

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BAKTERİOFAJ T4 LİZOZİM GENİNİN (*Gen e*) PLASMİD VEKTÖRLER İLE KLONLANMASI

Ali İrfan GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLARI

Prof. Dr. Halil KASAP

Doç. Dr. Numan ÖZCAN

Bu tez, Çukurova üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBE 99.YL.2.
nolu proje olarak ve DPT tarafından 98K121040 nolu proje kapsamında (bir
alt proje olarak) desteklenmiştir.

Tez No:.....90379

ADANA - 2000

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora/Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan **BAKTERİOFAJ T4 LİZOZİM GENİNİN (Gen e) PLASMİD VEKTÖRLER İLE KLONLANMASI** adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: **21/01/2000**



İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi
Jüri Bakanı

Prof. Dr. Halil KASAP

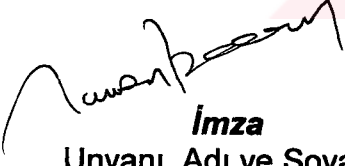


İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi

Prof. Dr. Mülkiye KASAP



Prof. Dr. Klymet AKSOY



İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi

Doç. Dr. Numan ÖZCAN



İmza
Unvanı, Adı ve Soyadı,
Üniversitesi
Raportör
Doç. Dr. Osman DEMİRHAN

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun **26/11/2000**.....tarih ve **2/10-8** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kadri ÖZCAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle, her zaman olduğu gibi, tez çalışmam süresince de beni isabetli bir şekilde yönlendiren, yol gösteren ve sorunların çözümlenmesinde her türlü yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli hocam, anabilim dalımız başkanı sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a ve eşi, hocamız sayın Prof. Dr. Mülkiye KASAP'a sonsuz teşekkürlerimi bütün içtenliğimle arz ediyorum.

Ayrıca, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmanın yapılmasında her türlü desteği ve laboratuvarındaki bütün imkanları sağlayan, ikinci danışman hocam sayın Doç. Dr. Numan ÖZCAN'a ve Ç. Ü. Ziraat Fak. Zootehni Bölümü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı Başkanlığına da teşekkürlerimi arz ediyorum.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından ve desteklerinden dolayı, çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Adem ALTINALAN'a, doktora öğrencisi B. Devrim ÖZCAN'a, Arş. Gör. Arzu ÖZKÜTÜK'e, Arş. Gör. Meltem AŞAN'a ve Zootehni bölümü lisans öğrencileri Zeynep GÜLNAZ ve Lutfiye ÖZKAN'a da teşekkür ediyorum.

Aynı zamanda, Anabilim dalımızdaki değerli hocalarıma, arkadaşlarıma, diğer personele ve çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olan sayın Dr. Fuat DİLMEÇ'e ve tezin düzenlenmesinde yardımcı olan arkadaşım Arş. Gör. Nizami DURAN'a da teşekkürlerimi iletiyorum.

Manevi yardımlarını her zaman üzerimde hissettiğim aileme, eşim Mediha'ya ve çocuklarıma da sonsuz sevgilerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Lizozim	3
2.2. Gen Klonlama Vektörleri	9
2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)	14
2.4. Plazmid DNA İzolasyonu	15
2.5. DNA Konsantrasyonu ve Safılık Derecesinin Ölçülmesi	23
2.6. Restriksiyon Endonükleazlar	23
2.7. Ligazlar	24
2.8. Jel Elektroforezi	25
2.9. Transformasyon	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Bakteriyofaj T4 Lizozim Geninin PCR ile Amplifikasyonu ve Ligasyona Hazırlanması	28
3.2.1.1. Primer Seçimi	28
3.2.1.2. Programlama	32
3.2.1.3. Reaksiyonun Hazırlanması	33
3.2.1.4. PCR Ürününün Elektroforezi ve Jelden Arıtılması	34
3.2.1.5. PCR Ürününün Kesimi ve Ligasyona Hazırlanması	35
3.2.2. Klonlama Vektörlerinin İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması	37
3.2.3. Lizozim Geni ile pUC18 DNA'nın Ligasyonu	38
3.2.4. Kompetent Bakteri Hazırlanması ve Transformasyon	38
3.2.5. Koloni Seçimi ve Rekombinantların Karakterizasyonu	39
3.2.6. Lizozim Geni ile pRS416 Vektörünün Ligasyonu	40
3.2.7. Klonlamanın Doğrulanması İçin Yapılan İlave Çalışmalar	41
4. BULGULAR	43
4.1. Bakteriyofaj T4 Lizozim Geninin (<i>Gen e</i>) PCR ile Amplifikasyonu	43
4.2. Klonlama Vektörlerinin (pUC18 ve pRS416) İzolasyonu	43
4.3. pUC18 + Lizozim Geni (pUC18L) Rekombinantlarının Tespiti	44
4.4. pRS416 + Lizozim (pRS416L) Rekombinantlarının Tespiti	47
4.5. Klonlamanın Doğrulanması İçin Yapılan İlave Çalışmalar	48

4.5.1. Rekombinant Plazmidlerden Lizozim Geninin PCR ile Amplifikasyonu	48
4.5.2. Rekombinant Kolonilerde Lizozim Aktivitesinin Gösterilmesi	49
4.5.3. Lizozim Geni Taşıyan Kolonilerin Hipotonik Ortamdaki Lizatlarında Nükleik Asit Taraması	49
4.5.4. Besi Ortamlarından Proteinlerin Çökertilmesi	50
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	54
7. KAYNAKLAR	55
EKLER	60
EK-1	60
EK-2	67
EK-3	72
ÖZGEÇMİŞ	75



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Peptidoglikon molekülünün yapısı.	3
Şekil 2.2.	PUC18/19 ve pRS416 plazmid vektörlerinin genel yapıları.	13
Şekil 2.3.	Plazmid amplifikasyonu.	19
Şekil 2.4.	Bakteri hücrelerinin kontrollü bir şekilde patlatılması.	20
Şekil 2.5.	Süperkoil ve halkasal DNA konformasyonları.	20
Şekil 2.6.	Alkalın denatürasyon metodu.	21
Şekil 2.7.	CsCl yoğunluk gradienti ile DNA ayırımı.	22
Şekil 2.8.	EtBr'ün DNA'ya bağlanması.	22
Şekil 2.9.	DNA ligazlarla katalizlenen reaksiyon tipleri.	25
Şekil 3.1.	PUC18 ve pRS416 vektörlerinin MCS bölgeleri.	31
Şekil 3.2.	Lizozim genini T4 genomundan ayırmada kullanılacak primer dizileri.	32
Şekil 3.3.	PCR'ın birinci döngüsünde primer ve kalıp DNA durumu.	33
Şekil 3.4.	PCR ürününün <i>Bam</i> HI'la kesilmesiyle beklenen sonuç.	36
Şekil 4.1.	PCR ürününün %1'lik agaroz jeldeki elektroforezi.	43
Şekil 4.2.	PUC18 ve pRS416 DNA'larının %1'lik agaroz jeldeki elektroforezi.	44
Şekil 4.3.	Transformasyon sonrası X-gal ve ampisilinli ortama ekilen bakteriler tarafından oluşturulan mavi ve beyaz koloniler.	45
Şekil 4.4.	Şekil 4.3.'deki plaklardan kürdanla alınarak aynı özelliklerdeki ikinci bir plağa aktarılan beyaz kolonilerin bir gece üredikten sonraki durumları.	45
Şekil 4.5.	PUC18+Lizozim geni (pUC18L) transformantlarının tespiti için iki ayrı beyaz koloniden izole edilen plazmidlere ait %1'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları.	46
Şekil 4.6.	PRS416+Lizozim geni (pRS416L) transformantlarının tespiti için 4 ayrı beyaz koloniden izole edilen plazmidlere ait %1'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları.	47
Şekil 4.7.	PUC18L ve pRS416L'nin kalıp olarak kullanıldığı PCR amplifikasyonu.	48
Şekil 4.8.	Lizozim aktivitesinin <i>M. luteus</i> üzerinde gösterilmesi.	49
Şekil 4.9	<i>E. coli</i> pRS416L (rekombinant) ve <i>E. coli</i> pRS416 bakterilerinin hipotonik ortama alındıktan sonra oluşan sıvının %1'lik agaroz jeldeki elektroforez sonucu.	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Plazmid büyüklüğü ve transformasyon verimi.	11
Çizelge 2.2.	Agaroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri.	26
Çizelge 3.1.	Lizozim geninin T4 genomu içindeki yeri.	28
Çizelge 3.2.	T4 lizozim geni içinde tanıma dizisi olan endonükleazlar ve tekrar sayıları.	30
Çizelge 3.3.	Bazı restriksiyon endonükleazların lineer DNA parçalarını uç bölgelerinden kesim şekilleri.	30
Çizelge 3.4.	T4 lizozim genine ait nükleotid dizisi ve kodonları.	31
Çizelge 3.5	Lizozim geninin PCR'ı için Termal Cycler'a verilen program.	33
Çizelge 3.6.	Optimizasyon reaksiyonu.	34
Çizelge 3.7.	PCR ürünü için hazırlanan kesim reaksiyonu.	35
Çizelge 3.8.	pUC18 ve pRS416 DNA'ları için hazırlanan kesim reaksiyonu.	37
Çizelge 3.9.	pUC18 DNA ve PCR ürünü için hazırlanan ligasyon reaksiyonu.	38

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Amp	Ampisilin
BAC	Bacterial Artificial Chromosome (Bakteriyel yapay kromozom)
Bp	base pair (baz çifti)
cccDNA	covalently closed-circular DNA (kovalent olarak kapalı halkasal DNA)
DNA	Deoxiribo Nucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
EtBr	Ethidium Bromide
Kb	kilo base (kilo baz)
MCS	Multiple Cloning Site (Çoklu Klonlama Bölgesi)
mg	miligram (1/1000 gr)
µg	mikrogram (1/1000 mg)
ng	nanogram (1/1000 µg)
ocDNA	open-circular DNA (açık halkasal DNA)
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PEG	Poly Ethylene Glycole
RNA	Ribo Nucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
TBE	Trise-Boric acid-EDTA
TCA	TriChloro Acetic Acid
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetrasiklin
U	Unit (Ünite)
UV	Ultra Viole (mor ötesi)
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-Galactopyranoside
YAC	Yeast Artificial Chromosome (Maya Yapay Kromozomu)

ÖZET

Bakteriofaj T4 Lizozim Geninin (*Gen e*) Plazmid Vektörler ile Klonlanması

Lizozim (EC 3.2.1.17), prokaryotik hücre duvarlarının peptidoglikan heteropolimerlerinde bulunan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) arasındaki β -1,4 glikosidik bağlarının hidrolize olmasını katalizleyen bir enzimdir.

Bu çalışmada, bakteriofaj T4 lizozim geninin (*gen e*) pUC18 ve pRS416 vektörlerini kullanarak *Escherichia coli*'de klonlanması amaçlanmıştır. *Gen e*'nin T4 genomundan PCR ile amplifikasyonu için *Bam* HI tanıma dizisine sahip primerler dizayn edildi. Vektörlerin ve PCR ürününün *Bam* HI endonükleaz ile kesiminden sonra ligasyon reaksiyonu ile iki rekombinant plazmid oluşturuldu ve pUC18L ve pRS416L olarak isimlendirildi. Bu plazmidleri taşıyan rekombinant *E. coli* hücrelerinin *gen e*'yi eksprese ettiği ve lizozim E olarak adlandırılan aktif T4 lizozimini besi ortamına salgıladığı tespit edildi. Aynı zamanda lizozim E'yi üreten *E. coli* klonlarının L ve LB besi ortamlarında lize olmaksızın ürettiği gözlemlendi. Fakat, kültüre alınan rekombinant bakteri hücrelerinin, non-iyonik su veya 10 mM'lık Tris pH 8.0 gibi osmotik dengeleyicilerin olmadığı hipotonik bir ortama alındıklarında osmotik basınca dayanamayarak kolayca patladığı görüldü. Rekombinant *E. coli*'nin hücre duvarının, üretilen lizozim E'nin etkisi ile zayıflatılmış olabileceği fakat besi ortamındaki tuz konsantrasyonuyla oluşturulan osmotik basıncın ise duvarı zarar görmüş hücreleri lize olmaktan korumuş olabileceği düşünülmektedir.

Bu sonuçlar, *gen e*'yi taşıyan her hangi bir *E. coli* plazmid vektörü ile EDTA, lizozim ve SDS gibi hücre duvarı ve hücre zarını parçalayıcı ajanlar kullanmaksızın plazmid veya kromozomal DNA izolasyonunun kolaylaştırılabileceğini göstermektedir. pRS416L bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş bir prototip mekik vektördür.

Anahtar Sözcükler: *E. coli*, T4 Lizozim geni, Klonlama, PCR, Plazmid vektörler

ABSTRACT

Cloning of Bacteriophage T4 Lysozyme Gene (*Gene e*) With Plasmid Vectors

Lysozyme (EC 3.2.1.17) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of glycosidic bonds between N-acetyl glucosamine (NAG) and N-acetyl muramic acid (NAM) which are present in peptidoglycan heteropolymers of prokaryotic cell wall.

In this study, it is aimed at the cloning of bacteriophage T4 lysozyme gene (*gene e*) in *Escherichia coli* using the pUC18 and pRS416 vectors. The primers with *Bam* HI recognition sites were designed for the PCR amplification of the *gene e* from T4 genome. After digesting the vectors and PCR product with *Bam* HI endonuclease, two recombinant plasmids were constructed by ligation reaction and called pUC18L and pRS416L. It is determined that, recombinant *E. coli* cells harboring these plasmids were expressed the *gene e* and secreted the active T4 lysozyme called lysozyme E in the culture medium. At the same time it was observed that, *E. coli* clones producing lysozyme E were grown in L and LB medium without lysis. But it is seen that cultured recombinant cells did not withstand against osmotic pressure and burst out easily in the hypotonic environment which does not contain osmotic stabilizers such as non-ionic water or 10 mM Tris-HCl pH 8.0. It is suggested that the cell wall of the *E. coli* may be weakened by the action of the lysozyme E, but the osmotic pressure created by the NaCl concentration in the medium may protect the damaged cells from lysis.

These results show that the isolation of plasmid or chromosomal DNA may be facilitated with any *E. coli* plasmid vectors bearing *gene e* even in the absence of cell wall and cell membrane disruptive agents such as EDTA, lysozyme and SDS. For this purpose, pRS416L is constructed as a prototype shuttle vector.

Key Words: Cloning, *E. coli*, PCR, Plasmid vectors, T4 Lysozyme gene

1. GİRİŞ

Lizozim (EC 3.2.1.17), prokaryotik hücre duvarlarının peptidoglikan heteropolimerlerinde bulunan N-asetil glukosamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) arasındaki β -1,4 glikosidik bağlarının hidrolize olmasını katalizleyen bir enzimdir¹.

Alexander Flemming tarafından 1922'de bulunmuş ve gram pozitif bakteriler (özellikle de *Micrococcus luteus*) üzerindeki bakterisidal özelliği ile dikkatleri çekmiştir².

Lizozim, göz yaşında (proteinlerin ~%23-35'i), tükürükte, mukusta, sütte, diğer vücut sıvılarında, fagositik hücrelerin lizozomlarında ve yumurta akında bulunmaktadır. Ekzokrin bezlerin büyük çoğunluğunun salgı hücrelerinde sentezlenmektedir. En yüksek konsantrasyonlar gözyaşı, mide özsuğu, böbrek dokusu, anne sütü, trake ve bronşların yüzey epiteli ve submukoza hücrelerindedir^{3,4,5}.

Böbrek hastalıkları, monositik lösemi, tuberkülozis, sarkoidozis ve diğer granülomatozis hastalıklarında serum ve idrardaki oranı yükselir. Lösemik granülositler ve monositlerde lizozim oranı yükselir. Bu hücreler parçalandığı zaman serum ve idrardaki lizozim miktarı da artar. Lizozim değeri normalde, serumda 5-10 μ g/ml ve idrarda ise 2 μ g/ml' dir^{6,7}.

İnsan lizozim genindeki iki nokta mutasyonu non-nöropatik sistemik amiloidozis olarak bilinen ve otozomal dominant geçiş gösteren bir kalıtsal hastalığa da neden olur. Bu mutasyonların birinde, oldukça korunmuş olan 56. pozisyonundaki izolösin yerine threonin (ile56Thr, ATA→ACA), diğerinde ise 67. pozisyonundaki aspartik asit yerine histidin (Asp67His, TAG→TAC), geçtiği tespit edilmiştir. Gen 12. kromozom üzerinde lokalizedir⁸.

Lizozim mutantları, doğal (wild type) lizozime benzer üç boyutlu yapıya sahip olmasına rağmen ısıya dikkate değeri ölçüde daha az dayanıklıdır. *In vitro* koşullarda ısıtıldıkları zaman çözülürler, enzimatik aktivitelerini kaybederler ve amiloid fibrilleri oluşturmak için kümeleşirler. Doğal lizozimde ise böyle bir durum gözlenmemiştir. Doğal lizozimin ısıyla denatürasyonunun dönüşümlü

(renatüre olabilme özelliğinde) olmasına karşın amiloidogenik özellikteki lizozim varyantları ısıyla dönüşümsüz olarak inaktive olmaktadır. Aynı zamanda varyantların doğal lizozimden 10-14°C düşük sıcaklıklarda bile ısıya hassasiyet gösterdiği tespit edilmiştir. Buna ilaveten her iki varyant da pH 7.4 ve 37°C'de tutulduğunda bir müddet sonra bütün aktivitesini kaybetmiş, halbuki doğal lizozim bu şartlarda tam aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, mutant lizozimin amiloid oluşturması denatüre yapıya eğiliminden ileri geldiği söylenebilir^{9,10,11,12}.

Lizozim, tripsin, kimotripsin ve pepsinden etkilenmez. Bu özelliğinden dolayı ülser, multiple sklerozis, bazı deri hastalıkları ve ameliyat sonrası enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceği tavsiye edilmektedir. Ayrıca, analjezik, antitümör, antimetastatik ve antiinflamator aktivite olduğu da yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir^{5,13,14,15,16}.

Lizozim bir çok canlının antibakteriyel savunma mekanizmasında yer alan önemli bir enzimdir. Bakteriofajların genomunda bulunan lizozim ise litik döngüde hücre duvarını eritir ve bakterilerin parçalanarak faj partiküllerinin serbest kalmasını sağlar^{17,18}.

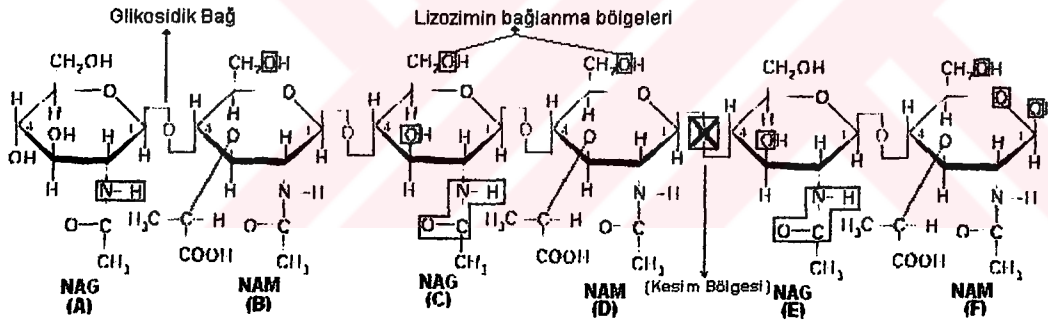
Bu çalışmada, bakteriofaj T4 lizozim geninin, faj genomundan PCR ile izole edilerek plazmid vektörlerle klonlanması ve ilerde yeni bir vektör geliştirme çabalarına bir başlangıç oluşturulması amaçlanmıştır.

Ayrıca, lizozim geninin ekmek mayası ve laktik asit bakterilerinde eksprese edilmesi de düşünülmektedir. Maya hücrelerine aktarıldıktan sonra deney hayvanları üzerinde antitümör ve antimetastatik aktiviteleriyle ilgili çalışmalar da planlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Lizozim

Lizozimin substratı bakteri hücre duvarındaki polisakkaritlerdir (peptidoglikan ya da mürein tabakası). Hücre duvarını oluşturan polisakkarit iki çeşit şekerden yapılmıştır; bunlar N-acetylglucosamine (NAG) ve N-acetylmuramate (NAM)'dir. NAM ve NAG, amino grupları asetile olmuş glucosamine türevleridir. Bakteri hücre duvarında NAG ve NAM; C-1 ve C-4 karbonlarında glikosidik bağlarla bağlanmışlardır. Hücre duvarındaki bütün glikosidik bağlar β konfigürasyonuna sahiptir. Böylece, hücre duvarını oluşturan polisakkaritler birbirlerine β 1-4 bağlarıyla bağlanmış tekrar eden NAM ve NAG polimerleridir (Şekil 2.1.). Lizozim, NAM ve NAG arasındaki glikosidik bağları hidrolize ettiğinden muramidaz olarak da bilinmektedir.



Şekil 2.1. Peptidoglikan molekülünün yapısı. Lizozim, molekülün 6 birimi üzerinde 10 noktadan (çerçeve içine alınmış yerler) kompleks oluşturur ve bir bölgeden (D ve E arasından) kesim yapar.

Kabuklu canlılardaki kitin örtü de, NAG birimlerinin β 1-4 şeklinde bağlanmasıyla oluştuğundan lizozim için bir substrattır².

Lizozim genleri moleküler genetik çalışmalarında model genler olarak kullanılmaktadır. Tavuk lizozim geni, ilk izole edilen ve karakterizasyonu yapılan ve üzerinde moleküler düzeyde en çok çalışma yapılan bir gendir. Şimdiye kadar birçok türden lizozim gen aileleri izole edilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Lizozim gen aileleri arasındaki genel özellik hepsinin oldukça küçük

(10 kb'den küçük) ve 4 exon ile 3 intron içeriyor olmalarıdır. Omurgalı genomları hakkında yeni görüşler oluşturmak için lizozim genlerinin yapısal, fonksiyonel ve transkripsiyonel özellikleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir¹⁹.

İzolasyonu ve üzerinde moleküler genetik çalışmaları yapılan lizozim genlerinden bazıları şunlardır:

a) Tavuk lizozimi: Tavuk yumurta akından izole edilen bu enzim, üçboyutlu yapısı incelenenlerden, sekansı (DNA baz dizileri) yapılanlardan ve mekanizması detaylı olarak çalışılanlardan ilki olması yönleriyle tarihsel önemi olan bir enzimdir. Bu enzimin sentezi ovidükteki steroid hormonlar tarafından kontrol edilir. Önce prelizozim olarak sentezlenir ve müteakiben 18 amino asitten (a.a.) oluşan sinyal peptidinin uzaklaştırılması ile olgun lizozim olarak salgılanır²⁰. Moleküler ağırlığı 15.000 Dalton (D) olup 129 a.a. uzunluğundadır². Tavuk lizozim geni maya hücrelerinde klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Verimli bir maya promotörü kontrolünde sentezlenen lizozimin maya proteinlerinin %1.5'i oranında olduğu ve bunun 2/3'ünün besi ortamına salgılandığı tespit edilmiştir²⁰.

b) İnsan Lizozimi: İnsan lizozim geni 12. kromozom üzerinde lokalize olup 4 exon ile 3 introndan oluşur ve 5856 bp uzunluğundadır²¹. Primer ve tersiyer yapısı tavuk lizozimi ile büyük ölçüde benzerlik göstermektedir²². Moleküler ağırlığı 15.000 daltondur²³.

İnsan lizozimi klinik ve endüstriyel önemi olan bir enzimdir. Doğal kaynağı sınırlı olduğu için rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi yolunda değişik çalışmalar yapılmıştır²⁴. Bu çalışmalarla insan lizozim geni, *E. coli*'de²⁵, *Bacillus subtilis*'de²⁶, *Saccharomyces cerevisiae*'de²⁷ ve *Aspergillus oryzae*'de²⁸ klonlanmış ve sentezlenmiştir.

