyerindeki fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Kongo kırmızısı likenanlı ortamı kırmızıya boyayacağından, kırmızıya boyanan zeminde etrafında sarımtırak zon oluşan koloniler likenaz pozitif bakterilerdir (Teather ve Wood, 1982).

3.2.4. pBR325SLik Entegratif Vektörünün *Spirulina platensis* Hücrelerine Elektrotransformasyonu

pBR325SLik vektörünün *Spirulina platensis* hücrelerine elektrotransformasyonu Toyomizu ve ark. (2001) ve Baylan (2007)'na göre aşağıda verilen protokol takip edilerek yapılmıştır.

1. *S. platensis* 30°C'de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddetindeki sürekli aydınlatmanın sağlandığı laboratuvar koşullarında, gelişme yoğunluğu gün $\text{OD}_{750\text{nm}}$ de 0.5-1.0 olana kadar üretilmiştir.
2. Gelişmiş olan *S. platensis*'den 10'ar ml alınarak steril santrifüj tüplerine konmuş ve 4950 dev/dk'da 10 dk süreyle santrifüj edilerek pelet haline getirilmiştir.
3. Peletler 5'er ml *S. platensis* besi ortamında (*Spirulina* ortamı) pipetlenerek yıkanmış ve 90 saniye süreyle sonikasyon yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. *Spirulina*'dan DNA izolasyonu amacıyla hücre duvarını parçalamak için kullanılan sonikatör cihazı

4. Tekrar 4950 dev/dk 10 dk süreyle santrifüj yapılmış ve pelet 1mM EDTA (Ek 2.11) içeren besi ortamında tekrar çözülmüştür.
5. Örnekler 30 °C'de ve hafif ışıktta 1 gece bekletilmiştir.
6. Bir gün sonra 10'ar ml'lik santrifüj tüplerinde 4950 dev/dk'da 10 dk santrifüj edilmişlerdir. Peletler 5'er ml HEPES (Ek 2.12) ilave edilerek yıkanmıştır.
7. Altıncı adım 3 kere daha tekrarlanmıştır (toplam 4 yıkama).
8. Sonunda pelet 4 ml HEPES (Ek 2.12) (OD_{750nm} 'de 3-4 olacak şekilde) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır.
9. Bu karışımdan 4'er adet olmak üzere 800'er μ l alınarak mikrosantrifüj tüplerine alınır. 5'er μ g pBR325SLik plazmidi ilave edilerek daha önce buz üzerinde soğutulmuş olan 0.4 cm'lik elektroporasyon küvetlerine ayrı ayrı aktarılmıştır. Diğer 2 örnek ise DNA ilave edilmeksizin (kontrol grubu) daha önce buz üzerinde soğutulmuş olan 0.4 cm'lik elektroporasyon küvetlerine ayrı ayrı aktarılmış, bütün küvetler buz üzerinde 2-3 dk süreyle bekletilmiştir.
10. Küvetler elektroporasyon cihazına yerleştirildikten sonra 50/1800 μ F/V kapasitans, 150 Ω yükleme rezistansı, 4.5 kv cm^{-1} , 5.0 kv cm^{-1} , 5.5 kv cm^{-1} ve 6.0 kv cm^{-1} elektriksel alan seçenekleri ile 25 mA değerleri kullanılarak elektrik akımı verilmiştir. Elektrik şoku uygulanan küvetler tekrar buz üzerine alınarak 1 saat süreyle bekletilmiştir.

11. Süre sonunda *S. platensis* 0.5 µg/ml kloramfenikol içeren sıvı besi yerine ekilmiştir. Kontrol grubuna ait bakteriler ise yine antibiyotik içermeyen ve 0.5 µg/ml Cm içeren sıvı besi yerlerine ekilerek 30°C'de 20 gün süreyle bekletilmiştir.

Elektroporasyon, farklı elektriksel alan ve sonikasyon değerlerinde aşağıdaki verilen çizelge 3.4.'e göre yapılmıştır. Bu değerler Baylan (2007) ve Kawata ve ark. (2004)'ün çalışmalarının sonucunda elde edilen bulgular dikkate alınarak seçilmiştir.

Çizelge 3.4. *S. platensis*'e pBR325SLik rekombinant plazmidinin elektroporasyon tekniği ile aktarılmasında kullanılan sonikasyon hızları ve elektriksel alan değerleri

Elektiriksel Alan Değerleri \ Sonikasyon Hızları	(0) 0 kHz			(1) 1.5 kHz			2) 3.0 kHz		
	(1) 4.5 kv cm ⁻¹	√	√	√	√	√	√	√	√
(2) 5.0 kv cm ⁻¹	√	√	√	√	√	√	√	√	√
(3) 5.5 kv cm ⁻¹	√	√	√	√	√	√	√	√	√
(4) 6.0 kv cm ⁻¹	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Elektroporasyon işlemi sonrası örnekler 0.5 µg/ml Cm içeren sıvı *Spirulina* ortamına alınırken, kontrol grubu (plasmid içermiyor) hem 0.5 µg/ml Cm içeren hemde içermeyen sıvı *Spirulina* ortamına alınmıştır.

3.2.5. *Spirulina platensis* Kültüründen Kromozomal DNA İzolasyonu

Spirulina platensis kültüründen kromozomal DNA izolasyonu Wu ve ark. (2000)'na göre aşağıda verilen protokol takip edilerek yapılmıştır.

A. Hücrenin Parçalanması

1. *S. platensis* (100 ml) kültürü 6000 devirde 10 dk süreyle santrifüj edilerek hücreler pelet haline getirilmiştir.
2. Tüpün dibindeki hücre peleti 10 ml Tampon A (Ek 2.13) ile karıştırılmış ve 10 dk

oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3. Son konsantrasyon % 0.1 v/v olacak şekilde sarkosil eklenmiş ve +4°C'de 30-90 dk daha bekletilmiştir.
4. Flamentler 8000 devirde 10 dk süreyle santrifüj yapılarak toplanmış (hücre dışı sıvı mavimsi görünür) (Şekil 3.7) ve 20 ml TES eriyiği (Ek 2.14) ile yıkandıktan sonra santrifüjle çöktürülerek 2.5 ml TES eriyiğinde çözülmüştür.
5. Son konsantrasyon 0.5 mg/ml olacak şekilde lizozim eklenmiş ve 30 dk süreyle 37°C'de bekletilmiştir.
6. Üzerine son konsantrasyon % 1 olacak şekilde SDS (Ek 2.3) eklenerek örnek karıştırılmış ve 37°C'de 10 dk bekletilmiştir.
7. Örneklerin üzerine son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K eklenerek 1 saat süreyle 37°C'de bekletilmiştir.



Şekil 3.7. *Spirulina/pBR325SLik*'de kromozomal DNA izolasyonu aşamasında sarkosil ilavesi sonrası mavimsi görüntüsü.

B. DNA'nın Saflaştırılması

1. DNA örneği proteinlerden arındırılmak amacıyla 1 hacim fenol ile muamele edilerek 5 dk süreyle 16.500 dev/dk'da santrifüj edilmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde alınarak temiz mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur.
2. Üzerine 1 hacim kloroform:izoamil alkol (24:1) (Ek 2.7) karışımı ilave edilerek dikkatli bir şekilde alt-üst edilmiş ve tekrar 5 dk süreyle 16.500 dev/dk'da santrifüj edilerek üst faz temiz mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır.

C. DNA'nın Çöktürülmesi

1. Örneğin üzerine sırasıyla 2/3 hacim 5 M NaCl ve 1 hacim izopropanol eklenerek homojenize edilmiştir. Böylece DNA küme şeklinde gözle görülebilir hale gelmiştir
2. DNA kümesi bir pipet yardımıyla temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve 150 µl % 70'lik alkol ile yıkanmıştır. Daha sonra santrifüjle çöktürülen DNA kurutularak bir miktar TE (Ek 2.8) eriyiği ile çözülmüştür.

D. *S. platensis*'e Ait Kromozomal DNA'nın RNA'dan Saflaştırılması ve Spektrofotometrede DNA Miktarının Ölçülmesi

S. platensis'den elde edilen DNA'lar RNaz enzimi ile muamele edilerek RNA'dan arındırılmışlardır. Saflaştırma Birnboim ve Doly (1979)'a göre aşağıda verilen protokol kullanılarak yapılmıştır.

1. DNA çözeltisinin hacmi TE solüsyonu (Ek 2.8) ilave edilerek 100 µl'ye tamamlanmıştır.
2. DNA'nın üzerine son konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde RNaz eriyiği (Ek 2.5) ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 37°C'de 1 saat bekletilmiştir.
3. DNA+RNaz eriyiğinin hacmi 40 µl 3M Na-asetat (pH: 5.2) (Ek 2.4) ve 260 µl saf su ilave edilerek 400 µl'ye tamamlanmıştır.
4. Üzerine 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol karışımı (25:24:1) (Ek 2.6) ilave edilerek DNA eriyik haline gelene kadar tüp alt-üst edilmiştir. Karışım 16500 dev/dk'da 5 dk süreyle santrifüj yapılmış ve üst faz tekrar temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır.
5. Üst fazın üzerine bu sefer 1 hacim kloroform:izoamil alkol karışımı (Ek 2.7) ilave edilerek eriyik haline gelene kadar tekrar alt-üst edilmiştir.
6. Karışım 16.500 dev/dk'da 5 dk süreyle santrifüj yapıldıktan sonra üst faz tekrar temiz bir tüpe alınmıştır. Üzerine 2.5 hacim % 99'luk soğuk etanol ilave edilerek homojenize edilmiş ve sonra -20 °C'de en az 2 saat süreyle bekletilmiştir.
7. İnkübasyon sonunda örnekler 16.500 dev/dk'da 15 dk süreyle santrifüj edilerek kromozomal DNA'nın küme oluşturması sağlanmıştır.

8. Sıvı kısım dökülerek DNA kümesi % 70'lik etanol ile yıkanmıştır.
9. Son olarak DNA kümesi kurutularak üzerine 30 µl TE eriyiği (Ek 2.8) ilave edilmiş ve DNA'nın çözünmesi için +4 °C'de bekletilmiştir.
10. Çözünen DNA solüsyonundan 1 µl alınarak 999 µl TE içerisine konulmuş ve iyice homojenize edilmiştir. Bu arada 1000 µl TE solüsyonu (DNA içermiyor) spektrofotometre küvetine alınarak cihaza yerleştirilmiş kalibrasyon amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra hazırlanan DNA örneği spektrofotometre küvetine alınarak cihaza yerleştirilmiş ve DNA'nın miktar ve saflığı ölçülmüştür.

DNA konsantrasyonu UV (Ultra Viyole) spektrofotometresi ile direkt ölçülebilmektedir. Solüsyon tarafından emilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm'de ölçülür. Ayrıca, UV absorbansı DNA'nın saflığın ölçmek için de kullanılmaktadır (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de ise proteinler pik vermektedir (**Sambrook ve ark., 1989**)).

3.2.6. *Spirulina platensis* Kromozomal DNA'sında Likenaz Enzim Geninin Tespiti

3.2.6.1. *S. platensis* DNA'sından Likenaz Geninin PZR ile Çoğaltılması İçin Gerekli Primerlerin Belirlenmesi

Streptococcus bovis kromozomunda bulunan likenaz geninin tamamına ait nükleotid sırası internet taramaları ile bulunmuş ve Çizelge 3.5'de verilmiştir. Likenaz geninin PZR tekniği kullanılarak tespiti için genin belirli bölgesini farklı ileri (forward) ve geri (reverse) primer dizileri belirlenmiştir.

Primerlerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (T_m =annealing sıcaklığı), primer uzunlukları dikkate alınarak iki primer için de ayrı ayrı hesaplanmıştır. Primerlerin T_m değerleri $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanarak hesap edilmiştir.

Oluşturulan ileri ve geri primerler aşağıdaki dizilerden oluşmaktadır:

Primer-F (primer A): 5'-AAGTGAATTTAACTACGA- 3' $T_m=46.5^\circ\text{C}$

Primer-R (primer B): 5'-GCTCTTCCATCAACATAC -3' $T_m=52.4^\circ\text{C}$

Belirlenen primere ait yapışma sıcaklığı 49°C alınmıştır.

Çizelge 3.5. Likenaz geninin baz dizilimi ve kodladığı proteinin amino asit dizini

LOCUS	Z92911	981 bp	DNA	linear	BCT 18-APR-2005
DEFINITION	S.bovis gene encoding beta-(1,3-1,4)-glucanase.				
ACCESSION	Z92911				
VERSION	Z92911.1 GI:2231061				
KEYWORDS	beta-1,3-1,4-glucanase; lichenase.				
SOURCE	Streptococcus equinus				
ORGANISM	Streptococcus equinus Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 981)				
AUTHORS	Ekinici,M. and Flint,H.J.				
TITLE	Isolation and overexpression of a gene encoding an extracellular beta-(1,3-1,4)-glucanase from Streptococcus bovis JB1				
JOURNAL	Unpublished				
REFERENCE	2 (bases 1 to 981)				
AUTHORS	Flint,H.J.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (14-MAR-1997) Flint H.J., Rowett Research Institute, Greenburn Road, Bucksburn, Aberdeen, United Kingdom,				
AB21 9SB					
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..981 /organism="Streptococcus equinus" /mol_type="genomic DNA" /strain="JB1" /db_xref="taxon:1335" /clone="pTL1R" /clone_lib="lambda EMBL3"				
CDS	137..850 /standard_name="lichenase" /codon_start=1 /transl_table=11 /product="beta-(1,3-1,4)-glucanase" /protein_id="CAB07443.1" /db_xref="GI:2231062" /db_xref="GOA:O07856" /db_xref="HSSP:P23904" /db_xref="InterPro:IPR000757" /db_xref="InterPro:IPR008263" /db_xref="InterPro:IPR008264" /db_xref="InterPro:IPR008985" /db_xref="InterPro:IPR013320" /db_xref="UniProtKB/TrEMBL:O07856"				
	/translation="MWKKVSLIVLLLAFFGFQQGVDAQSKYHYSQELNYYNGNAMELRNGSNGGMFNCNFVPGNVGFNNGMLMSLKIDSDGRGGYTGGEWRKERFGYGLFQVNMKPIKNPGVSSFFTYTGPSDGTKWDEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTSGQGNHEYLYNLGFDASQGFHTYGFWDWQADHITWYVDGRAVYTAYNNIPSTPGKIMMNAWPGTHEVDSWLGA YNGRTPLYAYYDWISYDQF"				
sig_peptide	137..208				
mat_peptide	209..847 /product="beta-(1,3-1,4)-glucanase"				


```

/function="hydrolysis of beta-(1,3-1,4)-
glucans"
/standard_name="lichenase"

ORIGIN

5' → .....
      1 tttgaagtaa cagttactga aaagaaa aag tgaatttaac
tacgattgat taggcgtttt
      61 caatctgtag tagaggagat tagttccttt ttctgacaga
actccttttt aaaatgatta
      121 aaattgaggt attattatgt ggaaaaaagt tagttgttta
attgttctct tattggcttt
      181 ctttggtttt caacaagggtg ttgatgcgca aagcaaatac
cactatagtc aagaactaaa
      241 ttactataat ggtaatgcca tggaaacttcg taatggttct
aatgggtgta tgtttaactg
      301 taattttgtc cctggaaatg tcggctttaa taacggcttg
atgagtcctta aaattgacag
      361 tgatggctgt ggcggctaca ctgggggcca atggcgtagt
aaagaacgct ttggctatgg
      421 tcttttccaa gtaaacaatga aacctattaa aaatccaggt
gtcgtttctt cattctttac
      481 ttatactgga ccaagtgatg gtacaaaatg ggatgaaatc
gacattgaat ttttagggaa
      541 agatacaaca aaagttcaat tcaactacta cacaagcggg
caaggtaatc acgaatacct
      601 ttacaattta ggatttgatg catctcaagg cttccacact
tatggttttg attggcaagc
      661 tgatcacatt acttgggatg ttgatggaag agctgtttac
actgcttaca acaatattcc
      721 tagcacacct ggtaagatta tgatgaatgc ttggcctgga
actcatgaag tggattcttg
      781 gttgggtgct tacaatgggc gaactccttt gtatgcatat
tatgactgga ttagctacga
      841 ccaattttta taaagctaga cagtaaccaa ataacaattt
gtttttactt aactgattat
      901 aactacactc cccaataaaa tcggttaaaa tctctctcaa
caaaataact ctttaaaatt
      961 ctttcttttt aaacgttgac t..... → 3'

```

Not: Kutu içerisinde verilen diziler primer yapışma bölgeleridir.

