



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KIRMIZI FLORESAN PROTEİN GENİNİN  
KLONLANMASI VE *CEREIBACTER*  
*SPHAEROIDES* O.U.001'DE EKSPRESYONU

Ayşenur ALTINKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Mayıs-2025  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır

## TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşenur ALTINKAYA tarafından hazırlanan “Kırmızı Floresan Protein Geninin Klonlanması ve *Cereibacter sphaeroides* O.U.001’de Ekspresyonu” adlı tez çalışması 13/05/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

### İmza

#### Başkan

Prof. Dr. Gökhan SADİ

#### Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

#### Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ....../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY  
FBE Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Ayşenur ALTINKAYA

Tarih:13/05/2025

**ÖZET****YÜKSEK LİSANS TEZİ****KIRMIZI FLORESAN PROTEİN GENİNİN KLONLANMASI VE  
CEREİBACTER SPHAEROİDES O.U.001'DE EKSPRESYONU****Ayşenur ALTINKAYA****Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS****2025, 161 Sayfa****Jüri****Prof. Dr. Gökhan KARS****Prof. Dr. Gökhan SADİ****Dr. Öğr. Üyesi Aslı DAĞERİ**

*Cereibacter sphaeroides*, fotosentetik, fakültatif anaerob ve gram-negatif bir bakteridir. Metabolik çeşitliliği ve genetik olarak manipüle edilebilme yeteneği sayesinde biyoteknolojik uygulamalarda potansiyel bir konak hücre olarak değerlendirilmektedir. Floresan proteinler, belirli dalga boylarında ışığı emerek daha uzun dalga boylarında ışık yayabilmektedir. Bu özellikleri sayesinde biyoteknoloji ve moleküler biyoloji alanında geniş bir kullanım alanına sahiptirler. Kırmızı Floresan Protein (RFP), uzun dalga boyunda emisyon yapması nedeniyle biyomedikal görüntüleme ve hücre içi analizlerde önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, *C. sphaeroides*'in rekombinant protein üretimi için bir hücre fabrikası olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla fruktoz ile indüklenebilen bir ekspresyon vektörü geliştirildi. Vektörün çalışabilirliğini değerlendirmek için RFP geni kullanıldı. Bu kapsamda, *rfp* geni, fruktoz ile indüklenebilen pFRU2 ekspresyon vektörüne klonlandı ve klonlama işleminin doğrulanması için moleküler biyolojik yöntemler kullanıldı. Çalışma kapsamında, *rfp* geni uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek pFRU2 vektörüne entegre edilmiş ve bu işlem hem geleneksel klonlama yöntemi hem de Gibson Assembly yöntemi ile gerçekleştirildi. Rekombinant vektör, *C. sphaeroides* O.U.001 suşuna konjugasyon ile aktarıldı ve başarılı klonların belirlenmesi amacıyla koloni PCR, restriksiyon enzimi kesim analizi ve dizileme yöntemleri kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, *rfp*'nin pFRU2 vektörüne başarıyla klonlandığını ve rekombinant suşların doğrulandığını gösterdi. RT-qPCR analizleri, hedef genin transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirildi ve *rfp* transkriptlerinin varlığı tespit edildi. Ancak, protein düzeyinde yapılan değerlendirmelerde herhangi bir floresan sinyal elde edilemedi. Ayrıca, fruktoz varlığı ve yokluğu arasında *rfp* transkripsiyon seviyelerinde belirgin bir fark gözlemlenmedi. Bu bulgular, fruktoz ile indüklenebilen ekspresyon sisteminde promotör aktivitesinin beklenen seviyede indüksiyon ile çalışmadığını ve transkripsiyon sürecinin translasyona dönüşmediğini göstermiştir. Çalışma, fruktoz ile indüklenebilen ekspresyon sistemlerinin etkinliği üzerine yapılan araştırmalara katkı sağlamakta ve genetik düzenleyici elemanların optimizasyonuna yönelik yeni çalışmalar için temel oluşturmaktadır. Gelecekte yapılacak çalışmalar, *rfp* geninin kodon optimizasyonu ile ekspresyon seviyesinin artırılması, farklı promotör sistemlerinin kullanılması ve farklı floresan proteinlerinin kullanım potansiyelinin araştırılması yönünde ilerleyebilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cereibacter sphaeroides* O.U.001, Ekspresyon vektörü, Gibson Assembly, Kırmızı Floresan Protein, Klonlama.

**MS THESIS****CLONING OF THE RED FLUORESCENT PROTEIN GENE AND ITS  
EXPRESSION IN *CEREIBACTER SPHAEROIDES* O.U.001****Ayşenur ALTINKAYA****The Graduate School Of Natural And Applied Science Of Necmettin Erbakan  
University****The Degree Of Master Of Science In Molecular Biology And Genetics****Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS****2025, 161 Sayfa****Jury****Advisor Prof. Dr. Gökhan KARS****Prof. Dr. Gökhan SADI****Asst. Prof. Aslı DAĞERİ**

*Cereibacter sphaeroides* is a photosynthetic, facultative anaerobic, and Gram-negative bacterium. Due to its metabolic versatility and the ability to be genetically manipulated, it is considered a potential host for biotechnological applications. Fluorescent proteins absorb light at specific wavelengths and emit light at longer wavelengths. Thanks to these properties, they have a wide range of applications in biotechnology and molecular biology. RFP (Red Fluorescent Protein) is widely used as a significant tool in biomedical imaging and intracellular analyses due to its long-wavelength emission. In this thesis study, an expression vector inducible by fructose was developed to test the usability of *C. sphaeroides* as a cell factory for recombinant protein production. The RFP gene was used to evaluate the functionality of the vector. Within this scope, the *rfp* gene was cloned into the fructose-inducible pFRU2 expression vector, and molecular biology methods were used to confirm the cloning process. The *rfp* gene was excised with appropriate restriction enzymes and integrated into the pFRU2 vector using both traditional cloning and Gibson Assembly methods. The recombinant vector was transferred to the *C. sphaeroides* O.U.001 strain via conjugation, and colony PCR, restriction enzyme digestion analysis, and sequencing were used to identify successful clones. The results showed that *rfp* was successfully cloned into the pFRU2 vector and that recombinant strains were confirmed. RT-qPCR analyses were performed to determine the transcription levels of the target gene, and the presence of *rfp* transcripts was detected. However, no fluorescent signal was observed in protein-level evaluations. Additionally, no significant difference was observed in *rfp* transcription levels in the presence or absence of fructose. These findings indicate that the promoter activity in the fructose-inducible expression system did not function at the expected induction level, and the transcription process did not translate into protein production. This study contributes to research on the efficiency of fructose-inducible expression systems and lays the foundation for future work aimed at optimizing genetic regulatory elements. Future studies may focus on increasing expression levels through codon optimization of the *rfp* gene, using different promoter systems, and exploring the potential of other fluorescent proteins.

**Keywords:** *Cereibacter sphaeroides* O.U.001, Cloning, Expression vector, Gibson Assembly, Red Fluorescent Protein.

## ÖNSÖZ

Bu tez, yüksek lisans eğitimim boyunca edindiğim bilgi ve deneyimleri derleyerek, seçtiğim konu üzerine derinlemesine bir araştırma yapmamın bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Tezin hazırlanmasında emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunmak isterim.

Tez sürecim boyunca bana her zaman destek olan ve yol gösteren, bilimsel bakış açımı geliştirmeme katkı sağlayan danışmanım Prof. Dr. Gökhan KARS'a, sunduğu rehberlik ve sabır için özellikle teşekkür ederim. Kendisinin kıymetli bilgi birikimi ve yol gösterici tavsiyeleri bu çalışmanın en önemli yapı taşlarından biridir. Değerli katkıları için tez jüri üyeleri Prof. Dr. Gökhan SADİ ve Dr. Öğretim Üyesi Aslı DAĞERİ'ne teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmamın her aşamasında beni destekleyen, moral ve motivasyon sağlayan başta kıymetli annem Cevriye SEREN, canım ablalarım Sıddıka YANAR ve Merve SÜTÇÜ, kıymetli dayım Ömer SEREN olmak üzere tüm aileme ve arkadaşlarıma minnettarlığımı ifade etmek istiyorum. Bu süreci onlar olmadan geçirmek çok daha zor olurdu.