E. coli 'de yapılan klonlamada, insan lizozimi, tavuk lizozimi sinyal dizisi ve 2µ maya plazmidi terminatörü ile birlikte GAL10 promotörü bulunduran Yep51 plazmidine takılmış ve oluşturulan rekombinant plazmid (YEp-HLYSIG) maya hücrelerine transforme edilmiştir. Maya hücrelerinin, hibrid lizozimi önce prelizozim olarak kültür ortamına ve periplazmik aralığa salgıladığı ve daha sonra da bunları işleyerek (sinyal dizisi ve lizozim bağlantı noktasından keserek) olgun insan lizozimi haline getirip kültür ortamına yaklaşık 0.96 mg/L

(en yüksek değer) olarak salgıladığı tespit edilmiştir. Bu şekilde oluşan lizozimin normal insan lizozimi ile aynı spesifik aktiviteye sahip olduğu da gsterilmiřtir²⁷. Sinyal dizisi, mayada yabancı proteinlerin üretimi için kullanılmıştır aksi takdirde üretilen lizozimin hücre içinde inaktif yabancı cisim olarak kaldığı (inclusion bodies) tespit edilmiřtir²⁵. Mayada yabancı proteinlerin üretimi için dışarıya salgılanan bir proteinin (α -faktör gibi) sinyal dizisi kullanılıyordu^{29, 30}. Tavuk lizozim geninin sinyal dizisi taşıdığı daha önce yapılan dizi analizi ile tespit edildięinden³¹ bu çalışmada bu gene ait sinyal dizisi kullanılmış ve aynı zamanda tavuk sinyal dizisinin mayada protein sekresyonu ve işlenmesinde kullanılabileceği de gsterilmiřtir²⁷.

Başka bir klonlama çalışmasında ise , İnsan lizozim geni ve tavuk lizozim geni sinyal dizisinden oluşan sentetik DNA parçası birleştirilerek oluşturulan rekombinant plazmid vektörü (pMAR5-HLY) *Aspergillus oryzae* M-2-3 'e transforme edilmiştir. Burada kullanılan plazmid amyB promotoru (taka-amylase A genine ait) taşıtmaktadır. Bu promotor maltozla uyarılıp glikozla baskılanabildiği için genin sentezi de kontrol altına alınabilmirmiştir. Transformantların insan lizozimini aktif bir şekilde ve yaklaşık 1.2mg/L düzeyinde besi ortamına salgıladığı tespit edilmiřtir²⁸.

c) Bakteriofaj lizozimi: Bakteriofaj T4 lizozimi globular monomerik bir protein olup 164 amino asitten oluşmaktadır. Konakçı hücrenin peptidoglikan tabakasını muhtemelen stoplazmik taraftan bozarak hücrenin patlamasını ve virüs partiküllerinin serbest kalmasını saęlar³². Aktif bölgesinin yapısı ve bakteri hücre duvarındaki peptidoglikana etki şekli tavuk lizozimindekine benzer şekildedir^{33, 34, 35}. T4 lizozimi de (tavuk lizoziminde olduğu gibi) moleküler genetik çalışmalarında bir çok araştırma için esas alınmıştır. Mutant varyantları oluşturularak protein yapısı ve fonksiyonu üzerine etkileri araştırılmıştır^{36, 37, 38, 39, 40}. T4 lizozimi üzerinde çalışmaların yapılabilmesi için *E.coli* de klonlanması gerekmektedir. Gen, DNA dizi analizinin yapılması için lamda vektörü ile klonlanmıř⁴¹ fakat ekspresyonu için herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Konakçı hücrenin patlatılarak virüs partiküllerinin serbest kalması için lizozim dışında birtakım T4 genlerinin de eksprese olması gerektiğinden^{18, 42}, lizozim geninin *E. coli*'de tek başına klonlanmasıyla enzimin belli bir düzeye kadar tolere edilerek

non-toksik olarak eksprese edilebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla T4 lizozimini kodlayan *gen e*⁴¹, restriksiyon endonükleazlarla işlenerek *tacII* promotoru kontrolünde eksprese edilmek üzere, rekombinant bir plazmid (pT4lystacII) oluşturulmuştur. Bu plazmid *E. coli* hücrelerine transforme edilmiş ve IPTG ilavesiyle, enzimin aktif olarak hücre proteinlerinin %2'si oranında ekspresyonu sağlanmıştır⁴³. T4 fajla enfekte *E. coli* B hücrelerinde lizozim miktarı 5-10mg/L olarak tespit edilmiştir¹⁷. pT4lystacII plazmidi ile transforme olmuş D1210 (bir *E. coli* K-12 suşu) IPTG ile uyarıldığında yaklaşık olarak aynı miktarda (lisis olmaksızın) lizozim üretilmiştir⁴³. Bu sonuç, hücrenin patlaması için başka T4 genlerinin de gerekli olduğu^{18, 42} şeklindeki görüşü de desteklemektedir⁴³.

Yapılan başka bir çalışmada T4 lizozim geninin PCR'la mutant formları (Thr161Ala, Thr152Met, Lys43Ile ve thr151Ala gibi) elde edilmiş ve lamda klonlama vektörlerine aktarılmıştır. Oluşturulan bu mutasyonların lizozim geninin yapı ve fonksiyonu üzerindeki etkileri, lizozim geni ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarla kıyaslanarak değerlendirilmiştir³⁶. Buna benzer amaçlarla değişik faj lizozimlerinin değişik bölgelerindeki amino asitler *in vitro* mutagenезle değiştirilmiş ve aynı şekilde enzimin yapı ve fonksiyonlarındaki değişiklikler gözlemlenmiştir^{44, 45, 46}.

T7 fajına ait lizozim geni, bütün bitkisinden elde edilen patogenezele ilgili bir proteine (PR-1b) ve Shiva-I genine ait sinyal dizisi ile birlikte pUC19 plazmidine klonlanmıştır. Oluşturulan transgenik bitkide lizozim geninin Shiva-I geni ile transkribe edildiği ve enzimin hücre dışına salgılandığı tespit edilmiştir⁴⁷. *Ava II* ve *Hae III* endonükleazlarla kesilen T7 DNA'sından lizozim genini içeren 632 bp'lik DNA parçası pBR322 vektörünün *Bam HI* bölgesine klonlanmıştır. Transforme edilen suşların lizozimi hücre içinde ürettiği SDS-PAGE ile tespit edilmiştir⁴⁸.

d) Diğer canlılara ait lizozimler: *Menduca sexta* genomu tarafından kodlanan lizozimin canlının antibakteriyel savunma mekanizmasında merkezi bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu canlıdan elde edilen lizozim genine ait cDNA, Northern blot analizinde prob olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışma, canlının peptidoglikanla muamele edilmesinden sonra lizozim

transkripsiyonunun 7 dokuda önemli derecede arttığını (en fazla da yağ dokusunda) göstermiştir⁴⁹.

Sığır ve kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalar bu canlıların farklı dokularında birden fazla lizozim benzeri genlerin eksprese edildiğini göstermiştir. Sığır genomlarında 10, farelerde ise iki ayrı lizozim benzeri genler tespit edilmiş ve bunların cDNA'ları yapılmıştır¹⁹.

Omurgalılarda olduğu gibi böceklerde de değişik dokularda eksprese olan farklı lizozimler tespit edilmiştir. Bakteriyel enfeksiyon durumunda lizozim genleri de diğer antibakteriyel faktörlerle birlikte kuvvetli bir şekilde uyarılır. Bu uyarım memelilerdeki immün cevap oluşturma mekanizmasına benzer şekildedir. Çürüten maddelerde oluşan mikroorganizmalar üzerinde yaşayan kara sinekler ve meyve sinekleri gibi böceklerde özelleşmiş lizozim genleri gelişmiş olup sindirim kanalının farklı bölgelerinde eksprese olmaktadır. Bu lizozimlerin dizi analizlerinin de birbirlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir⁵⁰.

Sıtma vektörü olan bir sivrisinekten (*Anopheles gambiae*) RT-PCR yöntemi ile lizozim genine ait cDNA oluşturulmuştur. Bu çalışmada, lizozim geninin şekerle beslenen erginlerde bol miktarda eksprese edildiği ve kanla beslenen dişilerde ise ekspresyonun önemli ölçüde azaldığı da tespit edilmiştir. Gen, politen kromozomu 2L üzerinde 27. segmentte lokalizedir⁵¹.

Lizozim, güve böceğinde de (*Hyalophora cecropia*) bakteriyel enfeksiyon veya yaralanma durumunda üretilen antimikrobiyal proteinlerden biridir. İmmun cevaptaki mekanizmanın anlaşılabilmesinde önemli olduğu için bu canlıdan da lizozim geni izole edilmiş, karakterizasyonu yapılmış ve dizi analizi belirlenmiştir. Lizozim geninin bakteriyel enfeksiyonla olduğu gibi lipopolisakkaritler ve phorbol esterle de uyarıldığı ve 24 saat içinde maksimum düzeyde transkribe olduğu tespit edilmiştir⁵².

Heliothis virescens larvasından izole edilen lizozimin de *H. cecropia* lizozimine benzediği ve önemli bir antibakteriyel protein olduğu tespit edilmiştir. *H. virescens* lizoziminin 100 °C ve pH 3.0'da 1 saat tutulduktan sonra bile antibakteriyel aktivitesini koruduğu gözlenmiştir⁵³.

Lizozimin fizyolojik rolü bakterisidal olduğu kabul edilirse, sütte iyi bir koruyucu özelliğe sahiptir. Bir çok canlı türünün sütünde lizozim olduğu

belirlenmiştir. Sütteki lizozim miktarları canlılar arasında farklılık göstermektedir, örn. kısırak sütünde 79 mg/ml, insan sütünde 13 mg/ml, sığır sütünde ise 4.5 µg/ml'dir. İnsan sütü ile sığır sütü arasındaki bir çok fizikokimyasal fark gibi, lizozim içerikleri arasındaki fark da özellikle önemlidir. Bir çok araştırmacı sığır sütü ile beslenen bebeklerin sütlerine lizozim ilave edilmesini tavsiye etmektedirler⁵⁴.

Lizozim, *Listeria monocytogen* gibi gıda bozulması ve bunlara bağlı hastalıklara sebep olan bakterilere oldukça etkilidir. Peynirde *Clostridia* kökenli butirik asit fermentasyonunu kontrolde lizozimin potansiyeli 1966' larda gösterilmiş ve daha sonra da bir çok peynir çeşitlerinde gaz birikimini önlemek ve tat arttırmak için uygulamalar geliştirilmiştir⁵⁵.

Süt bezlerinde insan lizozim geni ekspresyonunun değerlendirilmesi amacı ile transgenik fareler model olarak kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada insan lizoziminin fare sütüne 0.25-0.71µg/µl oranında salgılandığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, süt endüstrisinde lizozim salgılayan transgenik hayvanların kullanılabileceği de önerilmektedir⁵⁶.

100 litre süte 2.5-3 g lizozim ilavesiyle, peynirde mesofilik laktobasillerin ve aerobik spor oluşturan bakterilerin üremesinin büyük ölçüde, anaerobik spor oluşturan bakterilerin üremesinin ise tamamen engellenebildiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, anaerobik spor oluşturan bakterilerin üremesini engellemek için süte nitrat ilavesi yerine zararsız olan lizozimin tercih edilebileceğini göstermektedir⁵⁷.

Süte nisin ve lizozim ilavesinin *Clostridia* hücrelerinin üremesini tamamen durdurduğu, peynirin verimini arttırdığı ve raf ömrünü uzattığı tespit edilmiştir⁵⁸,
59, 60

Gram negatif bakterilerin hücre duvarının en dışında lipopolisakkarit tabakası bulunduğundan lizozim peptidoglikan tabakasına etki edemez. Yapılan çalışmalar lizozimin hidrofobik bir taşıyıcıya bağlanmasıyla mürein tabakasına ulaşabileceğini göstermiş ve bu amaçla, birer yağ asidi olan stearat ve palmitat birimlerinin ilavesiyle gram negatif bakterilere karşı etkin modifiye lizozimler geliştirmiştir. Bu şekildeki asilasyon lizozime transmembranal bir özellik

kazandırmış ve gram negatif bakterilere karşı etkin ve uygulanan canlı için de zararsız bir ilaç olarak kullanılabilme yolunu açmıştır⁶¹.

Lizozimin perillaldehyde ile modifikasyonunun da gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir⁶².

2.2. Gen Klonlama Vektörleri

Gen klonlama, bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının oluşturulmasını sağlayan bir işlemdir. Bu işlem sırasında yabancı DNA molekülü taşıyıcı bir molekül (klonlama vektörü) aracılığı ile konakçı hücreye aktarılır.

Klonlama vektörleri;

- Yabancı DNA'yı kabul edebilmeli, konakçı hücrelerde çoğalabilmeli ve yeni hücrelere de aktarılabilmelidir.
- Rekombinant molekülleri taşıyan hücreleri diğerlerinden ayırabilecek özelliklere (örn. bir antibiyotik direnç geni) sahip olmalıdır.
- Oldukça küçük (ideal olanı 10 kilobaz (kb)'dan daha az) olmalıdır.

Bu özellikleri taşıyan ve klonlama vektörü olarak sıklıkla kullanılan DNA molekülleri plazmidler ve bakteriyofaj DNA molekülleridir. Bu iki çeşit DNA molekülü, moleküler biyoloji teknikleri ile manipule edilerek değişik amaçlara uygun çeşitli vektör molekülleri geliştirilmiştir. Plazmid vektörler ve bakteriyofaj kökenli vektörler dışında fajmidler, kosmidler, bakteriyel yapay kromozomlar (BAC'lar) ve maya yapay kromozomları (YAC'lar) değişik amaçlar için geliştirilen vektör moleküllerine örnek olarak verilebilir^{63, 64}.

Bu tez çalışmasında vektör molekülü olarak plazmid klonlama vektörleri kullanıldığı için sadece bunlar hakkında genel bilgiler verilecektir.

Plazmid vektörler: Plazmidler bakteri hücrelerinde bulunan, kromozomal DNA'dan bağımsız olarak çoğalabilme özelliğine sahip halkasal yapıdaki DNA molekülleridir. Konakçı hücreye çoğunlukla avantaj kazandıran bir veya daha fazla gen taşırlar^{63, 65}.

Plazmidlerin özellikleri:

a- Bakteriyel genomun bir parçası olmayan kromozom dışı halkasal DNA molekülleridir.

b- 1-250 kb arası büyüklükleri vardır.

c- Konakçı hücreye;

- antibiyotiklere dirençli olmak (toksik konsantrasyondaki antibiyotikli ortamda yaşayabilirler),
- kompleks organik bileşikleri ve ağır metalleri parçalayan enzimler üretmek,
- antibiyotik üretmek ve
- restriksiyon ve modifikasyon enzimleri üretmek gibi birtakım avantajlar sağlarlar.

d- Replikasyonları konakçı DNA replikasyonu ile beraber, fakat bağımsız olarak gerçekleşir.

Bakteri hücrelerinde doğal olarak bulunan plazmidler özelliklerine göre 5 gruba ayrılabilir^{63, 65};

1. **Fertilite veya 'F' plazmidleri:** *Escherichia coli* (*E. coli*)'de 95 kb büyüklüğünde bir plazmidir. Bu plazmid *tra* (transfer) genlerinin bulunduğu büyük bir operonu da içeren 30 gen taşımaktadır. Bu genler F pilus'un sentezlenmesinde ve DNA transfer işlemlerinde gereken proteinleri kodlamaktadır. F⁺, F plazmidini bulunduran, F⁻ ise bulundurmeyen bakteri hücreleridir.
2. **Direnç (Resistance) veya 'R' plazmidleri:** Konakçı bakteriye bir veya daha fazla antibakteriyel ajana (örn. kloramfenikol, ampicilin ve cıva gibi) karşı direnç kazandıran genleri taşırlar. R plazmidleri klinik mikrobiyolojide çok önemlidirler.
3. **Col Plazmidleri:** Diğer bakterileri öldüren proteinleri (colicins) kodlarlar. Örn. *E. coli*'nin ColE1'i gibi.
4. **Parçalayıcı (Degradative) Plazmidler:** Konakçı bakteriye toluen ve salisilik asit gibi molekülleri metabolize etme özelliği kazandırırılar.
5. **Virulans Plazmidleri:** Konakçı bakteriye patojenite özelliği kazandırırılar.

Plazmidlerin klonlama vektörleri olarak kullanılmasını sağlayan özelliklerden bazıları ise şunlardır^{63, 64, 66};

- Küçük oluşları, plazmid DNA'nın izolasyonu ve manipulasyonunu kolaylaştırır.
- Halkasal yapıda oluşları, kimyasal izolasyon sırasında DNA'nın daha stabil kalmasını sağlar.
- Bağımsız replikasyon orijinine sahip oluşları, kromozomal DNA kontrolünden bağımsız olarak çoğalabilirler.
- Kopya sayılarının çok oluşu, hücre içinde birden fazla sayıda bulunabilirler (DNA amplifikasyonunu sağlar).
- Seçici bir marker gene sahip oluşları, plazmidi bulunduran klonların seçimini kolaylaştırır.

Plazmid vektörlerin istenen bütün özellikleri bir arada bulunduracak şekilde geliştirilmesi bir seri çalışmalar sonunda başarılmıştır.

Bu çalışmalarda ilk basamak pMB1(veya ColE1) replikonu taşıyan plazmidlere seçici marker genler (*tef* ve *amp*^r) aktarılması olmuştur.

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar, hem vektör boyutunu hem de bir çok restriksiyon endonükleazla kesilerek oluşturulan DNA parçalarını kabul edebilme kapasitesini artırma üzerinde yoğunlaşmıştır. Bir çok nedenden dolayı küçük boyutlu plazmidler tercih edilir^{64, 67}:

- Transformasyon verimi plazmid büyüklüğü ile ters orantılıdır. Çizelge 2.1'de büyüklük ve transformasyon verimi arasındaki ilişki verilmiştir⁶⁴.

Çizelge 2.1. Plazmid büyüklüğü ve transformasyon verimi.

Plazmid büyüklüğü (kb)	Mak. Transformasyon (%)
2.0	57
3.2	100
4.3	86
12.5	43
20.0	36
39.0	14
54.0	6

- Küçük plazmidlere daha büyük DNA parçaları takılabilir.
- Restriksiyon haritaları ile karakterize etmek daha kolaydır.
- Plazmid boyutu büyüdükçe hücredeki kopya sayısı azalır.

Son yıllarda vektörler üzerindeki restriksiyon enzimi kesim bölgeleri daha da arttırılmış ve kesim bölgeleri sentetik olarak bir araya getirilmiştir. Seri halde bir araya getirilmiş kesilme bölgeleri 'polilinker', 'restriksiyon bölge bankaları' (restriction site banks) veya 'çoklu klonlama bölgeleri' ('polycloning sites' veya 'multiple cloning sites') olarak isimlendirilmektedir. Birçok vektörde bu bölgedeki kesim noktaları yalnızca bir tanedir. Çoklu klonlama bölgesini taşıyan plazmid vektörler üzerindeki çalışmalar, rekombinant kolonilerin histokimyasal yöntemle seçilebilmesine olanak veren pUC serisi plazmidlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu vektörler *E. coli lac* (lactoz) operonundan β -galaktozidaz'ın α -komplementini (amino-terminal parçasını) kodlayan bir DNA parçasını (*Lac Z* genini) taşırlar. Bu gen içine, okuma çerçevesini (open reading frame) bozmayacak şekilde ilave edilen çoklu klonlama bölgesi (MCS) enzim aktivitesine zarar vermez. Bu özellikteki vektörler β -galaktozidaz'ın karboksi-terminal parçasını kodlayan konakçı hücrelerle birlikte kullanılır. Aynı ayrı olduklarında aktivite göstermeyen bu iki parça bir araya geldiğinde aktif bir enzim oluşturur. β -galaktozidaz, kromogenik ve laktoz analogu bir madde olan X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)' i parçalayarak mavi renk oluşturmaya neden olur. Yani X-gal'li plaklarda bu özellikteki bakteriler mavi koloni oluştururlar. MCS içine yapılan klonlamada β -galaktozidaz'ın α -komplementi sentezlenemediği için (gen inaktif edildiğinden) aynı ortamda rekombinant plazmidi taşıyan bakteriler beyaz koloni (normal koloni) oluştururlar. Bu şekildeki basit renk testinin geliştirilmesi rekombinantların seçimini oldukça kolaylaştırmıştır.

Plazmid vektörlerin geliştirilmesi, bir çok amaca yönelik olarak bir takım yardımcı dizilerin ilave edilmesiyle devam etmiştir. Bu amaçlardan bazıları DNA dizi analizi için tek iplikli DNA kalıplarının oluşturulması, klonlanan genin *in vitro* transkripsiyonu ve klonlanan genden verimli bir şekilde ilgili proteinin ekspresyonudur^{63, 64}.

Hem plazmid vektörlere örnek oluşturması için hem de bu tez çalışmasında vektör molekülleri olarak kullanıldığından, pUC18 ve pRS416 plazmid vektörlerinin yapısı (Şekil 2.2.) ve özellikleri genel olarak izah edilecektir:

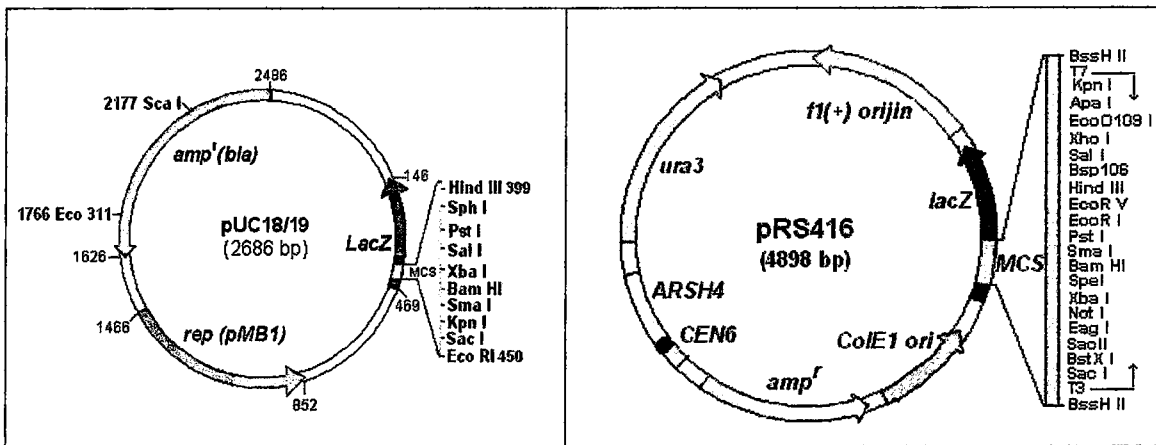
pUC18/19 plazmid vektörleri küçük (2686 bp) ve yüksek kopya sayısına sahip *E. coli* plazmidleridir. Her ikisi de aynı özelliklerdedir yalnızca MCS bölgelerinin orientasyonu farklıdır. Bu plazmidler üzerinde bulunan yapılar şu şekildedir⁶⁸;

- 1- **pMB1 replikonu:** pBR322 orijinli olup plazmidin replikasyonundan sorumludur. pUC serisi plazmidlerin yüksek kopya özelliğine sahip olması *rep* geni olmayışı ve *rep* geni içinde bir nokta mutasyonu bulunmasındandır.
- 2- ***bla* geni:** Ampisiline direnç sağlayan β -lactamase kodlayan bir genidir, pBR322 orijinlidir.
- 3- ***LacZ* geni:** M13 mp 18/19 orijinlidir (bu genin özelliği yukarıda açıklanmıştır).

PMB1 replikonu taşıyan plazmidler kloramfenikol kullanılarak amplifiye edilebilir.

pRS416 plazmid vektörü yukarıdaki yapılara ilaveten şu özelliklere de sahiptir:

- 1- ***ura3*:** Mayalara özgü minimal ortamda seçicilik sağlar. Bu geni taşıyan vektörler urasil bakımından mutant olan maya hücrelerini konakçı olarak kullanır.
- 2- ***ARSH4*:** Maya kromozomu orijinlidir ve plazmidin maya hücrelerinde replikasyonunu sağlar.
- 3- ***CEN6*:** Maya kromozomu orijinlidir ve plazmidin hücre içinde kromozom gibi davranarak sürekliliğini sağlar.



Şekil 2.2. pUC18/19 ve pRS416 plazmid vektörlerinin genel yapıları.