Spirulina platensis kromozomal DNA'sında likenaz enzim geni tespiti için bir PZR hazırlanmıştır. Reaksiyon hazırlanmadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelenmiş ve stok kontaminasyonlarını önlemek amacıyla her birinden günlük kullanımlar için steril ependorflara belirli miktarlarda paylaştırılmıştır. PZR

bileşenleri ile hazırlanan PZR cihazı programı sırasıyla çizelge 3.6 ve 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. *S. platensis* DNA'sı kullanılarak likenaz genini elde etmek için hazırlanan PZR'u bileşenleri

Cinsi	Stok Konsantrasyonu	Alınan Miktar	Son Konsantrasyon
<i>S. platensis</i> kromozomal DNA'sı	200 ng/μl	1 μl	200 ng
Primer A	20 pmol/μl	1 μl	20 pmol
Primer B	20 pmol/μl	1 μl	20 pmol
dNTP karışımı	200 μM (her biri)	1 μl	200 μM (herbiri)
Reaksiyon tamponu	10 X	5 μl	1X
Taq DNA polimeraz	2.5 u/μl	1 μl	1.25 u
Saf su (dH ₂ O)	-	40 μl	-
TOPLAM	-	50 μl	-

Hazırlanan reaksiyon karışımı 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak PZR cihazının örnek bloğuna yerleştirilmiş ve Çizelge 3.7'de verilen program cihaza yüklenerek cihaz çalıştırılmıştır.

Çizelge 3.7. Likenaz geni elde etmek için PZR cihazına verilen program

Program Grupları	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
1	95 °C	3 dk	1
2	94 °C 49 °C 72 °C	40 sn 40 sn 40 sn	45
3	72 °C	10 dk	1
4	4 °C	Maksimum 24 saat	1

3.2.7. Rekombinant *S.platensis*/pBR325Lik ile Kontrol Grubu Olan Orijinal Düz-Spiral Form *S.platensis* ve *E.coli*/pBR325Lik Organizmalarına İlişkin SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri

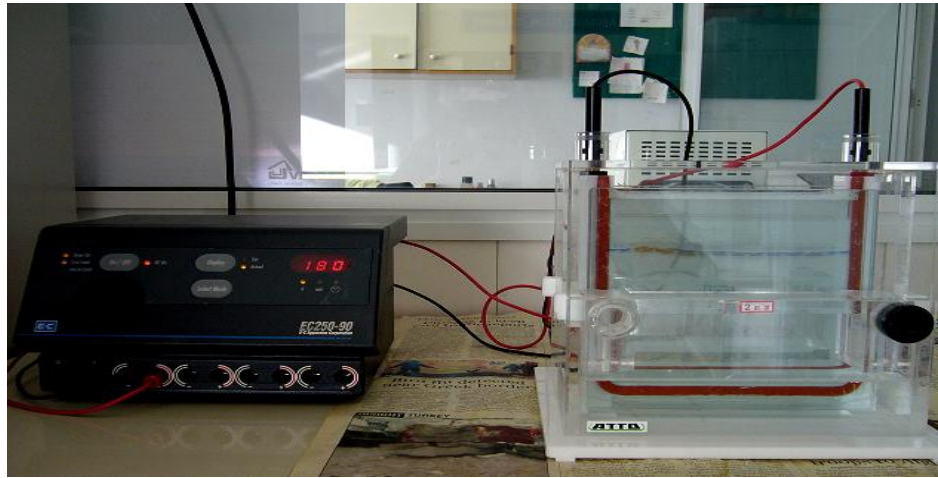
SDS-PAGE deneyleri Laemmli (1970)'e göre yapılmıştır.

3.2.7.1. Organizmalardan Proteinlerin İzolasyonu

Organizmalardan hücre içi (intraselüler) protein izolasyonu, yüksek protein eldesi için 3 farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. İntraselüler protein izolasyonu için, 48 saat süreyle üretilmiş bakteriler (*E.coli/pBR325SLik* ve *E.coli/pBR325*) ve yaklaşık 3 hafta üremiş rekombinant ve orijinal *Spirulina* (düz ve spiral form) hücreleri 4950 dev/dk da 10 dakika süreyle santrifüjle çöktürülmüş ve elde edilen hücre peleti başlangıç hacmine eşit saf su ile çözülmüştür. Elde edilen çözeltiler buz içerisinde 70 saniye süreyle sonikasyon işlemine (1.5 kHz) tabi tutularak hücreler patlatılmış, açığa çıkan hücresel atıklar ise 4950 dev/dk da santrifüjle uzaklaştırılmıştır. Süpernatant kısım A_{260nm}/A_{280nm} 'de okunmuş ve içeriğindeki DNA ve protein miktarı belirlenmiştir. Eş zamanlı yürütülen diğer protein eldesi yönteminde sonikasyon sonrası süpernatant içine lizozim (10 mg/ml) ilave edilmiş ve 1 saat enzim aktivitesi için 37 °C'de bekletilmiştir. Süre sonunda A_{260nm}/A_{280nm} 'de DNA ve protein miktarları ölçülmüştür. Protein eldesindeki son yöntem olarak, bu kez lizozim ilave edilmiş test tüplerinin içine son konsantrasyonu % 1 w/v olacak şekilde SDS ilave edilmiş, tekrar 1 saat 37 °C'de bekletildikten sonra A_{260nm}/A_{280nm} 'de DNA ve protein miktarları ölçülmüştür. Daha sonra hücre içi proteinleri içeren farklı aşamalardaki süpernatant kısımlar (sonikasyon sonrası, sonikasyon+lizozim sonrası, sonikasyon+lizozim+SDS sonrası) TCA (% 20) ile muamele edilerek proteinler elde edilmiştir. Son olarak protein örnekleri 1M Tris (pH: 8.0) (Ek 2.10) ile çözülmüş ve SDS-PAGE'de elektroforez için hazır hale getirilmiştir. Ayrıca eş zamanlı çalışılan diğer süpernatant kısımlar % 70'lik alkolde ve 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir. Elde edilen proteinler sodyum-fosfat tamponu (pH: 6.5)+% 0.1 w/v likenan+% 1.5 w/v agar içeren besiyerine alınmıştır. Besi yeri 1 gece 37 °C'de bekletildikten sonra % 0.2 kongo kırmızısı ve 5 mM NaOH ile hazırlanmış boya ile muamele edilmiştir. Daha sonar besi yerine 1M NaCl ilave edilmiştir. Bu yöntem ile protein ekspresyonunun olup olmadığı fenotipik olarak aydınlatılmaya çalışılmıştır.

3.2.7.2. Elektroferez Aletinin Çalıştırılması

Protein örnekleri SDS-PAGE kuyularına bir otomatik pipet yardımıyla konularak elektroferez tankının kapağı kapatılmış ve birer uçları güç kaynağına bağlı olan kabloların diğer uçları da elektroferez tankına bağlanmıştır. Güç kaynağı, çift jel kullanılmış olup proteinler toplayıcı jelde ilerlerken 45 mA ve 90 V'da, ayırıcı jelde ilerlerken 90 mA ve 180 V'da çalıştırılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Denatüre proteinlerin elektroferez işlemine tabi tutulması

3.2.7.3. Organizmalara Ait Toplam Proteinlerin SDS-PAGE'de Karşılaştırılması

Protein örnekleri % 12'lik SDS-PAGE jele yüklenerek uygun volt ve mA değerlerinde proteinlerin jel içerisinde birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra, jel dikkatli bir şekilde iki cam levha arasından çıkarılarak içerisinde boya solüsyonu (Coomassie blue) (Ek 2.20) bulunan bir kabın içerisine konmuş ve 45-60 dk süreyle jelin boyanması için beklenmiştir. Boyama tamamlandıktan sonra jel boyadan alınmış ve içerisinde destain solüsyonu (yıkama solüsyonu) (Ek 2.21) bulunan bir kaba konarak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Son olarak organizmalara ait toplam hücre içi proteinler karşılaştırılmıştır.

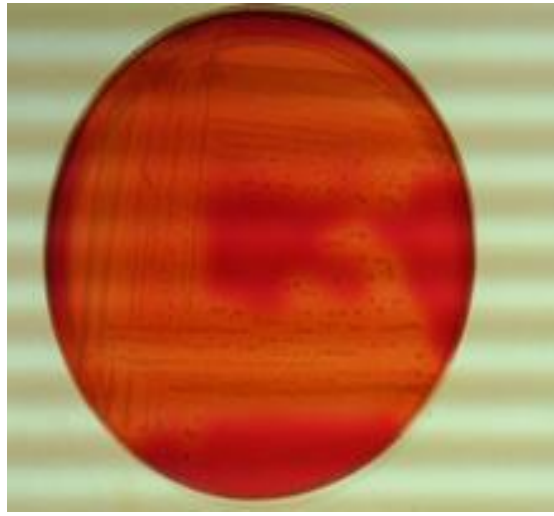
3.2.7.4. Organizma Proteinlerin SDS-Likenan-PAGE'de Karşılaştırılması

Protein örnekleri SDS-Likenan-PAGE (% 0.2 w/v likenan) jele yüklenerek proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi sağlanmıştır. Proteinlerin jel içerisinde ilerlemesi tamamlandıktan sonra jel şu şekilde muamele edilmiştir:

1. Jel iki cam levha arasından dikkatlice çıkarılarak renatürasyon solüsyonuna (% 80 v/v 50 mM Na-fosfat solüsyonu (pH: 6.5) (Ek 2.22), % 20 v/v izopropanol) alınmıştır ve bu solüsyon içerisinde 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Böylece SDS jelden uzaklaştırılarak proteinler renatüre edilmiş olur.
2. Daha sonra jel 50 mM Na-fosfat solüsyonu + 5 mM β -merkaptoetanol + 1 mM EDTA'dan oluşan solüsyona alınarak +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
3. Ertesi gün jel bu solüsyondan alınarak 50 mM Na-fosfat solüsyonu (pH: 6.5) içerisine konulmuş ve +4°C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.
4. Daha sonra jel streç filme sarılarak, likenaz enziminin ortamdaki substratı hidrolize etmesi için 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
5. SDS-Likenan-PAGE kongo kırmızısı (Ek. 2.9) ile boyanarak rekombinant organizmalara ait enzim bantları ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. Bulgular****4.1.1. pBR325SLik Plazmidi İçin Likenaz Enzim Geni Varlığının Tespiti**

E.coli/pBR325SLik bakterisi likenaz enzim aktivitesi bakımından 3.2.3’de verilen protokole göre fenotipik olarak test edilmiştir ve likenaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.1).



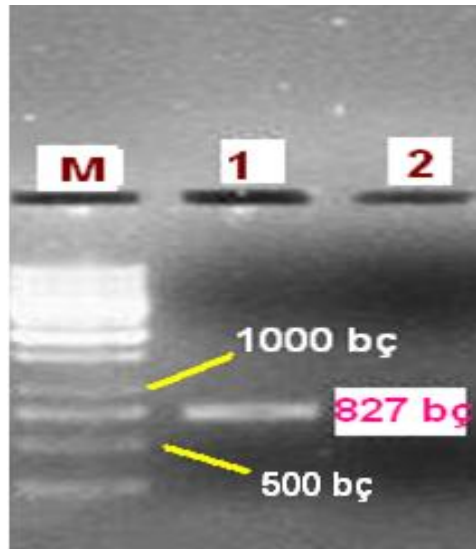
Şekil 4.1.. *E.coli*/pBR325SLik bakterisinin LB/Likenan/Agar besi yerinde likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

4.1.2. *E.coli* XL1 Blue MRF/pBR325SLik Bakterisinden Plazmid DNA İzolasyonu

E.coli/pBR325SLik’den 3.2.1’ de verilen protokole göre plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra spektrofotometrede A_{260nm} değerinde miktarı ve saflığı ölçülerek plazmid DNA elde edilmiş ve bu plazmid *Spirulina platensis*’e (düz ve spiral form) elektroporasyon yolu ile transformasyonda likenaz enzim geni taşıyıcısı olarak kullanılmıştır.