Son olarak, tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren tüm hocalarıma, bana katkı sunan laboratuvar arkadaşlarıma; İnnocent MANGA, Besna DALMIŞ, Beyza NUR SAYANER TAŞÇI, Tuğba BAŞ, Merve BAŞTUTAN'a ve araştırmam boyunca laboratuvar olanaklarını sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi'ne de teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, uzun ve zorlu bir yolculuğun sonunda elde edilen bir başarı olarak benim için büyük bir anlam taşımaktadır. Çalışmamın bilime ve ilgili literatüre katkı sağlamasını umuyorum.

Saygılarımla,

Ayşenur ALTINKAYA  
KONYA-2025

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET .....</b>	<b>1</b>
<b>ÖNSÖZ .....</b>	<b>3</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>4</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>8</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>	<b>10</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR.....</b>	<b>13</b>
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>15</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>18</b>
2.1. Klonlama.....	18
2.1.1. Geleneksel Klonlama .....	18
2.1.2. Gateway Klonlama .....	21
2.1.3. TOPO Klonlama .....	22
2.1.4. CRISPR Tabanlı Klonlama.....	23
2.1.5. Gibson Klonlama .....	24
2.2. Gen Aktarım Yöntemleri .....	26
2.2.1. Doğrudan Gen Aktarım Yöntemleri .....	27
2.2.1.1. Elektroporasyon .....	27
2.2.1.2. Mikroenjeksiyon .....	27
2.2.1.3. Gen Tabancası (Biyolistik Yöntem) .....	28
2.2.1.4. Ultra Sonikasyon.....	28
2.2.2. Dolaylı Gen Aktarım Yöntemleri .....	29
2.2.2.1. Plazmit Vektörleri ile Aktarım .....	29
2.2.2.2. Virüs Vektörleri ile Aktarım.....	29
2.2.2.3. Konjugasyon .....	30
2.2.2.4. Transdüksiyon.....	30
2.2.2.5. Transformasyon .....	31
2.3. Vektörler .....	31
2.3.1. Plazmit Vektörler .....	33
2.4. Vektör Genetik Elementleri .....	34
2.4.1. Promotörler .....	34
2.4.1.1. Promotör elementleri .....	36
2.4.2. Transkripsiyon terminatör çeşitleri .....	39
2.4.2.1. Rho-bağımlı sonlandırma .....	40
2.4.2.2. Rho bağımsız sonlandırma.....	41
2.4.3. Etiket peptit ve proteinler .....	42
2.4.3.1. Poli-His Etiketi .....	43
2.4.3.2. His etiketli proteinin saflaştırılması.....	45
2.4.3.3. Maltoz bağlama proteini (MBP).....	47
2.4.3.4. Glutasyon S-transferaz proteini (GSP).....	48

2.4.3.5.Kalmodulin Bağlayıcı Protein (CBP) .....	49
2.4.3.6.Streptavidin / Biotin Bazlı Etiket.....	49
2.4.3.7.Tioredoksin A (TrxA).....	50
2.4.3.8.Küçük ubikutin benzeri değiştirici (SUMO) .....	50
2.5. Floresan Proteinler .....	51
2.5.1. Yeşil Floresan Protein (GFP).....	53
2.5.2. Camgöbeği Floresan Protein (CFP).....	55
2.5.3. Sarı Floresan Protein (YFP).....	57
2.5.4. Evoglow Floresan Protein.....	58
2.5.5. Kırmızı Floresan Protein (RFP).....	59
2.5.5.1. RFP Olgunlaşma Süreci.....	63
2.6.Floresan Proteinlerin Kullanım Alanları.....	64
2.7. <i>Cereibacter sphaeroides</i> ( <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ) O.U.001.....	66
2.7.1.Hücre Fabrikası Olarak <i>C. sphaeroides</i> .....	66
2.7.2.Fiziksel özellikleri.....	67
2.7.3.Genetik özellikleri.....	69
2.8. <i>Cereibacter sphaeroides</i> için Kullanılan Vektörler.....	70
2.8.1.pFRU2.....	71
2.8.2. pBBR1MCS .....	72
2.8.2.1. pBBR1MCS-2.....	72
2.8.2.2.pBBR1MCS-3.....	73
2.8.2.3. pBBR1MCS-4.....	74
2.8.2.4. pBBR1MCS-5.....	74
2.8.3. pIND .....	75
2.8.4. pMG170/pMG171 .....	76
2.9. <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'de Kullanılan Promotorler.....	76
2.9.1. fruBKA Operonu Promotoru .....	76
2.9.2. Cer Operonu Promotoru.....	76
2.9.3. puf Promotoru .....	77
2.10. <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'de Kullanılan Transkripsiyon Terminatörleri .....	77
2.10.1.BBa_J95029 .....	77
2.10.2. SV40 (Simian Virus 40) poly(A) sinyali .....	78
2.10.3. Bovine growth hormone (bGH) poly(A) sinyali.....	78
2.11. <i>Cereibacter sphaeroides</i> Gen ekspresyon Çalışmaları .....	79
2.7.1. Membran proteininin heterolog ekspresyonu .....	79
2.7.2. Zar taşıma proteinlerinin heterolog ekspresyonu.....	80
2.7.3. Glutamil-tRNA redüktaz geninin heterolog ekspresyonu .....	80
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>81</b>
3.1. Klasik Klonlama Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması.....	81
3.1.1. pFRU2' nin Klonlama İşlemi İçin Hazırlanışı.....	81
3.1.1.1. Agaroz Jel Elektroforezi .....	84
3.1.1.2. Konsantrasyon Ölçümü.....	84
3.1.1.3. <i>NruI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesim.....	85
3.1.1.4. Kesilen plazmit DNA'nın Defosforilasyonu .....	85
3.1.1.5. pFRU2 Plazmit DNA Purifikasyonu .....	86
3.1.2. RFP Geninin Klonlama İşlemi İçin Hazırlanışı.....	87
3.1.2.1. pSB1C3-BBa_J04450 Plazmit İzolasyonu .....	88
3.1.2.2. Primer Tasarımı ve Validasyonu .....	90

3.1.2.3. RFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu .....	90
3.1.2.4. Amplifiye Edilen RFP Geninin Purifikasyonu .....	91
3.1.2.5. Purifie Edilen RFP Geninin Fosforillenmesi .....	92
3.1.2.6. Fosforillenen RFP Geninin Purifikasyonu .....	93
3.1.3. Kompetan Hücre Hazırlama .....	93
3.1.4. RFP Geninin pFRU2'ye Ligasyonu .....	94
3.1.5. Transformasyon .....	95
3.1.6. Klon Yön Tayini .....	96
3.1.6.1. Koloni PCR Analizi (cPCR) .....	96
3.1.6.2. pFRU2-RFP Plazmit İzolasyonu .....	97
3.1.6.3. <i>NcoI</i> Restriksiyon Enzimi ile Kesim .....	98
3.1.6.4. Primer Tasarımı ve Validasyonu .....	99
3.1.6.5. Klon Yön Tayini PCR Analizi .....	99
3.1.6.6. <i>HincII</i> Restriksiyon Enzim Kesimi .....	100
3.1.6.7. İzolatların PCR Analizi .....	101
3.1.6.8. <i>PstI</i> ve <i>HincII</i> Restriksiyon Enzimleri ile Çift Kesim .....	102
3.1.6.9. Primer Tasarımı ve Validasyonu .....	103
3.1.6.10. Kesim Sonrası PCR Analizi .....	103
3.1.6.11. Dizileme Öncesi PCR Analizi .....	104
3.1.6.12. RFP Geni Klonlanmış pFRU2'nin Dizi Analizi .....	105
3.2. Gibson Assembly Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması .....	105
3.2.1. Primer Tasarımı ve Validasyonu .....	106
3.2.2. Gibson Assembly Reaksiyonu için RFP Fragmanının Hazırlanması .....	106
3.2.3. Gibson Assembly Reaksiyonu için pFRU2 Vektörünün Hazırlanması .....	107
3.2.4. Gibson Assembly Reaksiyon .....	108
3.2.5. Transformasyon .....	109
3.2.6. Klon Yön Tayini .....	110
3.2.6.1. Klon Yön Tayini PCR Analizi .....	110
3.2.6.2. <i>PstI</i> ve <i>HincII</i> Restriksiyon Enzimleri ile Çift Kesim .....	111
3.2.6.3. RFP Geni Klonlanmış pFRU2'nin Dizi Analizi .....	112
3.3. Vektörün <i>C. sphaeroides</i> 'e Konjugasyon ile Aktarılması .....	112
3.3.1. Konjugantlardan Plazmit İzolasyonu ve PCR Analizi .....	113
3.4. RFP Gen İfade Analizi .....	114
3.4.1. cDNA (Tamamlayıcı DNA) Sentezi .....	115
3.4.2. Eş Zamanlı PCR (qPCR) .....	116