Son yıllarda vektörler üzerindeki restriksiyon enzimi kesim bölgeleri daha da arttırılmış ve kesim bölgeleri sentetik olarak bir araya getirilmiştir. Seri halde bir araya getirilmiş kesilme bölgeleri 'polilinker', 'restriksiyon bölge bankaları' (restriction site banks) veya 'çoklu klonlama bölgeleri' ('polycloning sites' veya 'multiple cloning sites') olarak isimlendirilmektedir. Birçok vektörde bu bölgedeki kesim noktaları yalnızca bir tanedir. Çoklu klonlama bölgesini taşıyan plazmid vektörler üzerindeki çalışmalar, rekombinant kolonilerin histokimyasal yöntemle seçilebilmesine olanak veren pUC serisi plazmidlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu vektörler *E. coli lac* (laktöz) operonundan β -galaktozidaz'ın α -komplementini (amino-terminal parçasını) kodlayan bir DNA parçasını (*Lac Z* genini) taşırlar. Bu gen içine, okuma çerçevesini (open reading frame) bozmayacak şekilde ilave edilen çoklu klonlama bölgesi (MCS) enzim aktivitesine zarar vermez. Bu özellikteki vektörler β -galaktozidaz'ın karboksi-terminal parçasını kodlayan konakçı hücrelerle birlikte kullanılır. Aynı zamanda aktifte göstermeyen bu iki parça bir araya geldiğinde aktif bir enzim oluşturur. β -galaktozidaz, kromogenik ve laktöz analogu bir madde olan X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)' i parçalayarak mavi renk oluşturmaya neden olur. Yani X-gal'li plaklarda bu özellikteki bakteriler mavi koloni oluştururlar. MCS içine yapılan klonlamada β -galaktozidaz'ın α -komplementi sentezlenemediği için (gen inaktif edildiğinden) aynı ortamda rekombinant plazmidi taşıyan bakteriler beyaz koloni (normal koloni) oluştururlar. Bu şekildeki basit renk testinin geliştirilmesi rekombinantların seçimini oldukça kolaylaştırmıştır.

Plazmid vektörlerin geliştirilmesi, bir çok amaca yönelik olarak bir takım yardımcı dizilerin ilave edilmesiyle devam etmiştir. Bu amaçlardan bazıları DNA dizi analizi için tek iplikli DNA kalıplarının oluşturulması, klonlanan genin *in vitro* transkripsiyonu ve klonlanan genden verimli bir şekilde ilgili proteinin ekspresyonudur^{63, 64}.

Hem plazmid vektörlere örnek oluşturma için hem de bu tez çalışmasında vektör molekülleri olarak kullanıldığından, pUC18 ve pRS416 plazmid vektörlerinin yapısı (Şekil 2.2.) ve özellikleri genel olarak izah edilecektir:

Bir PCR reaksiyonu için gerekli olan bileşenler ve fonksiyonları ise genel olarak şu şekildedir^{63, 69}:

- 1) Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTPs);** polimerizasyon reaksiyonu için enerji ve nükleotid kaynağını oluştururlar.
- 2) DNA Polimeraz;** termofilik bakterilerden izole edildiğinden yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır. DNA polimerizasyonunu sağlar.
- 3) Primerler;** kalıp molekül üzerindeki amplifiye edilecek bölgenin sınırlarını belirleyen sentetik oligonükleotidlerdir, aynı zamanda polimerizasyon için DNA polimeraz enzimine primer görevi yapar. Reaksiyonun başarılı olmasındaki en önemli faktörlerden biri olduğundan özenle seçilmelidir. Primer seçiminde şu kriterler göz önünde bulundurulmalıdır:

- Kendi aralarında ve diziler içinde komplementer bölgeler olmamalı.
- 3' uçlarında Timin (T) bulunmamalı. Çünkü T nükleotid yanlış eşleşmeye daha toleranslıdır.
- Tm' leri aynı veya çok yakın olmalı.
- GC (Guanin-Sitozin) oranı %40-60 arasında olmalı.
- Dizi 1-2 pürin bazı ile başlayıp bitmeli.
- Bir baz 4'den fazla arka arkaya gelmemeli.

- 4) Kalıp DNA;** amplifiye edilecek bölge için ana kalıp (template) görevi yapar. Çalışılacak olan herhangi bir canlıdan özenle izole edilir ve saflaştırılır.
- 5) Reaksiyon tamponu;** reaksiyon ortamının iyonik direnci, pH' sı ve enzimatik reaksiyonlar için gereken her şeyi bulunduran bir karışımdır.

2.4. Plazmid DNA İzolasyonu

Bakteri kültüründen kromozomal ve plazmid DNA saflaştırılmasında aynı genel strateji uygulanmakta olup kısaca şöyledir⁶³:

a) Bakteri Kültürünün Hazırlanması ve Hasadı:

Çoğu bakteriler sıvı besi yerinde kolaylıkla üreyebilmektedir. Besi yerleri, bakteri hücrelerinin etkin bir şekilde büyüüp bölünebilmesi için gereken bütün bileşenleri dengeli bir şekilde içermektedir.

Bakteri kültürü uygun besi yeri ve üreme sıcaklığında bir gece (~ 12 saat) üretilir. Bakteri hücreleri her 20 dakikada bir bölünerek süre sonunda $2-3 \times 10^9$ hücre/mililitre'ye ulaşacaktır (bu değer *E. coli* içindir). Kültürün büyümesi 600 nm'deki absorbans (optical density, OD) okunarak izlenebilir. 600 nm'deki 1 OD birimi, $\sim 0.8 \times 10^9$ hücre/ml'ye karşılık gelmektedir (Bakteri türüne göre değişebilir). Bakteri kültürü $A_{600 \text{ nm}}$ 'de ~ 3 OD birime ulaştınca, etüvden alınarak (düşük hızda (4.000-5.000 rpm) santrifüj edilir ve hücreler çöktürülür. Besi yeri (sıvı faz) atılarak hücreler düşük hacimde lizis tamponunda tekrar çözülür.

b) Hücre Özütünün (cell extract) Hazırlanması:

Bakteri hücreleri sert bir hücre duvarı ve stoplazmik zarla çevrilidir. Hücre bileşenlerini açığa çıkartmak için bu engellerin ortadan kaldırılması (hücrenin patlatılması) gerekmektedir. Hücreler fiziksel veya kimyasal yöntemlerle patlatılabilir. DNA hazırlanmasına yönelik çalışmalarda kimyasal teknikler kullanılmaktadır.

Kimyasal liziste bakteri hücre duvarını ve hücre zarını parçalamak için iki ayrı ajan kullanılır. Kullanılan kimyasal, hücre türüne göre değişebilir. *E.coli* ve benzer hücreler için hücre duvarı, lizozim, ethylen diamine tetra acetate (EDTA) veya ikisinin kombinasyonu ile zayıflatılır. Lizozim hücre duvarına sertlik veren polimerik bileşikler (peptidoglikan, mürein tabakası) parçalar, EDTA ise hücre duvarının bütünlüğünü sağlamada gereken magnezyum iyonlarını (Mg^{+2}) bağlar (chelating agent) ve bir de DNA'yı parçalayan hücresel enzimleri inhibe eder.

EDTA ve lizozimle birlikte genellikle sodium dodecyl sulphate (SDS) gibi deterjanlarda kullanılır. Deterjanlar lipid moleküllerini uzaklaştırarak hücre zarının yapısını bozar ve lizise yardımcı olur. Lizat oluşturulduktan sonra suda çözünmeyen hücre artıkları santrifüjle uzaklaştırılır ve özüt berrak süpernatant halinde kalır.

c) Hücre Özütünden DNA'nın Saflaştırılması:

Bakteri özütü DNA'ya ilaveten önemli miktarlarda protein ve RNA da içerecektir. Değişik işlemlerle bu kontaminantlar da uzaklaştırılarak DNA saf hale getirilir.

Hücre özütünü deproteinize etmek için standart bir yol özüte fenol veya 1:1 oranında fenol-kloroform karışımı ilave etmektir. Bu organik çözücüler proteinleri presipite eder fakat DNA ve RNA ya zarar vermez. Bu çözücülerin ilavesinden sonra özüt nazik bir şekilde sallanarak homojenize edildikten sonra santrifüj'e alınır. Presipite olan protein molekülleri organik çözücü ve sulu çözelti arasında beyaz bir çökelti oluşturacak şekilde ayrılır. Nükleik asitlerin bulunduğu sulu çözelti pipetle dikkatli bir şekilde alınır. Bazı hücre özütlerinde protein içerik fazla olabilir, bu durumda yukarıdaki işlemler tekrarlanabilir. Fakat bu uygulama DNA molekülünde kırıklara neden olabileceği için fazla tekrarlanması pek tercih edilmez, Bunun yerine özüt fenol aşamasından önce pronaz veya proteinaz-K gibi bir proteazla muamele edilebilir. Bu enzimler polipeptitleri küçük birimlere ayırarak fenolle daha kolay bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlarlar. Bazı RNA molekülleri de özellikle mRNA, fenol muamelesi sırasında uzaklaştırılır, fakat çoğu sulu çözeltide DNA ile birlikte kalır. RNA'yı solüsyondan uzaklaştırmanın en etkin yolu molekülleri hızlı bir şekilde ribonükleotid alt birimlerine ayıran ribonükleaz enzimi ile parçalamaktır.

d) DNA'nın Yoğunlaştırılması:

Başarılı bir izolasyon, çoğunlukla daha fazla yoğunlaştırmaya gerek kalmayacak şekilde yoğun bir DNA solüsyonu ile sonuçlanır. Seyreltik çözelti elde edilmesi durumunda DNA konsantrasyonunu arttıracak metotlar kullanılır. Çoğunlukla kullanılan yoğunlaştırma yöntemi etanol presipitasyonudur. Tuz varlığında (Na^+ gibi monovalent katyonlar) ve -20°C veya daha düşük sıcaklıklarda saf etanol (absolute ethanol) polimerik nükleik asitleri etkin bir şekilde presipite eder. DNA solüsyonu yoğun ise etanol üstte kalır, DNA ise arada yoğunlaşır. Bu durumda DNA etanol içinden temiz bir cam çubukla alınır ve yeterli miktar TE buffer' da (Ek 1.9.) veya saf suda çözülür.

Alternatif olarak, eğer çözelti seyreltik ise presipitasyon santrifüjle toplanır ve sonra steril suda veya TE buffer'da tekrar çözülür. Etanol presipitasyonun bir avantajı da kısa zincirli ve monomerik nükleik asitleri solüsyonda bırakmasıdır. Ribonükleaz muamelesinde oluşan ribonükleotidler de bu aşamada arındırılır.

Kromozomal DNA hazırlanması ile plazmid DNA hazırlanması arasındaki önemli bir fark, plazmid DNA'yı bir arada bulunduğu büyük miktardaki kromozomal DNA'dan ayırmaktır. İki tip DNA'yı birbirinden ayırmak zor olabilir. Fakat plazmid klonlama vektörü olarak kullanılacaksa bu zorunludur. Çok küçük miktarlardaki kromozomal DNA kontaminasyonu bile gen klonlama deneylerinde istenmeyen sonuçlara neden olabilir. Plazmid DNA hazırlanması sırasında kromozomal DNA'yı uzaklaştıracak değişik metodlar vardır. Bunların tek veya birlikte kullanılmasıyla çok saf bir şekilde plazmid DNA'nın izolasyonu mümkün olmaktadır. Bu metodlar plazmid DNA ve kromozomal DNA arasındaki fiziksel farklılıklara dayanmaktadır. Bu farklılıkların en belirginini büyüklük farklarıdır, örn. en büyük plazmid bile *E.coli* kromozomunun % 8'i kadardır ve çoğu plazmidler çok daha küçüktür. Küçük DNA'yı büyüklerinden ayıran teknikler plazmid DNA'yı etkin bir şekilde ayırabilecektir.

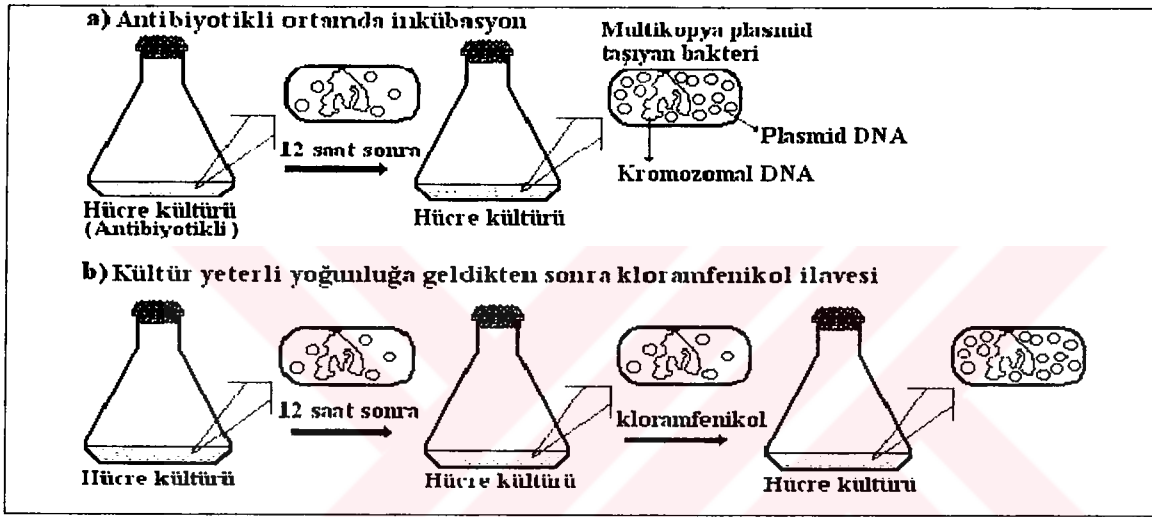
Büyüklük farkına ilaveten, plazmid ve kromozomal DNA konformasyonu (molekülün komple yapısı) da farklıdır. Plazmidler ve bakteriyel kromozom sirküler (çembersel) yapıdadır, fakat hücre özütü hazırlanması sırasında kromozom kırılarak lineer forma dönüşür. Sirküler DNA'yı lineer DNA'dan ayıran metod, plazmid DNA'nın saf olarak elde edilmesini sağlayacaktır.

Plazmid Amplifikasyonu (kopya sayısının artırılması):

Bakterilerdeki plazmid DNA kromozomal DNA'ya göre çok küçük bir orandadır. Bakteri kültüründen elde edilen plazmid miktarı hayal kırıklığına uğratabilecek kadar düşük olabilir. Bu yüzden plazmid amplifikasyonu verimi arttırmak için önemlidir. Bazı multikopya plazmidler (hücrede 20 veya daha fazla sayıda bulunanlar) protein sentezi olmadığı zamanlarda çoğalma özelliğindedirler. Bu durum kromozomal DNA ile çelişir, çünkü kromozomal DNA bu şartlarda replike olmaz. Kültürdeki hücre yoğunluğu yeterli miktara ulaştıktan sonra ortama protein sentezini inhibe eden bir ajan (örn. chloramphenicol) ilave

edilerek inkübasyona ~12 saat daha devam edilir. Bu süre içinde plazmid molekülü replikasyona devam eder fakat kromozomal DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi bloke edilir. Sonuçta plazmid, hücre başına yüzlerce kopya sayısına ulaşır (Şekil 2.3b).

Plazmid amplifikasyonu için bir alternatif de inkübasyon sırasında besi yerine belirli miktarda, plazmidin taşıdığı antibiyotik direnç geni cinsinden antibiyotik ilave etmektir. Bu durumda bakteri ortamdaki antibiyotiğe direnç için otonom olarak plazmid sayısını normalin üstüne çıkaracaktır (Şekil 2.3a).



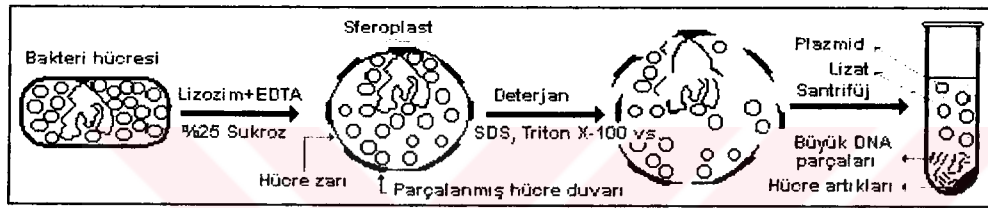
Şekil 2.3. Plazmid amplifikasyonu. a) Antibiyotik ilavesiyle b) Kloramfenikol ilavesiyle.

Yukarıda kısaca açıklanan plazmid izolasyon yöntemlerinin detayları aşağıda verilmiştir.

a) Büyüklük Farkına Dayalı Ayırım

Bakteri hücreleri çok dikkatli ve kontrollü bir şekilde lizise uğratılırsa kromozomal DNA kırılmaları çok az olacaktır. Açığa çıkan kromozomal DNA hala plazmidten çok büyüktür (kırılma olsa bile) ve hücre artıklarıyla birlikte santrifügasyonla uzaklaştırılabilir. Bu işleme şu gerçek de yardımcı olur; bakteriyel kromozomal DNA hücre zarına fiziksel olarak bağlı durumdadır ve bu bağlantı kopmadığı sürece DNA bağlı olduğu zar parçasıyla çökecektir. Bu yüzden hücrelerin lizise uğratılması sırasındaki işlemler çok dikkatli bir şekilde yürütülmelidir. *E.coli* ve benzer bakteriler için kontrollü bir lizis Şekil 2.4.'de

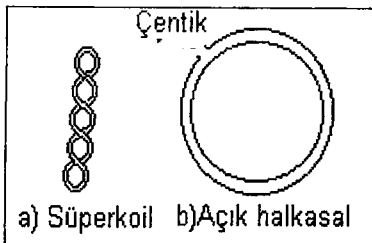
görüldüğü gibi yapılabilir. EDTA ve lizozim ile muamelede ani patlamayı önlemek için işlem sukroz varlığında yapılır ve sferoplastlar (hücre duvarı kısmen zayıflatılmış hücreler) oluşturulur. Bu aşamada sferoplastların lizisi ortama Triton X-100 gibi non-iyonik deterjanlar (non-iyonik deterjanlar iyoniklerden daha az kromozomal kırıklar oluşturur) ilave edilerek gerçekleştirilir. Santrifügasyonla hemen tamamen plazmid içeren berrak bir lizat (süpernatant) elde edilir. Bu yöntemin dezavantajı ise lizat içinde hala küçük kromozomal artıklar kalmış olabilir ve eğer plazmid DNA büyükse hücre artıklarıyla çökebilir. Bu yüzden kromozomal DNA kontaminasyonunu engelleyen alternatif metotlar kullanmak gerekir.



Şekil 2.4. Bakteri hücrelerinin kontrollü bir şekilde patlatılması.

b) Konformasyona Dayalı Ayırım

Plazmidlerin her zaman sirküler konformasyonda olduğunu söylemek doğru değildir, çünkü çift sarmallı DNA halkaları birbirinden oldukça farklı iki konfigürasyondan birini alırlar. Plazmidlerin çoğu, hücrede süperkoil moleküller olarak bulunur. Süperkoil konformasyonu yalnızca her iki polinükleotid iplikçiklerinin de sağlam olduğu (kırık olmadığı) durumlarda korunur. Bu forma daha teknik bir dille kovalent olarak kapalı halkasal DNA (covalently closed-



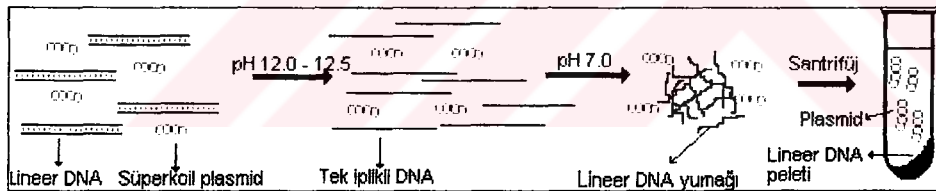
Şekil 2.5. Süperkoil ve Halkasal DNA konformasyonları

circular DNA, cccDNA) denir (Şekil 2.5a). Eğer Polinükleotid ipliklerinden biri kırılırsa çift sarmal normal, çözülmüş duruma dönecek ve plazmid açık halkasal (open-circular DNA ,ocDNA) konformasyon olarak isimlendirilen şekli alacaktır (Şekil 2.5b). Süperkoil durum plazmid izolasyonunda önemlidir, çünkü süperkoil moleküller diğer DNA' lardan

oldukça kolay bir şekilde ayrılabilirler. Bu işlem için yaygın olarak iki farklı metot kullanılmaktadır:

I. Alkalın denatürasyonu

Bu yöntemin temel prensibi şudur; öyle dar bir pH aralığı vardır ki bu aralıkta süperkoil olmayan DNA denatüre olurken süperkoil plazmidler etkilenmez. Hücre özütüne veya lizata sodyum hidroksit (NaOH), ilave edilerek pH 12.0-12.5'e ayarlanır. Bu pH aralığında süperkoil olmayan DNA moleküllerinin hidrojen bağları kırılır ve çift sarmal yapı açılır, polinükleotid zincirleri ayrılır. Tam bu sırada ortama asit ilave edilerek aniden pH düşürülür ve denatüre olmuş DNA iplikçikleri rasgele düzensiz bir şekilde tekrar birleşir. Bu durum karmaşık bir DNA yumağı oluşmasına neden olur. Suda çözünmeyen bu ağsı yapı santrifügasyonla çökeltilir ve süpernatant içinde saf plazmid DNA kalır (Şekil 2.6.). Bu işlemin bir avantajı da bazı durumlarda (özellikle SDS ile lizis ve sodyum asetat ile nötralizasyon yapıldığında) çoğu protein ve RNA molekülleri de insoluble hale gelir ve santrifüjlenerek uzaklaştırılır. İşlem iyi yürütülürse fenol ve ribonükleaz muamelesi gerekmez.

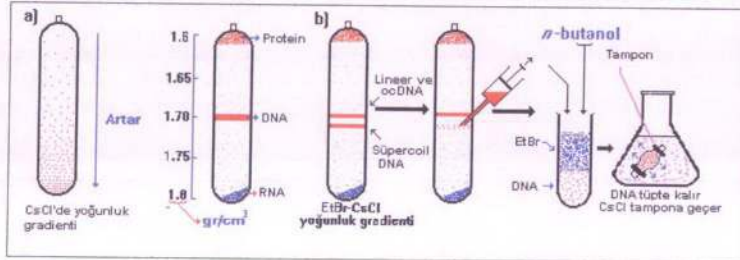


Şekil 2.6. Alkalın denatürasyon metodu

II. Etidyum Bromid-Sezyum Klorid (EtBr-CsCl) yoğunluk gradienti santrifügasyonu:

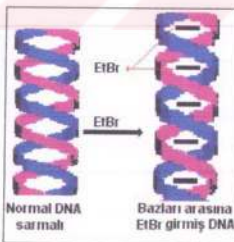
Bu yöntem daha genel olan yoğunluk gradienti santrifügasyon tekniğinin özelleştirilmiş bir versiyonudur. Sezyum klorid (CsCl) solusyonunun yüksek hızda santrifüjlenmesi yukarıdan aşağıya doğru artan bir yoğunluk gradienti oluşturur (Şekil 2.7a). Makromoleküler CsCl solusyonu içinde santrifüjlendiği zaman yoğunluk gradienti içinde farklı noktalarda bantlar oluşturur. Bir molekülün tam olarak nerede bant oluşturacağı onun buyant densitesine (bd) bağlıdır. DNA yaklaşık 1.7 gr/cm^3 lük bir bd'ne sahiptir ve gradient içinde CsCl

yoğunluğunun 1.7 gr/cm^3 olduğu noktaya göç eder. Protein molekülleri daha küçük $\text{bd}'ne$ sahip oldukları için tüpün üst bölgesinde kalırken RNA'lar tabana çökerek pelet oluştururlar (Şekil 2.7a).



Şekil 2.7. a) CsCl ile yoğunluk gradienti oluşturulması b) CsCl-EtBr santrifüjasyonu ile lineer ve süperkoil DNA moleküllerinin ayrılması.

Yoğunluk gradienti, DNA, RNA ve proteinleri ayırabildiği için DNA saflaştırılmasında fenol ve ribonükleaz uygulamalarına alternatif olarak kullanılabilir. Daha önemlisi, etidyum bromid (EtBr) varlığında yoğunluk gradienti santrifüjasyonu süperkoil DNA'yı diğerlerinden ayırmak için kullanılabilir. EtBr DNA molekülüne baz çiftleri arasına girerek bağlanır (intercalating) ve çift sarmalın kısmen açılmasına neden olur (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. EtBr' ün DNA bazları arasına girerek konformasyonunu değiştirmesi.

Bu açılma linear DNA'da bd 'nin 0.125 gr/cm^3 'ü oranında azalmasıyla sonuçlanır. Süperkoil DNA'da serbest uç olmadığı için çok az bir oranda açılma olur ve yalnızca sınırlı miktar EtBr bağlayabilir, sonuçta bd 'indeki azalma çok azdır (yalnızca 0.085 gr/cm^3). Süperkoil DNA, lineer ve açık halkasal DNA'ya göre EtBr-CsCl yoğunluk gradientinde farklı bir pozisyonda band oluşturacaktır. DNA bantlarının tüpteki yerleri tüp UV'ye tutularak tespit edilir ve tüp (plazmidlerin olduğu noktadan) bir enjektörle delinerek ağlanmış olan EtBr *n*-butanol ile, CsCl ise diyalizle

uzaklaştırılır. Elde edilen plazmid %100 oranında saftır ve kullanıma hazırdır (Şekil 2.7b)⁶³.