4.1.3. pBR325SLik Entegratif Vektöründe Serin esteraz Geninin Belirlenmesi

pBR325SLik rekombinant vektörünün kontrolü amacıyla, pBR325SLik vektörünü almış olan rekombinant *E. coli* XL1 Blue MRF' bakterisinden plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan DNA, Çizelge 3.2 ve 3.3'de verilen PZR reaksiyonunda kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Bu reaksiyon ürününün % 0.8 w/v agaroz jel kontrolünde 827 bç'ne tekabül eden serin esteraz gen bandı gözlenmiştir. Böylece *E.coli* hücrelerinden elde edilen vektörün pBR325SLik olduğu teyit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. pBR325SLik DNA'sından Taq polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltılan PZR ürünü Serin esteraz geni

4.1.4. pBR325SLik Entegratif Vektörünün *Spirulina platensis* Hücrelerine Elektrotransformasyonu

Farklı sonikasyon ve elektriksel alan değerleri kullanılarak pBR325SLik'in düz ve spiral *S. platensis*'e yapılan elektrotransformasyonun sonucu sırasıyla Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 ile Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı elektriksel alan ve sonikasyon değerleri kullanılarak yapılan elektrotransformasyondan sonra sıvı besi yerlerine ekilen düz form *S. platensis*/pBR325SLik'in üreme durumu

Sonikasyon değerleri (90 sn)	(0) 0 kHz			(1) 1.5 kHz			(2) 3.0 kHz		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
<i>Spirulina</i> ortamı Elektriksel alan									
(1) 4.5 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	-	+	-	-
(2) 5.0 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	+	+	-	+
(3) 5.5 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	+	+	-	-
(4) 6.0 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	-	+	-	-

- (*) 0: Plazmid (-), antibiyotiksiz
 1: Plazmid (-), antibiyotikli (cml)
 2: PBR325SLik (+), antibiyotikli (cml)
 (+): ÜREDİ, (-): ÜREMEDİ

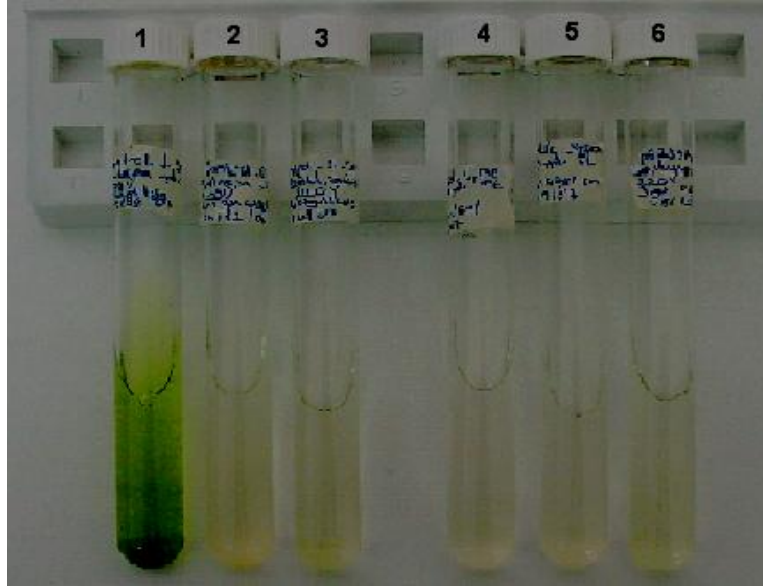
Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere düz form *Spirulina* için uygulanan elektriksel alan ve sonikasyon değerleri yer almaktadır. 1.5 kHz sonikasyon değerinde ve 5.0 kV cm⁻¹ ile 5.5 kV cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinde, ayrıca 3.0 kHz sonikasyon değeri ile 5.0 kV cm⁻¹ elektriksel alan değerinde *S. platensis*/pBR325SLik'in antibiyotikli besi ortamında ürediği gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı elektriksel alan ve sonikasyon değerleri kullanılarak yapılan elektrotransformasyondan sonra sıvı besi yerlerine ekilen spiral form *S.platensis*/pBR325SLik'in üreme durumu

Sonikasyon değerleri (90 sn)	(0) 0 kHz			(1) 1.5 kHz			(2) 3.0 kHz		
	0	1	2	0	1	2	0	1	2
<i>Spirulina</i> ortamı Elektriksel alan									
(1) 4.5 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	-	+	-	-
(2) 5.0 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	-	+	-	+
(3) 5.5 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	-	+	-	-
(4) 6.0 kv cm ⁻¹	+	-	-	+	-	+	+	-	+

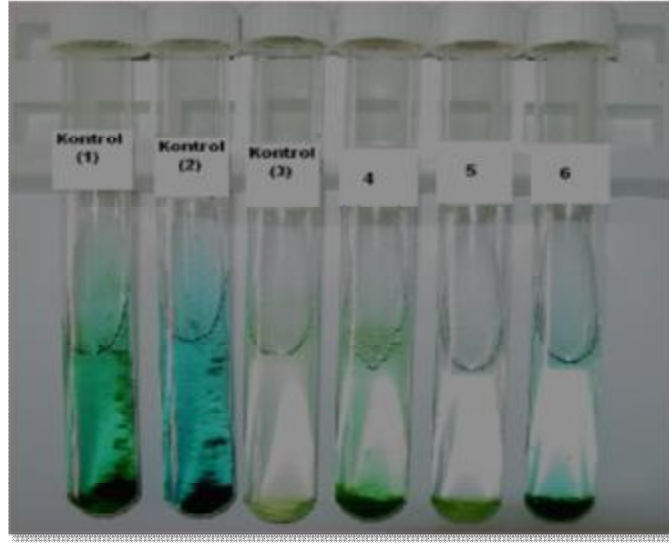
- (*) 0: Plazmid (-), antibiyotiksiz
 1: Plazmid (-), antibiyotikli (cml)
 2: PBR325SLik (+), antibiyotikli (cml)
 (+): ÜREDİ, (-): ÜREMEDİ

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere 5.0 ve 6.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin ve 1.5 ve 3.0 kHz hızlarında sonikasyon uygulandığı *S. platensis*’in antibiyotikli besi ortamında ürediği gözlenmiştir.

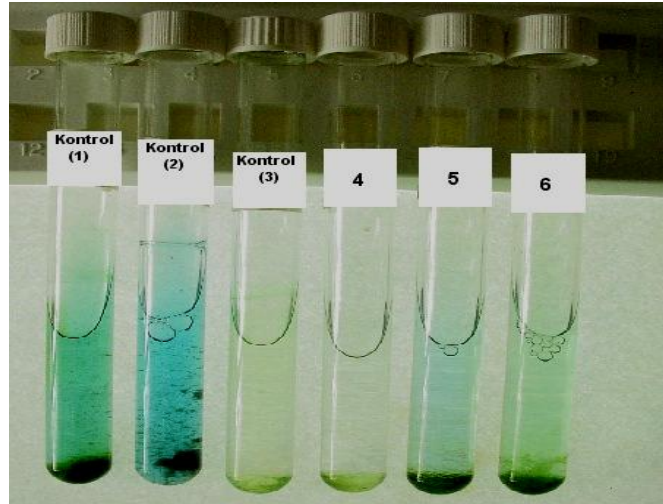


Şekil 4.3. 0 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form *S. platensis*’in 30 gün sonraki görüntüsü
(**1:** antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **2:** antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme yok **3:** Cm’li *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme yok **4,5,6:** Cm’li *Spirulina* ortamı (pBR325SLik plazmidini almış) ve üreme yok)

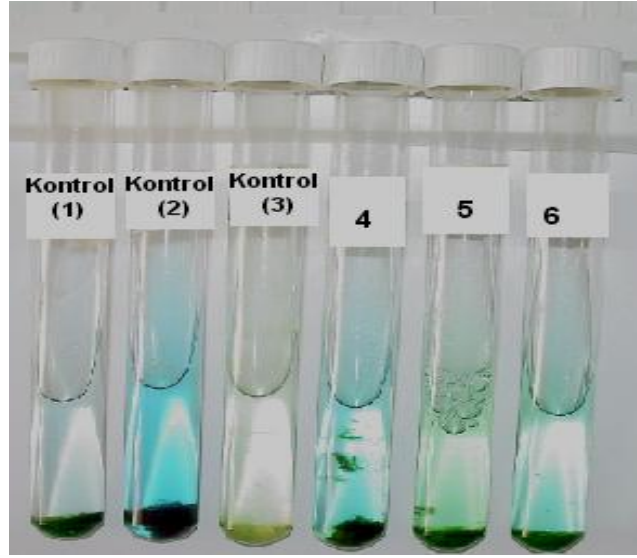
Şekil 4.3.’de görüldüğü üzere sonikasyon uygulanmayan, 1 numaralı kontrol grubu (düz form *Spirulina*, plazmid yok) hariç diğer *Spirulina* türleri ölmüştür.



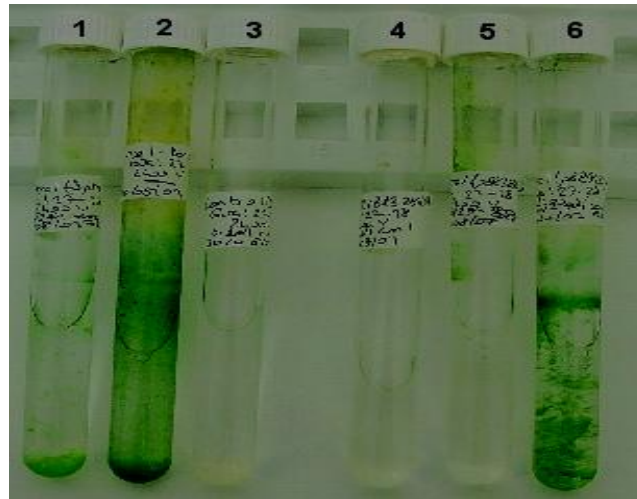
Şekil 4.4. 1.5 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form *S. platensis*'in 30 gün sonraki görüntüsü
(1: antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **2:** antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **3:** Cm'li *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme yok **4,5,6:** Cm'li *Spirulina* ortamı (pBR325SLik plazmidini almış) ve üreme var)



Şekil 4.5. 1.5 kHz sonikasyon hızı ve 5.5 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form *S. platensis*'in 30 gün sonraki görüntüsü
(1: antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **2:** antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **3:** Cm'li *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme yok **4,5,6:** Cm'li *Spirulina* ortamı (pBR325SLik plazmidini almış) ve 5 ve 6 numaralı tüplerde üreme var)



Şekil 4.6. 3.0 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen düz form *S.platensis*'in 30 gün sonraki görüntüsü
(1: antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **2:** antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **3:** Cm'li *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme yok **4,5,6:** Cm'li *Spirulina* ortamı (pBR325SLik plazmidini almış) ve üreme var)



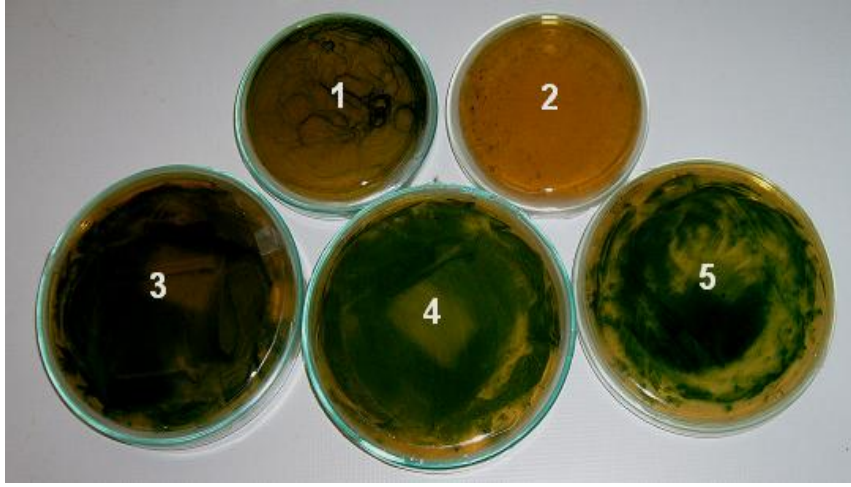
Şekil 4.7. 3.0 kHz sonikasyon hızı ve 6.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra sıvı besi yerine ekilen spiral form *S.platensis*'in 30 gün sonraki görüntüsü
(1: antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **2:** antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme var **3:** Cm'li *Spirulina* ortamı (plazmid yok) ve üreme yok **4,5,6:** Cm'li *Spirulina* ortamı (pBR325SLik plazmidini almış) ve 5. tüpte az üreme varken 6. tüpteki üreme yoğun)

Elektroporasyon sonrası Cm içeren sıvı *Spirulina* ortamında üreyen *Spirulina*/pBR325SLik kültürleri, kromozomal DNA izolasyonu için 60 ml besi yeri ve 0.5 µg/ml Cm bulunan 250 ml'lik erlen içerisinde alınmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 1.5 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı elektrotransformasyon çalışmasından sonra erlene alınan düz form *S. platensis*/pBR325SLik'in ve antibiyotikli besi yerine alınan plazmid içermeyen kontrol grubunun görüntüsü

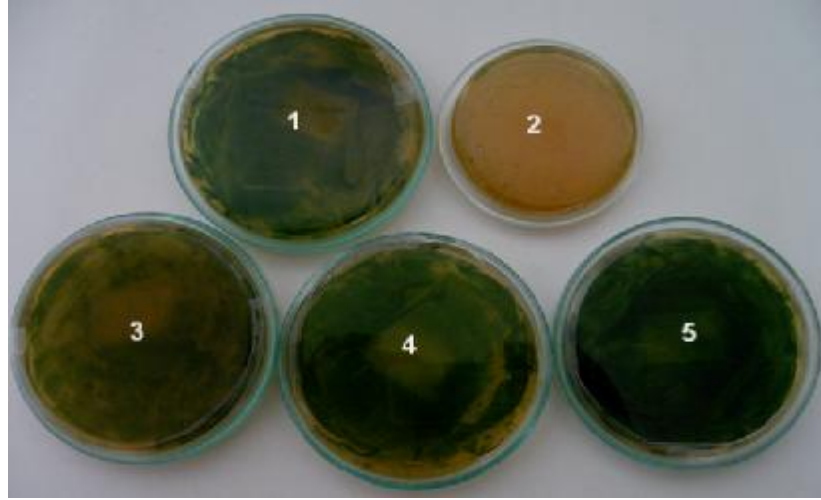
Sıvı *Spirulina* ortamında üreyen türlerden daha sonra yayma metodu ile katı *Spirulina* ortamına 200 µl ekim yapılmıştır. Yaklaşık 1 ay sonra katı 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamında da rekombinant türlerin ürediği gözlenmiştir (Şekil 4.9.ve 4.10).