#### 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 118

4.1. Klasik Klonlama Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması .....	118
4.1.1. pFRU2 Plazmit İzolasyonu .....	118
4.1.2. pFRU2'nin Restriksiyon Enzim Kesimi .....	119
4.1.3. pFRU2'nin Purifikasyonu .....	119
4.1.4. pSB1C3-BBa_J04450 Plazmit İzolasyonu .....	120
4.1.5. RFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu .....	121
4.1.6. RFP Geninin Purifikasyonu .....	122
4.1.7. Ligasyon Ürününün <i>E. coli</i> <i>SI7-1</i> ( $\lambda$ pir)'e Transformasyonu .....	122
4.1.8. Klon Yön Tayini Koloni PCR Analizi .....	123
4.1.9. Transformantlardan Yapılan Plazmit İzolasyonu .....	124
4.1.10. Transformantların Restriksiyon Enzim Kesimi .....	124
4.1.11. Klon Yön Tayini PCR Analizi .....	125

4.1.12. Transformantların Restriksiyon Enzim Kesimi .....	126
4.1.13. RFP Geninin PCR Analizi .....	126
4.1.14. Restriksiyon Enzimleri ile Yapılan Çift Kesim .....	127
4.1.15. Enzim Kesimi Sonrası PCR Analizi .....	128
4.1.16. RFP Geninin Amplifikasyon Analizi.....	128
4.1.17. RFP Geni Klonlanan pFRU2 Vektörünün Dizi Analizi .....	129
4.2. Gibson Assembly Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması .....	129
4.2.1. RFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu .....	129
4.2.3. pFRU2 Vektörünün Restriksiyon Enzim Kesimi .....	130
4.2.4. Kompetan <i>E. coli</i> 5- <i>alpha</i> ' ya Ligasyon Ürününün Transformasyonu .....	131
4.2.5. Gibson Assembly PCR Analizi.....	132
4.2.6. RFP Geni Klonlanan pFRU2 Vektörünün Dizi Analizi .....	133
4.3. Vektörün <i>C. sphaeroides</i> 'e Konjugasyon ile Aktarılması .....	133
4.3.1. Konjugasyon Sonrası PCR Analizi.....	134
4.4. RFP Gen İfade Analizi.....	134
4.4.1. cDNA Sentezi .....	135
4.4.2. qPCR Ekspresyon Grafikleri .....	136
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>141</b>
5.1. Sonuçlar .....	141
5.2. Öneriler .....	143
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>144</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>152</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2. 1.</b> Araştırmalarda kullanılan yaygın bakteri promotörleri .....	35
<b>Tablo 2. 2.</b> GFP çeşitleri .....	55
<b>Tablo 2. 3.</b> CFP çeşitleri.....	57
<b>Tablo 2. 4.</b> YFP çeşitleri .....	58
<b>Tablo 2. 5.</b> Kırmızı floresan protein özellikleri.....	60
<b>Tablo 2. 6.</b> RFP çeşitleri.....	62
<b>Tablo 2. 7.</b> <i>C. sphaeroides</i> 'in sistematik sınıflandırılması.....	67
<b>Tablo 3. 1.</b> <i>NruI</i> enzimi kesim komponentleri .....	85
<b>Tablo 3. 2.</b> Alkaline fosfotaz enzim komponentleri.....	86
<b>Tablo 3. 3.</b> Tasarlanan primerler .....	90
<b>Tablo 3. 4.</b> PCR içeriği.....	91
<b>Tablo 3. 5.</b> PCR döngüsü .....	91
<b>Tablo 3. 6.</b> T4 Polinükleotid kinaz enzim komponentleri.....	92
<b>Tablo 3. 7.</b> T4 DNA Ligaz enzim komponentleri .....	95
<b>Tablo 3. 8.</b> PCR içeriği.....	97
<b>Tablo 3. 9.</b> PCR döngüsü .....	97
<b>Tablo 3. 10.</b> <i>NcoI</i> enzimi kesim komponentleri .....	99
<b>Tablo 3. 11.</b> Tasarlanan primer .....	99
<b>Tablo 3. 12.</b> PCR içeriği.....	100
<b>Tablo 3. 13.</b> PCR döngüsü .....	100
<b>Tablo 3. 14.</b> <i>HincII</i> enzimi kesim komponentleri .....	101
<b>Tablo 3. 15.</b> PCR içeriği.....	102
<b>Tablo 3. 16.</b> PCR döngüsü .....	102
<b>Tablo 3. 17.</b> <i>PstI</i> ve <i>HincII</i> enzimi kesim komponentleri .....	103
<b>Tablo 3. 18.</b> Tasarlanan primerler .....	103
<b>Tablo 3. 19.</b> PCR içeriği.....	104
<b>Tablo 3. 20.</b> PCR döngüsü .....	104
<b>Tablo 3. 21.</b> PCR içeriği.....	105
<b>Tablo 3. 22.</b> PCR döngüsü .....	105
<b>Tablo 3. 23.</b> Tasarlanan primerler .....	106
<b>Tablo 3. 24.</b> PCR içeriği.....	107
<b>Tablo 3. 25.</b> PCR döngüsü .....	107
<b>Tablo 3. 26.</b> <i>NruI</i> enzimi kesim komponentleri .....	108
<b>Tablo 3. 27.</b> Gibson Assembly reaksiyon komponentleri .....	109
<b>Tablo 3. 28.</b> Gibson Assembly pozitif kontrol reaksiyon komponentleri .....	109
<b>Tablo 3. 29.</b> PCR içeriği.....	110
<b>Tablo 3. 30.</b> PCR döngüsü .....	111
<b>Tablo 3. 31.</b> <i>PstI</i> ve <i>HincII</i> enzimi kesim komponentleri .....	111
<b>Tablo 3. 32.</b> PCR içeriği.....	114
<b>Tablo 3. 33.</b> PCR döngüsü .....	114
<b>Tablo 3. 34.</b> cDNA sentez komponentleri.....	116
<b>Tablo 3. 35.</b> PCR içeriği.....	116
<b>Tablo 3. 36.</b> PCR döngüsü .....	117
<b>Tablo 4. 1.</b> İzole edilen pFRU2 konsantrasyon sonuçları .....	118
<b>Tablo 4. 2.</b> Purifie edilen pFRU2 konsantrasyon sonuçları .....	120
<b>Tablo 4. 3.</b> İzole edilen pSB1C3-BBa_J04450 plazmitinin konsantrasyon sonuçları .....	121
<b>Tablo 4. 4.</b> Purifie edilen RFP geninin konsantrasyon sonuçları.....	122
<b>Tablo 4. 5.</b> İzolatların konsantrasyon sonuçları .....	124

<b>Tablo 4. 6.</b> PCR ile amplifiye edilen RFP geninin konsantrasyon sonucu .....	130
<b>Tablo 4. 7.</b> <i>NruI</i> ile kesilen pFRU2' nin konsantrasyon sonucu.....	131
<b>Tablo 4. 8.</b> Konjugantlardan yapılan total RNA izolasyonu konsantrasyon sonuçları	135
<b>Tablo 4. 9.</b> cDNA konsantrasyon sonuçları .....	136