2.5. DNA Konsantrasyonu ve Saflık Derecesinin Ölçülmesi

Kesim, ligasyon ve transformasyon gibi reaksiyonlar hazırlanırken sıvıdaki DNA miktarını ve saflık derecesini bilmek oldukça önemlidir. DNA konsantrasyonu UV (Ultra Viyole) spektrofotometresi ile doğru olarak ölçülebilmektedir. Solüsyon tarafından emilen (tutulan) UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans genellikle 260 nm'de ölçülür. Bu dalga boyundaki her absorbans değeri 50 µg/ml çift sarmallı DNA miktarına karşılık gelir ($A_{260 \text{ nm}}$ 'de 1 OD = 50 µg/ml DNA). Bu değer tek iplikli DNA (ssDNA) için 33 µg/ml, RNA için ise 40 µg/ml'dir⁷⁰.

UV absorbansı aynı zamanda DNA'nın saflığını kontrol etmek için de kullanılabilir (260 nm'de nükleik asitler, 280 nm'de de proteinler pik verir). Saf bir DNA örneğinde 260 ve 280 nm deki absorbans oranı $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = 1.8$ ' dir. 1.8'den düşük değerler örnekte protein veya fenol kontaminasyonu, 1.8'den büyük değerler ise RNA kontaminasyonu varlığını gösterir (RNA için $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = 1.8-2.0$ dir).

2.6. Restriksiyon Endonükleazlar

Çift iplikli DNA moleküllerini yalnızca özgün tanıma dizilerinden kesen özel enzimler grubudur. Restriksiyon endonükleazlar hemen hemen bütün bakteri türleri tarafından sentezlenir. Bakteriye giren virüslerin nükleik asitlerini parçalayarak viral enfeksiyonlara engel olduklarından restriksiyon, DNA molekülünü genelde uç kısımlar değil daha içten kestikleri için de endonükleaz ismini almışlardır. Birbirlerinden küçük farklarla ayrılan üç tip restriksiyon endonükleaz vardır; Tip I, Tip II ve Tip III. Tip I ve Tip III oldukça kompleks olup genetik mühendisliği çalışmalarında kullanımı sınırlıdır.

Tip II endonükleazların tanıma dizileri özgün, palindromik, kesim yeri tanıdığı dizi içinde ve kesim şekli de düzenlidir (Tip I. ve Tip III

endonükleazlarda bu özellikler yoktur). Bu enzimler oldukça stabildir ve kofaktör olarak yalnızca Mg^{+2} a ihtiyaç duyarlar. DNA üzerinde 4-8 nükleotidlik özel tanıma dizilerine sahiptirler. Kesim şekilleri, tanıma dizisi içinde ya küt (blunt) ya da yapışkan (sticky veya cohesive) uç oluşturacak şekildedir (Şekil 2.9.).

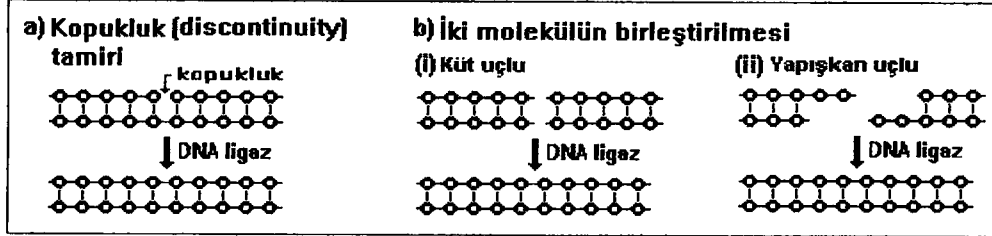
Restriksiyon endonükleazların bazıları tanıma dizilerindeki bir veya iki nükleotid değişimlerine toleranslı olabilir (dejeneratif özellik), bazıları aynı tanıma dizilerine sahip olabilirler (izoşimerler) ve bazıları da farklı tanıma dizilerine sahip oldukları halde aynı şekilde yapışkan uç oluşturabilirler (uyumlu enzimler). Son durumda oluşan moleküllerin birleştirilmesi halinde hibrid diziler oluşur ve bu dizi daha önceki enzimler tarafından tanınmaz fakat başka enzimler tarafından tanınabilir.

Restriksiyon endonükleazlarla hazırlanacak bir reaksiyonda DNA/Enzim oranı, tampon bileşimi ve inkübasyon sıcaklığı dikkat edilecek en önemli kriterlerdir. Kural olarak bir ünite enzim, 1.0 μ g λ DNA'yı 1 saat içinde kesen enzim miktarı olarak kabul edilir ve ayarlamalar buna göre yapılır. Enzimler %50 oranında gliserol içinde pazarlandığından reaksiyon ortamındaki gliserol miktarının artmaması için, enzim miktarı reaksiyon hacminin 1/10'unu geçmemelidir. Ortamdaki fazla gliserol ve enzim/DNA arasındaki dengesizlik (enzim miktarındaki fazlalık) durumunda enzim DNA'yı özgün olmayan bölgelerden kesebilir ve dizi içindeki kesim yerini de değiştirebilir (star aktivitesi). Reaksiyon süresi sonunda (~1-1.5 saat), son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde EDTA ilave edilerek, ısıya hassas olanlar için 70 °C'de 15-20 dakika tutularak veya fenol ekstraksiyonu yapılarak reaksiyon durdurulur⁶³.

2.7. Ligazlar

İki ayrı DNA molekülünün birleşmesini (ligasyonunu) katalizleyen enzimlerdir. Hücre içinde DNA ligazların görevi; DNA replikasyonu sırasında olduğu gibi (okazaki fragmentlerinin birleştirilmesi) çift sarmallı DNA moleküllerinde ortaya çıkan tek iplik üzerindeki kopuklukları (discontinuties) tamir etmek, fosfodiester bağına kurmaktır (Şekil 2.9) (kopukluklar zaman aşımına uğrayan DNA'da kendiliğinden de olabilir). Çoğu organizmalarda, DNA

ligazların görevi, iki ayrı çift sarmallı DNA moleküllerini birleştirmektir (Şekil 2.9.). Bu yüzden DNA ligazlar hücrede oldukça hayati öneme sahiptirler. Bütün canlı hücreler DNA ligaz üretirler fakat genetik mühendisliğinde kullanılan DNA ligaz genellikle T4 fajla enfekte olmuş *E.coli* bakterilerinden saflaştırılır⁶³.



Şekil 2.9. DNA ligazlarla katalizlenen reaksiyon tipleri

2.8. Jel Elektroforezi

Proteinler ve diğer bir çok biyolojik bileşiklerde olduğu gibi DNA molekülleri de elektriksel bir yük (negatif yük) taşırlar. Sonuçta, elektriksel bir alana konduklarında pozitif kutba doğru göç ederler. Molekülün göçü iki faktörün etkisi altındadır; şekli ve yükünün kütlesine oranı. Fakat çoğu DNA molekülleri aynı şekle ve aynı yük/kütle oranına sahiptir. Bu yüzden farklı büyüklüklerdeki DNA parçaları, standart elektroforez yöntemiyle birbirinden ayıramaz (büyüklük farkına rağmen çok küçük fark oluşur). Eğer elektroforez işlemi agaroz, poliakrilamid veya ikisinin karışımından oluşan bir jel ortamında gerçekleştirilirse, büyüklük molekülün göçünü etkileyen bir faktör olur. Jel ortamı, DNA moleküllerinin anoda doğru hareketi sırasında içinden geçmek zorunda olduğu karmaşık ağısı veya gözenekli bir yapı oluşturur. Buradaki hareket hızı tamamen molekülün büyüklüğü ile orantılıdır (küçük olan daha hızlı gider). Bu şekildeki büyüklüğe bağlı hareket, farklı büyüklüklerdeki (bir nükleotidlik farkla bile) moleküllerin birbirinden ayrılmasına neden olur. Jel konsantrasyonlarının ayarlanmasıyla (Çizelge 2.2.) agarozla 1 kb'dan 30 kb'a kadar, poliakrilamid ile de 1 bp'den 300 bp'e kadar olan farklar etkin bir şekilde ayrılabilir⁶³.

Çizelge 2.2. Agaroz ve akrilamid konsantrasyonları ve ayırabildikleri DNA büyüklükleri

Agaroz mik. (%)	DNA (kb)	Akrilamid mik. (%)	DNA (bp)
0.3	60 - 5	3.5	100 - 1000
0.6	20 - 1	5.0	80 - 500
0.7	10 - 0.8	8.0	60 - 400
0.9	7 - 0.5	12.0	40 - 200
1.2	6 - 0.4	20.0	10 - 100
1.5	4 - 0.2		
2.0	3 - 0.1		

Agaroz jeller yatay kalıplara genelde 0.5 cm kalınlıkta, poliakrilamid jeller ise dikey kalıplara 0.3 mm kalınlıkta dökülür. Oluşan DNA bantlarını jelde UV altında görebilmek için EtBr ile boyanması gerekmektedir. Burada 25 ng'dan az DNA içeren bantları gözlemek pek mümkün olmaz. Bu durumda daha hassas yöntemler kullanılır. Örn., Otoradiografi ile 2 ng DNA içeren bantlar bile görüntülenebilmektedir⁶³.

Jel elektroforezi kesim sonucu oluşan farklı büyüklükteki DNA parçacıklarını pozitif kutba doğru sürükleyerek bantlar oluşturur. Bantların büyüklüklerini tahmin etmenin en basit yolu standardize edilmiş bir kesim reaksiyonu ürünü (marker) kullanmaktır. Örn., λ DNA *Hind* III ile 23 kb ile 125 bp arasında değişen, büyüklükleri belirlenmiş sekiz parça (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 ve 125 bp'lik parçalar) oluşturur. Bu şekilde bir marker kullanarak %5'lik bir yanılma ile fragmanların büyüklüğü tahmin edilebilir⁶³.

2.9. Transformasyon

Transformasyon, herhangi bir DNA molekülünün canlı bir hücreye girmesi anlamındadır. Çoğu bakteri türleri ortamdaki DNA moleküllerini alabilirler fakat alınan molekül üzerinde konakçı bakteri tarafından tanınan bir replikasyon orijini yoksa parçalanır. *E.coli*'de dahil bir çok bakteri türü normal koşullarda yalnızca sınırlı miktarda DNA molekülünü alabilirler. Bu türlere, bir takım fiziksel ve kimyasal uygulamalarla ortamdaki DNA moleküllerini kolaylıkla alabilme özelliği kazandırılabilir ve bu şekildeki bir uygulamaya maruz kalan bakteriye de **kompetent** bakteri denir⁶³.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada kullanılan biyolojik ve kimyasal maddelerin başlıcaları; T4 DNA (*Escherichia coli* B, ATCC 11303 kaynaklı), Lamda faj DNA (*Escherichia coli* W3110 kaynaklı) ve *Micrococcus luteus* Sigma'dan, Primerler lyontek'den, vektör molekülleri ve konakçı bakteri (*Escherichia coli* XL1 Blue MRF) Stratagene'den, kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve Taq DNA polimeraz Boehringer Mannheim (Roche)'den, PCR optimizasyon kiti Sigma'dan, besi ortamları ve kullanılan diğer kimyasallar Merck ve Sigma'dan satın alınmıştır.

Kullanılan başlıca teknik malzemeler ise; Thermal cycler (Techne, Progene), Spektrofotometre (Pharmacia-Biotech, Gene Quant), Jel görüntüleme cihazı (UVitec), Santrifüjler (Hettich, EBA12), Otoklav (Nüve, OT 4060), Hassas terazi (Ohaus, Analytical grade), Su banyosu (Mettler), Etüv (Nüve), Otomatik pipetler (Biohit ve Socharex), Vorteks (Cat 3M 6/1), Çalkalayıcı (Ika-vibrax VXR), Steril kabin (Bilser), pH metre (NEL), UV (Vilber Lourmat), Elektrofrez tankı ve Güç kaynağı (Atto), Deepfreez (Arçelik 2020D), ve Buzdolabı (Arçelik, no-frost), araştırmanın yapıldığı Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği ile Ç.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD laboratuvarlarında bulunmaktadır.

3.2. Yöntem

Bakteriofaj T4 lizozim geninin plazmid vektörlerle klonlanması için yapılan bu tez çalışması; lizozim geninin PCR'la bakteriofaj T4 genomundan izolasyonu, PCR ürünü ve vektör molekülünün ligasyonu, oluşan rekombinant molekülün konakçı bakteriye transforme edilerek rekombinant kolonilerin seçilmesi ve enzim aktivitesinin belirlenmesi için uygulanan yöntemleri kapsamaktadır.

3.2.1. Bakteriyofaj T4 Lizozim Geninin PCR ile Amplifikasyonu ve Ligasyona Hazırlanması

PCR için gereken bileşenler; kalıp DNA molekülü (template), primerler, dNTP'ler, termostabil DNA polimeraz ve reaksiyon tamponudur. Bu çalışmada primerler hariç diğer bileşenler hazır olarak satın alındı. Primerler ise, T4 genomuna ait dizi analizi üzerinde lizozim geninin bulunduğu bölgeden seçildi. Bu seçim, primer dizilerinin hazırlanmasındaki bütün kriterler (bkz. sayfa 15) dikkate alınarak aşağıda izah edildiği şekilde yapıldı.

3.2.1.1. Primer Seçimi

İnternet taramaları ile T4 lizozim geni ve T4 genomunun tamamına ait nükleotid dizileri (Çizelge 3.1. ve 3.4.) çeşitli veri kaynaklarından alındı^{71, 72, 73}. Bu dizi analizleri dikkatli bir şekilde incelenerek, lizozim geninin yeri genom üzerinde saptandı ve geni T4 genomundan ayırmada kullanılacak olan primer dizileri belirlendi. Primer dizilerinin seçildiği bölgeler Çizelge 3.1. ve 3.4.'de çerçeve içinde gösterilmektedir.

PCR ürününü daha sonra kesip, yapışkan uçlar oluşturarak vektörle ligasyonunu kolaylaştırmak için her iki primerin de 5' uçlarına *Bam* HI endonükleaza ait tanıma dizisinin (5'GGATCC3') kalıp DNA üzerinde (primerlerin seçildiği yerde) karşılığı bulunmayan kısmı ilave edildi. İlgili enzimin seçilmesinde şu önemli noktalar dikkate alındı:

1. Çoğaltılacak olan gen bölgesi içinde tanıma bölgesine sahip olmaması.
2. Vektör molekülü üzerindeki çoklu klonlama bölgesinde kesim yapan enzimlerden biri olması.
3. Kesim yapabilmesi için kesim bölgesinin her iki tarafında belli sayıda nükleotid gerektirip gerektirmediğinin belirlenmesi.

Yukarıdaki kriterlere *Bam* HI endonükleazın uygun olduğu saptandı.

Çünkü:

1. Çoğaltılacak olan DNA bölgesi, 'restriction mate'⁷⁴ programı ile taranarak tanıma dizisi olan endonükleazlar belirlendi ve *Bam* HI'nin ilgili bölgede tanıma dizisi olmadığı görüldü (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.1. Lizozim geninin T4 genomu içindeki yeri.

LOCUS	T4	168899 bp	DNA	PHG	09-OCT-1996
DEFINITION	T4 Genome.				
ACCESSION	T4				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Bacteriophage T4.				
ORGANISM	Bacteriophage T4 Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Tailed phages; Myoviridae; T4 phage group.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 168899)				
AUTHORS	Kutter,E., Arisaka,F., Kunisawa,T., Tsugita,A., Mosig,G., MesyanzHinov,V., Ruger,W. And Stidham,T.				
TITLE	Bacteriophage T4 genome analysis				
JOURNAL	Microbiological Reviews (1996)				
CDS	complement(66497..66991) /gene="e" /codon_start=1 /product="lysozyme" /transl_table=11 /Translation="MNIFEMLRIDERLRLKIYKDTEGYTIGIGHLLTKSPSLNAAKSELDKAIGRNCNGV ITKDEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVRRCALINMVFQMGETGVAGFTNSLRMLQQKRWDE AAVNLAKSIWYNQTPNRAKRVITTFRTGTWDAYKNL" Sequence (5'→3')(sense) 5'→..... 66361 TGGCCTTTAC TACAGAAGCT TCGGCAATAA ATTCTTGATA TGTTTTCATA TGTTTCCTTT 66421 AAATATTTTA ATTAGTAATT GTCTATTCAA GTAATTGTGA ATATACTATC ACAATT CCAA (primer bölgesi) (Genin sonu) 66481 GAGAAAGTAA ACA GCTttat agatttttat acgcgtccca agtgccagtt ctaaacgttg 66541 taatgactcg ttttgcgoga ttaggtgttt gattatacca tatactttta gctaagttaa 66601 ctgctgcttc atcccagcgt tttgttgaa gcatacgtaa agagtttagta aatcctgcca 66661 caccggtttc tcccatttgg aaaaccatat taatcaatgc acagcgacga accgcatcaa 66721 gagaatcata aaccgggtttt aatttagcat ttotcagaat tccgcgaaca gcagcatcaa 66781 catcctgatt aaagagtttt tcagcctcat cttttgtaat tacaccattg caattacgoc 66841 caatagcttt atctaattca gatttagcag cattaagtga tggacttttt gtaagcaa 66901 gaccgatgcc aatagtgtaa tagccttotg tgtotttata gattttaagt ctaagacggt 66961 catctatacg taacatttca aatatattca TAAGTATTTA TAGAAG TAT (Genin başlangıcı) (primer bölgesi) 67021 TTATAAAATT AAAAGAGGTT GTTCATTATT CGGTAAAGTG AAGGACCCAT CACATATTGC 67081 CACTGAGTAC GAGGAATAAG AGCAAAAGCG TCCATCTCTG GAATCATAAC GCCATCTTTA→3'				

2. *Bam* HI, klonlamada kullanılacak olan vektör moleküllerinin (pUC18 ve pRS416) çoklu klonlama bölgesinde tanıma dizisi bulunan endonükleazlardan biridir (Şekil 3.1.).
3. Promega kataloğu incelendiğinde *Bam* HI'nın kesim bölgesinin 5' ucunda fazladan bir nükleotid olmasa bile kesim yapabildiği görülmüştür (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.2. T4 lizozim geni içinde tanıma dizisi olan endonükleazlar ve tekrar sayıları.

T4 lizozim geni içinde tanıma dizisi olan restriksiyon endonükleazların;									
Adı	Tekrar Sayısı	Adı	Tekrar Sayısı	Adı	Tekrar Sayısı	Adı	Tekrar Sayısı	Adı	Tekrar Sayısı
Alu I	3	Bbv I	1	Eco 105I	2	Hap II	2	Mae III	3
Acc II	3	Bsp 423I	1	Eco RI	1	Hha II	2	Mse I	7
Acs I	1	Bst 71I	1	Fnu 4HI	4	Hinf I	2	Mvn I	3
Apo I	1	Bsa AI	2	Fnu DII	3	Hinc II	1	Mlu I	1
Age I	2	Cvi JI	6	Fsi I	1	Hind II	1	Msp I	2
Afl III	1	Cvi RI	1	Hin 6I	1	Hind III	0	Ple I	1
Bam HI	0	Cfr 10I	3	Hin P1I	1	Hha I	1	Psp1406I	1
Bst UI	3	Cfo I	1	Hgu I	1	Ita I	5	Tru 9I	6
Bsr FI	3	Dde I	4	Hpa II	2	Mae II	3	Tsp EI	7

Çizelge 3.3. Bazı restriksiyon endonükleazların lineer DNA parçalarını uç bölgelerinden kesim şekilleri^{68*}.

Enzim	İlk kesim	% Kesim başarıları, (Enzim mik.)	Kesim bölge-sinden önceki nükleotid say.	Enzim	İlk kesim	% Kesim başarıları, (Enzim mik.)	Kesim bölge-sinden önceki nükleotid say.
Acc 65I	Ecl 136II	95 (10u/μg)	3	Eco RI	Ecl 136II	100 (5u/μg)	3
<i>Bam</i> HI	<i>Hin</i> cII	100 (10u/μg)	9	Eco RI	Eco 24I	100 (2u/μg)	1
<i>Bam</i> HI	Sal I	100 (10u/μg)	7	<i>Hin</i> cII	Pst I	33 (10u/μg)	1
<i>Bam</i> HI	Acc 65I	100 (2u/μg)	4	<i>Hind</i> III	Pst I	100 (5u/μg)	7
<i>Bam</i> HI	Kpn I	100 (2u/μg)	4	<i>Hind</i> III	Pae I	0 (10u/μg)	1
<i>Bam</i> HI	Xba I	100 (5u/μg)	1	Kpn I	Eco 24I	0 (10u/μg)	1
<i>Bam</i> HI	Cfr 9I	>50 (10u/μg)	0	Pae I	<i>Hind</i> III	75 (10u/μg)	1
<i>Bam</i> HI	Eco 880I	>90 (10u/μg)	0	Pst I	<i>Hinc</i> II	100 (5u/μg)	3
Cfr 9I	<i>Bam</i> HI	95 (10u/μg)	0	Pst I	Pae I	0 (10u/μg)	1
Ecl 136II	Kpn I	80 (10u/μg)	1	Sal I	Pst I	0 (10u/μg)	1
Eco 24I	Kpn I	80 (10u/μg)	1	Sma I	Eco 24I	100 (2u/μg)	5
Eco RI	Cfr 9I	100 (2u/μg)	11	Sma I	<i>Bam</i> HI	20 (10u/μg)	0
Eco RI	Eco 88I	100 (10u/μg)	11	Xba I	<i>Hin</i> cII	>95 (10u/μg)	3
Eco RI	Acc 65I	100 (5u/μg)	7	Xba I	<i>Bam</i> HI	>30 (10u/μg)	1
Eco RI	Kpn I	100 (5u/μg)	7				

*Bu çalışmada pUC19 DNA'sı kullanılmış ve kesimler MCS bölgesinde yapılmıştır. İlk kesim yapıldıktan sonra DNA ³²P ile işaretlenmiş daha sonrada kesim başarıları kontrol edilecek olan enzimle kesilerek kesim başarıları otordiyografik inceleme ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu enzimin tanıma dizisine kadar olan nükleotid sayısı da belirlenmiştir.

Dikkat edilmesi gereken bir diğer husus da, primer dizisinin klonlanan gende vektörle ligasyonundan sonra çerçeve kayması (frame shift) mutasyonuna neden olmayacak şekilde ayarlanmasıdır. Bu nokta, ilgili genin ekspresyonu vektör üzerindeki promotorun (örn. lac promotoru) kontrolünde olacaksa özellikle önemlidir. Böyle bir duruma meydan vermemek için lizozim geni ve vektör molekülünün klonlama bölgesine ait nükleotid dizileri ve kodonlar (Şekil 3.1. ve Çizelge 3.4.) dikkatli bir şekilde incelendi ve çerçeve kayması oluşturmayacak şekilde gerekli ayarlamalar yapılarak primer dizileri belirlendi.

A) pUC18 Hind III Pae I Sda I Sal I Xba I Bam HI Sma I Kpn I Sac I Eco RI
 ...5' CAA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC CGA GCT CGA ATT CGT 3'...
 ...3' GTT CGA ACG TAC GGA CGT CCA GCT GAG ATC TCC TAG GGG CCC ATG GCT CGA GCT TAA GCA 5'...

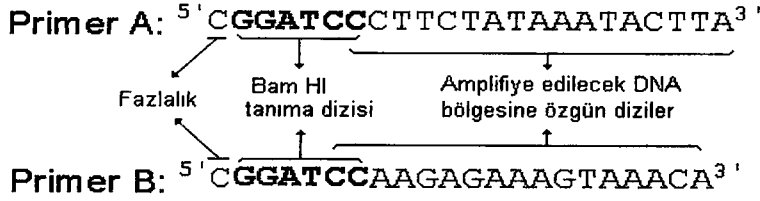
B) pRS416 Bss III Kpn I Xho I
5' GCG CGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GGG TAC CGG GCC CCC CCT CGA GGT CGA
3' CGC GCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC GCT TAA CCC ATG GCC CGG GGG GGA GCT CCA GCT
Cla I Hind III Eco RI Bam HI Xba I
 CGG TAT CGA TAA GCT TGA TAT CGA ATT CCT GCA GCC CGG GGG ATC CAC TAG TTC TAG AGC
 GCC ATA GCT ATT CGA ACT ATA GCT TAA GGA CGT CGG GCC CCC TAG GTG ATC AAG ATC TCG
Sac I Bss III
 GGC CGG CAC CGG GGT GGA GCT CCA GCT TTT GTT CCC TTT AGT GAG GGT TAA TTG CGC GCT 3'...
 CCG GCC GTG GCC CCA CCT CGA GGT CGA AAA CAA GGG AAA TCA CTC CCA ATT AAC GCG CGA 5'...