Şekil 4.9. Sıvı *Spirulina* ortamında üreyen düz form orijinal ve rekombinant *Spirulina*'ların katı *Spirulina* ortamındaki 3 hafta sonundaki üreme görüntüleri

(**1:** Kontrol (Düz orijinal form *Spirulina*), antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı, üreme var, **2:** Kontrol (Düz orijinal form *Spirulina*), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme yok, **3:** Düz form *Spirulina*/pBR325SLik (1.5 kHz sonikasyon hızı ile 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan uygulanan), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme var, **4:** Düz form *Spirulina*/pBR325SLik (1.5 kHz sonikasyon hızı ile 5.5 kv cm⁻¹ elektriksel alan uygulanan), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme var, **5:** Düz form *Spirulina*/pBR325SLik (3.0 kHz sonikasyon hızı ile 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan uygulanan), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme var)

Şekil 4.9'da görüldüğü üzere, 2 numaralı petri kabındaki düz form orijinal *Spirulina* (plazmid yok) kontrol amacıyla alındığı 0.5µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamında üreme göstermezken, 1 numaralı petri kabında antibiyotiğin bulunmadığı *Spirulina* ortamında ise üreme göstermiştir. *Spirulina*/pBR325SLik türleri ise alındıkları 0.5µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamında (3, 4 ve 5 numaralı petri kapları) üreme göstermiştir.



Şekil 4.10. Sıvı *Spirulina* ortamında üreyen spiral form orijinal ve rekombinant *Spirulina*'ların katı *Spirulina* ortamındaki 3 hafta sonundaki üreme görüntüleri

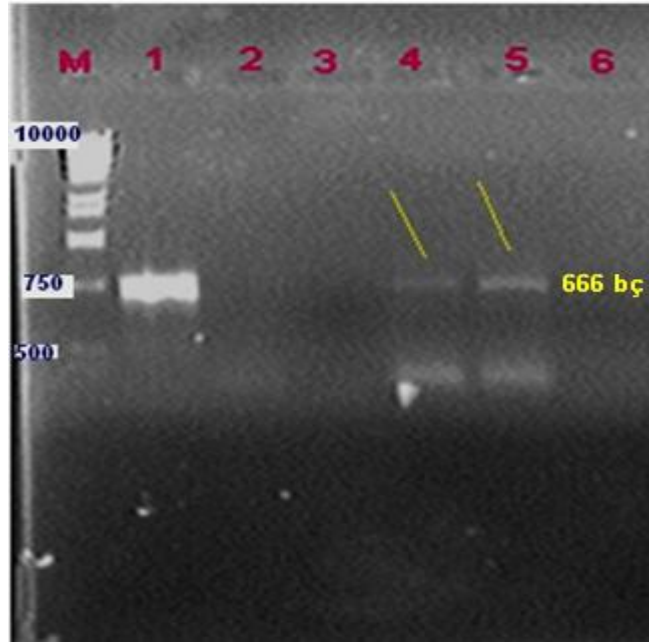
(1: Kontrol (spiral orijinal form *Spirulina*), antibiyotiksiz *Spirulina* ortamı, üreme var, 2: Kontrol (spiral orijinal form *Spirulina*), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme yok, 3: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik (1.5 kHz sonikasyon hızı ile 6.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan uygulanan), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme var, 4: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik (3.0 kHz sonikasyon hızı ile 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan uygulanan), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme var, 5: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik (3.0 kHz sonikasyon hızı ile 6.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan uygulanan), 0.5 µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamı, üreme var)

Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, 2 numaralı petri kabındaki spiral form orijinal *Spirulina* (plazmid yok) kontrol amacıyla alındığı 0.5µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamında üreme göstermezken, 1 numaralı petri kabında antibiyotiğin bulunmadığı *Spirulina* ortamında ise üreme göstermiştir. *Spirulina*/pBR325SLik türleri ise alındıkları 0.5µg/ml Cm içeren *Spirulina* ortamında (3, 4 ve 5 numaralı petri kapları) üreme göstermiştir.

4.1.5. *Spirulina*/pBR325SLik'den Kromozomal DNA İzolasyonu

S. platensis'den 3.2.5'de verilen protokole göre kromozomal DNA izolasyonu yapılarak 3.2.5 (D)'de verilen protokole göre de RNA'dan arındırılmıştır. Daha sonra spektrofotometrede miktarı ve saflığı ölçülerek, likenaz geninin çoğaltılması için

çizelge 3.6 ve 3.7’de verilen PZR’da kalıp DNA olarak kullanılmış ve sonrasında PZR ürünleri % 0.8 w/v agaroz jelde kontrol edilmiştir. Jel görüntüsünde 1.5 kHz sonikasyon hızı ve 6.0 kv cm^{-1} elektriksel alan değerlerinin uygulandığı spiral form *Spirulina*/pBR325SLik ile 3.0 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm^{-1} elektriksel alan değerlerinin uygulandığı düz form *Spirulina*/pBR325SLik kromozomal DNA’larında primer amplifiye bölgesi olan 666 bç uzunluğunda bant gözlenmiştir. Bu sonuç, pBR325SLik vektörünün *Spirulina* (düz ve spiral form) kromozomuna entegre olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *S. platensis* kromozomal DNA’sından PZR ile çoğaltılan likenaz genlerinin % 0.8 w/v agaroz jel görüntüsü (M: DNA Markır (1 kb), 1: pBR325SLik DNA’sından PZR ürünü, 2: pBR325 DNA’sından PZR ürünü, 3: Spiral form *Spirulina* kromozomal DNA’sından PZR ürünü, 4: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik kromozomal DNA’sından PZR ürünü, 5: Düz form *Spirulina*/pBR325SLik kromozomal DNA’sından PZR ürünü, 6: Düz form *Spirulina* kromozomal DNA’sından PZR ürünü)

4.1.6. Orijinal ve Rekombinant Hatlara Ait SDS-PAGE ve Zymogram Analizleri

SDS-PAGE analizi 3.2.7’de verilen protokole göre yapılmıştır. TCA muamelesi öncesi 3 farklı aşama sonrası elde edilen süpernatant kısımlara ait (düz ve

spiral *Spirulina*'ya ait) A_{260nm}/A_{280nm} 'deki ölçüm sonuçları Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Düz form *Spirulina* için uygulanan protein eldesi yönteminde farklı aşamalarda elde edilen süpernatant kısımlardaki DNA ve proteinlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçları (DNA: A_{260nm} ; protein: A_{280nm})

	ÖRNEKLER	DNA ($\mu\text{g/ml}$)	PROTEİN (mg/ml)
İLK ÖLÇÜMLER (Doğal spontan liziz)	Düz Form	8.4	0.0
	Düz-1.5 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	9.7	0.0
	Düz-1.5 kHz, 5.5 kv cm^{-1}	21.1	0.0
	Düz -3.0 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	0.0	0.0
SONİKASYON SONRASI	Düz Form	50.1	0.5
	Düz -1.5 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	35.2	0.2
	Düz-1.5 kHz, 5.5 kv cm^{-1}	34.5	0.4
	Düz -3.0 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	46.8	0.5
SONİKASYON+ LİZOZİM SONRASI	Düz Form	68.2	1.6
	Düz-1.5 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	55.6	1.4
	Düz -1.5 kHz, 5.5 kv cm^{-1}	80.9	2.0
	Düz -3.0 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	47	1.0
SONİKASYON+ LİZOZİM+ SDS SONRASI	Düz Form	97.0	1.7
	Düz-1.5 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	68.0	1.6
	Düz-1.5 kHz, 5.5 kv cm^{-1}	99.6	1.9
	Düz -3.0 kHz, 5.0 kv cm^{-1}	68.8	1.4

Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere DNA ve protein içeriğinin en yoğun olduğu aşama sonikasyon+lizozim+SDS sonrası'dır. Düz form *Spirulina*'nın (3.0 kHz sonikasyon hızı ve 5.0 kv cm^{-1} elektriksel alan uygulanmıştır) ilk ölçümlerde (herhangi bir işlem uygulanmadan önceki durum) DNA içeriği 0 olarak bulunmuştur.

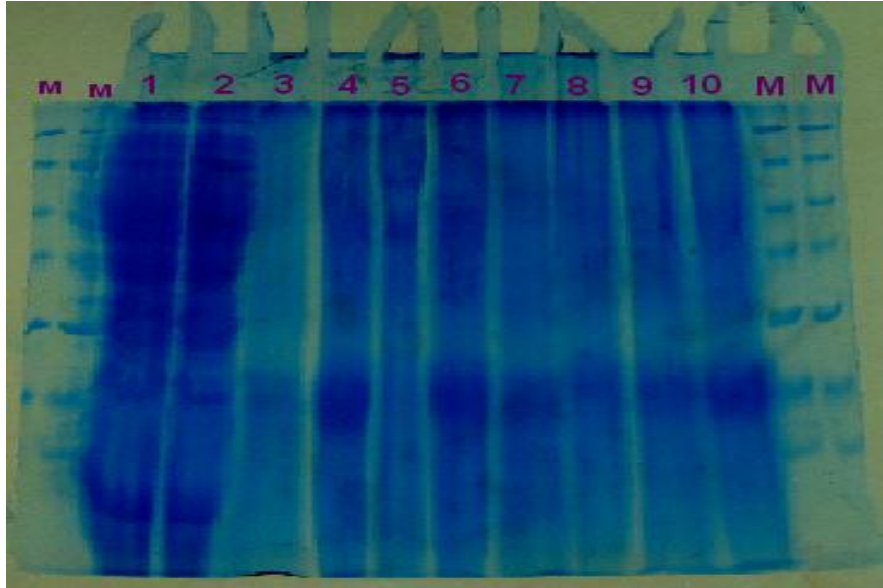
Çizelge 4.4. Spiral form *Spirulina* için uygulanan protein eldesi yönteminde farklı aşamalarda elde edilen süpernatant kısımlardaki DNA ve proteinlerin spektrofotometrik ölçüm sonuçları (DNA: A_{260nm}; protein: A_{280nm})

	ÖRNEKLER	DNA (µg/ml)	PROTEİN (mg/ml)
İLK ÖLÇÜMLER (Doğal spontan lizis)	Spiral Form	9.4	0.0
	Spiral, 1.5 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	8.8	0.0
	Spiral, 3.0 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	6.1	0.0
	Spiral, 3.0 kHz, 5.0 kv cm ⁻¹	9.4	0.0
SONİKASYON SONRASI	Spiral Form	43.8	0.3
	Spiral, 1.5 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	34.4	0.2
	Spiral, 3.0 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	41.2	0.3
	Spiral, 3.0 kHz, 5.0 kv cm ⁻¹	41.4	0.2
SONİKASYON+ LİZOZİM SONRASI	Spiral Form	63.3	1.7
	Spiral, 1.5 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	48.8	0.8
	Spiral, 3.0 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	50.2	1.0
	Spiral, 3.0 kHz, 5.0 kv cm ⁻¹	54	1.5
SONİKASYON+ LİZOZİM+ SDS SONRASI	Spiral Form	83.4	1.9
	Spiral, 1.5 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	78.6	2.0
	Spiral, 3.0 kHz, 6.0 kv cm ⁻¹	71.4	1.5
	Spiral, 3.0 kHz, 5.0 kv cm ⁻¹	77.3	1.7

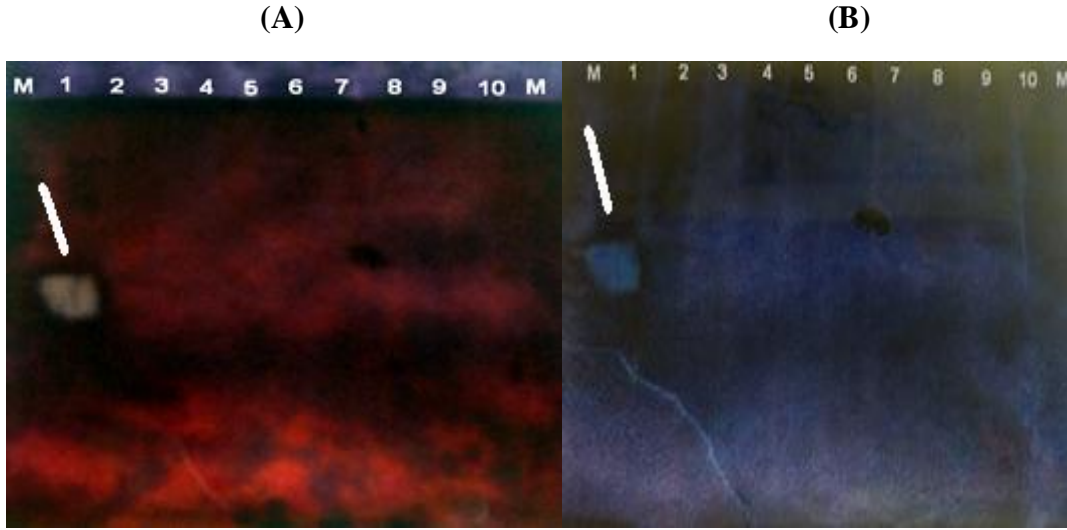
Çizelge 4.4’de görüldüğü üzere DNA ve protein içeriğinin en yüksek olduğu aşama sonikasyon+lizozim+SDS sonrasıdır.

Protein eldesi farklı 3 yöntem ile elde edilmiştir. I. yöntemde sonikasyon sonrası 4950 dev/dk’da örnekler çöktürülmüş ve süpernatant kısım % 20 v/v TCA ile muamele edilmiştir. II. yöntemde sonikasyon sonrası süpernatant kısma lizozim (10 mg/ml) ilave edilerek 37°C’de 1 saat bekletildikten sonra 4950 dev/dk’da örnekler çöktürülmüş ve süpernatant kısım % 20 v/v TCA ile muamele edilmiştir. III: yöntemde lizozim sonrası süpernatant içine son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde SDS ilave edilerek tekrar 37°C’de 1 saat bekletildikten sonra 4950 rpm’de örnekler çöktürülmüş ve süpernatant kısım % 20 v/v TCA ile muamele edilmiştir. Her üç

yöntemde de örnekler 1M Tris (pH: 8.0) ile çözülmüş ve SDS-PAGE işlemi uygulanmıştır. SDS-PAGE analizi 3.2.7’de verilen protokole göre yapılmıştır. Sonuçta *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteinler zymogram analizi sonucu aktif bant oluştururken, *Spirulina* intraselüler proteinlerinin zymogram analizlerinde böyle bir aktif banda rastlanmamıştır (Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17). Ayrıca *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisinden izole edilen likenaz geni büyüklüğünün 25 kDa olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).