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Kırmızı, yeşil, mavi floresan proteinle etiketlenmiş hücre kültürü .....	15
Şekil 1. 2. <i>Cereibacter sphaeroides</i> mikroskopik görüntüsü .....	16
Şekil 2. 1. Moleküler klonlama akışı .....	20
Şekil 2. 2. Gibson klonlama akışı .....	25
Şekil 2. 3. <i>E. coli</i> S17-1( $\lambda$ pir) ve <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 arasındaki konjugasyon süreci .....	30
Şekil 2. 4. Prokaryotik ekspresyon vektörü bileşenleri .....	32
Şekil 2. 5. Promotör yapısı .....	35
Şekil 2. 6. Güçlü ve zayıf promotör yapısı .....	36
Şekil 2. 7. Ökaryotik bir gen yapısı .....	37
Şekil 2. 8. Prokaryotik promotör bölgeleri .....	38
Şekil 2. 9. RNA polimerazın promotöre bağlanması.....	38
Şekil 2. 10. Rho bağımlı terminasyon .....	40
Şekil 2. 11. Rho bağımsız terminasyon- GC baz içeriği .....	41
Şekil 2. 12. Rho bağımsız terminasyon- poliA kuyruğu .....	42
Şekil 2. 13. Polihistidin etiketlerinin eklenmesi. ....	44
Şekil 2. 14. 6xHis etiketi eklemek için PCR kullanarak hazırlanmış primer örneği (Malhotra, 2009b). ....	45
Şekil 2. 15. Bir Ni-NTA reçine kolonu kullanılarak 6xHis etiketli füzyon proteinlerinin saflaştırılması .....	46
Şekil 2. 16. Nikel (Ni <sup>2+</sup> ) şelatlı reçinenin his etiketli rekombinant proteine seçici bağlanması .....	46
Şekil 2. 17. Maltoz bağlama proteini.....	47
Şekil 2. 18. Bir glutatyon-S-transferaz füzyon proteinini saflaştırmak için afinite kromatografisinin kullanılması .....	48
Şekil 2. 19. Streptavidin-biyotin bağlantıları ile boncuklara bağlanma .....	49
Şekil 2. 20. SUMO etiketli protein saflaştırılması.....	51
Şekil 2. 21. <i>Aequorea Victoria</i> .....	52
Şekil 2. 22. Yaygın olarak kullanılan birkaç floresan proteinin, görünür bölgedeki uyarma ve emisyon spektrumları .....	53
Şekil 2. 23. GFP yapısı .....	54
Şekil 2. 24. <i>A. victoria</i> GFP'nin Aquamarine floresan proteinine mutasyonu.....	56
Şekil 2. 25. İn vivo-floresan Evoglow proteinler, geleneksel Sarı Floresan Protein (YFP) ile karşılaştırıldığında .....	59
Şekil 2. 26. mRFP1 yapı (678 bp) .....	60
Şekil 2. 27. <i>Discosoma mercantii</i> .....	61
Şekil 2. 28. RFP emisyon-eksitasyon grafiği .....	64
Şekil 2. 29. Floresan proteinlerin kullanım alanları .....	65
Şekil 2. 30. <i>Cereibacter sphaeroides</i> O.U.001 .....	68
Şekil 2. 31. pFRU2 vektör yapısı .....	71
Şekil 2. 32. pFRU2 vektörünün indüklenebilir yapısı .....	72
Şekil 2. 33. pBBR1MCS-2 yapısı.....	73
Şekil 2. 34. pBBR1MCS-3 yapısı.....	73
Şekil 2. 35. pBBR1MCS-4 yapısı.....	74
Şekil 2. 36. pBBR1MCS-5 yapısı.....	75
Şekil 2. 37. pIND yapısı .....	75
Şekil 2. 38. pMG170/pMG171 yapısı .....	76

Şekil 3. 1.-80°C'den bakteri aktifleştirme süreci .....	82
Şekil 3. 2. pFRU2 plazmitini içeren <i>E. coli S17-1 λpir</i> ' in stoktan aktifleştirilmesi .....	82
Şekil 3. 3. Plazmit izolasyon süreci .....	83
Şekil 3. 4. Plazmit purifikasyon süreci .....	87
Şekil 3. 5. LB hazırlama süreci .....	88
Şekil 3. 6. pSB1C3-BBa_J04450 plazmitini içeren <i>E. coli S17-1 λpir</i> ' in stoktan aktifleştirilmesi .....	88
Şekil 3. 7. pSB1C3-BBa_J04450 plazmit izolasyon aşamaları .....	89
Şekil 3. 8. Kompetan hücre hazırlama süreci .....	94
Şekil 3. 9. Transformasyon süreci .....	96
Şekil 3. 10. Kesim yapılan örneklerin ısı bloğunda inkübasyonu .....	101
Şekil 3. 11. Gibson Assembly reaksiyon aşamaları .....	109
Şekil 3. 12. Donör ve reseptör bakteri arasında oluşan konjugasyon aşamaları .....	112
Şekil 4. 1. İzole edilen pFRU2 agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2-3-4: pFRU2) .....	118
Şekil 4. 2. <i>NruI</i> ile yapılan kesim sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-3: <i>NruI</i> ile kesilmiş pFRU2, 2: Kesilmemiş pFRU2) .....	119
Şekil 4. 3. <i>NruI</i> ile kesildikten sonra purifie edilen pFRU2 agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: Purifie edilmiş pFRU2) .....	120
Şekil 4. 4. RFP genini içeren pSB1C3-BBa_J04450 plazmitinin izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: pSB1C3-BBa_J04450) .	121
Şekil 4. 5. Amplifiye edilen RFP geninin agaroz jel görüntüsü (M: Sizer™ DNA Marker, 1-2-3-4-5: RFP geni) .....	122
Şekil 4. 6. <i>E. coli S17-1 λpir</i> konakçı hücrelerine transforme edilmiş pFRU2-RFP konstruktünün agaroz jel görüntüsü .....	123
Şekil 4. 7. Transformantlardan yapılan koloni PCR agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 4-6: Tahmini pFRU2-RFP konstrüktü) .....	123
Şekil 4. 8. İzole edilen pFRU2-RFP konstruktünün agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: pFRU2-RFP konstrüktü) .....	124
Şekil 4. 9. <i>NcoI</i> ile kesilen pFRU2-RFP konstruktünün agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1,2: Örnekler) .....	125
Şekil 4. 10. Klon yön tayini amacıyla yapılan PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: pFRU2-RFP konstrüktü) .....	125
Şekil 4. 11. <i>HincII</i> ile kesilen pFRU2 ve pFRU2-RFP konstruktünün agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: <i>HincII</i> ile kesilen pFRU2, 2: <i>HincII</i> ile kesilen pFRU2-RFP konstrüktü) .....	126
Şekil 4. 12. RFP-L/R primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: Sizer™ DNA Marker, 1: RFP geni) .....	127
Şekil 4. 13. <i>PstI</i> ve <i>HincII</i> enzimleri ile yapılan çift kesim sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: Örnekler) .....	127
Şekil 4. 14. RFP-L/R-seq primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: Örnekler) .....	128
Şekil 4. 15. RFP-L/R primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: RFP geni) .....	129
Şekil 4. 16. PCR ile çoğaltılan RFP geninin agaroz jel görüntüsü (M: Sizer™ DNA Marker, 1: RFP geni) .....	130
Şekil 4. 17. <i>NruI</i> ile kesilen pFRU2' nin agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: pFRU2) .....	131
Şekil 4. 18. Kompetan <i>E. coli 5-alpha</i> ' ya transforme edilmiş pFRU2-RFP konstruktünün plaka görüntüsü .....	132

<b>Şekil 4. 19.</b> PCR ile çoğaltılan pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M:SM0333 DNA Marker, 1-2-3-4: pFRU2-RFP konstrüktü) .....	132
<b>Şekil 4. 20.</b> <i>E. coli 5-alpha</i> ile <i>C. sphaeroides</i> arasında oluşan konjugasyon görüntüsü .....	134
<b>Şekil 4. 21.</b> PCR ile çoğaltılan pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M:SM0333 DNA Marker, 1-2-3-4: RFP geni).....	134
<b>Şekil 4. 22.</b> Konjugantlardan yapılan total RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: Total RNA).....	135
<b>Şekil 4. 23.</b> Dört farklı örnekte gerçekleştirilen gen ekspresyon analizi sonucu oluşan amplifikasyon eğrisi.....	137
<b>Şekil 4. 24.</b> Dört farklı örnekte gerçekleştirilen gen ekspresyon analizi sonucu oluşan erime eğrisi .....	137