Şekil 3.1. pUC18 ve pRS416 vektörlerinin *LacZ* geni içindeki çoklu klonlama bölgelerine ait nükleotid dizileri, kodonlar ve tanıma dizileri olan endonükleazlardan bazıları.

Çizelge 3.4. T4 Lizozim genine ait nükleotid dizisi ve kodonlar²⁵.

ID	MYT4ER1_3; parent: MYT4ER1
CDS	49-543 (595 bp)
/translation=	"MNIFEMLRIDERLRLKIYKDTEGYTTIGIGHLLTKSPSLNAAKSELDKAIGRNCNG VITKDEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVRRCALINMVFQMGETGVA GFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLAksiWYNQTPNRAKRVITTFRTGTWDAYKNL"
Sequence	543 bp; (5'→ 3')
1	ACC TCT TTT AAT TTT ATA AAT A <u>CC TTC TAT AAA TAC TTA</u> GGA GGT ATT
49	<u>ATG</u> AAT ATA TTT GAA ATG TTA CGT ATA GAT GAA CGT CTT AGA CTT AAA
97	ATC TAT AAA GAC ACA GAA GGC TAT TAC ACT ATT GGC ATC GGT CAT TTG
145	CTT ACA AAA AGT CCA TCA CTT AAT GCT GCT AAA TCT GAA TTA GAT AAA
193	GCT ATT GGG CGT AAT TGC AAT GGT GTA ATT ACA AAA GAT GAG GCT GAA
241	AAA CTC TTT AAT CAG GAT GTT GAT GCT GCT GTT CGC GGA ATT CTG AGA
289	AAT GCT AAA TTA AAA CCG GTT TAT GAT TCT CTT GAT GCG GTT CGT CGC
337	TGT GCA TTG ATT AAT ATG GTT TTC CAA ATG GGA GAA ACC GGT GTG GCA
385	GGA TTT ACT AAC TCT TTA CGT ATG CTT CAA CAA AAA CGC TGG GAT GAA
433	GCA GCA GTT AAC TTA GCT AAA AGT ATA TGG TAT AAT CAA ACA CCT AAT
481	CGC GCA AAA CGA GTC ATT ACA ACG TTT AGA ACT GGC ACT TGG GAC GCG
529	TAT AAA AAT CTA TAA AGC TGT TTA CTT TCT CTT GGA ATT GTG ATA GTA
	<u>3' ACA AAT GAA AGA GAA CC 5'</u>

Yukarıda belirtilen özellikleri taşıyacak şekilde dizayn edilen ve lizozim genini T4 genomundan ayırmada kullanılacak olan primer dizileri Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Lizozim genini T4 genomundan ayırmada kullanılacak primer dizileri.

3.2.1.2. Programlama

Primerin kalıp DNA'ya yapıştığı sıcaklık (annealing sıcaklığı) reaksiyon ürününün özgülüğü için önemli bir kriterdir. Kullandığımız primerlerin özelliği gereği iki ayrı annealing sıcaklığı uygulandı.

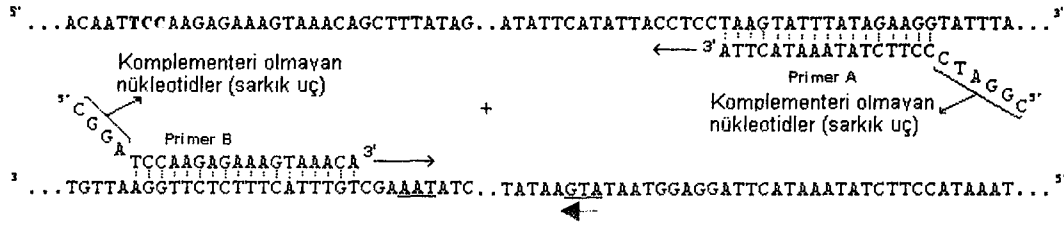
Primerlerin T_m 'leri $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanılarak hesap edildiğinde;

Primer A için ($5' \text{CGGATCCCTTCTATAAAATACTTA}^{3'}$) $T_m = 62^\circ\text{C}$ ve

Primer B için ise ($5' \text{CGGATCCAAGAGAAAGTAAACA}^{3'}$) $T_m = 62^\circ\text{C}$ 'dir.

Bu durumda annealing sıcaklığı her iki primer için de aynı ve 59°C olarak alınabilmektedir (T_m 'nin $2-5^\circ\text{C}$ aşağısı annealing sıcaklığı olarak alınmaktadır).

Primerlerin koyu ve altı çizili olarak gösterilen kısımlarının kalıp DNA (T4 DNA) üzerinde komplementleri olmadığından birinci döngüde sarkık (karşılıksız) olarak kalmaları gerekecektir (Şekil 2.3.). Bu durumda ise ilk hesaplama sonucuna göre verilecek olan annealing sıcaklığı (59°C) primerlerin kalıp DNA'ya yapışmasını önleyecek kadar yüksek bir sıcaklık olacaktır. Çünkü sarkık uçlar hesaba alınmadığında T_m 'ler, Primer A için 42°C ve Primer B için ise 48°C 'dir. O halde ilk iki döngü için yapışma sıcaklığı 40°C olarak alınabilmektedir. Oluşan reaksiyon ürünleri daha sonraki döngülerde tercihen kalıp molekül olarak kullanılacağı için üçüncü döngüden itibaren annealing sıcaklığı ilk hesaplama göre (59°C) alınmıştır.



Şekil 3.3. PCR'ın birinci döngüsünde primer ve kalıp DNA durumu

Yukarıdaki açıklamalar doğrultusunda hazırlanan Thermal Cycler programı Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Lizozim geninin PCR'ı için Thermal Cycler'a verilen program.

Prog.Grupları*	Sıcaklıklar	Süre	Döngü Sayısı
1	95 °C	35 saniye	1
2	94 °C	1 dakika	2
	40 °C	1 dakika	
	72 °C	1 dakika	
3	94 °C	1 dakika	15
	59 °C	1 dakika	
	72 °C	1 dakika	
4	94 °C	1 dakika	10
	59 °C	1 dakika	
	72 °C	1.5 dakika	
5	72 °C	7 dakika	1
6	4 °C	Maksimum 24 saat	1

* Her bir program döngü sayısı bitiğinde bir sonrakine bağlanır.

3.2.1.3 Reaksiyonun Hazırlanması

Reaksiyonu hazırlamadan önce reaksiyon bileşenleri tek tek incelendi ve stok kontaminasyonlarını önlemek amacıyla her birinden günlük kullanımlar için steril ependorflara belli miktarlarda paylaştırıldı.

Sigma PCR Optimizasyon Kiti (Ek 3.4.) protokolünde PCR reaksiyonundaki bileşenlerinin miktarları 50 µl'lik reaksiyon hacmi için şu şekilde önerilmektedir:

- 5µl 10X reaksiyon tamponlarının birinden
- 1µl 50X üniuersal tampon
- 1µl 10 mM dNTP karışımı

- Her bir primerden 200 ng
- 200 ng Kalıp DNA
- 2.5 U Termotabil DNA polimeraz
- 50 µl'ye tamamlayacak kadar su

PCR'da tampon bileşimi ve ortam pH'sı reaksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Öncelikle, reaksiyon sonunda kalitatif ve kantitatif olarak en iyi sonucu verecek ve daha sonraki PCR reaksiyonlarında da kullanılacak olan tampon bileşiminin belirlenmesi için optimizasyon kitindeki bütün tamponların kullanıldığı bir optimizasyon reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyonlar mümkün olduğu kadar steril şartlarda ve buz üzerinde, en son enzim ilave edilecek şekilde 12 ayrı tüpte ve her tüp için farklı bir reaksiyon tamponu kullanılarak hazırlandı (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Optimizasyon reaksiyonu. 12 ayrı tüpte hazırlandı ve her tüp için farklı bir 10X'lik reaksiyon tamponu kullanıldı (diğer bileşenler hepsinde aynı)

Reaksiyon Bileşenlerinin;		
Cinsi	Stok Kon.	Alınan Mik
Su (saf ve steril)	-	40 µl
T4 DNA (kalıp)	150 ng/µl	1.5 µl
Primer A	560 ng/µl	0.5 µl
Primer B	510 ng/µl	0.5 µl
DNTP karışımı	10 mM	1 µl
Üniversal Tampon*	50X	1 µl
Reaksiyon tamponu(12 adet)*	10X	5 µl
T7 DNA polimeraz	5 U/µl	0.5 µl
Toplam		50 µl

* Tampon bileşimleri Ek 3.4.'de verilmiştir.

0.5 ml'lik ependorflarda bu şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı daha önce programlanmış olan cihazın örnek bloğuna yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı.

3.2.1.4. PCR Ürününün Elektroforezi ve Jelden Arıtılması

Program tamamlandıktan sonra reaksiyon ürünleri ve daha önce marker olarak kullanılmak amacıyla *Hind* III ile kesilen lamda DNA' ya 6X yükleme tamponundan (Ek.1.6.) 1/5 oranında (1 hacim yükleme tamponu, 5 hacim reaksiyon ürünü) ilave edildi ve hafifçe pipetlendi. Örnekler %1'lik agaroz jel

kuyularına dikkatli bir şekilde yüklendi ve 100V, 40mA'de yaklaşık 90 dakika süreyle elektroforeze tabi tutuldu (jelin hazırlanışı Ek .1.5.'de verilmiştir).

Elektroforez sonunda her bir reaksiyon için oluşan bantlar, miktar tahmini için bant parlaklığına, reaksiyon kalitesi için de nonspesifik amplifikasyonlar olup olmadığına bakılarak değerlendirildi ve en iyi sonucu veren reaksiyon tamponu belirlendi.

Beklenen yerde oluşan DNA bantları temiz bir bistüri ile dikkatli bir şekilde kesildi, jel fazlası temizlendi ve darası alınan temiz bir ependorf tüpe konarak miktarı tespit edildi.

Ek 3.4.'de verilen arıtma kiti ve protokolü kullanılarak jel içindeki DNA agarozdan arıtıldı. Elüsyondan (DNA'nın bağlı bulunduğu silika matriksden ayrılarak ortamdaki sıvıya geçmesi) sonra 5 µl'si alınarak spektrofotometrede (260 ve 280 nm'de) okundu, miktarı ve saflık derecesi tüp üzerine yazılarak ileride kullanılmak üzere +4 °C'de korundu.

3.2.1.5. PCR Ürününün Kesimi ve Ligasyona Hazırlanması

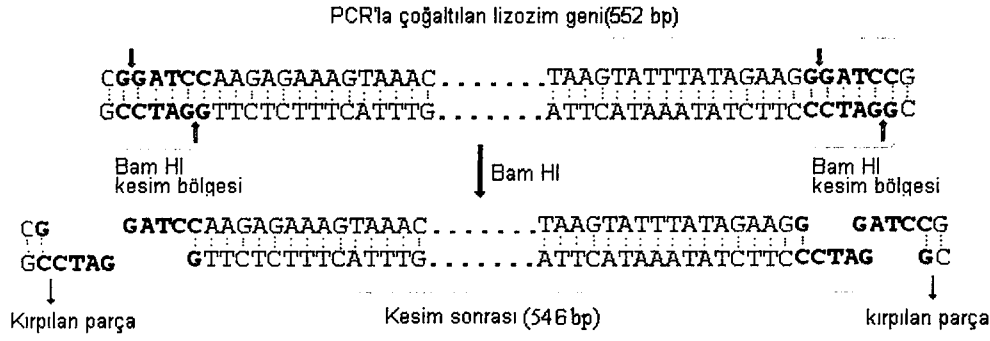
Bir önceki işlemle arıtılan ve spektrofotometrik ölçümü yapılan PCR ürünü, Çizelge 3.7.'deki uygulamaya göre *Bam* HI' la kesim reaksiyonuna alındı.

Çizelge 3.7. PCR ürünü için hazırlanan kesim reaksiyonu.

Cinsi	Reaksiyon Bileşenlerinin;	
	Stok Kon.	Alınan Mik
Su	-	2 µl
PCR ürünü	0.08 µg/µl	15 µl
Reaksiyon Tamponu	10X	2 µl
Enzim (<i>Bam</i> HI)*	10 U/µl	1 µl
Toplam		20 µl

*Kesim bölgesi uçlarda olduğu için promega kataloğundaki uygulama da (Çizelge 3.3.) dikkate alınarak enzim miktarı normalden fazla kullanıldı.

Kesim reaksiyonu sonunda, PCR ürününün Şekil 3.4.'deki gibi yapışkan uçlu hale gelmesi beklenmektedir.



Şekil 3.4. PCR ürününün *Bam* HI ile kesilmesiyle beklenen sonuç.

Kesim reaksiyonu sonucunda PCR ürününün uçlarından kırılan küçük parçacıkların (6 + 6 = 12 nükleotidlik) reaksiyonunda istenmeyen ligasyonların oluşmasına neden olabileceğinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Aynı zamanda kesim reaksiyonunda kullanılan *Bam* HI endonükleaz da ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bunları yapabilmek için reaksiyon ürününün ya elektroforeze tabi tutularak tekrar jelden arıtılması ya da fenolle deproteinizasyon yapıp etanolle çöktürülmesi gerekecektir. Burada deproteinizasyon ve etanolle çöktürme yöntemi kullanıldı.

Bu işlem için;

- Reaksiyon karışımı üzerine 70 µl TE ve 10 µl de 3 M Sodyum asetat (pH 4.8) ilave edilerek hacim 100µl'ye çıkartıldı.
- Bir hacim (100 µl) fenol-kloroform-isoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 3-5 dakika süreyle yavaş yavaş karıştırıldı.
- 15000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant (üst faz) dikkatli bir şekilde alınarak başka bir tüpe aktarıldı.
- Bir hacim kloroform-isoamil alkol (24:1) ilave edilerek 3-5 dakika süreyle yavaş yavaş karıştırıldı.
- 15000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak başka bir tüpe aktarıldı.
- Daha sonra 2-2.5 hacim etanol ilave edildi, vortekslendi ve bir gece -20°C'de bekletildi.

- Oda sıcaklığında, 15000 rpm'de (maksimum hızda) 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Tüp ters çevrildi ve oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilerek alkolün buharlaşması sağlandı.
- Pellet üzerine 15-20 µl TE tamponu (Ek 1.9.) ilave edildi ve bir gün bekletilerek iyice çözünmesi sağlandı.

Bu işlemlerle, hem kesim reaksiyonunda kullanılan endonükleaz hem de kırılan parçacıklar (uygulanan santrifügasyonla çökemeyecek kadar küçüktür) ortamdan uzaklaştırıldı ve PCR ürünü, *Bam* HI'la kesilmiş bir vektör molekülüyle ligasyon yapabilecek duruma getirildi.

3.2.2. Klonlama Vektörlerinin İzolasyonu ve Ligasyona Hazırlanması

Bu tez çalışmasında klonlama vektörü olarak pUC18 ve pRS416 plazmid vektörleri kullanıldı (Şekil 2.2.).

Ek 2.2.'de verilen protokole göre, pUC18 ve pPRS416 plazmidleriyle transforme edilen *E.coli* XL1 Blue MRF suşu, LB besisi yerine (Ek 1.7.) inoküle edilerek bir gece üretildi ve plazmidleri izole edildi. Plazmid izolasyonlarında kısmen modifiye edilen Birnboim ve Doly (1979)⁷⁵ alkalın denatürasyon protokolü (Ek 2.2.) kullanıldı. İzole edilen plazmidlerden 5'er µl alınarak spektrofotometrede okundu, miktar ve saflık dereceleri tüplerin üzerine yazıldı.

Plazmid DNA'lar mikrograma 1U enzim (*Bam* HI) kullanılarak 1.5 saat süreyle kesim reaksiyonuna alındı. Kesim reaksiyonları 8 µg DNA kullanılarak 30 µl' lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.8. pUC18 ve pRS416 DNA'ları için hazırlanan kesim reaksiyonları

PUC18 için			PRS416 için		
Reaksiyon Bileşenlerinin;			Reaksiyon Bileşenlerinin;		
Cinsi	Stok Kon.	Alınan Mik	Cinsi	Stok Kon.	Alınan Mik
Saf su	-	21 µl	Saf su	-	19.5µl
DNA	1.6 µg/µl	5 µl	DNA	1.2 µg/µl	6.5µl
R. Tamponu	10X	3 µl	R. Tamponu	10X	3 µl
Enzim (<i>Bam</i> HI)	10 U/µl	1 µl	Enzim (<i>Bam</i> HI)	10 U/µl	1 µl
Toplam		30 µl	Toplam		30 µl

Reaksiyon ürünleri marker (*Hind* III ile kesilmiş Lamda DNA) ile %1'lik agaroz jelde yaklaşık 1.5 saat süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Vektör moleküllerine ait bantlar jelden alınarak Ek 2.1.'deki protokolle agarozdan arıtıldı. Elüsyondan sonra spektrofotometrik ölçüm yapılarak DNA miktarları belirlendi ve ligasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Lizozim Geni ile pUC18 DNA' nın Ligasyonu

pUC18'in transformasyon verimi pRS416'dan daha yüksek olduğu için⁶⁴ ilk klonlama bu plazmid kullanılarak yapıldı. Yukarıdaki uygulamalarla ligasyona hazır hale getirilen PCR ürünü (Lizozim geni) ve pUC18 plazmid DNA molekülü için hazırlanan ligasyon reaksiyonu Çizelge 3.9.'da verilmiştir. Reaksiyon karışımı 15 °C'de 1 gece (~10 saat) inkübe edildi.

Çizelge 3.9. pUC18 DNA ve PCR ürünü (Lizozim geni) için hazırlanan ligasyon reaksiyonu

Cinsi	Reaksiyon Bileşenlerinin; Stok Kon.	Alınan Mik
Saf su	-	14.5 µl
PUC18 DNA	0.2 µg/µl	0.5 µl
PCR ürünü	0.05 µg/µl	2 µl
Ligaz Tamponu	10X	2 µl
Enzim (T4 DNA Ligaz)	1 U/µl	1 µl
Toplam		20 µl

3.2.4. Kompetent Bakteri Hazırlanması ve Transformasyon

Kompetent bakteri oluşturmada kullandığımız *E.coli* suşu (XL1 Blue MRF), hiç plazmid bulundurmayan ancak kromozomal DNA'sı üzerinde tetrasiklin direnç geni (*tet^r*) bulunan bir suştur. Ek 2.3.'de verilen protokol uygulanarak bakteri kompetent hale getirildi ve ligasyon reaksiyonu sıvısından belli bir miktar alınıp aynı protokole devam edilerek transformasyon yapıldı.

3.2.5. Koloni Seçimi ve Rekombinantların Karakterizasyonu

Transformasyon tüpündeki sıvının tamamı önce 3 ml'lik antibiyotiksiz sıvı besi ortamına ekildi (bu uygulama, kompetent oluşturulma uygulamalarıyla hassaslaşmış olan bakterilerin normal hale dönmelerini ve bu arada plazmidle taşınan genlerin düşük seviyede de olsa ekspresyonlarını sağlayacaktır). Bir süre sonra (~ 1 saat) buradan 100-200 µl alınarak ampisilin ve X-gal (laktoz analogu ve β-galaktozidazla parçalandığında mavi renk oluşturan kromogenik bir madde) (Ek 1.16.) içeren katı besi ortamına bagetle yayılarak 37 °C' de bir gece inkübasyona bırakıldı. Burada koloni oluşturan bakteriler ligasyon reaksiyonunda ya rekombinant (geni almış olan) veya non-rekombinant (geni almadan kapanmış olan) plazmidlerle transforme olmuş olan bakteriler olacaktır. Her ikisinde de ampisilin direnç geni (β-laktamaz kodlar) sağlam olacağı için ampisilinli ortamda koloni oluşturabileceklerdir. Klonlama *lacZ* geni (β-galaktozidazın α-komplementini sentezler) içindeki MCS bölgesine yapıldığından rekombinant plazmidlerde *lacZ* geni inaktive olacaktır (insertional inactivation). Bu plazmidlerle transforme olan bakteriler de ortamdaki X-gal'i parçalayamayacağından kolonileri beyaz renkli olarak gelişecektir. Diğer taraftan rekombinant olmayan plazmidleri alan bakterilerin *lacZ* geni sağlam olduğundan X-gal'i kullanacak ve kolonileri de mavi renkli olarak gelişecektir.

X-gal'in parçalanması sonucu oluşan renk değişiminin daha belirgin olması için plaklar buz dolabına alınarak 5-6 saat bekletildi. Daha sonra beyaz koloniler tespit edildi ve her biri steril bir şekilde kürdanla alınarak aynı özelliklerdeki katı besi yerine pasajlandı ve tekrar inkübasyona alındı. Pasajlama rekombinant plazmid içermediği halde beyaz renkli olarak gelişen kolonileri (sekonder koloniler) belirlemek için yapıldı. Pasaj plaklarında da beyaz olarak gelişen kolonilerin her birinden ampisilinli sıvı besi yerine bakteri ekilerek Ek 2.2.'de verilen protokolle plazmidleri izole edildi. Gen entegrasyonu *Bam* HI'le yapıldığından geni tekrar çıkartmak için plazmidler bu enzimle tekrar kesildi. Plazmidi rekombinant halde lineer hale getirmek için de MCS bölgesindeki tek noktadan kesim yapan bir başka enzim kullanılarak kesim reaksiyonu hazırlandı. Orijinal plazmidler de *Bam* HI ile kesilerek (tek noktadan kesim yapan diğer enzimlerden biri de kullanılabilir) lineer hale getirildi.

Reaksiyon ürünleri lamda marker ve PCR ürünü ile birlikte elektroforeze tabi tutuldu. Jel 'UVIdoc' jel görüntüleme cihazı ile fotoğraflandı ve oluşan bantların moleküler ağırlıkları aynı cihaza ait bilgisayar programı ile (UVISoft) değerlendirilerek karakterizasyonları yapıldı.

3.2.6. Lizozim Geni ile pRS416 Vektörünün Ligasyonu

Yapışkan uç oluşturmak amacıyla *Bam* HI ile kesilen ve arıtılan pRS416 plazmid vektörüyle, rekombinant pUC18 (pUC18L)'in *Bam* HI ile kesilmesiyle açığa çıkan ve jelden alınarak arıtılan lizozim geni Çizelge 3.9.'daki gibi ligasyon reaksiyonuna alındı. Transformasyon ve Rekombinantların seçimi ise 3.2.4. ve 3.2.5.'deki uygulamalara benzer şekilde yapıldı (farklı olarak pUC18 yerine pRS416 kullanıldı).

3.2.7. Klonlamanın Doğrulanması İçin Yapılan İlave Çalışmalar

1. Rekombinant plazmidlerle PCR

Bu çalışma, plazmid vektörlere entegre edilen DNA parçasının T4 lizozim geni olduğunu ispatlamak için yapıldı. Daha önceki PCR reaksiyonu protokolü (Çizelge 3.6.) aynen uygulandı. Reaksiyon üç ayrı tüpte hazırlandı ve her tüpte farklı bir kalıp molekül kullanıldı. Tüplerden birinde T4 DNA (kontrol için) diğerlerine ise rekombinant plazmidler (pUC18L ve pRS416L) kalıp olarak kullanıldı.

2. Lizozim Aktivitesinin Gösterilmesi:

Rekombinant Bakterilerin (*E. coli* pUC18L veya *E. coli* pRS416L) aktif lizozim ürettiğinin gösterilmesi amacıyla aşağıdaki denemeler yapıldı.

a) Rekombinant bakteriye ait üreme ortamının *M. luteus* üzerine etkisi:

Bu denemede lizozime en hassas olduğu bilinen ve gram pozitif bir bakteri olan *Micrococcus luteus* kullanıldı. Bir gece boyunca üremiş olan *M. luteus* 1/100 oranında yeni besi yerine inokule edildi ve 37 °C'de 3 saat üretildi. Daha önceden hazırlanmış olan yumuşak agar (Ek 1.17.) eritildi ve sıcaklığı yaklaşık 40-45 °C' ye geldiğinde (agarın donmayacağı ve bakterinin zarar görmeyeceği bir sıcaklık) kültür ortamından 100 µl bakteri alınarak steril bir şekilde yumuşak agar içine aktarıldı ve karışımın homojen olması için kısa süreli vortekslendi. Daha fazla beklemeden katı besi yeri bulunan plak üzerine döküldü ve plağın her tarafına yayılması sağlandı.