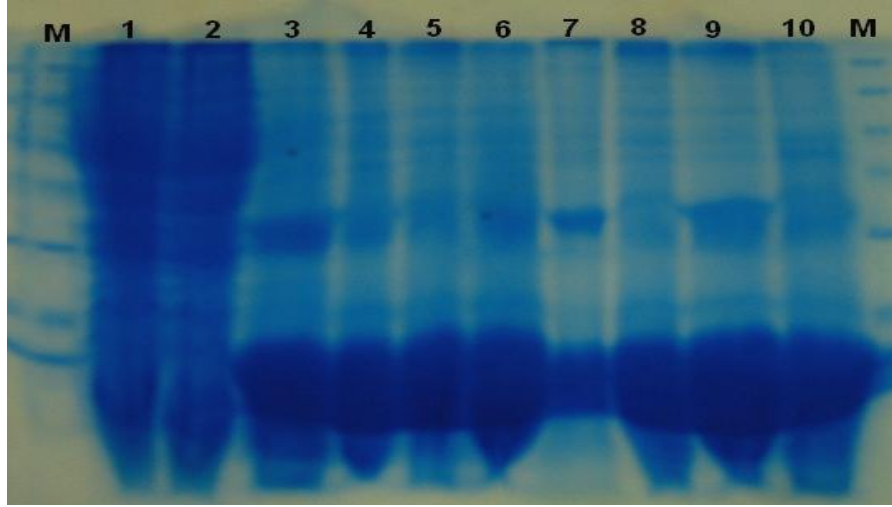
Şekil 4.12. Yalnızca Sonikasyon işlemi uygulanan değişik organizmalara ait protein profillerinin SDS-PAGE’de karşılaştırılması
(M: Marker, 1: *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteinler, 2: *E.coli*/pBR325 intraselüler proteinler, 3: Spiral form *Spirulina* intraselüler protenler, 4,5 ve 6: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler, 7: Düz form *Spirulina* intraselüler proteinler, 8,9 ve 10: Düz form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler)



Şekil 4.13. Değişik organizmaların (yalnızca sonikasyon işlemi uygulanmıştır) SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması, **A:** SDS-Likenan-PAGE’in kongo kırmızısı ile boyanması. **B:** SDS-Likenan-PAGE’in kongo kırmızısı ile boyanması sonrasında Coomassie Blue ile boyanması. β -(1,3-1,4)-glukanaz aktif zymogram bandı beyaz çizgi ile gösterilmiştir.

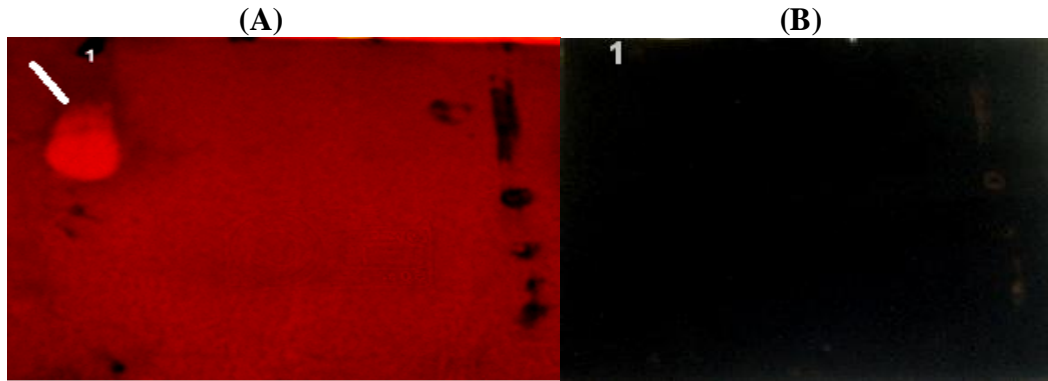
(**M:** Marker, **1:** *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteinler, **2:** *E.coli*/pBR325 intraselüler proteinler, **3:** Spiral form *Spirulina* intraselüler proteinler, **4,5 ve 6:** Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler, **7:** Düz form *Spirulina* intraselüler proteinler, **8,9 ve 10:** Düz form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler).

Şekil 4.13.’de görüldüğü üzere yalnızca 1 numaralı (beyaz çizgi ile gösterilmiştir) *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisine ait intraselüler proteinin SDS-PAGE profilinde aktif bant gözlenirken, *Spirulina*/pBR325SLik türlerine ait proteinlerin SDS-PAGE profillerinde aktif bant gözlenmemiştir.



Şekil 4.14. *Spirulina*/pBR325SLik rekombinant organizmaların sonikasyon+ lizozim (10 mg/ml) + TCA ile muamelesi sonrası protein profillerinin SDS-PAGE’de görüntüsü

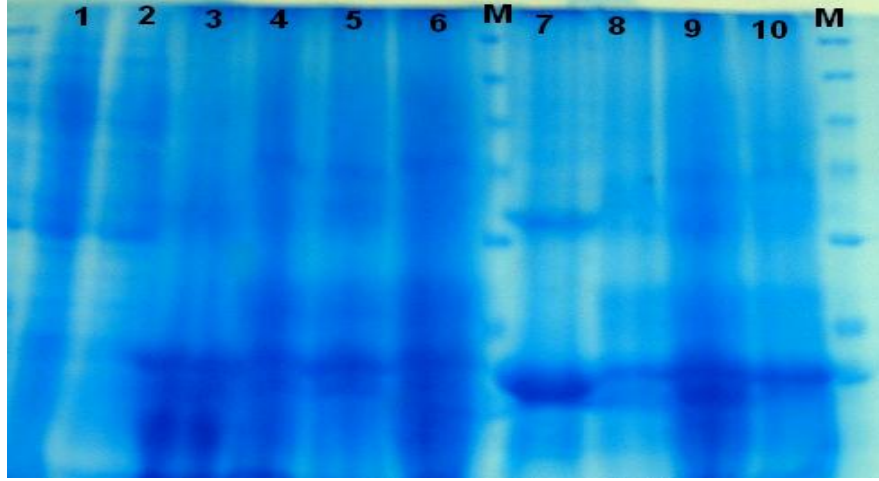
(M: Marker, 1: *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteinler, 2: *E.coli*/pBR325 intraselüler proteinler, 3: Düz form *Spirulina* intraselüler proteinler, 4,5 ve 6: Düz form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler, 7: Spiral form *Spirulina* intraselüler proteinler, 8,9 ve 10: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler)



Şekil 4.15. *E. coli*/pBR325SLik, *E.coli*/pBR325, orijinal düz ve spiral form *Spirulina*’lar ile rekombinant düz ve spiral *Spirulina*’ların (sonikasyon+lizozim işlemleri uygulanmıştır) SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması **A:** SDS-Likenan-PAGE’in Kongo kırmızısı ile boyanması. **B:** SDS-Likenan-PAGE’in kongo kırmızısı ile boyanması sonrasında Coomassie Blue boyası ile boyanması

1: *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteini

Şekil 4.15’de görüldüğü üzere yalnızca 1 numaralı (beyaz çizgi ile gösterilmiştir) *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisine ait intraselüler protein SDS-PAGE profilinde aktif bant gözlenmiştir.

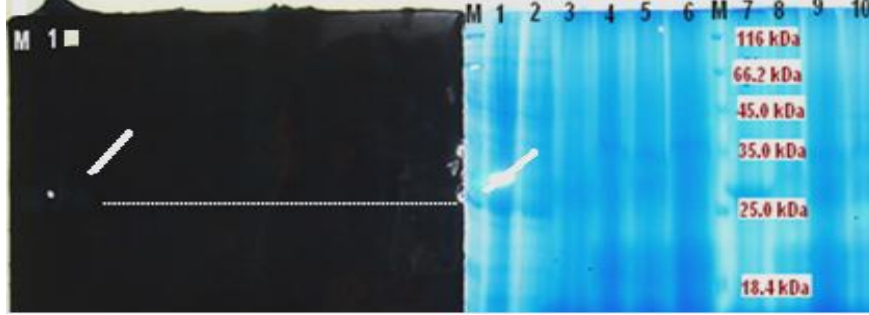


Şekil 4.16. *Spirulina*/pBR325SLik rekombinant organizmaların sonikasyon+ lizozim (10mg/ml) + SDS (% 1) ve % 20 v/v TCA ile muamelesi sonrası protein profillerinin SDS-PAGE’de görüntüsü (M: Marker, 1: *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteinler, 2: *E.coli*/pBR325 intraselüler proteinler, 3: Düz form *Spirulina* intraselüler proteinler, 4,5 ve 6: Düz form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler, 7: Spiral form *Spirulina* intraselüler proteinler, 8,9 ve 10: Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik intraselüler proteinler



Şekil 4.17. *E. coli*/pBR325SLik, *E.coli*/pBR325, orijinal düz ve spiral form *Spirulina*’lar ile rekombinant düz ve spiral *Spirulina*’ların (sonikasyon+lizozim+SDS işlemleri uygulanmıştır) SDS-Likenan-PAGE’de renatürasyon sonrası likenaz aktivitesi bakımından karşılaştırılması **A:** SDS-Likenan-PAGE’in kongo kırmızısı ile boyanması. **B:** SDS-Likenan-PAGE’in kongo kırmızısı ile boyanması sonrasında Coomassie Blue boyası ile boyanması **1:** *E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteini

Şekil 4.17’de görüldüğü üzere yalnızca 1 numaralı (beyaz çizgi ile gösterilmiştir) *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisine ait intraselüler protein SDS-PAGE profilinde aktif bant gözlenmiştir.



Şekil 4.18. SDS-Likenan-PAGE’in Congo-red ile boyanması sonrasında Coomassie Blue ile boyanması ve aktivite gözlenen *E.coli*/pBR325SLik rekombinant bakterisine ait likenaz enzim geni büyüklüğünün marker ile karşılaştırmalı tespiti (aktif bant beyaz çizgi ile gösterilmiştir)

Protein ekspresyonu varlığını test etmek için farklı bir yaklaşım olarak sonikasyon sonrası, sonikasyon+lizozim sonrası ve sonikasyon+lizozim+SDS sonrası elde edilen süpernatant kısımların % 70 v/v etilalkol ile çöktürülmesi sonucu elde edilen proteinler, sodyum-fosfat tamponu (pH: 6.5), % 0.1 w/v likenan ve % 1.5 w/v agar’dan oluşan katı besi yerinde açılan oluklar içirisine alınarak ve 1 gece 37°C’de bekletilmiş ve % 2 kongo kırmızısı + 5mM NaOH boyası ile boyanmıştır (Şekil 4.19). Boyama sonucunda az miktarda likenaz aktivitesi gözlenmiştir (lizozim aşaması sonrası aktivite gözlenmiş fakat fotoğrafa yansımamıştır) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *Spirulina*/pBR325SLik için likenaz enzim aktivitesinin belirlenmesi (Spiral form *Spirulina*/pBR325SLik- 1.5 kHz sonikasyon değeri ile 6.0 kV cm⁻¹ elektriksel alan değeri uygulanmıştır (A: Sonikasyon+% 70 etilalkol, B: Sonikasyon+lizozim+% 70 etilalkol, C: Sonikasyon+lizozim+SDS+% 70 etilalkol sonrası proteinleri)

4.2. Tartışma

Hayvan besleme açısından önemli enzimlerden biri olan β -(1,3-1,4)-glukanaz (likenaz) enzimi tahılların endosperm hücre duvarında bulunan β -glukanları hidrolize ederek sindirimi artırmaktadır. Böylece yem hammaddelerinin içinde bulunan β -glukanların fazlalığı nedeniyle oluşabilecek, fizyolojik rahatsızlık olarak bilinen yapışkan dışkı olayını önlemektedir. Bu nedenle hayvan beslemede likenaz enzimi yem katkısı olarak büyük öneme sahiptir.

Streptococcus bovis JB1'e ait β -(1,3-1,4)-glukanaz geni *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus faecalis* bakterilerinde klonlanıp eksprese edilmiştir (Ekinci ve ark., 1997). Ayrıca Likenaz geninin subklonlama ile *E. coli-Bacillus* sp. mekik vektörü pMK3'e ligasyonu yapılmış ve geliştirilen rekombinant plazmid pMK3Lik, önce ara konakçı *E. coli*, daha sonra da *Bacillus coagulans*'a aktarılmıştır (Aşan ve Özcan, 2007). Bu çalışmada, likenaz enziminin ekonomik üretilmesine farklı bir yaklaşım olarak bu enzim geninin *S. platensis*'e aktarımı düşünülmüştür. *S. platensis*'e ait serin esteraz geni daha önce pPLc2833 vektörü ile *E.coli* HB101'de klonlanmış ve DNA baz dizileri okunarak yayınlanmıştır (Salvi ve ark., 1994). Şu ana kadar serin esteraz geninden hariç *S. platensis*'e pHSG399 plazmidi (Toyomizu ve ark., 2001), Tn5 transpozon-transpozoz-lipozom kompleksi (Kawata ve ark., 2004) ile pBR325SL (serin esteraz ve lizozim genleri takılı) (Baylan, 2007) elektroporasyon tekniği kullanılarak aktarılabilmektedir. Bu çalışmada *Streptococcus bovis* JB1 kromozomundan izole edilen likenaz enzim geni ve *Spirulina* kromozomundan izole edilen serin esteraz (plazmidin *Spirulina* kromozomuna entegre olabilmesi için) enzim genlerinin pBR325 plazmidine takılması ile oluşturulan rekombinant pBR325SLik entegratif plazmidi *S. platensis*'e aktarılmıştır. pBR325SLik vektörünü taşıyan *S. platensis* gerek antibiyotik içeren gerekse antibiyotik içermeyen sıvı *Spirulina* ortamında fenotipik olarak test edilmiştir. Cm'lü sıvı besi ortamında pBR325SLik vektörünü almış olan *S. platensis*'ler ürerken, vektör aktarılmamış olan kontrol grubu ürememiş fakat kontrol antibiyotiksiz besi ortamında ise üremiştir. Rekombinant *Spirulina*'lardan kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Likenaz enzim gen bölgesi içinde 666 bp uzunluğunda bölgeyi çoğaltabilecek primerler hazırlanmıştır ve bu primerler

kullanılarak *S. platensis*/pBR325SLik genomunda likenaz enzim geni varlığı belirlenmiştir. Bu sonuç pBR325SLik vektörünün başarıyla *Spirulina platensis* kromozomuna entegre olduğunu göstermiştir. pBR325SLik vektörünün *S. platensis*'e elektroporasyon çalışmalarında 5.0 kv cm⁻¹ de ve 6.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerleri ile 1.5 kHz ve 3.0 kHz sonikasyon hızlarında başarılı olunmuştur. Daha önce 2-12 kv cm⁻¹ arasındaki elektriksel alan değerleri kullanılarak *S. platensis*'e yapılan elektroporasyon çalışmalarında, 4-6 kv cm⁻¹ de en iyi sonuç verdiği belirtilirken sonikasyon hızı konusunda herhangi bir değer belirtilmemiştir (Toyomizu ve ark., 2001). Kullanılan değerlerin Toyomizu ve ark. (2001) tarafından yapılan elektroporasyon çalışmalarında kullanılan değerler ile benzerlik göstermesi sonikasyon hızlarının da uyumlu olabileceğini akla getirmektedir. Ancak diğer araştırmacılar tarafından kullanılan sonikasyon hızı belirtilmediğinden bu konuda net bir karşılaştırma yapma imkanına sahip bulunulmamaktadır. Bunun dışında sonikasyon işleminde kullanılan başlık çapının da sonikasyon şiddetini etkilediği, küçük çaplı başlıkların yoğun bir enerji yarattığı fakat enerjinin yayıldığı alanın daraldığı, buna karşılık büyük çaplı başlıkların daha küçük bir enerji yarattığı fakat enerjinin yayıldığı alanın daha genişlediği belirtilmiştir (Goodwin, 1990; Delikara, 2006).