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

bp	base pair (baz çifti)
cm	santimetre
Ct	threshold cycle (eşik döngüsü)
dk	dakika
g	gram
kDA	kilodalton
kb	kilobaz (1000 baz çifti)
L	litre
M	molar (mol/L)
Mbp	megabaz (1 milyon baz çifti)
mg	miligram
ml	mililitre
mM	milimolar
µl	mikrolitre
µm	mikrometre
µg	mikrogram
µM	mikromolar
nm	nanometre
°C	santigrat derece
rpm	devir/dakika (revolutions per minute)
Tm	erime sıcaklığı (melting temperature)

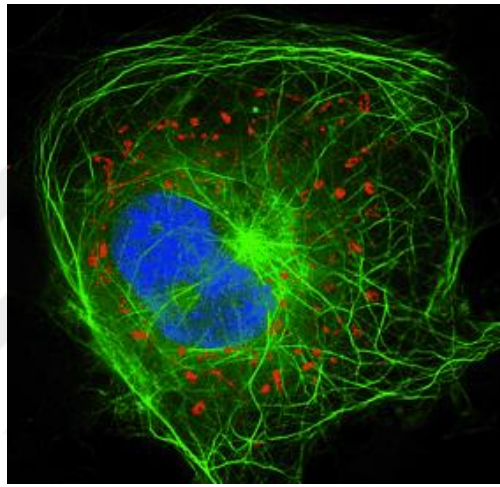
### Kısaltmalar

4HBA	4-Hidroksibenzoik Asit
B&P	Biebl ve Pfennig
BAC	Bakteri Yapay Kromozom
Bhr	Geniş Konakçı Aralığı
bGH	Bovine Growth Hormone
CBP	Kalmodulin Bağlayıcı Protein
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit
CmR	Kloramfenikol Dirençli
CoQ10	Koenzim Q10
cPCR	Koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CFP	Camgöbeği Floresan Protein
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DSB	Double-Strand Break
dsDNA	Çift Zincirli Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOH	Ethanol
EYFP	Geliştirilmiş Sarı Floresan Protein
FMN	Flavin Mononükleotid
FRET	Förster Rezonans Enerji Aktarımı

GFP	Yeşil Floresan Protein
gRNA	Genomik Ribonükleik Asit
GSP	Glutatyon S Transferaz Proteini
HDR	Homolojiye Yönelik Onarım
His-tag	Histidin Etiketi
iGEM	International Genetically Engineered Machine
IMAC	Hareketsiz Metal Afinite Kromatografisi
Kd	Ayrışma Katsayısı
LB	Luria-Bertani
M	Marker
MBP	Maltoz Bağlayıcı Protein
MCS	Çoklu Klonlama Bölgesi
MLCK	Miyosin Hafif Zincir Kinaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
mRFP1	Monomerik Kırmızı Floresan Protein
Ni-NTA	Nikel Nitrilotriasetik asit
NHEJ	Homolog Olmayan Uç Birleştirme
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHB	Polihidroksibütirat
pH	Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)
PNK	Polinükleotid Kinaz
PNS	Mor Kükürtsüz
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBS	Ribozom Bağlanma Bölgesi
RFP	Kırmızı Floresan Protein
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SE	Sferoiden
SO	Sferoidenon
SUMO	Küçük Ubikutin Benzeri Değişirici
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-asetat-EDTA
TBB	Transkripsiyon Başlangıç Bölgesi
THR203	Treonin Rezidüsü 203
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
TRXA	Tioredoksin A
UTR	Transle Olmayan Bölge (Untranslated Region)
YAC	Maya Yapay Kromozom
YFP	Sarı Floresan Protein

## 1. GİRİŞ

Floresan proteinler, biyolojik araştırmalarda hücreSEL yapıları ve süreçleri görselleştirmek için belirli bir dalga boyundaki ışığı emerek başka bir dalga boyundaki ışığı yayan proteinlerdir. Araştırmacılara biyolojik araştırmalarda moleküler süreçlerin gözlemlenmesini ve izlenmesini sağlayan benzersiz bir izleme aracı sunmaktadır. Özellikle canlı hücrelerdeki protein lokalizasyonunu, hücreSEL dinamikleri ve gen ekspresyonunu araştırmak için bu proteinleri genetik olarak işaretlemek mümkündür (Şekil 1.1).



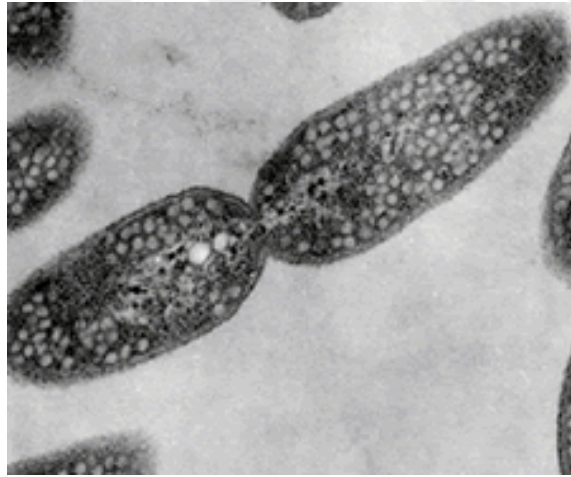
Şekil 1. 1. Kırmızı, yeşil, mavi floresan proteinle etiketlenmiş hücre kültürü (Nienhaus, 2008).

İlk olarak denizanası *Aequorea victoria*'da keşfedilen yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein, GFP), floresan etiketleme yöntemlerinin gelişmesini sağlamış ve yeni floresan proteinlerin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda GFP' nin sahip olduğu yüksek floresan etkinliği ve yüksek foto stabilitesinin yetersiz olduğu anlaşılmış ve bu protein yerini Kırmızı Floresan Proteinini (Red Fluorescent Protein: RFP) gibi daha yüksek etkinliğe sahip floresan proteinlere bırakmıştır (Zimmer, 2002). RFP' nin gelişmesiyle birlikte tıp ve biyoteknoloji alanlarında uzun süreli gözleme dayalı ve derin doku görüntüleme gibi uygulamalara alan açılmıştır.

580-610 nm dalga boyu aralığında emisyon yapan RFP, canlı dokularda daha iyi sinyal iletimi ve daha az enerji kaybı sağlaması sayesinde oldukça tercih edilmektedir. Bu nedenle, derin dokularda bile RFP ile yüksek çözünürlükte görüntüleme yapılabilmektedir. RFP, diğer floresan proteinlere göre daha uzun dalga boyunda emisyon

yapabilmesi sayesinde, hücrelerin daha az foto toksisite yaşamasına olanak tanımaktadır. RFP' nin uzun süreli sinyal stabilitesi ile floresan gözlemler yapmak mümkündür, bu da biyomoleküler süreçlerin daha dinamik bir şekilde izlenmesine olanak sunmaktadır. Tüm bu avantajları sayesinde RFP, GFP gibi diğer floresan proteinlere kıyasla biyomoleküler ve biyoteknolojik araştırmalar gibi birçok durumda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *C. sphaeroides*' in rekombinant protein üretimi için bir hücre fabrikası olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla, fruktoz ile indüklenebilen bir ekspresyon vektörü geliştirilmiştir. Vektörün çalışabilirliğini değerlendirmek üzere Kırmızı Floresan Protein geni (*rfp*) kullanılmıştır. *C. sphaeroides*, aerobik ve anaerobik koşullarda yaşayabilme yeteneği ile oldukça dikkat çeken fotosentetik bir bakteridir (Şekil 1.2.). Genetik yapısının detaylı araştırılmış olması nedeniyle, biyoteknolojik uygulamalar ve protein ekspresyon araştırmaları için mükemmel bir model organizmadır. Bu bakterinin metabolik esnekliği, RFP' nin farklı oksijen seviyelerinde ve fotosentez gibi ışığa duyarlı süreçlerdeki davranışını anlamada avantaj sağlamaktadır. *C. sphaeroides* tüm bu özelliklerinin sunduğu faydalarla birlikte, çevresel koşulların protein ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek için ideal bir model organizmadır.



Şekil 1. 2. *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 mikroskopik görüntüsü  
<https://genome.jgi.doe.gov/portal/rhosp/rhosp.home.html> erişim tarihi:19-10-23

Ekspresyon sistemleri, genetik mühendisliği ve biyoteknoloji alanında belirli proteinlerin üretimi için kullanılan önemli bir araçtır. Üretimi istenilen proteinlerin biyolojik sistemlerde eksprese edilmesi, protein-protein etkileşimlerinin ve hücresel süreçlerin işleyişini anlamak ve bu işleyişleri manipüle edebilmek açısından büyük kolaylık sağlamaktadır. Bakteriyel, mayasal, bitkisel ve hayvansal hücre tabanlı sistemler

gibi farklı ekspresyon sistemleri, RFP gibi proteinlerin üretiminde farklı avantajlar sunmaktadır (Brown, 2016).