Bir gece üremiş olan *E. coli* pRS416 (kontrol olarak kullanılmaktadır) ve rekombinant *E. coli* pRS416L (pRS416+Lizozim geni) kültürlerinden 1'er ml alındı ve 10.000 rpm' de santrifüjlenerak bakteriler çöktürüldü. Üst fazlar dikkatli bir şekilde alındı ve hazırlanmış olan yumuşak agarlı plakların değişik yerlerine 10'ar µl damlatıldı. Bu işlemde her kültür ortamı için ayrı ayrı plak kullanıldı ve üzerleri etiketlenerek ters çevrilmeden etüve kondu ve bir gece bekletildi. Plaklardaki değişiklikler incelendi, değerlendirildi ve dijital kamera ile görüntülendi.

b) Rekombinant *E. coli*'nin osmatik basınca olan hassasiyetinin gösterilmesi:

Rekombinant (*E. coli* pRS416L) ve non-rekombinant (*E. coli* pRS416) bakteri kültürlerinde normal şartlarda hiçbir fark gözlenmemesine rağmen üretilen lizozimden dolayı rekombinant bakterinin hücre duvarının zayıflamış olması ve ilave edilen hipotonik ortamların (saf su veya 10 mM tris, pH 8.0) hücreleri patlatması beklenmektedir.

Bir gece üretilmiş olan kültür ortamlarının (*E. coli* pRS416 ve *E. coli* pRS416L) 600 nm'deki optik dansiteleri tespit edilip, orantılı olarak ~5' er ml kültür sıvısı alındı ve 4500 rpm'de santrifüjlenerak bakteriler

çöktürüldü. Bakteri pelletleri üzerine 0.5 ml, 10 mM'lık Tris (pH 8.0) (saf su da olabilir) ilave edilip pipetaj yapılarak oluşan değişiklikler gözlemlendi ve değerlendirildi.

c) Hipotonik ortamın nükleik asitler açısından değerlendirilmesi:

Bir önceki denemede, rekombinant bakterinin hipotonik ortamda sümüksü bir yapı oluşturması bakterinin patlamış olduğu şeklinde yorumlandı. Böyle bir durumda bakterinin nükleik asitleri ortama yayılmış olacaktır. Ortamda nükleik asit bulunup bulunmadığının tespiti için şu şekilde bir deneme yapıldı:

Her iki bakteriye (*E. coli* pRS416 ve *E. coli* pRS416L) ait 10 mM tris'le çözölen pellet birkaç dakika sonra 15000 rpm'de 10 dakika santriföjlendi ve sıvı faz başka bir tüpe alındı. Bu sıvıdan 25 µl alınarak %1'lik agaroz jelde marker'la birlikte 1.5 saat süreyle elektroforeze tabi tutuldu. Jel görüntölenerek oluşan bantlar değerlendirildi.

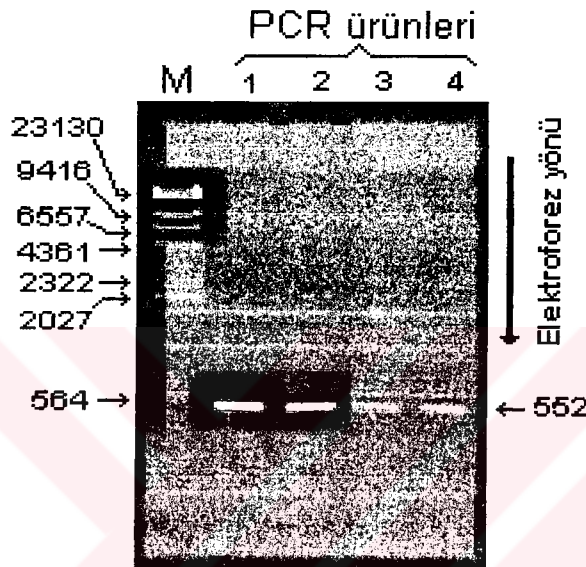
d) Üreme ortamlarının protein içeriklerine göre değerlendirilmesi:

LB besi yerinde bir gece üretilen *E. coli* pRS416 ve *E. coli* pRS416L bakterilerinin 600 nm'de optik dansiteleri tespit edilerek ~5'er ml alındı ve 4500 rpm'de santriföjlendi. Süpernatantlar temiz deney tüplerine alınarak üzerlerine eşit hacimde %20'lik TCA (TriChloro Acetic acid) ilave edildi ve oluşan değişiklikler gözlemlendi.

4. BULGULAR

4.1. Bakteriyofaj T4 Lizozim Geninin (*Gen e*) PCR'la Amplifikasyonu

Lizozim genini (*gen e*) T4 faj genomundan izole etmek amacıyla gerçekleştirilen PCR ürününe ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.

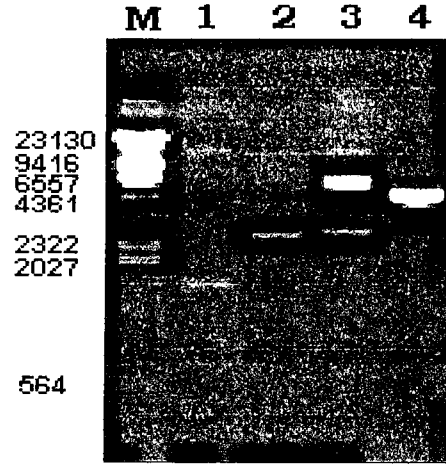


Şekil 4.1. Lizozim genine ait PCR ürününün %1'lik agaroz jeldeki elektroforezi.
M (Marker): Lamda DNA/*Hind* III, 1-4. Sütunlar: PCR ürünleri.

Sütun 1 ve 2'deki bantlar optimizasyon kitindeki 5 numaralı tamponla, sütun 3 ve 4'deki bantlar ise 4 numaralı tamponla (Ek 3.4.) gerçekleştirilen amplifikasyonlarla elde edilen sonuçlardır. Şekil 4.1.'den de görüleceği gibi en iyi amplifikasyon 5 numaralı tampon çözeltisi ile gerçekleşmiştir.

4.2. Klonlama Vektörlerinin (pUC18 ve pRS416) İzolasyonu

E. coli pUC18 ve pRS416 bakterilerinden elde edilen plazmid DNA'lar *Bam* HI'la kesilerek ve kesilmeden Lamda DNA marker'la birlikte elektroforeze tabi tutulduğunda Şekil 4.2.'deki sonuç elde edilmiştir.



Şekil 4.2. pUC18 ve pRS416 plazmid DNA'larının %1'lik agaroz jeldeki elektroforezi.
M: lamda DNA/*Hind* III. **1.sütun:** kesilmemiş pUC18 DNA. **2.sütun:** pUC18 DNA/*Bam* HI.
3.sütun: kesilmemiş pRS416 DNA. **4. Sütun:** pRS416 DNA/*Bam* HI.

Jel sonuçları UVIssoft⁷⁶ programı ile değerlendirildiğinde plazmidlerin lineer formda iken (sütun 2 ve 4) moleküler ağırlıklarının pUC18 için 2686 bp ve pRS416 için 4898 bp olduğu görüldü.

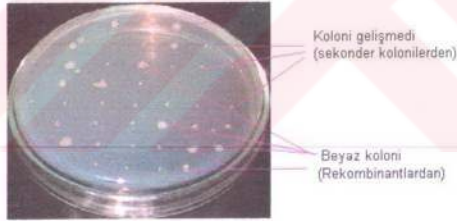
4.3. pUC18 + Lizozim Geni (pUC18L) Rekombinantlarının Tespiti

Lizozim genini (*gen e*) içeren pUC18 vektörüne ait ligasyon sıvısıyla yapılan transformasyon sonunda bakteriler tarafından katı besi yerinde oluşturulan kolonilere ait iki plak görüntüsü Şekil 4.3.'de verilmiştir. Buradaki mavi koloniler normal plazmidle (pUC18), beyaz koloniler ise rekombinant plazmidle (pUC18L) transforme oluş bakterilere ait kolonilerdir.



Şekil 4.3. Transformasyon sonrası X-gal ve ampisilin içeren katı besi yerlerine ekilen bakteriler tarafından oluşturulan mavi ve beyaz koloniler.

Plaklarda beyaz olarak gelişen koloniler aynı özelliklerdeki yeni katı besi yerine pasajlanıp bir gece üretildiğinde Şekil 4.4.'deki sonuç elde edilmiştir. Rekombinant olmayan bazı genç kolonilerin *lac Z* geni ürününü tam olarak eksprese etmediklerinden dolayı bazen beyaz görünebilmektedirler. Bu nedenle beyaz koloniler ikinci kez pasajlanıp, koloniler tam gelişene kadar üretilerek, test edilmişlerdir.

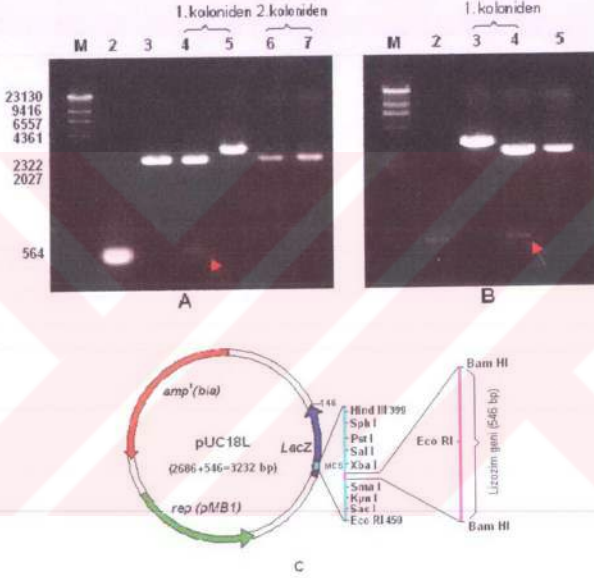


Şekil 4.4. Şekil 4.3.'deki plaklardan kürdanla alınarak aynı özelliklerdeki ikinci bir plağa aktarılan beyaz kolonilerin bir gece üredikten sonraki durumu.

Pasaj plaklarında da beyaz olarak gelişen kolonilerden izole edilen plazmidlerin *Bam* HI ve *Hind* III ile kesim reaksiyonu sonunda yapılan %1'lik agaroz jel elektroforezine ait görüntü Şekil 4.5A'da verilmiştir. Jelde oluşan bantlar incelendiğinde lizozim genine (*gen e*) ait insörtü taşıyan rekombinant plazmidin 1. koloniden izole edilen plazmid olduğu ve *Bam* HI ile kesildiğinde *gen e* insörtünü oluşturduğu görülürken; 2 nolu koloniden çıkarılan plazmid

DNA'larının lizozim geni insörtü taşımadıkları (*Bam* HI ile kesildiğinde gen e insörtünü oluşturmadıkları) görülmüştür.

1. kolonideki bakterilerin rekombinant olduğundan emin olmak için aynı koloniden üretilen bakterilerden tekrar plazmid DNA izole edilerek aynı şekilde kesim yapıp elektroforeze tabi tutulduğunda 546 bp uzunluğundaki lizozim genine eşdeğer büyüklükte bir DNA insörtü taşıdıkları görülmüştür (Şekil 4.5B ve C).



Şekil 4.5. pUC18+Lizozim geni (pUC18L) transformantlarının tespiti için iki ayrı beyaz koloniden izole edilen plazmidlere ait %1'lik agaroz jel elektroforezi sonuçları:

A) M: λ DNA/*Hind* III. **2. Sütun:** PCR'la elde edilen lizozim geni. **3. Sütun:** Orijinal pUC18 DNA/*Bam* HI. **4. Sütun:** 1. Koloniden elde edilen pUC18L DNA/*Hind* III. **5. Sütun:** 1. Koloniden elde edilen pUC18L DNA/*Hind* III. **6. Sütun:** 2. Koloniden elde edilen pUC18L DNA/*Bam* HI. **7. Sütun:** 2. Koloniden elde edilen pUC18L DNA/*Hind* III.

B) Birinci koloninin rekombinant koloni olduğunu teyit için aynı koloniden üretilen bakterilerden tekrardan izole edilen plazmidlere ait kesim sonuçları. M: λ DNA/*Hind* III. **2. Sütun:** PCR'la elde edilen lizozim geni. **3. Sütun:** 1. Koloniden elde edilen rekombinant pUC18 DNA/*Hind* III. **4. Sütun:** 1. Koloniden elde edilen rekombinant pUC18 DNA/*Bam* HI. **5. Sütun:** Orijinal pUC18 DNA/*Bam* HI (kontrol).

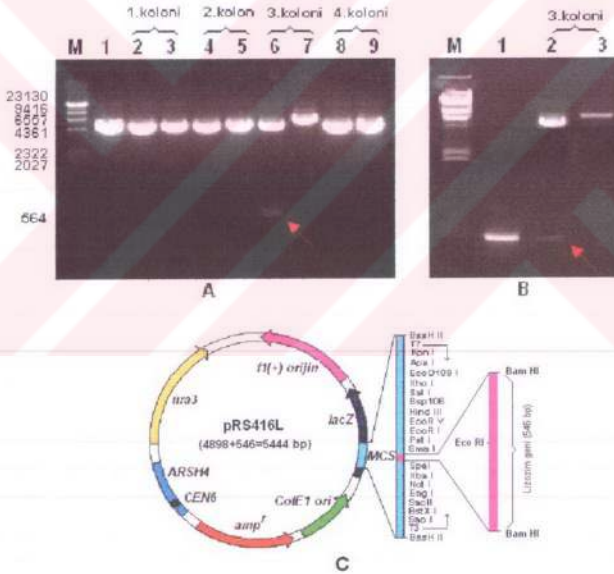
C) Oluşturulan rekombinant vektör molekülü (pUC18L).

*Lizozim genine ait insört bantları oklarla gösterilmiştir.

4.4. pRS416 + Lizozim (pRS416L) Rekombinantlarının Tespiti

Rekombinant kolonilerin seçimi ve karakterizasyonu bundan önceki pUC18L rekombinantlarının seçimindeki uygulamalara göre yapıldı. Beyaz kolonilerden elde edilen plazmidlerin *Bam* HI ve *Hind* III ile kesimleri sonunda elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.6A'da verilmiştir. Jelde oluşan bantlar değerlendirildiğinde, *gen* e'yi bulunduran rekombinant plazmidin 3. koloniye ait olduğu görülmektedir.

3. kolonideki bakterilerin rekombinant olduğundan emin olmak için aynı koloniden üretilen bakterilerden tekrar plazmid DNA izole edilerek aynı şekilde kesim yapıp elektroforeze tabi tutulduğunda da yine aynı sonuç gözlenmiştir (Şekil 4.6B ve C).



Şekil 4.6. pRS416+Lizozim geni (pRS416L) transformantlarının tespiti için 4 ayrı beyaz koloniden izole edilen plazmidlere ait %1'lik agaroz jel elektroforez sonuçları.

A) M: λ DNA/*Hind* III marker. **1. Sütun:** Orijinal pRS416/*Bam* HI. **2. Sütun:** 1. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Bam* HI kesimi. **3. Sütun:** 1. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Hind* III kesimi. **4. Sütun:** 2. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Bam* HI kesimi. **5. Sütun:** 2. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Hind* III kesimi. **6. Sütun:** 3. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Bam* HI kesimi. **7. Sütun:** 3. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Hind* III kesimi. **8. Sütun:** 4. Koloniden

elde edilen plazmid DNA/*Bam* HI kesimi. **9.Sütun:** 4. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Hind* III kesimi.

B) Üçüncü koloninin rekombinant koloni olduğunu teyit için aynı koloniden üretilen bakterilerden tekrardan izole edilen plazmidlere ait kesim sonuçları. **M:** λ DNA/*Hind* III marker. **1. Sütun:** PCR ürünü. **2.Sütun:** 3. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Bam* HI kesimi. **3.Sütun:** 3. Koloniden elde edilen plazmid DNA/*Hind* III kesimi.

C) Oluşturulan rekombinant vektör molekülü (pRS416L).

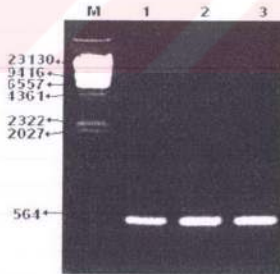
*Lizozim genine ait insört bantları oklarla gösterilmiştir.

4.5. Klonlamanın Doğrulanması İçin Yapılan İlave Çalışmalar

Klonlanan genin Lizozim geni olduğunu ispatlamak için yapılan dört ayrı denemeden alınan sonuçlar aşağıda verilmiştir:

4.5.1. Rekombinant Plazmidlerden Lizozim Geninin PCR ile Amplifikasyonu

Kalıp DNA yerine rekombinant plazmidlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen PCR ürünlerine ait agaroz jel elektroforez sonuçları Şekil 4.7.'de verilmiştir. Bu amplifikasyonun kontrol amplifikasyonu ile aynı moleküler büyüklükte bir DNA parçası ürettiği görülmektedir.



Şekil 4.7. Lizozim geninin rekombinant plazmidler (pUC18L ve pRS416L) üzerinden amplifikasyonu (re-amplifikasyon) için yapılan PCR 'a ait %1'lik agaroz jel elektroforezi.

M: Lamda DNA/*Hind* III. **1.sütun:** T4 DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu (kontrol). **2. Sütun:** pUC18L'ni kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu. **3. Sütun:** pRS416L'nin kalıp olarak kullanıldığı PCR sonucu.

4.5.2.Rekombinant Kolonilerde Lizozim Aktivitesinin Gösterilmesi

Rekombinant bakteriler tarafından üretilen lizozimin E (gen e ürünü) aktivitesini göstermek amacıyla, yumuşak agara ekili *M. luteus* üzerine rekombinant bakteriye ait üreme ortamının damlatılmasıyla (A), elde edilen sonuç Şekil 4.8.'de görülmektedir. *E. coli* pRS416'ya (ait üreme ortamı damlatılan plakta *M. luteus*'un üremesinde hiçbir değişiklik gözlenmezken, *E. coli* pRS416L (rekombinant bakteri)'nin üreme ortamı damlatılan plakta (B), bu bölgelerde *M. luteus*'un lize olup zon oluşturduğu (üreme olmadığı) gözlenmiştir.



Şekil 4.8. Lizozim aktivitesinin *M. luteus* üzerinde gösterilmesi.

A: Yumuşak agar içine ekilmiş *M. luteus* üzerine rekombinant *E. coli* pRS416L'nin üreme ortamı damlatılmış plak.

B: Yumuşak agar içine ekilmiş *M. luteus* üzerine *E. coli* pRS416'nin üreme ortamı damlatılmış plak (kontrol).

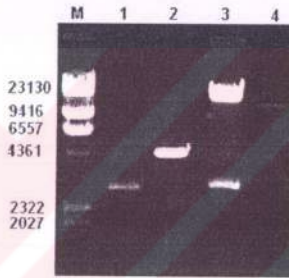
Rekombinant bakterinin üreme ortamının plağa damlatılmasıyla bu bölgelerde *M. luteus*'un üremediği açıkça görülmektedir (Şekil 4.8A).

4.5.3. Lizozim Geni Taşıyan Kolonilerin Hipotonik Ortamdaki Lizatlarında Nükleik Asit Taraması

Lizozim aktivitesinin gösterildiği diğer bir deney ise rekombinant bakterinin hipotonik ortama (saf su veya 10 mM Tris, pH 8) alınır alınmaz lize olduğu bunların lizatlarında kromozomal ve plazmid DNA'ların gösterilmesi ile kanıtlanabilir. Bakterinin lize olduğu, ortamın viskos (sümküsü) bir yapı

almasından dolayı kolayca anlaşılmaktadır. Kontrol olarak kullanılan *E. coli* pRS416'nın aynı ortamda günlerce bekletildiği halde viskos bir yapı oluşmadığı görülmüştür.

Yukarıdaki gözlemi desteklemek amacıyla lizat sıvısının agaroz jelde elektroforeze tabi tutulması ile elde edilen sonuç Şekil 4.9.'da gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde *E. coli* pRS416L bakterilerine ait lizatın hem kromozomal DNA hem de plazmid DNA bandını içerdiği görülmektedir. Öte yandan *E. coli* pRS416'da böyle bir sonuç gözlenmemiştir.



Şekil 4.9. *E. coli* pRS416L (rekombinant) ve *E. coli* pRS416 bakterilerinin hipotonik ortama alındıktan sonra oluşan sıvının %1'lik agaroz jeldeki elektroforez sonucu.

M: Lamda DNA/*Hind* III. **1. Sütun:** kesilmemiş pRS416L (kontrol) **2.sütun:** pRS416/*Hind* III (kontrol). **3. Sütun:** hipotonik ortama alınan *E. coli* pRS416L bakterisine (rekombinant) ait sıvı. **4. Sütun:** hipotonik ortama alınan *E. coli* pRS416 bakterisine ait sıvı.

4.5.4. Besi Ortamlarından Proteinlerin Çöktürülmesi

Lizozimin aktivite gösterdiğine ilişkin bir diğer gözlemlerde üreme ortamlarına %20'lik TCA ilavesi sonucu gözlenen durumdur. Bu uygulamada rekombinant bakteriye (*E. coli* pRS416L) ait üreme ortamına TCA ilave edilir edilmez yoğun bir çökeltme olduğu halde kontrol olarak kullanılan *E. coli* pRS416'ya ait sıvıda böyle hızlı bir çökeltme olmadığı görülmüştür (data gösterilememiştir).

5. TARTIŞMA

Escherichia coli T4 bakteriofajına ait lizozim geni (*gen e*) daha önce klonlanarak restriksiyon enzim haritası çıkarılmış^{43, 78} ve *gen e*'ye ait DNA baz dizileri de okunarak yayınlanmıştır⁴¹. Bu nedenle, *gen e*'nin T4 faj genomundan restriksiyon endonükleazlar yardımı ile doğrudan klonlanması yerine, bunun PCR ile direk amplifikasyonunun daha uygun olacağı düşünülmüştür. T4 bakteriofaj lizozim genini (*gen e*) içinde taşıyan 552 bp'lik DNA parçası uygun primerler seçilerek PCR ile ilk kez bu çalışmada çoğaltılmıştır. PCR ile amplifikasyonu yapılan DNA parçası pUC18 ve pRS416 vektörlerine klonlanmasını kolaylaştırmak amacıyla *gen e* içerisinde kesim noktası bulunmayan bir endonükleaza (*Bam* HI) ait tanıma dizileri, seçilen primer dizilerinin 5' uçlarına ilave edilmiştir. Böylece PCR ile amplifiye edilen lizozim geni, *Bam* HI enzimiyle kesilerek yapışkan uçlar elde edilebilmiş ve aynı enzimle kesilen vektörlere kolayca kaynatılabilmektedir.

Gen e'nin pUC18 vektörüne takılması ile *E. coli*'de T4 lizozim enziminin (lizozim E) üretimi amaçlanırken, pRS416 vektörüne takılması ile de *S. cerevisiae*'de genin eksprese edilmesi hedeflenmiştir. Bilindiği üzere pRS416 *E. coli* ve *S. cerevisiae*'de replike olabilen bir mekik (shuttle) vektördür.

Gen e'yi taşıyan rekombinant plazmidler (pUC18L ve pRS416L) *E. coli* bakterilerine transforme edilmişler ve rekombinant *E. coli* klonlarının L ve LB besi ortamlarında üremeleri normal olarak seyretmiştir.

Gen e'nin kodladığı lizozimin, *E. coli* hücrelerine toksik bir etki göstermediği hatta lac promotoru ardında IPTG maddesiyle uyarılarak enzim sentezinin artırılması ile de bakterilerin lize olmadan normal şekilde üredikleri görülmüştür⁴³. Aynı durum *E. coli* bakterilerini konakçı olarak kullanan T7 fajına ait lizozim geninin pBR322 plazmidinde phi 10 promotoru ardında güçlü bir şekilde sentezlenmesi sonucunda da gözlenmiştir⁴⁸. Bu açıklamalardan T4 ve T7 lizozim genlerinin bakteriyel hücre duvarlarını parçalamada tek başına yeterli olmadıkları görülmektedir. Fajların *E. coli*'yi enfeksiyonunun son aşamasında söz konusu lizozim enzimleri dışında bazı moleküllerin de görev aldığı

anlaşılmaktadır. Gerçekten de T4 fajının, *gen e*'nin kodladığı lizozim E dışında birisi *gen 5* tarafından kodlanan iki farklı lizozime daha sahip olduğu bildirilmiştir⁷⁹. Kanımızca lizozim E peptidoglikan yapısındaki hücre duvarını zayıflatmakta ancak zayıflamış hücre duvarı, hücre zarı ve dış membranın da desteği ile L ve LB besi yerindeki tuz sayesinde ortamdaki osmotik basınca karşı mukavemet edebilmektedir. Bilindiği üzere L ve LB besi yerleri sırasıyla %0.5 ve %1 (w/v) NaCl içermektedirler. Hipotezimizi test etmek amacıyla rekombinant bakteriler L ve LB ortamlarında üretilmişlerdir. Santrifüjlenerek bakteriler çöktürülmüş ve besi ortamı uzaklaştırılarak yerine hipotonik ortam (saf su veya 10mM tris pH: 8.0) ilave edilerek hücre lizizi gözlenmiştir. Hücrelerin lize oldukları ise ortamda nükleik asitlerin belirlenmesi ile tespit edilmiştir.