2004 yılında yapılan bir çalışmada transformant *S. platensis*'lerin katı besi ortamında ancak iki ayda gelişimini tamamladığı bildirilmiş, fakat sıvı besi yerinde gelişimi konusunda herhangi bir şey belirtilmemiştir (Kawata ve ark., 2004). Test etmek amacıyla sıvı besi yerinde üreyen transformant *S. platensis* hücreleri Cm içeren katı *Spirulina* ortamına alınmış ve 3 hafta sonunda gelişimlerinin sıvı besi yerine oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca düz form rekombinant *Spirulina* hücrelerinin gelişimlerinin spiral form rekombinant *Spirulina* hücrelerinin gelişimlerine oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Daha önceki çalışmalarda *S. platensis* hücrelerine elektroporasyonda kullanılan vektörler lineer hazırlanmıştır (Toyomizu, 2001; Baylan, 2007). Bu çalışmada, vektör lineer aktarıldığında elektroporasyon sonrası vektörün uç kısımlarında enzimatik parçalanma meydana gelebileceği ve transformasyon etkinliğini düşürebileceği düşüncesiyle plazmidler halkasal olarak aktarılmıştır.

Likenaz geninin hücre içi sitoplazmik ekspresyonunu belirlemek için, transformant *Spirulina* hücrelerinden 3 farklı yöntemle protein izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. A_{260nm}/A_{280nm} okumaları sonucu en fazla DNA içeriğinin sonikasyon+lizozim+SDS aşaması sonrası gözlemlendiği bulunmuştur. Fakat SDS'in proteinleri denatüre etkisi göz önünde bulundurulmuştur. SDS-PAGE analizi sonucunda ise pozitif kontrol grubu (*E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteini) dışında diğerlerinde likenaz enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Likenaz enzim aktivitelerinin tespit edilememe sebebinin, genin bu *Spirulina*'larda çok düşük miktarda eksprese olduğu (likenaz genine ait promotor diziler muhtemelen *Spirulina*'larca zayıf transkribe edilmesi) ya da genin eksprese olarak enzim üretimini gerçekleştirdiği fakat bu *Spirulina*'larda bulunan proteolitik aktiviteden etkilendiği düşünülmüştür. Bir bakteri içerisine giren yabancı genlerin ekspresyonu ile üretilen rekombinant enzimler, hücre içerisinde katlanmaları esnasında, konukçu bakterinin hücre duvarında bulunan proteaz enzimlerince proteolitik aktiviteye maruz kalarak parçalanmasının doğal bir sonuç olduğu daha önce bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Schallmey ve ark., 2004; Rozkov, 2001; Braun ve ark., 1999). Fakat enzimin az eksprese olma ihtimalinin (kromozoma entegrasyon sonrası tek kopyalı olmasından dolayı) çok daha yüksek olduğu düşünülmüştür. Rekombinant *Spirulina*'larda enzim aktivitesine rastlanılamamasının bir diğer sebebi olarak, enzim aktivitesinde önemli bir rol oynayan uygun protein katlanmasının gerçekleşmemiş olabileceği de düşünülebilir. Zira enzimler sentezlendikten sonra uygun katlanmayı yaparak üç boyutlu yapısını kazanır ve fonksiyonel hale geçerler (Roder ve ark., 2003; Cooper, 1997). Fakat zymogram analizleri böyle bir ihtimalin bulunmadığını göstermiştir. Ayrıca proteinin az transkribe olduğu veya protein sentezinin yeterli olmadığı da düşünülebilir. Zira elde edilen proteinlerin sodyum-fosfat tamponu (pH: 6.5)+ % 0.1 w/v likenan ve % 1.5 w/v agar ile hazırlanan besi yeri içindeki kuyucuklara alınıp boyaması yapıldıktan sonra az oranda yalnızca spiral form *Spirulina*'dan (1.5 kHz sonikasyon hızı ve 6.0 kV cm⁻¹ elektriksel alan uygulanmıştır) elde edilen proteinde likenaz aktivitesi gözlenmiştir. Bu sonuç vektörün kromozoma entegre olması ve tek kopyalı olmasından dolayı proteinlerin diğer doğal *Spirulina* proteinlerine oranla son derece az üretildiğini göstermektedir.

Ortama SDS konulduğunda ise söz konusu bu aktivitenin yitirildiği gözlenmiştir (Şekil 4.19).

Besinsel içeriği yüksek olan *Spirulina*'dan yüksek verim elde edilmesi için genetik mühendisliği tekniklerinin *Spirulina* üzerinde uygulanmasında karşılaşılan en büyük problemlerden birisi klonlama vektörü yetersizliğidir. Bilgilerimize göre bu çalışma ile ilk kez pBR325 vektörünün pBR325SLik haline dönüştürülmesiyle likenaz geninin elektroporasyon metoduyla başarılı bir şekilde spesifik kromozom bölgesine (serin esteraz) geni homolog crossing over ile aktarılabileceği gösterilmiştir.

Yabancı (heterologous) proteinlerin *Spirulina*'da entegratif vektörlerle kromozoma aktararak ekonomik seviyede üretilmesinin ancak uygun promotör seçimi ile veya tandem gen organizasyonu ile mümkün olduğu sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Yapılan bu çalışma ile pBR325SLik (Kromozoma entegrasyonu sağlanması için *Spirulina*'ya ait serin esteraz geni ve *Streptococcus bovis* JB1 suşuna ait likenaz geni takılı) entegratif vektörü halkasal olarak elektroporasyon yolu ile *S. platensis* hücrelerine aktarılmıştır. pBR325SLik vektörünü taşıyan *S. platensis* gerek antibiyotik içeren gerekse antibiyotik içermeyen sıvı *Spirulina* ortamında fenotipik olarak test edilmiş, pBR325SLik vektörünü almış olan farklı elektriksel alan ve sonikasyon hızı uygulanmış olan *S. platensis*'lerin Cm'lü sıvı besi ortamında ürettiği, buna karşılık vektör aktarılmamış olan kontrol grubu *S. platensis*'lerin Cm'lü besi ortamında üremezken, antibiyotiksiz besi ortamında ise ürettiği gösterilmiştir.

2. Sıvı kültürden katı kültüre alınan *Spirulina*/pBR325SLik organizmalarından yaklaşık 20 gün sonra fenotipik olarak en iyi üremenin düz form rekombinant *Spirulina*'larda olduğu gözlenmiştir.

3. Fenotipik olarak Cm içeren besi yerinde ürettiği test edilen *S. platensis* hücrelerinden kromozomal DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra uygun primerler kullanılarak PZR hazırlanmış ve % 0.8 w/v agaroz jel kontrolünde ise fenotipik test sonucu rekombinant olduğu belirlenen 6 *Spirulina* hücre DNA'larından yalnızca 2 tanesinde (3.0 kHz sonikasyon hızı ile 5.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı düz form *Spirulina*/pBR325SLik ve 1.5 kHz sonikasyon hızı ile 6.0 kv cm⁻¹ elektriksel alan değerlerinin uygulandığı spiral form *Spirulina*/pBR325SLik) likenaz gen bandı gözlenmiştir.

4. Transformant *S. platensis* hücrelerinden protein izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. Analiz sonucunda ise yalnızca pozitif kontrolde (*E.coli*/pBR325SLik intraselüler proteini) likenaz aktivitesi gözlenmiştir. Protein analizi için katı besi yeri çalışması sonucunda ise vektörün entegrasyon sonucu tek kopyalı olması ve *Spirulina* hücrelerinin yaklaşık 20 gün gibi uzun sürede üremelerinden dolayı proteinin az eksprese olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen bu bulgular değerlendirilerek *S. platensis* üzerinde önemli genetik çalışmaları yapılabilir. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- A:** *S. platensis*'in yüksek DNaz içeriği nedeniyle transformasyon etkinliğinin düşük olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, DNaz aktivitesini engellemek için EDTA kullanılmıştır. DNaz aktivitesini engellemek için daha etkili bir yöntem bulunabilir.
- B:** pBR325SLik'in *Spirulina* hücrelerine elektrotransformasyonunun başarılı olduğunun gösterilmesi ile pBR325 vektörünün ileride mavi yeşil algler üzerine uygulanacak genetik çalışmaları için uygun olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca pBR325 vektörünün *Spirulina*'ya gen aktarımı için yeni modifiye vektör tasarlanması çalışmalarına öncülük edebileceği akla gelmektedir.
- C:** Elektrotransformasyonun başarısının test edilmesi için pBR325 vektörüne serin esteraz geni yerine entegrasyonun sağlanması açısından yine *Spirulina* kromozomuna ait olan gen takılarak yeni bir deneme kurulabilir.
- D:** Ayrıca likenaz geninin *Spirulina* hücrelerinde eksprese olmamasının nedeninin bu genin orijininin kaynaklanıp kaynaklanmadığını tespit etmek için başka bir mikroorganizma (bakteriyel) kaynaklı likenaz genini *S. platensis*'e aktararak bu organizmada ekspresyonu araştırılabilir.
- E:** Diğer mikroorganizmalar için kullanılan uygun vektörlere *S. platensis* kromozomal DNA'sına ait replikasyon orijini bölgesi takılarak, bu mikroorganizmalarla *S. platensis* arasında mekik vektörleri geliştirilebilir.
- F:** Dünyanın birçok ülkesinde hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı yasaklanmaktadır. *Spirulina* enfeksiyonlara karşı bağışıklık sistemini güçlendirerek dolaylı yoldan antibiyotik kullanımını azaltacaktır. İçeriğindeki fikosiyenin pigmenti ile bağışıklık güçlendirici olarak kullanımı mümkündür. *S. platensis*'in biyolojik değerini artıracak diğer enzim genleri klonlanarak yeni rekombinant *S. platensis* hatları geliştirilebilir.

G: *Spirulina*/pBR325SLik rekombinant organizmaları için protein ekspresyonu iyice araştırılmalıdır. Transkripsiyon aydınlatılmalıdır (DNA transkribe oluyor fakat translasyonda sorun meydana geliyor olabilir).

KAYNAKLAR

- ANONİM, 2006. <http://www.arabidopsis.org/ais/images/vol22/vol22-pg2-fig1.gif>. (04/01/2009).
- APIRADEE, H., KALYANEE, P., PONGSATHON, P., PATCHARAPORN, D., MATURA, S., SANJUKTA, S., SUPAPON, C. and MORAKOT, T., 2004. The expression of three desaturase genes of *Spirulina platensis* in *Escherichia coli* DH5 α . *Molecular Biology Reports*, 31: 177-189.
- AŞAN, M., 2002. Genetik mühendisliği teknikleri ile yem katkısı kanatlı probiyotiklerinin oluşturulması. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- AŞAN, M., ÖZCAN, N., 2007. Expression of the β -(1,3-1,4)-glucanase gene in *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*, 31(5): 319-324.
- BAYLAN, M., 2007. *Spirulina platensis* (Cyanophyta)'e gen aktarımı üzerine bir araştırma. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- BECKER E., VENTKATERAMAN, L.V., 1981. *Biotechnology and Exploitation of Algae- The Indian Approach-* Edited by R.D. Fox, All Indian Coordinated Project on Algae Dep. of Science and Tech., India.
- BINI, F., ROSSI, E., BARBIERATO L., and RICCARDI, G., 1992. Molecular cloning and sequencing of the β -isopropylmalate dehydrogenase gene from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of General Microbiology*, 138, 493-498.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, J., 1979. A rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BOURRELLY, R., 1970. *Les algues d'eau douce*. Tome 3, 1970, Algues bleues et rouges: 1-522 Edit Boubee' Paris.
- BRAUN, P., GERRISTE, G., VAN DIJL, J.K., and QUAX, W.J., 1999. Improving Protein Secretion by Engineering Components of the Bacterial Translocation Machinery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(4): 376-381.

- BUTTARELLI, F.R., CALOGERO, R.A., TIBONI, O., GUALERZI, C.O., PON, C.L., 1989. Characterization of the str operon genes from *Spirulina platensis* and their evolutionary relationship to those of other prokaryotes. *Mol.Gen. Genet.* 217: 97-104.
- CAO, J., XU, Z., QUI, G., LI, B., 1999. Studies on sensitivity of *Spirulina platensis* to antibiotics and herbicide: relationship with selectable markers for genetic transformation. *Bioresource Technology*, 70:89-93.
- CHALLEM, J.J., 1981. *Spirulina*, A Good Health Guide. ISBN 0-87963-262-2. New Canaan, CT. USA.
- CIFFERI, O., 1983. Mutants, genes and phylogeny of *Spirulina platensis*, algae of life, *Bulletin de L'Institut Oceanographique*, no: 12, Monaco.
- CONK DALAY, M., 1997. İzole Edilmiş *Spirulina* sp.'nin Kültür Ortamlarında Yetiştirilmesi ve Besin Kalitesi Değişimleri Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- COOPER, G.M., 1997. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C., U.S.A., 676s.
- DELİKARA, B., 2006. *L. Monocytogenes*'in Sonikasyonla İnaktivasyonuna Farklı Amplitüd, pH ve Sıcaklığın Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- DURMAZ, R., 1995. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Teknolojisi ve Mikrobiyolojide Kullanımı. *Tükiye Microbiol Bült.*, 29: 304-311.
- EKİNCİ, M.S., MCCRAE, S.I., and FLINT, H.J., 1997. Isolation and Overexpression of a Gene Encoding an Extracellular β -(1,3-1,4)-Glucanase from *Streptococcus bovis* JB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3752-3756.
- FEDKOVIC, Y., 1993. *Spirulina* et Cancer, *Algae of Life*, *Bulletin de L'Institut Océanographique*, No:12, Monaco.
- FOX, R.D., 1983. *Algaculture, The Microalgae Spirulina (Cyanophyceae)*, A Study of the Conditions Necessary for Their Growth, *These de Doctorat*, France.
- FOX, R.D., 1993. Health Benefits of *Spirulina* and Proposal for as Nutrition test on Children Sufferin from Kwashiorkor and Marasmus, *Algae of Life*, *Bulletin de L'Institut Océanographique*, No:12, Monaco.