Bakteriyel ekspresyon sistemleri, sahip oldukları yüksek protein verimliliği ve hızlı üretim süreleri ile ekspresyon sistemleri arasında en çok tercih edilen araçların başında gelmektedir (Brown, 2016). Bu sistemlerin en büyük avantajlarından biri, farklı proteinlerin sentezine olanak tanımaları ve genetik mühendislik teknikleriyle kolayca değiştirilebilmeleridir. Ekspresyon vektörleri isteğe bağlı olarak indüklenebilir promotör içerebilirler ve bu da dışsal faktörlerin uyarımıyla protein üretim seviyelerini kontrol etme avantajı sunmaktadır. İndüklenebilir promotörler, istenilen zamanda ve belirli koşullar altında aktif duruma gelerek hedef proteinin sentezini başlatmaktadır. Bu sayede araştırmacılar çevresel faktörlere ve deneysel gereksinimlere göre protein üretimini en iyi şekilde ayarlayabilmektedir.

Bu sistemler, çeşitli mikroorganizmalarda kullanılabilirlikleri olmakla birlikte, özellikle *Escherichia coli* gibi araştırmalarda çokça kullanılan bakterilerde protein sentezleme ve genetik materyalin klonlanması için sıklıkla tercih edilmektedir. *E. coli*, çoğalma hızı ve genetik modifikasyona uygunluğu ile protein ekspresyonu için mükemmel bir model organizmadır. Bu bakteri birçok hücresel prosesleri kolay bir şekilde gerçekleştirebildiği ve düşük maliyetli olduğu için çalışmalarda sıklıkla tercih edilmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmadaki asıl hedef, *C. sphaeroides*' in rekombinant protein üretimi için bir hücre fabrikası olarak kullanılabilirliğini test etmek amacıyla, fruktoz ile indüklenebilen bir ekspresyon vektörü geliştirmektir. Bu kapsamda *C. sphaeroides*'te replike olabilen yeni bir ekspresyon vektörü test edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular *C. sphaeroides*'in hücre fabrikası olarak kullanılması yönündeki araştırmalara yol gösterici nitelikte olacaktır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Klonlama

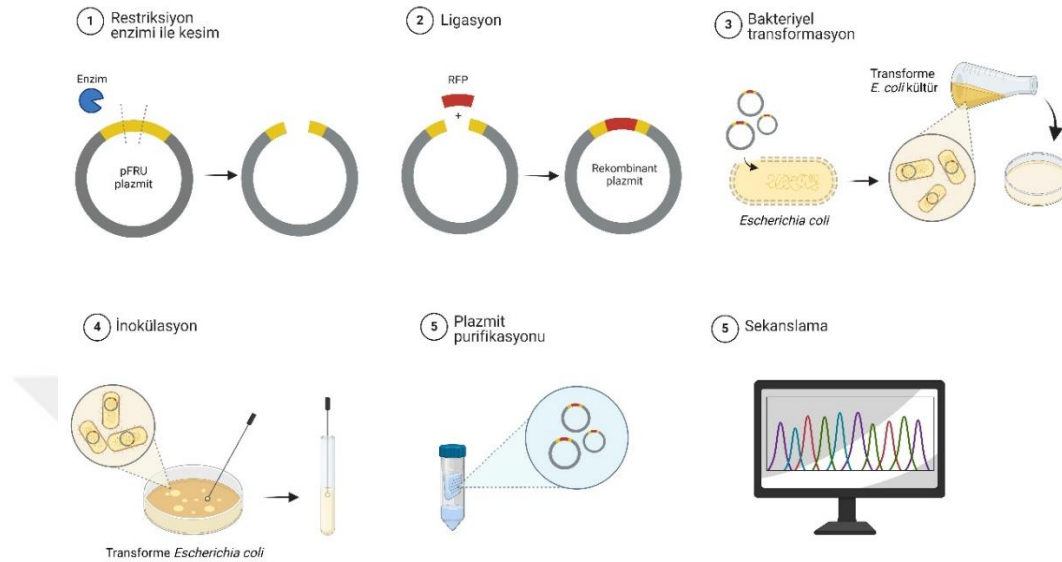
#### 2.1.1. Geleneksel Klonlama

Geleneksel klonlama, moleküler biyolojide önemli bir yöntemdir ve genetik mühendislik araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem, bir vektör kullanarak bir organizmanın DNA'sının belirli bir genetik bölgesinin veya geninin başka bir organizmada ekspresyonunu sağlamaktadır (Çadircı, 2021). Geleneksel klonlama, bir dizi biyokimyasal reaksiyon ve genetik mühendislik aşamasından oluşmaktadır. Hedef DNA, bu aşamalarda izole edilip, restriksiyon enzimleri ile kesilip, uygun vektörle birleştirilerek, “transformasyon” adı verilen son aşama ile konak hücreye aktarılmaktadır (Şekil 2.1.). Bu sürece dair adımlar detaylı bir şekilde aşağıda verilmiştir (Brown, 2016):

- **Hedef DNA'nın Hazırlanması:** İlk adım olarak hedef DNA'nın izole edilmesi ve saflaştırılması gerekmektedir. Hedef gen, genellikle genomik DNA'dan kesilerek veya PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi yöntemler kullanılarak çoğaltılmaktadır. Bu DNA parçası sayesinde belirli bir diziyi taşıyan segmentler elde edilebilmektedir. Ardından restriksiyon enzimleri kullanılarak, hedef DNA kesilmektedir. Kullanılan bu restriksiyon enzimleri, palindromik dizileri tanıyan ve kesen enzimlerdir. Bu kesim aracılığı ile kullanılacak vektör ve hedef DNA kesilerek her iki molekül üzerinde yapışkan veya küt uçlar oluşmaktadır. Böylece hedef DNA, birbirine tamamlayıcı diziler oluşturularak, vektöre entegre edilir.
- **Vektör Hazırlanması:** Hedef DNA'yı taşımak için genellikle vektör görevi gören plazmitler kullanılmaktadır. Bakterilerde doğal olarak bulunan dairesel ve ekstra kromozomal DNA molekülleri, “plazmit” olarak bilinmektedir. Taşıyacağı genetik materyalin doğruluğunu görebilmek için, vektör üzerinde belirli işaret dizileri içermektedir. Seçici markör olarak görev yapan antibiyotik direnç genleri, bu diziler arasında bulunmaktadır. Hedef DNA ile uyumlu hale gelmek için önceden restriksiyon enzimleri ile vektör kesilmektedir. Bu basamak, hedef DNA'nın vektöre entegre olabilmesi için gerekli uçları oluşturmak için kullanılmaktadır. Ligasyon işlemi öncesinde fosfataz enzimi kullanılarak, plazmitin kendi kendine birleşmesi engellenmektedir.