T4 ve T7 fajlarından lizozim genlerini daha önce *E. coli*'de klonlayan araştırmacılar ortamda bulunan tuzun bakteriler üzerine önemli izotonik bir etkiye bulunduğunu fark edememişler dolayısıyla hücreleri dondurup çözerek veya kloroform kullanarak lize etmişlerdir^{43, 48}. Bu çalışmada ilk kez lizozim E'nin hipotonik ortamda tek başına *E. coli* hücrelerini lize etmede yeterli olduğu gösterilmiştir. Hipotonik ortam olarak kullanılan 10 mM tris'in, saf suya oranla santrifüj sonrasında daha berrak bir lizat oluşturduğu da tespit edilmiştir. Öte yandan lizozim E'nin izotonik ortamda *M. luteus*'u lize etmeye yeterli olduğu da gösterilmiştir. Bu durum söz konusu mikroorganizmanın hücre duvarının lizozime son derece hassas olmasının bir sonucudur. Çünkü *M. luteus* ATCC 4698 suşu lizozim aktivitesinin ölçülmesinde genellikle standart olarak kullanılmaktadır²⁸.

pUC18L ve pRS416L taşıyan rekombinant *E. coli* bakterilerinin hipotonik ortamda kolayca lize olmaları plazmid izolasyonunda yeni bir alternatifi de beraberinde getirmiştir. Yaygın olarak kullanılan plazmid izolasyon metodları öncelikle hücre duvarının yumurta akı lizozimiyle parçalanması, sonra da hücre zarının iyonik veya non-iyonik deterjanlarla (SDS veya Triton-X100) parçalanıp lizat oluşturulması prensibine dayanır⁷⁵. Lizozim geninin vektör üzerinde bulunması durumunda hücrelerin lize edilmesi L veya LB besi yerinde üretilen bakterilerin doğrudan hipotonik ortama alınması ile gerçekleşeceğinden protokollerde yer alan lizozim ve SDS ilavesi otomatik olarak devre dışı

bırakılabilir. Böylece yapısında lizozim geni bulunduran plazmidlerin klonlama amacıyla kullanımı daha hızlı ve daha az kimyasal kullanılarak gerçekleştirilebilir. Özellikle pRS416L bu maksatla *E. coli* ve *S. cerevisiae* arasında transformasyon işlemlerini hızlandıracak bir prototip vektör olarak düşünülebilir. Şekil 4.9.'daki bulgular söz konusu bu iddiayı kanıtlar niteliktedir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışma ile T4 lizozim geni (*gen e*) faj DNA'sından PCR ile izole edilerek hem pUC18 hem de pRS416 plazmid klonlama vektörlerine aktarılmış ve konakçı hücrede (*E. coli* XL-1 blue MRF) ilgili genden aktif bir şekilde lizozim sentezlendiği gösterilmiştir. Rekombinant bakterilerden izole edilen plazmidlerin *Bam* HI ile kesilip lizozim genine ait 552 bp'lik insörtün agaroz jelde gösterilmesiyle gen entegrasyonunun tamam olduğu, lizozim E (*gen e* tarafından kodlanan lizozim) aktivitesini gösteren gözlemlerle de (rekombinant bakterinin ürettiği lizozimden dolayı hassaslaşıp hipotonik ortamda lize olması, rekombinant bakteriye ait üreme sıvısının yumuşak agara ekili *M. luteus*'un üremesine mani olması ve üreme ortamında normalden çok daha fazla protein olduğunun belirlenmesi gibi) üretilen proteinin aktif olduğu tespit edilmiştir.

Oluşturulan rekombinant plazmid ve konakçı hücreler tarafından sentezlenen lizozim kullanılarak, ileride aşağıda verilen veya bunlara benzer değişik çalışmalar yapılabilir:

1. Lizozim genini taşıyan ve aynı zamanda da bir maya vektörü olan pRS416L plazmidi maya hücrelerine aktarılabilir.
2. Lizozimin maya hücrelerindeki ekspresyonunu ve aktivitesi değerlendirilebilir.
3. Lizozimin, bakteri hücrelerindeki diğer proteinlerin sekresyonu üzerine etkileri değerlendirilebilir.
4. Lizozim üreten maya hücrelerini kontrollü bir şekilde çeşitli deney hayvanlarına yedirerek immün sistemi uyarıp uyarmadığı test edilebilir.
5. Kanseri geliştirilmiş olan deney hayvanları üzerinde anti-tümör aktivite gösterip göstermediğini gözlemlemek için çalışmalar yapılabilir.

Bütün bu ve çalışmaların hedefinde, alınacak olumlu sonuçların insan üzerinde de benzer sonuçları verebilmesi için yapılabilecek adaptasyonlar olmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Osserman EF, Canfield RE and Beychok S.** *Lysozyme*. Academic Press, New York, 1974
2. **Stryer L.** *Biochemistry*. 3 th International Ed. 1988: 201-203.
3. **Brock TD and Madigam MT.** *Biology of Microorganisms*. Printice Hall, 1988 : 78, 209, 416.
4. **Burtis CA and Ashwood ER.** *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. 1996:277.
5. **Bailey JE and Ollis DF.** *Biochemical Engeneering Fundamentals*. 2nd Ed. Singapore, 1986: 178.
6. **Beck WS.** *Hematology*, Massachusetts Institue of Technology, 1985: 285-286.
7. **Milton RJS.** *Immunochemistry of Enzymes and Their Antibodies*, Canada, John Willy & Sons, 1977:I-23, 151-192.
8. **Papys MB, Havarins PN, Booth DR, VigusHin DM, Tennent GA, Soutar AK, Totty N, Ngayan O, Blake CCF, Terry CJ, Feast TG and Hsuan JJ.** Human Lysozyme Gene Mutations Cause Hereditary Systemic Amyloidosis. *Nature*, 1993; 362: 553-557.
9. <http://www.medicine.bu.edu>. (Boston University Amyloid Treatment and Research Center). Erişim tarihi: 13.3.1999
10. **Lovat L B, Persey M R, Madhoo S, Pepys M B and Hawkins P N.** The Liver in Systemic Amyloidosis: Insights from I Serum Amyloid P Component Scintigraphy in 484 Patients. *Gut*, 1998; 42: 727-734.
11. **Belloti V and Merlini G.** Current Concepts on the Pathogenesis of Systemic Amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*, 1996; 11 Suppl 9: 53-62.
12. **Boot DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, HutchHinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Redford SE and Blake CCF.** Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, 1997; 385: 787-793.
13. **Bianchi C.** Is Flemming's Lysozyme an Analgesic Agent? *Eur J Pharmacol*, 1981; 71: 211.
14. **Sava G, Benetti A, Ceshia V and Pacor S.** Lysozyme and Cancer: Role of Exogeneous Lysozyme as Anticancer Agent (Review). *Anticancer Research*, 1989; 9: 583-592.
15. **Sava G, Benetti A, Ceshia V, Pacor S and Zabucchi G.** Observation on the Antimetastatic Action of Lysozyme in Mice Bearing Lewis Lung Carcinoma. *Anticancer Research*, 1991; 11: 1109-1114.
16. **Gordon LI, Douglas SD, Kay NE, Yamada O, Osserman EF and Jacob HS.** Modulation of neutrophil function by lysozyme. Potential negative feedback system of inflammation. *J Clin Invest*, 1979; 64: 226-232.

17. **Tsugita A, Inouye M, Terzaghi E and Streisinger G.** Purification of bacteriophage T4 lysozyme. *J Biol Chem*, **1968**; 243: 391-397.
18. **Tsugita A.** *Phage lysozyme and other lytic enzymes. The Enzymes.* Academic Press, New York, **1971**: 344-411.
19. **Irwin DM, Yu M and Wen Y.** Isolation and characterization of vertebrate lysozyme genes. *Exs*, **1996**; 75: 225-241.
20. **Oberto J and Davison J.** Expression of Chicken Egg White Lysozyme by *S. cerevisiae*. *Gene*, **1985**; 40: 57-65.
21. **Peters CW, Kruse U, Pollwein R, Grezchik KH and Sippel AE.** The human lysozyme gene. Sequence organization and chromosomal localization. *Eur J Biochem*, **1989**; 182(3): 507-516.
22. **Hisham RI, Koboyashi K and Kato A.** Length of Hydrocarbon Chain and Antimicrobial Action to Gram Negative Bacteria of Fatty Acylated Lysozyme. *J Agric Food Chem* **1993**; 41: 1164-1168.
23. **Klebanoff SJ and Clark RA.** *The Neutrophil.* Nort Holland; **1978**; 34-50,451-53.
24. **Qian S, Yu Y, Tian K, Jiao Q Ye J and Meng G.** Synthesis and cloning of the human lysozyme gene. *Chin J Biotechnol*, **1994**; 10(1):49-54.
25. **Muraki M, Jigami Y, Tanaka H, Harada N, Kishimoto F, Agui H Ogino S and Nakasato S.** Expression of synthetic human lysozyme gene in *E. coli*. *Agric Biol Chem*, **1986**; 50:713-723.
26. **Yoshimuro T, Toibara A, Kikuchi K, Kobayashi M, Hayakawa T, Nakahara K, Kikuchi M and Ikehara M.** Differences between *S. cerevisiae* and *B. subtilis* in secretion of human lysozyme. *Biochem Biophys Res Commun*, **1987**; 145: 712-718.
27. **Jigami Y, Muraki M, Harada N and Tanaka H.** Expression of synthetic human lysozyme gene in *S. Cerevisiae*: use of a synthetic chicken-lysozyme signal sequence for secretion and processing. *Gene*, **1986**; 43:273-279.
28. **Tsuchiya K, Tada S, Gomi K , Kitamoto K and Jigami J.** High level expression of the human lysozyme gene in *A. oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **1992**; 38:109-114.
29. **Bitter GA, Chen KK, Banks AR and Lai PH.** Secretion of foreign proteins from *S. cerevisiae* directed by α -factor gene fusions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**; 81: 5330-5334.
30. **Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Urdea MS and Barr PJ.** α -Factor directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *S. cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1984**; 81:4642- 4646.
31. **Jung A, Sippel AE, Grez M and Schutz G.** Exon encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1980**; 77:5759-5763.
32. **Weaver LH and Matthews BW.** Structure of bacteriophage T4 lysozyme refined at 1.7Å resolution. *J Mol Biol*, **1987**; 193: 189-199.
33. **Rossmann MG and Argos P.** Exploring structural homology of proteins. *J Mol Biol*, **1976**; 105: 75-95.

34. **Remington SJ and Matthews BW.** A general method to assess similarity of protein structures, with application to T4 bacteriophage lysozyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1978**; 75: 2180-2184.
35. **Matthews BW, Remington SJ, Gruetter MG and Anderson WF.** Relation between hen egg white lysozyme and bacteriophage T4 lysozyme: evolutionary implication. *J Mol Biol*, **1981**; 147:545-558.
36. **Bouvier SE and Poteete AR.** Second-site reversion of a structural defect in bacteriophage T4 lysozyme. *Faseb J*, **1996**; 10: 159-163.
37. **Poteete AR, Dao-pin S, Nicholson H and Matthews BW.** Second-site revertants of an inactive T4 lysozyme mutant restore activity by re-structuring the active site cleft. *Biochemistry*, **1991**; 30: 1425-1432.
38. **Rennel D, Bouvier SE, Hardy LW and Poteete AR.** Systemic mutation of bacteriophage t4 lysozyme. *J Mol Biol*, **1991**; 222: 67-88.
39. **Ho SN, Hunt HD, Honton RM, Pullen JK and Pease LR.** Site directed mutagenesis by overlap extension using PCR. *Gene*, **1989**; 77: 51-59.
40. **Baldwin E, Xu J and Hajiseyedjavadi O.** Construction and functional selection of a T4 lysozyme gene library randomly mutagenized at five specific sites. *In Techniques in Protein Chemistry IV*, **1993**: 499-507.
41. **Owen JE, Schultz DW, Taylor A and Smith GR.** Nucleotide sequence of the lysozyme gene of bacteriophage T4: analysis of mutations involving repeated sequences. *J Mol Biol*, **1983**; 16: 229-248.
42. **Josslin R.** The lysis mechanism of phage T4: mutants affecting lysis. *Virology*, **1970**; 40: 719-726.
43. **Perry LJ, Heyneker HL and Wetzel R.** Non-toxic expression in *E. coli* of a plasmid-encoded gene for phage T4 lysozyme. *Gene*, **1985**; 38: 259-264.
44. **Fastrez J.** Phage lysozymes. *Exs*, **1996**; 75: 35-64.
45. **Heinz DW, Baase WA and Matthews BW.** Folding and function of a T4 lysozyme containing 10 consecutive alanines illustrate the redundancy of information in an amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1992**; 89:9: 3751-3755.
46. **Rennell D, Bouvier SE, Hardy LW and Poteete AR.** Systematic mutation of bacteriophage T4 lysozyme. *J mol Biol*, **1991**; 222:1: 67-88.
47. **Huang W, Cui X, Tian Y, Lin M and Peng X.** Cloning of T7 lysozyme gene and construction of the vector for transgenic plants resistant to bacterial infection. *Wei Sheng Wu Hsueh Pao*, **1994**; 34: 261-265.
48. **Cui DS, Lian YN, Xu YR, Li DJ and Song LZ.** Cloning of the bacteriophage T7 lysozyme gene. *Chin J Biotechnol*, **1990**; 6: 87-93.
49. **Mulnix AB and Dunn PE.** Structure and induction of a lysozyme gene from the tobacco hornworm, *Menduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, **1994**; 24(3): 271-281.
50. **Hultmark D.** Insect lysozymes. *Exs*, **1996**; 75: 87-102.
51. **Kang D, Romans P and Lee JY.** Analysis of a lysozyme gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Gene*, **1996**; 174: 239-244.

52. **Sun SC, Asling B and Faye I.** Organization and expression of the immunoreponsive lysozyme gene in the giant silk moth, *Hyalophora cecropia*. *The Journal of Biological Chem (USA)*, **1991**; 266(10): 6644-6649.
53. **Lockey TD and Ourth DD.** Purification and characterization of lysozyme from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *Biochem and Biophy Res Commu (USA)*, **1996**; 220(3): 502-508.
54. **Birch GG, Parker KJ and Blakebrough N.** *Enzymes and Food Processing*. London, **1981**: 218-219.
55. **Fox PF.** Exogenous enzymes in dairy technology. *Journal of Food Biochemistry*, **1992**; 17: 173-179.
56. **Maga EA, Anderson GB and Murray JD.** The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *Journal of Dairy Science (USA)*, **1995**; 78(12): 2645-2652.
57. **Elias P.** Effect of lysozyme on manufacturing of cheese made from milk of high bacterial content. *Veterinary Medicine (Estonia)*, **1995**; 95:154-160.
58. **Todorovic M and Macak G.** Decontamination of anaerobic microflora in processed cheese. *Modern Trends in Food Technologists (Yugoslavia)*, **1995**; 9-10: 412-418.
59. **Macak GV.** Antibacterial effect of some modern substrate on presence Clostridium sp. In processed cheese. *Novi Sad (Yugoslavia)*, **1995**: 198.
60. **Neviani E.** The use of lysozyme in cheesemaking. From initial studies to the most recent acquisitions. *Industria del Latte (Italy)*, **1992**; 28(1): 23-44.
61. **Hisham RI, Koboyashi K and Kato A.** Length of hydrocarbon chain and antimicrobial action to gram negative bacteria of fatty acylated lysozyme. *J Agric Food Chem*, **1993**; 41: 1164-1168.
62. **Ibrahim HR, Hatta H, Fujiki M, Kim M and Yamamoto T.** Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative bacteria due to modification with perillaldehyde. *J of Agric and Food Chem (USA)*, **1994**; 42(8): 1813-1817.
63. **Brown TA .** *Gene Cloning, An Introduction*. Third Ed., UMIST, Manchester ,UK: Chapman & Hall, **1995** : 27-77.
64. **<http://vector.cshl.org/index1.html> Erişim tarihi: 23.4.1999**
65. **Brown TA.** *Genetics, A Molecular Approach*. Third Ed., Manchester, Chapman & Hall, **1997**: 359-378.
66. **Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1982**: 12-30.
67. **<http://www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/cloning/cloning1.html> Erişim tarihi: 15.12.1998**
68. **Kaufman DL and Evans GA.** *Biotechniques*. **1990**; 9: 305-306.
69. **Glover DM and Hames BD.** *DNA Cloning 2, A Practical Approach, Expression Systems*. 2nd Ed., Oxford University Press. New York. **1995**: 34-126.

70. **Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**; 1.3-4.15.
71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/repository/t4phage/geneorfs.txt>, Erişim tarihi: 5.11.1998
72. [http://www.srs.ebi.ac.uk:5000/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+\[embl-pid:G15261\]](http://www.srs.ebi.ac.uk:5000/srsbin/cgi-bin/wgetz?-e+[embl-pid:G15261]), Erişim tarihi: 1.2.1999
73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/repository/t4phage/genom.txt>, Erişim tarihi: 5.11.1998
74. **The restriction mate v1.0**, copyright 1994-1995 Microsoft Corporation, Dr. B.J. Murray and Dr C. Schaefer, Designed and Written for Boehringer Mannheim GmbH.
75. **Birnboim HC and Doly J.** *Nucl Acid Res*, **1979**; 7: 1513-1523.
76. **UVIDoc version 98.01 for windows** UVI Tech St John's Innovation Center Cawley Road CAMBRIDGE CB4 4WS UK
77. **Hanahan D.** Studies on Transformation of *E. coli* with Plasmids. *J Mol Biol*, **1983**; 166:557-580.
78. **O'Farrel PH, Kutter E and Nakanishi M.** A restriction map of the bacteriophage T4 genome. *Mol Gen Genet*, **1980**; 179: 421-435.
79. **Mosig G, Lin GW, Franklin J and Fan WH.** Functional relationships and structural determinants of two bakterioophage T4 lysozymes: a soluble (gen e) and a baseplate-associated (gen 5) protein. *New Biol*, **1989**; 1(2): 171-179.

EKLER

EK-1

Kullanılan Kimyasallar, Solüsyonlar ve Hazırlanması

Aşağıda verilen kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak "Molecular Cloning" ⁶⁶ esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genelde konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarına ulaştırmak için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir;

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

M_1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %).

V_1 = Stoktan alınması gereken miktar (v).

M_2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %).

V_2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (v).

1.1. 0.5 M EDTA (pH 7.5 ve 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde gerekli EDTA tartılır, bir miktar su ile çözülür, NaOH ile pH'lar ayarlandıktan sonra gerekli hacme tamamlanır, otoklavlanır (121 °C'de 15-20 dakika) ve 4°C'de saklanır.

1.2. 0.5 M Tris-HCl, (pH 7.5 ve 8.0)

İstenen hacimlerde 0.5 M olacak şekilde gerekli Tris baz tartılır bir miktar su ile çözülür, HCl ile pH'lar ayarlandıktan sonra gerekli hacme tamamlanır, otoklavlanır ve 4°C'de saklanır.

1.3. EtBr (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar Ethidium Bromid (EtBr) dikkatli bir şekilde tartılır ve suda iyice vortekslenerek çözülür. Işığa hassas

olduğu için renkli bir cam şişede veya alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'de saklanır. Jele son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

EtBr, floresan bir boyadır ve DNA ve RNA'ya bazları arasına girerek kuvvetlice bağlanır. UV ile parlayarak görüntü verir ve jeldeki nükleik asitlerin yerinin belirlenmesini sağlar.

Dikkat !: EtBr son derece mutajen bir maddedir. Tartım ve kullanım sırasında mutlaka eldiven ve maske giyilmelidir ve çevreyi de kontamine etmeden dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır.

1.4. 5X TBE Tamponu (pH 8.0)

Bir litre için;

54 gr Tris baz

27.5 gr Borik asit

0.01 M EDTA (pH 8.0)

Hazırlanmak istenen miktar için gereken bileşenler yukarıdaki değerlere göre orantılanarak alınır. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözülür, NaOH ile pH 8.0'a ayarlanır ve otoklavlanır.

1X yapmak için 1 hacim 5X'lik TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilir.

1.5. Agaroz Jel

Agaroz pahalı bir madde olduğu için öncelikle jel döküm tablasının boyutları (jel kalınlığı da dikkate alınarak) ölçülür ve hacmi belirlenir. Hazırlanmak istenen yüzde konsantrasyona göre (örn. %1'lik), belirlenen hacim için gereken miktar agaroz dikkatli bir şekilde tartılır ve erlen içine konur. Üzerine hesaplanan hacimde 1X TBE tamponu (1 hacim 5X TBE üzerine 4 hacim saf su ilave edilerek hazırlanır) konarak ateş üzerine alınır ve eritilir (3-5 saniye kaynaması yeterlidir). Ateşden alınan jel üzerine son konsantrasyon 0.5µg/ml olacak şekilde stok EtBr solüsyonundan ilave edilir. Jel sıcaklığı 45-50 °C'ye (el sıcaklığı) geldiğinde hazırlanan jel kabına dikkatli bir şekilde, hava kabarcığı oluşturmada dökülür ve yaklaşık 40 dakika beklenerek donması sağlanır. Jel elektroforez tankına alınır ve üzeri örtülene kadar 1X TBE tamponu

ilave edilir. Kuyucuk oluşturmak için yerleştirilen tarak dikkatli bir şekilde çıkartılır. Jel, örneklerin yüklenmesine ve elektroforeze hazırdır.

1.6. Yükleme Tamponu (6X)

%40 sukroz (w/v), (suda çözülür)

%0.25 bromfenol mavisi

Yukarıda verilen oranlara göre, istenen hacim için gereken miktarda sukroz ve boya tartılır, vorteksle iyice karıştırılır ve ependorfl tüplere paylaştırılarak 4°C'de saklanır. DNA solüsyonu ile 1/5 oranında (1 hacim boya 5 hacim DNA solüsyonu) karıştırılır.

1.7. L ve LB (Leuria Bertani) Besi Yerleri

a) Sıvı (1 litre için)

L

5 gr Yeast extract

10 gr Bacto tryptone

5 gr NaCl

LB

5 gr Yeast extract

10 gr Bacto tryptone

10 gr NaCl

Yukarıda verilen miktarlar 1 litre içindir. Hazırlanacak olan hacim için gereken miktar içerik orantılanarak tartılır. Manyetik karıştırıcı üzerinde toplam hacimden biraz az saf su ile çözülür ve pH'sı NaOH ile 7.5'e ayarlanır. Hacim saf su ile tamamlanır ve erlenlere (erlen hacminin 1/10'u oranında) paylaştırılır. Erlenlerin ağzı pamukla sıkıca kapatılır ve alüminyum folyo sarılarak otoklavlanır. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir. Kontaminasyon belirtisi olanlar dökülür.

b) Katı

Hazırlanan sıvı besiyerine %1.5 oranında agar katılır ve aynı şekilde otoklavlanır. Kullanılacak petri kutuları da kağıda sarılarak otoklavlanır. Besiyeri steril kabin içinde petri kutularına paylaştırılır ve donduktan sonra streç filmle sarılarak +4 °C saklanır. Saklama süresi iki haftayı geçmemelidir. Antibiyotik

veya X-gal ilave edileceği zaman, son konsantrasyonlar dikkate alınarak besi yeri sıcaklığı yaklaşık 48°C'ye geldiğinde ilave edilir ve zaman geçirmeden petri kutularına paylaştırılır. Plakların üzerine ilgili bilgiler yazılarak etiketlenir.

c) Yumuşak (Yarı-katı) Agar (%0.45'lik)

Sıvı besi yerine %0.45 oranında agar katılarak hazırlanır. Besi yeri 70-80 °C'de 10-15 dakika tutularak agarın erimesi sağlanır ve deney tüplerine paylaştırılır (her birine 2.5 ml). Tüplerin ağzı pamukla kapatılır ve otoklavlanır. Kullanılacağı zaman su banyosunda eritilir ve 45-50 °C'ye geldiğinde, çalışılacak olan bakteri kültüründen (taze ve ~3 saat üremiş) %4 oranında (100 µl) ilave edilir, vortekslenir ve daha önce hazırlanmış olan katı besi yeri üzerine dökülerek her tarafa yayılması sağlanır.