- FOX, R. D., 1996. Pub. By Editions Edisud, La Calade, R.N.7, 13090 Aix-en-Provence, FRANCE.
- GODFREY, T., 1983. Industrial Enzymology. (T. GODFREY and J. REINCHELT eds.), McMillion, LONDON, s. 466.
- GOODWIN, T.J., 1990. The Uses of Ultrasound in Chemistry. Elsevier Applied Science. (Ed: Mason, T.J.) 28:159-187.
- HENRIKSON, R., 1993. Mikroalga *Spirulina* Oikos Pharmaceuticals, C/San Pedro, 29640 Fuengirola, Malaga Costa del Sol, SPAIN.
- HENRISSAT, B., 1991. A Classification of Glycoside Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities. *Biochem. J.*, 280: 309-316.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A., 1993. New Families in the Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Similarities. *Biochem. J.*, 293: 781-788.
- HENRISSAT, B., BAIROCH, A., 1996. Updating the Sequence-based Classification of Glycosyl Hydrolases. *Biochem. J.*, 316: 695-696.
- HERRIN, D. L., LA CLAIRE II, J. W., 1997. Co-Isolation of high-quality DNA and RNA from coenocytic green algae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15:263-272.
- JINJIE, L., XUECHENG, Z., ZHENGHONG, S., YUNXIANG, M., XUE, S., 2004. Cloning, Sequencing and phylogenetic study of *rbcL* gene from cyanobacteria *Arthrospira* and *Spirulina*. *High Technology Letters*, 10 (1): 76-79.
- KASAHARA, M., YASHIRO, K., SAKAMOTO, T. and OHMORI, M., 1997. The *Spirulina platensis* Adenylate Cyclase Gene, *cyaC*, Encodes a Novel Signal Transduction Protein. *Plant Cell Physiol*, 38(7): 828-836.
- KAWATA, Y., YANO, S., KOJIMA, H., 1998. Efficient library construction with a TA vector and its application to cloning of the phytoene synthase gene from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Current Microbiology*, 37:289-291.
- KAWATA, Y., YANO, S., KOJIMA, H., MASAOKI, T., 2004. Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira sp.* PCC9438) with Tn5

- transposase-transposon DNA-cation liposome complex. *Marine Biotechnology*, 6:355-363.
- KAWAMURA, M., SAKAKIBARA, M., WATANABE, T., KITA, K., OBAYASHI, A., TAKAGI, M. and YANO, K., 1986. A new restriction endonuclease from *Spirulina platensis*. *Nucleic Acids Research*, 14,5: 1985-1989.
- KIM, J.Y., KIM, H.B., and LEE, D.S., 2002. Cloning and Expression of the *Bacillus circulans* Endo- β -1,3-1,4-glucanase Gene (*bglBC1*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 24: 53-57.
- KOKSHAROVA, O. A., WOLK, C. P., 2002. Genetic tools for cyanobacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58:123-137.
- KORU, E., CİRİK, S., 2003. *Spirulina platensis* (Cyanophyceae) Mikroalg'inin Büyümesine ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerine Sıcaklığın Etkisi. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 20:419-422.
- KURDRID, P., SUBUDHI, S., HONGSTHONG, A.,RUENJITCHATCHAWALYA, M. and TANTICHAROEN, M., 2005. Functional expression of *Spirulina*- $\Delta 6$ desaturase gene in yeast, *Saccharomyces cerevisie*. *Molecular Biology Reports*, 32: 215-226.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LI, D. M., QI, Y. Z., 1997. *Spirulina* Industry in Chine: Present status and future prospects . *Journal of applied Phycology*, 9:25-28.
- LI, Z.Y., GUO S. Y., LI L., 2005. Study on the Process, Thermodynamical Isotherm and Mechanism of Cr (III) Uptake by *Spirulina platensis*. *Journal of Food Engineering*, Vol. 75, pp. 129-136.
- LLOBERAS, J., PEREZ-PONS, J.A., and QUEROL, E., 1991. Molecular Cloning, Epression and Nucleotide Sequence of the Endo- β -1,3-1,4-D-Glucanase Gene From *Bacillus licheniformis*. *Eur. J. Biochem.*, 197: 337-343.
- LUI, J., ZHANG, X., SUI, Z., ZHANG, X. AND MAO, Y., 2005. Cloning and characterization of c-phycoyanin operon from the cyanobacterium

- Arthrospira platensis* FACHB341. Journal of Applied Phycology, 17: 181-185.
- LOUW, M.E., and WATSON, S.J.R., 1993. Characterization, Cloning and Sequencing of a Thermostable endo-(1,3-1,4) Beta-glucanase Encoding Gene From Alkalophilic *Bacillus brevis*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 38, 507-513.
- LUI, J., ZHANG, X., SUI, Z., ZHANG, X. AND MAO, Y., 2005. Cloning and characterization of c-phycoyanin operon from the cyanobacterium *Arthrospira platensis* FACHB341. Journal of Applied Phycology, 17: 181-185.
- LYRA, C., HALME, A., TORTI, A.M., TENKANEN, T., SIVONEN, K., 2000. Site-specific restriction endonucleases in cyanobacteria. Journal of Applied Microbiology, 89:979-991.
- MATSUNAGA, T., TAKEYAMA, H. and NAKAMURA, N., 1990. Characterization of cryptic plasmids from marine cyanobacteria and construction of a hybrid plasmid potentially capable of transformation of marine cyanobacterium, *Synechococcus sp.*, and its transformation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 24/25:151-160.
- MEESAPYODSUK, D., REED, D.W., CHEEVADHANARAK, S., DESHNIUM, P., COVELLO, P.S., 2001. Probing the mechanism of a cyanobacterial $\Delta 9$ fatty acid desaturase from *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira sp.* PCC 9438). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 129: 831-835.
- MILANO, A., ROSSI, E., ZANARIA, E., BARBIERATO, L., CIFERRI, O. and RICCARDI, G., 1992. Molecular characterization of the genes encoding acetohydroxy acid synthase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. Journal of General Microbiology, 138, 1399-1408.
- PLANAS, A., 2000. Bacterial 1,3-1,4- β -Glucanases: Structure, Function and Protein Engineering (Review). Biochim. Biophys. Acta, 1543: 361-382.
- PORTER, R. D., 1987. Transformation in cyanobacteria. CRC Critical Reviews in Microbiology, 13(2):111-132.
- RICCARDI, G., ROSSI, E., MILANO, A., FORLANI, G. and FELICE, M., 1991.

- Molecular cloning and expression of *Spirulina platensis* acetohydroxy acid synthase genes in *Escherichia coli*. Archives of Microbiology, 155:360-365.
- RICHMOND, A., 1992. Micro-algal Biotechnology, *Spirulina*, Cambridge University Press, Cambridge.
- RODER, H., CHENG, H., HENSLEY, H.H., LATYPOV, R.F., MAKI, K., SAMUEL, D., WANG, L., and ZHANG, J., 2003. Protein Folding, Structure and Function. Fox Chase Cancer Center 2003 Scientific Report (http://www.fccc.edu/docs/sci_report/Roder.pdf).
- ROZKOV, A., 2001. Control of Proteolysis of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Royal Institute of Technology, Department of Biotechnology, Stockholm,-Sweden.
- SALVI, S., TRINEI, M., LANFALONI, L. and PON, C. L., 1994. Cloning and characterization of the gene encoding an esterase from *Spirulina platensis*. Mol. Gen. Genet., 243: 124-126.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.3-4.15.
- SANANGELANTONI, A. M., CALOGERO, R. C., BUTTARELLI, F. R., GUALERZI, C. O. and TIBONI O., 1990. Organization and nucleotide sequence of the genes for ribosomal protein S2 and elongation factor Ts in *Spirulina platensis*. FEMS Microbiology Letters, 66, 141-146.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. and WARD, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. Can. J. Microbiol., 50: 1-17.
- SESHADRI, C.V., 1992. Some Experiences in *Spirulina* Feeding to Village Children, C.V. and N. Jeeji Bai (eds.) *Spirulina*, ETTA Nat. Symp. MCRC, Madras-INDIA.
- SPELLER, S., DENBEAUX, G., JONES, G., PEARSON, A. L., 2000. Fine structure of Cyanobacteria, *Spirulina platensis* and *Spirulina subsalsa*, as viewed by x-ray microscope, XM-1, beamline 6.1.2.
- STONE, B.A., and CLARKE, A.E., 1992. Chemistry and Biology of 1,3- β -Glucans, La Trobe University Press, Bundoora, Australia.

- TEATHER, R.M., WOOD, P.J., 1982. Use of Congo-red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* (43): 777-780.
- TIBONI, O., PASQUALE, G., CIFERRI, O., 1984a. Cloning and expression of the genes for ribulose-1,5- biphosphate carboxylase from *Spirulina platensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 783 : 258-264.
- TIBONI, O., PASQUALE, G., CIFERRI, O., 1984b. Two tuf genes in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Bacteriology*, July: 407-409.
- TOMASELLI, L., 1987. Physiology of Stres Response in *Spirulina spp.* *Algae of Life*, Bulletin de L'Institut Oceanographique, No: 12, Monaco.
- TOYOMIZU, M., SUZUAKI, K., KAWATA, Y., KOJIMA, H. and AKIBA, Y., 2001. Effective transformation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* using electroporation. *Journal of Applied Phycology*, 13: 209-214.
- WHITE, W.B., SUNDE, M.L., BIRD, H.R., MARLETT, J.A., PRENTICE, N.A., and BURGER, W.C., 1983. Viscosity of β -glucan as a Factor in the Enzymatic Improvement of Barley for Chicks. *Poult. Sci.*, 62: 853-862.
- WU, X., ZARKA, A. and BOUSSIBA, S., 2000. A simplified protocol for Preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Molecular Biology Reporter*, 18:385-392.
- YAMADA, T., 1994. *Cyanobacteria and Algae/Recombinent Microbes for Industrial and Agricultural Applications*, Marcel Dekker. Inc, 701-712.
- YASHIRO, K., SAKAMOTO, T., OHMORI, M., 1996. Molecular characterization of an adenylate cyclase gene of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Molecular Biology* 31:175-181.
- YILDIZ, G., 2001. *Spirulina Sp. (Cyanophyceae) Kültürü Üzerine Araştırmalar*. Yüksek Lisans Tez. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- YONGGING, C., DAXIN, S., XINGGI, H., HONG, J., WANYUAN, A., and WEIJUN, Z., 2005. Subcloning and Fructional Analysis of a *Bacillus subtilis* β -1,3-1,4-glucanase Gene (*bglS*) in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.*, 21(4): 267-271.

- YU, P., LI, J.R. and CEN, P.L., 2002. Cloning and sequencing of the phycocyanin gene from *Spirulina maxima* and its evolutionary analysis. *Journal of Applied Phycology*, 14: 307-310.
- ZHANG, X., ZHANG, X., SHIRAIWA, Y., MAO, Y., SUI, Z. and LIU, J., 2005. Cloning and characterization of *hoxH* genes from *Arthrospira* and *Spirulina* and application in phylogenetic study. *Marine Biotechnology*, 7: 287-296.

ÖZGEÇMİŞ

1983 Adana doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi 23 Nisan İlköğretim Okulunda 1997 yılında, lise öğrenimimi ise Adana Erkek Lisesinde (Süper Lise) 2001 yılında tamamladım. Aynı yıl Gazi Üniversitesi (Ankara) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım ve 2005 yılında aynı bölümden onur öğrencisi olarak mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım. Ç.Ü. Yabancı Diller Eğitim Merkezi'nde 6 ay dil eğitimi sonrası İngilizce muafiyet sınavında başarılı olarak alan derslerime katıldım ve katıldığım Yüksek Lisans derslerimi başarı ile verdim. Tez aşamasında iken 2007-2008 yılı Erasmus öğrencisi olarak, 1 ay İtalya'nın Perugia şehrinde İtalyanca dil eğitimi aldım ve ardından 5 ay İtalya'nın Sardunya adasındaki Sassari Üniversitesinde araştırmalara katıldım, ilgili alanlarda dersler aldım ve aldığım dersleri başarı ile tamamladım.

EKLER

Ek.1 BESİ YERLERİ

Ek 1.1. *Spirulina* Ortamı

Spirulina kültürlerinde kullanılan *Spirulina* ortamının içeriğindeki maddeler aşağıdaki gibidir (www.cyanosite.com).

Ortam-Solüsyon	Madde	Miktar
Part I	NaHCO ₃ (Sodyum bikarbonat)	16.80 g
	Na ₂ CO ₃ (Sodyum karbonat)	8.06 g
	K ₂ HPO ₄ (Potasyum bifosfat)	1.00 g
	Distile su	500.00 ml
Part II	NaNO ₃ (Sodyum nitrat)	5.00 g
	K ₂ SO ₄ (Potasyum sülfat)	2.00 g
	NaCl (Sodyum klorür)	2.00 g
	MgSO ₄ .7H ₂ O (Magnezyum sülfat. 7H ₂ O)	0.40 g
	CaCl ₂ (Kalsiyum klorür)	0.02 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir sülfat. 7H ₂ O)	0.02 g
	Na ₂ EDTA (Sodyum – EDTA)	0.16 g
	Mikro Element Solüsyonu	10.00 ml
	Vitamin Solüsyonu	5.00 ml
	Distile su	500.00 ml
Mikro element Solüsyonu	ZnSO ₄ .7H ₂ O (Çinko sülfat. 7H ₂ O)	0.001 g
	MnSO ₄ .7H ₂ O (Mangan sülfat. 7H ₂ O)	0.002 g
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Sodyum molibdat. 2H ₂ O)	0.01 g
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (Kobalt nitrat. 6H ₂ O)	0.001 g
	CuSO ₄ .5H ₂ O (Bakır sülfat. 5H ₂ O)	0.00005 g
	FeSO ₄ .7H ₂ O (Demir sülfat. 7H ₂ O)	0.7 g
	Na ₂ EDTA (Sodyum EDTA)	0.8 g
	Distile su	1.00 L

Part 2 (500 ml) ortamına 10 ml mikro element solüsyonu ilave edildikten sonra Part 1 (500 ml) ve Part 2 (500 ml) ortamı ayrı ayrı otoklavda steril edilir. Kullanılacağı zaman 2 ortam birleştirilir (1:1) ve *S. platensis*'e besin olarak verilir.