- **Ligasyon:** Klonlanacak hedef DNA ve vektör gerekli oranlarda uygun bir ligaz enzimi ile (T4 DNA ligaz vb.) birleştirilip, işlem gerçekleştirilmektedir. Ligaz enziminin işlevi DNA'nın şeker-fosfat omurgalarını bağlamaktır. Bu enzim sayesinde iki molekül birbirine entegre olmaktadır. Bu prosedür, hedef DNA'nın vektöre entegre olduğu bir rekombinant DNA molekülü oluşturmak için kullanılmaktadır. Ligasyon verimliliği, hedef DNA ve vektör uçlarının uyumuna, kullanılan vektöre, ligaz enziminin etkinliğine ve reaksiyon koşullarına bağlıdır.
- **Transformasyon:** Ligasyon sonucu oluşturulan rekombinant DNA molekülü, genellikle *E. coli* gibi kompetan hâlde olan bakterilere aktarılmaktadır. Hücre geçirgenliğini artırmak için ısı şoku veya elektroporasyon gibi yöntemler kullanılarak, transformasyon işlemi gerçekleştirilir. Hücreler, bu süreç boyunca dışarıdan alınan DNA moleküllerini içlerine alarak çoğalmaya başlamaktadırlar. Transformasyon tamamlandıktan sonra, rekombinant DNA'ya sahip bakteriler, antibiyotik içeren seçici besi ortamlarında çoğaltılmaktadırlar. Seçilebilen koloniler, antibiyotiğe dirençli geni bünyesinde bulunduran plazmiti içermektedir.
- **Seçim ve Tarama:** Transformasyon tamamlandıktan sonra rekombinant DNA'ya sahip bakterilerin belirlenmesi gerekmektedir. Vektörün taşıdığı antibiyotik direnç geninin varlığı, bu seçimin yapılmasına olanak sağlar. Doğru transformantların seçimi için antibiyotik direnç geninin yanı sıra mavi-beyaz tarama yöntemleri gibi, farklı seçim teknikleri de kullanılabilir. Ancak bu gibi yöntemler sonunda alınan sonuçlar, kesin bir seçim için yeterli değildir. Akabinde DNA dizileme, restriksiyon endonükleaz analizi ve PCR gibi işlemlerle klonların doğruluğu test edilmektedir. Restriksiyon analizi, vektörün doğruluğunu ve hedef genin entegrasyonunu kontrol ederken; PCR, hedef genin varlığını test etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA dizileme ise, hedef DNA'nın tam olarak vektörde bulunup bulunmadığını belirlemenin en doğru yolu olarak kullanılmaktadır.
- **Ekspresyon ve Saflaştırma:** Tarama işleminden sonra hedef genin ekspresyonu için doğru klonlar seçilerek, bakteriler kültürlenmelidir. Bu hedef genin konak hücrede eksprese edilmesi, plazmitin taşıdığı promotör ve diğer düzenleyici unsurların yardımıyla gerçekleşmektedir. Ekspresyon verimliliği, hedef genin özelliklerine ve kullanılan ekspresyon sistemine bağlı olarak değişir, bu nedenle bu aşama genetik mühendisliğinin en önemli aşamasıdır. Ekspresyon sonrasında,

sıklıkla hedef protein saflaştırılarak analiz edilmektedir. Afinite kromatografisi veya diğer protein saflaştırma yöntemleri, bu gibi saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır.



Şekil 2. 1. Moleküler klonlama akışı-Created in BioRender

Geleneksel klonlama, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinde oldukça kullanışlı olmasına rağmen bazı kısıtlamaları da beraberinde getirmektedir. Küçük, iyi karakterize edilmiş DNA parçalarının klonlanmasında yöntem başarılı olsa da büyük veya karmaşık DNA segmentlerinin manipülasyonu sırasında verimlilik düşebilmektedir. Bu teknik, restriksiyon enzimlerine bağımlı olduğu için hedef DNA üzerinde uygun kesim bölgelerinin olmaması durumunda, kullanılabilirliği sınırlanabilmektedir. Bunun sonucunda da doğrulama aşamaları zaman alıcı ve pahalı olabilmektedir. Tüm bunlara rağmen geleneksel klonlama; basitliği, düşük maliyeti ve geniş bir kullanım alanı sayesinde hala değerlidir ve modern tekniklerin gelişmesine temel oluşturan temel bir tekniktir (Brown, 2016). Geniş bir çerçeve içerisinde yeni nesil klonlama yöntemleri daha esnek ve hızlı çözümler sunsa da geleneksel klonlama birçok laboratuvarında hala sıklıkla kullanılmakta ve moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinin önemli bir aracı olarak tercih edilmeye devam edilmektedir.

### 2.1.2. Gateway Klonlama

Lambda faj rekombinasyon sistemini kullanan hızlı ve etkili bir klonlama yöntemi olan Gateway klonlama, genetik materyalin belirli bir vektöre aktarılmasını sağlamaktadır. Bu teknik, hedef DNA'nın "rekombinasyon bölgeleri" olarak adlandırılan spesifik dizilere dayalı olarak birleştirilmesini mümkün kılıp aynı genetik materyalin farklı vektörlere taşınabilmesini kolaylaştırmaktadır. Gateway klonlama, özellikle çoklu vektör sistemleriyle çalışan araştırmacılar için önemli bir araçtır (Jefferies & Hacıömeroğlu, 2010).

Bu teknik "giriş klonlama" ve "hedef klonlama" olmak üzere iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta, giriş vektörü olarak adlandırılan özel bir vektöre, hedef gen entegre edilmektedir. Rekombinasyon reaksiyonu rekombinaz enzimleri tarafından katalizlenmektedir. Bu süreç, lambda fajının *attB*, *attP*, *attL* ve *attR* dizileri tarafından yönlendirilmektedir. İlk basamağın sonunda giriş vektöründe hedef DNA kalıcı olarak bulunmaktadır. İkinci aşamada ise, hedef DNA giriş vektörden hedef vektöre aktarılmaktadır. Promotör ve seleksiyon bölgeleri gibi fonksiyonel bileşenler içeren destinasyon vektörü, genellikle spesifik bir ekspresyon için tasarlanmaktadır.

Gateway klonlamanın en büyük avantajlarından biri, hedef DNA'nın bir ligaz veya restriksiyon enzimi kullanmadan aktarılabilmesidir. Bunun yerine mevcut homolog rekombinasyon sistemi sayesinde rekombinaz enzimleri DNA'yı özenle birleştirmektedir. Ek olarak, bu teknik çok sayıda vektör sistemine de uygulanabilmektedir. Rekombinasyon bölgesi içeren vektörlerin çeşitliliği ile genetik materyalin çeşitli organizmalara adaptasyonunu kolaylaşmaktadır. Gateway klonlama, bu esnekliği sayesinde genetik mühendisliği, sentetik biyoloji ve proteomik alanlarında oldukça önemli bir teknik haline gelmiştir (Brown, 2016).

Tüm bu avantajların yanında Gateway klonlamanın belirli sınırlamaları da bulunmaktadır. Bunlardan birisi bu yöntemin sadece *attB* ve *attP* gibi spesifik diziler içeren vektörlerle çalışabilmesidir. Bu durum, genetik materyal tasarlanırken araştırmacıları belirli bir sistemle sınırlayabilmektedir. Bir diğeri ise Gateway klonlama için kullanılan reaktif ve kitlerin, klasik yöntemlerle karşılaştırıldığında daha pahalı olmasıdır. Tüm bunlara ek olarak da büyük gen dizilerinin transferi, sistemin verimliliğinin düşmesine neden olmaktadır.

Sonuç olarak, hız ve doğruluğun ön planda olduğu uygulamalar için Gateway klonlama oldukça tercih edilen bir yöntemdir. Rekombinasyon tabanlı bu sistem,

araştırmacılara özellikle çoklu gen ekspresyon vektörlerinin kullanıldığı projelerde büyük avantaj sağlamaktadır (Esposito vd., 2009). Gateway klonlama, genetik materyalin farklı sistemlere aktarılmasında sağladığı esneklik ve hata riskinin azlığı ile çağdaş biyoteknoloji için vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir.

### 2.1.3. TOPO Klonlama

TOPO klonlama, PCR ile amplifiye edilen DNA parçalarının vektörlere entegre edilmesi yöntemi ile çalışan, restriksiyon enzimlere veya ligaz kullanımına ihtiyaç duymayan etkili ve hızlı bir klonlama yöntemidir. Bu teknik, amplifikasyon sırasında Taq DNA polimerazın ürettiği tek sarmallı "A" uçlarını ve topoizomeraz enziminin ligasyon özelliğini kullanmaktadır (Brown, 2016). TOPO klonlama, geleneksel klonlama yöntemlerinin aksine birkaç dakikada tamamlanabilir ve bu açıyla da zaman açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır.

TOPO klonlama, topoizomeraz enziminin DNA'yı çift sarmallı yapıda kesme ve bağlama yeteneğine dayanmaktadır. Bu enzim TOPO vektörünün tek sarmallı timidin (T) nükleotidleriyle PCR ürünlerinin 3' ucunda bulunan adenozin (A) nükleotidlerini eşleştirmekle görevlidir. DNA'nın uçlarına kovalent olarak bağlanmış topoizomeraz enzimleri TOPO vektörleri üzerinde bulunmaktadır (Xu & Qingshun, 2008). Vektörün komplementer uçları ile PCR ürünü hizalandığında, topoizomeraz enzimi hızlı bir şekilde ligasyon gerçekleştirip istenilen PCR ürünü vektör içerisine entegre edilmektedir.