1.8. Besi Ortamları İçin Antibiyotiklerin Hazırlanması

a) Ampisilin (25 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar ampisilin dikkatli bir şekilde tartılır, saf suda çözülür, bakteriyel filtreden (0.2 µm) geçirilerek steril bir şekilde ependorf tüplere paylaştırılır ve -20°C' de saklanır. Besi ortamlarına 35-50 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

Ampisilin, penisilin türevi bir madde olup hücre duvarı sentezlenmesine engel olarak bakterinin ölümüne neden olur. Dirençli bakteriler tarafından sentezlenen β-lactamase, antibiyotiğin β-lactam halkasını kopartarak inaktive eder.

b) Tetrasiklin (12.5 mg/ml)

Etanol/saf su (1/2 v/v) karışımında 12.5 mg/ml olacak şekilde tetrasiklin hidroklorid çözülür, ve ependorflara paylaştırılarak -20°C'de saklanır. Tetrasiklin ışığa hassas olduğu için karanlık bir ortamda veya aliminyum folyaya sarılarak saklanmalıdır. Besi ortamlarına 12.5-15 µg/ml olacak şekilde ilave edilir. Magnezyum iyonları tetrasiklin için kuvvetli bir inhibitör madde olduğundan, tetrasiklin dirençli bakteri

seçimlerinde magnezyum içermeyen besi ortamları (örn. LB) kullanılmalıdır.

Tetrasiklin, ribozomların 30S'lik birimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini önler. Dirençli bakterilerin ürettiği bir protein hücre zarını modifiye ederek antibiyotiğin hücre içine alınmasını önler.

c) Kloramfenikol (34 mg/ml)

Mutlak (%100) alkol içinde 34 mg/ml olacak şekilde hazırlanır ve - 20 °C'de saklanır. Besi ortamlarına plazmid amplifikasyonu için 170 µg/ml, dirençli bakteri seçimi için ise 30 µg/ml olacak şekilde ilave edilir.

Kloramfenikol, ribozomların 50S'lik birimlerine bağlanarak peptid bağı oluğumunu önler. Direnç geninin kodladığı acetyltransferaz, antibiyotiği asetile eder ve inaktif hale gelmesini sağlar.

1.9. TE Tamponu, pH 8.0

10 mM Tris pH 8.0

0.1 mM EDTA pH 8.0

Hazırlanacak hacim için gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine etmeden kullanılır.

1.10. TNE Tamponu

10 mM Tris pH 7.5

100 mM NaCl

1 mM EDTA pH 7.5

İstenen hacme göre gerekli Tris ve EDTA hesaplanarak stoklardan alınır, gerekli miktar NaCl tartılır üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve 4°C' de saklanır.

1.11. Lizozim Solüsyonu (5 mg/ml)

50 mM Glikoz

50 mM Tris-HCl pH 8.0

50 mM EDTA pH 8.0

Önce, 25 ml 1 M Glikoz hazırlanır ve filtreden geçirilerek stok olarak saklanır. İstenilen hacimdeki solüsyon için gerekli Tris, EDTA ve Glikoz hesaplanır stoklardan alınır ve üzeri steril saf su ile tamamlanır, otoklavlanmaz, buz dolabında saklanır. Kullanılacağı zaman istenen hacimde solüsyon alınır, 5 mg/ml olacak şekilde liyofilize lizozim tartılır iyice vortekslenir ve kullanıncaya kadar buz üzerinde tutulur. Bu solüsyonun her zaman taze olarak hazırlanması gerektiğinden, varsa fazlası atılır.

1.12. SDS Solüsyonu

% 1 SDS

0.2 M NaOH

10 ml için; 0.1 gr SDS ve 0.08 gr NaOH pelleti tartılır üzerine 10 ml steril saf su ilave edilir ve iyice (pellet eriyinceye kadar) vortekslenir. Kullanıncaya kadar buz üzerinde tutulur ve fazlası atılır.

1.13. 3 M Na-Asetat (pH 4.8)

Hazırlanmak istenen hacimde 3M olacak şekilde Na-asetat tartılır ve magnetik karıştırıcı üzerinde bir miktar suda çözülür. Glacial asetik asit ile pH 4.8'e ayarlanır ve hacim su ile tamamlanır. Otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanır.

1.14. Fenol Hazırlanması

Fenol, fosfodiester bağlarını kıran ve DNA-RNA arasında çapraz bağlar oluşumuna neden olan oksidan ürünlerden (örn. quinonlar gibi) arındırılmış olmalıdır. Bu işlem 160 °C'de distilasyonla yapılır. Satın alınan katı fenol distile

edilmiş olmalıdır. Katı fenol aşağıda verilen uygulama ile kullanıma hazır hale getirilir:

- 1- Katı haldeki (distile edilmiş) fenolden hazırlanacak miktar kadar tartılır ve su banyosunda 68°C'de tamamen eriyinceye dek bekletilir.
Not: Fenolün görünüşü parlak ve renksiz olmalıdır. Pembe veya sarı renkli görünüm almış fenol kullanılmamalıdır.
- 2- Fenol üzerine %0.1 oranında 8-hidroksikinolin (renklendirmek için) ilave edilir ve iyice karıştırılır.
- 3- Eşit hacimde (1:1) 1M tris (pH 8.0) ilave edilir, şişenin ağzı kapatılır ve kuvvetlice çalkalanır. İki faz oluşuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilir.
- 4- Üst faz atılır ve bir önceki işlem tekrar edilir (en az iki defa).
- 5- Fenol üzerine eşit hacimde 0.1 M tris (pH 8.0) ilave edilir ve karıştırılır. Bu işlem üst fazın pH'sı 7.8-8.0 oluncaya dek tekrarlanır.
- 6- Fenol içine birkaç parça β -merkaptotanol ilave edilir ve üzerine 1/10 oranında 0.1 M tris (pH 8.0) eklenerek +4 °C'de saklanır.

Kullanılacağı zaman pipetle gereği kadar fenol (alt faz) alınır ve kullanılır. Folyo ile sarılarak ışıktan korunmalıdır.

Fenol organik bir çözücüdür, proteinleri denatüre ederek presipite olmasını sağlar. Yukarıdaki şekilde hazırlanan fenol DNA ve RNA'ya zarar vermez, ancak kullanım sırasında şiddetli ve tekrar tekrar muamele yine de DNA'da kırılmalara neden olur.

1.15. RNaz (10 mg/ml)

Hazırlanmak istenen hacim için gereken miktar RNaz dikkatli bir şekilde tartılır ve 10 mM Tris.Cl (pH 7.5) ve 15 mM NaCl içeren RNaz solüsyonunda çözülür. Daha sonra su banyosunda 100 °C'de 15 dakika tutulur (DNaz aktivitesini gidermek için), oda sıcaklığında soğutulur ve ependorflara paylaştırılarak -20°C'de saklanır.

1.16. X-gal Hazırlanması (20 mg/ml)

İstenen hacim için gereken miktar X-gal dikkatli bir şekilde tartılır ve N-N-Dimetil formamid içinde çözülür, filtreden geçirilmese de olur. Koyu renkli veya folyo ile sarılı şişelerde -20 °C' de saklanır. Hazırlanan katı besi yeri 48°C' ye kadar soğuduğunda son konsantrasyon 40 µg/ml olacak şekilde stokdan ilave edilir.

EK-2

Kullanılan Protokoller

2.1. DNA'nın Agaroz Jelden Arıtılması (Boehringer Mannheim, 'Agarose Jel DNA Extraction Kit')

Nükleik asitler katotropik tuzlar varlığında silika veya cam materyallerin yüzeylerine özel bir şekilde bağlanarak tuzlar ve proteinler gibi kontaminantlardan ayrılır. Su veya düşük tuz konsantrasyonlu tampon (pH 8.0-8.3) ilave edilmesiyle de matriksten ayrılır. Arıtma kiti özet olarak bu kurala göre çalışır.

Arıtma kit'inde bulunan maddeler şunlardır:

1. Vial 1 (Silika Matriks)
2. Vial 2 (Agaroz Solübilizasyon Tamponu)
3. Vial 3 (Nükleik Asit Bağlama Tamponu)
4. Vial.4 (Yıkama Tamponu)

Protokol:

1. DNA molekülü uygun konsantrasyondaki bir agaroz jelde yeteri kadar yürütülerek bantlar oluşturması sağlanır.
2. Jel, transillüminatör üzerine konur. İstenilen DNA bandı keskin bir jiletle agarozu mümkün olduğu kadar az almaya dikkat ederek jelden ayrılır ve darası alınan bir ependorf tüpe konarak tartılır (Dikkat: UV ve EtBr mutajen ajanlardır. Mutlaka maske ve eldiven giyilmeli ve hızlı çalışılmalıdır).
3. Her 100 mg agaroz için 300 µl vial 2'den ilave edilir (agaroz konsantrasyonu %2'den fazla ise bu miktar 600 µl alınır).

4. Silika matriks (Vial 1) vorteks üzerinde birkaç dakika tutularak homojen hale getirilir ve ependorfa 10 µl ilave edilir.
5. Karışım 56-60°C'de 10 dakika inkübe edilir ve bu arada her 2-3 dakikada bir vortekslenir.
6. 15000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenir ve süpernatant dökülür.
7. Pellet (matriks) üzerine 500 µl Vial 3'den ilave edilir, vortekslenir, bir önceki gibi santrifüjlenir ve süpernatant dökülür.
8. Pellet 500 µl yıkama tamponu ile (vial 4) yıkanır, önceki gibi santrifüjlenir ve süpernatant dökülür (bu işlem gerekirse tekrarlanabilir).
9. Pipetle kalan sıvı alınır ve tüp kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek oda sıcaklığında 15 dakika kurutulur (matriks rengi parlak beyaza döner).
10. Pellet üzerine 20-50 µl TE veya bidistile su (pH 8.0) ilave edilir hafifçe vortekslenir ve 56-60°C'de 10 dakika inkübe edilir (her 2-3 dakikada bir vortekslenir).
11. 15000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenir ve DNA'yı içeren sıvı kısım dikkatli bir şekilde alınarak (matriksi almadan) steril bir tüpe aktarılır.

2.2. Küçük Ölçekli Plazmid DNA İzolasyon Protokolü (Birnboim ve Doly -1979-)⁷⁵

Not: Bazı uygulamalar değişik protokoller incelenerek kısmen değiştirilmiştir. Çalışma süresince eldiven giyilmeli ve mümkün olduğu kadar steril çalışılmalıdır.

Protokol:

1. LB besi yerine steril şartlarda istenen plazmidi taşıyan *E.coli* ekilir ve uygun bir antibiyotik (plazmidle direnç sağlanan cinsten) ilave edilir (antibiyotiklerin hazırlanması ve besi ortamlarındaki konsantrasyonları Ek1. 'de verilmiştir) ve 37 °C'de sallamalı etüvde bir gece üretilir.
2. İçinde bakteri kültürü bulunan erlen +4 °C'ye (buz dolabına) alınarak soğutulur.
3. Kültür ortamı 5 ml'lik steril tüplere paylaştırılır ve 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.

4. Süpernatant dökülür ve pellet 5 ml soğuk TNE tamponu (Ek 1.10.) ile çözülür ve 4500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
5. Süpernatant dökülür ve pellet 200 µl lizozim solusyonu (Ek 1.11.) ile çözülerek ependorf tüplere aktarılır ve buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakılır.
6. Karışım üzerine 400 µl taze hazırlanmış SDS solusyonu (Ek 1.12.) ilave edilir parmakla tıklatarak karışması sağlanır ve buz üzerinde 5 dakika bekletilir.
7. Karışım üzerine 300 µl sodyum asetat (pH 4.8) (Ek 1.13.) ilave edilerek karıştırılır ve buz üzerinde 30 dakika bekletilir.
8. 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir ve süpernatant yeni bir ependorfa aktarılır.
9. 1 hacim fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilir ve emülsifiye oluncaya dek yavaş yavaş (3-5 dak.) karıştırılır.
10. 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir ve üst faz aradaki protein tabakasını almadan dikkatli bir şekilde alınır ve yeni bir tüpe aktarılır.
Not: DNA kaybını önlemek için gerekirse kalan sıvı üzerine bir miktar (100-200 µl) TE (Ek 1.9.) ilave edilir, karıştırılır, tekrar çöktürülür ve üst faz alınır.
11. 1 hacim kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edilir dikkatlice karıştırılır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir.
12. Üst faz dikkatli bir şekilde alınır ve yeni bir ependorfa (fazla ise iki ependorfa) aktarılır. Üzerine 1/4 oranında 0.3 M sodyum asetat (pH 7.0) ve 2-2.5 hacim soğuk etanol (tercihen %100'lük) ilave edilir, vortekslenir ve -20 °C'de en az 1saat bekletilir.
13. Karışım kısaca vortekslenir ve 15000 rpm'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüjlenir (4°C'de yapılan santrifüjde tuz çökebilir!).
14. Alkol dökülür, pellet 5-10 dakika kurutulur ve 100 µl TE ilave edilerek çözünmesi beklenir.
15. Tüp birden fazla ise bir tüpte toplanır ve son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde RNaz (Ek 1.15.) ilave edilir ve 37 °C'de 1 saat su banyosunda tutulur.

16. 0.1 oranında sodyum asetat (pH 4.8) ilave edilir ve üzerine 1 hacim fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) konarak hafifçe elde karıştırılır (3-5 dak) ve 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenir.
17. Üst faz dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir tüpe aktarılır ve üzerine 1 hacim kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edilir karıştırılır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir
18. Üst faz dikkatlice alınır yeni bir tüpe aktarılır. Üzerine 1/4 oranında 0.3 M sodyum asetat (pH 7.0) ve 2 hacim soğuk etanol (saf) ilave edilir vortekslenir ve -20 °C'de en az bir saat bekletilir.
19. Karışım vortekslenir ve 15000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenir.
20. Süpernatant tamamen dökülür ve pellet 1 ml soğuk %70'lik alkolle yıkanır ve yukarıdaki gibi santrifüjlenir (Pellet yerinden kalkmamışsa santrifülemeye gerek yoktur).
21. Alkol dökülür ve tüp kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek pellet 15-20 dakika kurutulur.
22. Pelletin büyüklüğüne bağlı olarak 25-100 µl TE ilave edilir ve olası DNaz kontaminasyonuna karşı 70 °C'de 15-20 dakika bekletilir.
23. Bir gece +4°C bekletilerek iyiye çözünmesi sağlandıktan sonra spektrofotometrik ölçümü yapılır ve etiketlenir.

DNA bu şekli ile kullanıma hazırdır. Buz dolabında saklanır ve gerektiği zaman kontamine etmeden alınarak ilgili çalışmalar yapılır.

2.3 Kompetent Bakteri Hazırlama ve Transformasyon⁷⁷

1. Tetrasiklinli (son konsantrasyon 12.5µg/ml) sıvı LB besiyeri yerine bakteri ekilir ve 37°C'de bir gece üretilir.
2. Üremiş olan kültürden %1 oranında yeni besiyerine inokülasyon yapılır ve 37°C'de OD_{500nm} ≈ 0.4 oluncaya kadar (~2.5 saat) üretilir.
3. Etüvden alınan bakteri buz üzerine alınır.
4. Buz üzerine konan 4 adet ependorfa 1'er ml kültür sıvısı konur.
5. 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.

6. Süpernatant dökülür ve pellet 1 ml soğuk $MgCl_2$ (0.1 M) ile nazik bir şekilde pipetlenerek çözülür.
 7. 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
 8. Süpernatant dökülür ve pellet 1 ml soğuk $CaCl_2$ (0.1 M) ilave edilerek nazik bir şekilde pipetlenerek çözülür.
 9. Buz üzerinde en az 20 dakika inkübe edilir.
 10. 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
 11. Süpernatant dökülür ve pellet 200 μ l soğuk $CaCl_2$ (0.1 M) ile tekrar çözülür.
 12. Tüplerdeki sıvılar birleştirilir, nazikce pipetlenir ve ependorf tüplere tekrar paylaşılır.
- Tüplerden biri kontrol, diğerleri ise transformasyon için kullanılır.

Transformasyon⁷⁷

Yukarıdaki işlemler sonunda bakteri, ortamdaki DNA moleküllerini hücre içine alabilecek duruma getirilmiştir. Daha sonra:

1. Kompetent bakteri bulunduran ependorf tüp(ler) buz üzerine konur
2. Ligasyon sıvısından 5-10 μ l ilave edilerek dikkatli bir şekilde pipetlenir, parmakla tıkatılarak karıştırılır.
3. Buz üzerinde en az 30 dakika bekletilir.
4. 42 °C' de 90 saniye tutulur ve süre sonunda tekrar buz üzerine alınır.
5. Tüpteki sıvının tamamı 3 ml' lik sıvı besi yerine ekilerek 37°C'de 1 saat üretilir.
6. Daha sonra 100-200 μ l alınarak steril kabinde katı besi yerine (ampisilin ve X-gal içeren) bagetle iyice yayılır ve 37°C'de bir gece inkübe edilir.

EK-3

Kullanılan Enzimler ve Tampon Sistemleri

3.1. Restriksiyon Endonükleazlar

Kullanılan restriksiyon endonükleazların hepsi Boehringer Mannheim (yeni adıyla Roche)'den satın alındığından, enzimlerin özelliklerinde ve tampon sistemlerinin sınıflandırılmasında bu firmanın katalog bilgileri esas alınmıştır.

Tampon Sistemleri:

Çalışma Tamponu İçeriği (mM)	Tampon Sistemi				
	A	B	L	M	H
Tris acetate	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50
Mg-acetate	10	-	-	-	-
MgCl ₂	-	5	10	10	10
K-acetate	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
Dithioerythritol (DTE)	-	-	1	1	1
Dithiothreitol (DTT)	0.5	-	-	-	-
2-Mercaptoethanol	-	1	-	-	-
PH at 37°C	7.9	8.0	7.5	7.5	7.5

Enzimler:

I.

Hind III										
Tanıma Dizisi: 5' *A ⁺ AG*CTT 3'						Kaynağı: <i>Haemophilus influenza</i> Rd				
İzoşizomeri			Yok							
Uyumlu Uç Oluşturduğu Enzimler			Yok							
Çalışma sıcaklığı			37 °C							
Saklama Sıcaklığı			-20 °C							
Tampon Sistemlerindeki Aktivite Değerleri (%)					Farklı DNA' lardaki Kesim Bölgesi Sayısı					
A	B	L	M	H	λ	M13mp7	PBR322	pUC18	PRS416	
50-75	100	25-50	100	50-75		7	1	1	1	

Hind III non-optimal koşullarda (tamponun iyonik direncinin düşürülmesi, gliserol oranının %5'in üzerine çıkarılması ve fazla enzim kullanılması durumlarında) star aktivitesi (bkz 2.6.) gösterir. Tanıma dizisindeki birinci A ve C'in metilasyonlu olması (' * ' ile gösterilmiştir) durumunda kesim yapamaz. 65 °C'de 15 dakikalık inkübasyonla inaktive edilebilir.

II.

Bam HI									
Tanıma Dizisi: 5' G⁺GAT⁺CC 3'					Kaynağı: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H				
İzoizomeri					<i>Bst</i> I				
Uyumlu Uç Oluşturduğu Enzimler					<i>Bcl</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Nde</i> II, <i>Sau</i> 3A ve <i>Xho</i> II				
Çalışma sıcaklığı					37 °C				
Saklama Sıcaklığı					-20 °C				
Tampon Sistemlerindeki Aktivite Değerleri (%)					Farklı DNA' lardaki Kesim Bölgesi Sayısı				
A	B	L	M	H	λ	M13mp7	PBR322	pUC18	PRS416
100	100	75-100	100	25-50	1	2	1	1	1

Bam HI, non-optimal koşullarda star aktivitesi gösterir. Bu durumda GGATCN veya GRATCC dizilerini de kesebilir. İç taraftaki Sitozinin 4. veya 5. pozisyonlarda metilli olması halinde aktivite gösteremez. 65 °C'de 15 dakikalık inkübasyonla inaktive edilebilir.

III.

Eco RI									
Tanıma Dizisi: 5' G⁺A⁺ATT⁺C 3'					Kaynağı: <i>Escherichia coli</i> B55				
İzoizomeri					<i>Rsr</i> I				
Uyumlu Uç Oluşturduğu Enzimler					<i>Acs</i> I, <i>Mun</i> I				
Çalışma sıcaklığı					37°C				
Saklama Sıcaklığı					-20°C				
Tampon Sistemlerindeki Aktivite Değerleri (%)					Farklı DNA' lardaki Kesim Bölgesi Sayısı				
A	B	L	M	H	λ	M13mp7	PBR322	pUC18	PRS416
100	100	25-50	50-75	100	5	2	1	1	1

Eco RI non-optimal koşullarda star aktivitesi gösterir. Bu durumda NAATTN veya RRATYY dizilerini de kesebilir. Adenin ve Sitozin metilasyonlarında aktivite gösteremez. Isı ile inaktive olmaz.

Nükleotidler için kullanılan kısaltmalar:

A = Adenin,	Y = C veya T,	B = C veya G veya T,
T = Timin,	M = A veya C,	D = C A veya G veya T,
G = Guanin,	K = G veya T,	H = A veya C veya T,
C = Sitozin	S = G veya C,	V = A veya C veya G,
R = G veya A,	W = A veya T,	N = A veya C veya G veya T

3.2. T4 DNA Ligaz

- *E. coli* NM 989 suşundan elde edilmiştir.
- Enzim, çift iplikli DNA'da komşu 3'-hidroksil ve 5'-fosfat grupları arasında fosfodiester bağları oluşturulmasını katalizler. Çift iplikli

DNA'nın tek ipliği üzerinde oluşan çentikleri (tek iplik kırıklarını) de kapatır.

- 65 °C'de 10 dakika inkübasyonla inaktive edilebilir.
- Aktivite gösterebilmesi reaksiyon ortamında ATP gerekir.
- Küt uçlu DNA molekülleri için hazırlanan ligasyon reaksiyonunda oratma %15 oranında (w/v) PEG ilave edilir.
- Ligasyon sıcaklığı, değişik uygulamalarda 4-25 °C arasında verilmiştir.

Reaksiyon tamponu (10X):

660 mM Tris-HCL, 50 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerytritol, 10 mM ATP, pH (20 °C'de 7.5).

3.3. Termostabil DNA Polimeraz

Termofilik bakterilerden izole edilir veya rekombinant olarak *E. coli*'de üretilir. Yüksek sıcaklıklara (bazıları 100 °C) ve değişen sıcaklık döngülerine dayanıklı olduklarından PCR reaksiyonları için son derece elverişlidirler. Değişik bakteri türlerinden izole edilmiş polimerazlar ticari olarak mevcut olup reaksiyonun özelliğine göre uygun olan tercih edilir. Hepsi de polimerizasyon için kofaktör olarak MgCl₂'e ihtiyaç duyarlar. Yaygın olarak kullanılanı Taq DNA polimerazdır (*Thermus aquaticus*'dan) fakat, Tth DNA polimeraz (*Thermus thermophilus*'dan), Tfl DNA polimeraz (*Thermus flowus*'dan) ve Pwo DNA polimeraz (*Pyrococcus woesei*'den) gibi değişik termofilik bakterilerden izole edilenleri de vardır.

Bu çalışmada Taq ve Tfl DNA polimerazlar kullanılmıştır.

3.4. Sigma PCR Optimizasyon Kiti tampon bileşimleri:

İçerik(mM)	10X Tampon Çeşitleri (Kod Numaralı)												50X Ünl.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Tris-HCl	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	20
MgCl ₂	15	15	35	35	15	15	35	35	15	15	35	35	-
KCl	250	750	250	750	250	750	250	750	250	750	250	750	-
Tris pH'sı	8.3	8.3	8.3	8.3	8.8	8.8	8.8	8.8	9.2	9.2	9.2	9.2	8.0
EDTA (nM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında K. Maraş'ın Göksun ilçesine bağlı Bozhüyük kasabasında doğdu. İlk öğrenimini Bozhüyük'de, orta ve lise öğrenimini de Kayseri'de tamamladı. 1986 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliğini kazandı ve buradan 1992 yılında mezun oldu. 1992-1996 yılları arasında Tunceli ve Çorum Anadolu Liselerinde Fen Bilgisi ve Biyoloji öğretmeni olarak görev yaptı. 1996 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programını kazandı. Aynı yıl Enstitü kadrosunda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen bu görevi yürütmektedir.

Evli ve üç çocuk babasıdır.