Ek 1.2. LB (Leuria Bertani) Besiyeri

a) Sıvı (1 litre için)

10 gr Bakto tripton

10 gr NaCl

5 gr Yeast ekstraktı

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre için olup, farklı hacimde LB besiyeri hazırlanacaksa bu miktarlar o hacme göre orantılanarak tartılmalıdır. Tartılan kimyasallar manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülerek pH'sı 0.1 M NaOH ile 7.5'e ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanarak erlenlere hacmin 1/10'u olacak şekilde paylaşılır. Erlenin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavlanır. Hazırlanan besi yeri oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir.

b) Katı

Hazırlanan sıvı besi yerine % 1.5 w/v agar ilave edilerek otoklavlanır. Otoklav sonrası elle tutulabilecek sıcaklığa (yaklaşık 48 °C) kadar soğuduktan sonra otoklavlanmış petri kaplarına steril kabin içerisinde paylaşılır. Donduktan sonra streç filmle sarılarak +4 °C'de muhafaza edilir. Antibiyotik ilave edileceği zaman, son konsantrasyon dikkate alınarak, besi yeri petri kaplarına paylaşılmadan hemen önce ilave edilerek karıştırılır ve beklemeden paylaşırma yapılır.

Ek 2. SOLÜSYONLAR

Ek 2.1. TNE Solüsyonu

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

100 mM NaCl

1 mM EDTA (pH 8.0)

İstenen hacim için gerekli Tris, NaCl ve EDTA (Ek 2.11.) hesaplanarak stoklarından alınır, saf su ile istenilen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra kullanılır. +4 °C'de muhafaza edilmelidir.

Ek 2.2. Lizozim Solüsyonu (5 mg/ml)

50 mM Glukoz

10 mM EDTA (pH: 8.0)

25 mM Tris (pH: 8.0)

Önce 25 ml 1 M glukoz hazırlanarak steril filtreden geçirilir ve stok olarak saklanır. İstenen hacimdeki solüsyon için gerekli Tris (Ek 2.10.), EDTA (Ek 2.11.) ve glukoz hesaplanarak stokdan alınır ve saf su ile hacme tamamlanır. Otoklav yapılmaz, buz dolabında saklanır. Kullanılacağı zaman istenen hacimde solüsyon alınarak 5 mg/ml olacak şekilde liyofilize lizozim tartılarak eklenir ve iyice vortekslenir. Kullanılıncaya kadar buz üzerinde tutulmalıdır. Her zaman taze hazırlanması gerektiği için fazlası dökülür.

Ek 2.3. SDS Solüsyonu

0.2 M NaOH

% 1 SDS (w/v)

10 ml için; 0.08 gr NaOH ve 0.1 gr SDS tartılarak üzerine 10 ml steril saf su ilave edilir. Vortekslenerek iyice homojenize edilir. Kullanılıncaya kadar buz üzerinde tutulmalıdır. Her zaman taze hazırlanması gerektiği için fazlası dökülür.

Ek 2.4. Na-asetat (3 M, pH 4.8 ve 5.2)

Hazırlanmak istenen hacimde, 3 M olacak şekilde Na-asetat tartılır ve manyetik karıştırıcı üzerinde bir miktar saf suda çözülür. Glisial asetik asit ile pH'sı ayarlanır ve saf su ile istenen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Ek 2.5. RNaz Hazırlanması (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gerekli kadar miktar RNaz dikkatli bir şekilde tartılarak RNaz solüsyonunda (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 15 mM NaCl)

çözülür. 100 °C’de 15 dk tutularak DNaz aktivitesi inhibe edilir. Oda sıcaklığında soğuduktan sonra mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılır ve -20 °C’de muhafaza edilir.

Ek 2.6. Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol (25:24:1)

Stok fenolden bir pipet yardımıyla dikkatlice 25 ml çekilir. Üzerine 24 ml kloroform ve 1 ml izoamil alkol ilave edilerek toplam hacim 50 ml’ye tamamlanır. Kullanmadan önce iyice çalkalanarak homojenize edilmelidir. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve +4 °C’de saklanmalıdır. Kullanım süresi 1 ayı geçmemelidir.

Ek 2.7. Kloroform:İzoamil Alkol (24:1)

24 hacim kloroform, 1 hacim izoamil alkol ile karıştırılarak hazırlanır. İçinde bulunduğu şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalı ve +4 °C’de saklanmalıdır.

Ek 2.8. TE Solüsyonu

10 mM Tris (pH 8.0)

0.1 M EDTA (pH 8.0)

Hazırlanacak hacim için gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stokdan alınır ve saf su ile istenilen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra kullanılır.

Ek 2.9. Kongo Kırmızısı (Congo-red) Boyası

% 0.1 w/w Congo-Red olacak şekilde istenilen hacim için gerekli miktar tartılarak saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda iyice çözdürülür. SDS-Lik-PAGE için daha sonra Kongo-Red içerisine 5 mM NaOH ilave edilerek çözülmesi sağlanır.

Ek 2.10. 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde Tris-HCl tartılarak bir miktar suda çözülür, pH'sı NaOH ile 8.0'a ayarlanarak saf su ile hacme tamamlanır. 121 °C'de 15 dk otoklav yapılarak +4 °C'de saklanır

Ek 2.11. 0.5 M EDTA (pH 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde EDTA tartılarak bir miktar suda çözülür, pH'sı NaOH ile 8.0'a ayarlanarak saf su ile hacme tamamlanır. 121 °C'de 15 dk otoklav yapılarak +4 °C'de saklanır.

Ek 2.12. 1 mM HEPES (PH 8.0)

İstenen hacim için gerekli HEPES hesaplanarak tartılır ve istenilen hacimde saf su ile çözülür. Otoklavlanarak +4 °C'de muhafaza edilir.

Ek 2.13. Tampon A

100 mM Tris (pH:8.0)

50 mM EDTA (pH: 8.0)

100 mM NaCl

İstenen hacim için gerekli Tris, NaCl ve EDTA hesaplanarak stoklarından alınır, saf su ile istenilen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra kullanılır. +4 °C'de muhafaza edilmelidir.

Ek 2.14. TES Solüsyonu

50 mM Tris (pH: 8.0)

5 mM EDTA (pH: 8.0)

50 mM NaCl,

İstenen hacim için gerekli Tris, NaCl ve EDTA hesaplanarak stoklarından alınır, saf su ile istenilen hacme tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra kullanılır. +4 °C'de muhafaza edilmelidir.

Ek 2.15. Stok Fenol

160 °C'de distile edilmiş katı fenolden istenilen miktarda tartılarak 68 °C'de tamamen eritilir. Renklendirmek için üzerine % 0.1 oranında 8-hidroksikinolin ilave edilir. Eşit hacimde (1:1) 0.5 M tris (pH 8.0) ilave edilerek iyice karıştırılır. İki faz ayrılıncaya kadar oda sıcaklığında beklenir. Üst faz atılarak bir önceki işlem tekrar edilir (en az iki defa). Bu sefer üzerine eşit hacimde 0.1 M tris (pH 8.0) ilave edilerek karıştırılır. Üst faz uzaklaştırılarak tekrar 0.1 M tris (pH 8.0) ilave edilir ve iyice karıştırılır. Bu işleme üst fazın pH'sı >7.8 oluncaya kadar devam edilir. pH ayarlandıktan sonra fenol içerisine % 0.2 β-merkaptotanol ve 1/10 oranında 0.1 M tris (pH: 8.0) eklenerek +4 °C'de saklanır. Saklama esnasında şişe alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmalıdır. Fenol organik bir çözücü olup proteinleri denatüre ederek tortu oluşturmasını sağlar.

Ek 2.16. Besi Ortamları İçin Stok Antibiyotik Hazırlanması

Kloramfenikol (34 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar kloramfenikol tartılarak saf alkol (% 100) içerisinde çözülür ve steril mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılarak -20 °C'de muhafaza edilir. Besi ortamlarına, plazmid amplifikasyonu için 170 µg/ml, dirençli bakteri seçimi için ise 5-50 µg/ml konsantrasyonlarında kullanılır.

Ek 2.17. 5X TBE Tamponu

Bir litre için; 54 gr Tris baz, 27.5 gr Borik asit, 10 mM EDTA (pH 8.0) kullanılır. Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülerek pH NaOH ile 8.0'a ayarlanarak otoklav yapılır.

Kullanım konsantrasyonu olan 1X yapmak için 1 hacim 5X TBE alınarak üzerine 4 hacim saf su ilave edilir.

Ek 2.18. Ethidium Bromid (EtBr) (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar Ethidium bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve saf suda vortekslenerek iyice çözülür. Işığa hassas olduğu için ya koyu renkli bir şişeye konur, veya bulunduğu kap alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C’de muhafaza edilir. Kuvvetli bir mutajen olduğu için tartım ve kullanım sırasında çok dikkatli olunmalı, mutlaka eldiven ve maske kullanılmalıdır. EtBr floresan bir boya olup DNA ve RNA’da bulunan bazlar arasına girerek bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerlerinin belirlenmesini sağlar.

Ek 2.19. Elektrod Solüsyonu (1 litre için)

0.05 M Glisin

0.05 M Tris-baz

% 0.1 SDS

Yukarıda verilen oranlara göre istenen hacim için gereken miktarlarda malzeme tartılarak bir kaba konur. İstenen hacmin biraz altında saf su ile çözüldükten sonra yine saf su ile hacme tamamlanır.

Ek 2.20. Coomassie Blue Boyası (1 litre)

2 gr Coomassie blue (% 0.2 w/v)

500 ml Metanol (% 50 v/v)

100 ml Glisial asetik asit (% 10 v/v)

400 ml Saf su

Yukarıda verilen miktarlarda malzemeler bir erlen içerisinde alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edilir.

Ek 2.21. Destain Solüsyonu (Yıkama Solüsyonu) (1 litre)

50 ml Metanol (% 5 v/v)

70 ml Glisial asetik asit (% 7 v/v)

880 ml Saf su

Yukarıda verilen miktarlarda malzemeler bir erlen içerisinde alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde iyice homojenize edilir.

Ek 2.22. 50 mM Na-fosfat Solüsyonu

50 mM Na₂HPO₄

50 mM NaH₂PO₄

İstenen hacim için gereken miktarlarda Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ tartılarak önce her biri için ayrı ayrı solüsyon hazırlanır. Daha sonra geniş bir kaba her iki solüsyondan dikkatlice aktararak birbiri ile pH: 6.5'e ayarlanır. Otoklavlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Ek 2.23. Yükleme Tamponu (6X)

%40 Sukroz (w/v), saf suda çözülür

%0.25 Bromfenol mavisi

Yukarıda verilen oranlara göre, istenen hacim için gereken miktarlarda sukroz ve boya tartılarak iyice homojenize edilir. Mikrosantrifüj tüplerine paylaştırılarak +4 °C'de muhafaza edilir. DNA solüsyonu ile 1:5 oranında (1 hacim boya, 5 hacim DNA solüsyonu) karıştırılır.

EK 3. PROTOKOLLER

Ek 3.1. Agaroz Jel'in Hazırlanması

Belirlenen hacim için gerekli agaroz tartılarak bir erlen içerisinde konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (Ek 2.17.) konarak alev üzerinde eriyinceye kadar tutulur. Elle tutulacak sıcaklığa kadar (45-50 °C) soğuduktan sonra son konsantrasyonu 0.5 µg/ml stok EtBr solüsyonu (Ek 2.18.) ilave edilir. Jel kabına dikkatli bir şekilde dökülerek jel targağı yerleştirilir ve donması için yaklaşık 40 dakika beklenir. Jel elektroforez tankına alınarak üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu ilave edilir. Tarak çıkarılarak oluşan kuyulara DNA örneği yerleştirilir.

Ek 3.2. SDS-PAGE'nin Hazırlanması (Laemmli, 1970)

% 12'lik ayırıcı jel aşağıda verilen oranlarda kimyasalların ilavesiyle hazırlanır:

12 ml Akrilamid (% 30; 30 gr akrilamid ve 0.8 gr bisakrilamid tartılarak toplam 100 ml olacak şekilde saf suda çözülür.)

5.62 ml Tris (2 M, pH 8.8)

0.3 ml SDS (% 10)

12.1 ml Saf su

Karışım hazırlandıktan sonra, polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl amonyum persülfat (% 10 w/v) ve 20 µl TEMED ilave edilerek daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan düzeneğin arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten 4-5 cm boşluk kalacak şekilde dökülür. Üzerine ince bir katman oluşturacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol ilave edilerek donması için 45 dk beklenir. Jel donduktan sonra üstteki bütanol bir teksir kağıdına emdirilerek alınır. Bu arada aşağıda verilen oranlarda kimyasalların karışımıyla toplayıcı jel bir erlen içerisine hazırlanır:

1.8 ml Akrilamid

3.65 ml Tris (0.5 M, pH 6.8)

0.15 ml SDS (% 10)

9.4 ml Saf su

Polimerizasyonu sağlamak için 100 µl amonyum persülfat (% 10) ve 10 µl TEMED eklenerek bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülür. Jel tarağı yerleştirilerek donması için 45 dk beklenir. Jel donduktan sonra tarak çıkarılarak yarısına kadar elektrod solüsyonu konmuş olan tankın içerisine kısa cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilir. Karşı tarafa iki cam levha yan yana konularak uzun cam iç tarafa gelecek şekilde yerleştirilir. Substratlı SDS-PAGE hazırlamak için, ayırıcı jele % 2 w/v'lik likenandan olacak şekilde ilave edilir. Daha sonra iki cam levhanın

arasına jelin zerina çıkacak kadar, dışına ise 4-5 cm. yüksekliğinde elektrod solüsyonu (Ek 2.19) ilave edilir.