PCR ürünlerinin herhangi bir ön işlem gerektirmeden doğrudan kullanılabilmesi bu yöntemin en büyük avantajlarından biridir. TOPO klonlama, PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi veya saflaştırılması işlemlerini gerektirmemektedir. Böylece klonlama süreci boyunca zaman ve iş günü tasarrufu sağlanır ve hata riski de önemli derecede azalmaktadır. Bunların yanında hem yönelim kontrollü (directional) hem de yönelim kontrollü olmayan (non-directional) uygulamalarda da TOPO klonlama kullanılabilir.

TOPO klonlamanın kullanım alanları oldukça çeşitlidir. Gen dizisi analizi için klonlanmış DNA'nın stabil bir şekilde saklanabilmesinde, rekombinant protein üretimi için genlerin ekspresyon vektörlerine aktarılabilmesinde ve moleküler biyolojinin diğer birçok alanında kullanılabilir. Bu yöntemin etkinliği, başlangıç materyali olarak DNA miktarının düşük olduğu uygulamalarda da oldukça dikkat çekicidir. TOPO klonlama birçok avantaja sahiptir, ancak bazı sınırlamaları da beraberinde getirmektedir.

Bunun en önemlisi sadece Taq DNA polimeraz veya benzer enzimlerle oluşturulan tek sarmallı A uçlarına sahip ürünlerle PCR çalışabilmesidir (Patel, 2009). Buna ek olarak diğer klonlama yöntemlerine kıyasla TOPO klonlama kitleri daha fazla maliyetlidir. Ayrıca gen tasarımının yanlış yapıldığı durumlarda da yönelim hataları oluşabilmektedir.

Özetle TOPO klonlama, hızlı ve kolay klonlama süreçleri sayesinde araştırmacılar için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, PCR ürünlerinin doğrudan vektöre aktarılmasını ve sonuçların hem zaman kazandırıcı hem de güvenilir bir şekilde verilmesini sağlamaktadır.

#### 2.1.4. CRISPR Tabanlı Klonlama

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats, Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri) tabanlı klonlama, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinde kullanılan çok önemli bir tekniktir. Belirli DNA dizilerini hedeflemek, değiştirmek, eklemek veya çıkarmak için kullanılan CRISPR-Cas9 sistemi, oldukça hassas ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntem, doğal olarak bakterilerde bulunan ve viral DNA'yı hedefleyerek bağışıklık sağlayan bir savunma mekanizmasının laboratuvar ortamında geliştirilmiş halidir (Baltacı & Arslan, 2020). Genom düzenleme teknolojilerinin temelini oluşturan CRISPR tabanlı klonlama, genetik manipülasyon uygulamalarında oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Cas9 proteini ve rehber RNA (guide RNA: gRNA) bu yaklaşımın merkezinde bulunmaktadır. Cas9, gRNA yoluyla yönlendirilen ve çift sarmallı DNA'yı kesebilen bir endonükleazdır. Hedef DNA dizisine komplementer bir sekans içeren gRNA, Cas9'u bu bölgeye yönlendirmektedir. Cas9 hedef DNA'da belirli bir bölgeyi belirledikten sonra, DNA'nın her iki sarmalını da kesmektedir (Güler Kara vd., 2022). Bu enzim, çift zincir kırığı (Double-strand break: DSB) olarak bilinen bir kırığı oluşturmaktadır. Oluşturulan bu kırık hücre tarafından onarılırken istenilen bir genetik materyal eklenebilir, çıkarılabilir veya değiştirilebilmektedir.

CRISPR tabanlı klonlama, homolog rekombinasyon (homology-directed repair: HDR) veya hata-prone onarım (non-homologous end joining: NHEJ) olmak üzere iki temel onarım mekanizmasından birini kullanmaktadır. HDR, genetik materyalin tamir edileceği kısma özel olarak tasarlanmış bir DNA şablonunun eklenmesini gerektirmektedir. Bu nedenle gen ekleme veya değiştirme gibi işlemler için ideal bir mekanizmadır. Bununla birlikte NHEJ, hatalı onarım mekanizmaları nedeniyle genellikle

küçük insersiyonlar veya delesyonlar oluşturur ve bu nedenle de gen susturma çalışmalarında kullanılmaktadır.

Genetik mühendisliği çalışmaları için CRISPR tabanlı klonlama oldukça avantajlıdır. Hedef DNA dizisini seçmek için sadece gRNA'nın tasarlanması yeterlidir. Bu sayede de sistem daha hızlı ve esnek hale gelmektedir. Ek olarak, aynı anda birden fazla genin düzenlenmesine izin vererek yüksek verimlilikle sonuç alınmasına olanak tanımaktadır. Diğer klonlama tekniklerinden farklı olarak, zaman alıcı basamaklar içermeyerek kısa sürede istenilen gen bölgelerinde değişiklikler yapılmayı da sağlamaktadır (Brown, 2016). Tarım biyoteknolojisi, hastalık modelleme, sentetik biyoloji ve gen tedavisi gibi birçok alanda bu yaklaşım kullanılmaktadır. CRISPR, insan genomunda hastalığa neden olan mutasyonları değiştirebilirken bitkilerde de daha dirençli ve daha verimli ürünler oluşturabilmektedir. Özellikle karmaşık genetik modifikasyonların gerekli olduğu araştırmalar için CRISPR klonlaması oldukça önemli bir hale gelmiştir.

Bu kullanım alanlarının yanında CRISPR tabanlı klonlamanın sınırlamaları da mevcuttur. Bunlardan birisi hedef DNA bölgesinde oluşabilecek beklenmedik mutasyonlardır (off-target etkileri). Bu mutasyonlar tıbbi uygulamalarda istenmeyen sonuçlar meydana getirebilmektedir. Ek olarak, HDR gibi hassas onarım mekanizmalarının düşük verimliliği bazı uygulamalar için kısıtlayıcı olabilmektedir. Mevcut sınırlamaların ötesinde gRNA'nın uygun şekilde tasarlanması ve optimize edilmesi protokollerde meydana gelebilecek sınırlamaları ortadan kaldırabilmektedir.

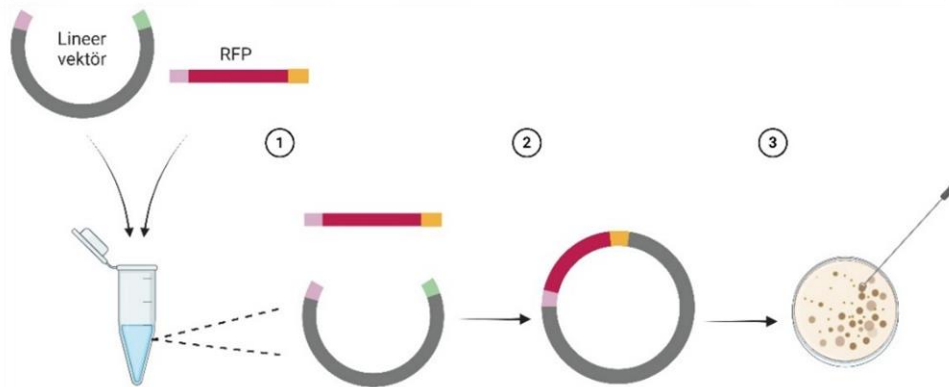
Sonuç olarak CRISPR tabanlı klonlama, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğinde yeni bir paradigma yaratan bir tekniktir (Dickinson & Goldstein, 2016). Hedefe yönelik ve esnek yapısı sayesinde, gen düzenleme çalışmalarında araştırmacılara benzersiz kontrol imkânı sağlamaktadır. CRISPR hem uygulamalı biyoteknolojide hem de temel bilimlerde genetik araştırmaların merkezinde yer alarak geleceğin biyoteknolojik uygulamaları için önemli bir temel oluşturmaktadır.

### **2.1.5. Gibson Klonlama**

Moleküler biyolojide devrim yaratan bir teknik olan Gibson klonlama, DNA parçalarını homolog dizilere dayalı olarak birleştirmektedir. Bu yöntem, geleneksel klonlama yöntemlerinin sınırlamalarını aşarak, restriksiyon enzimlerine bağımlılığı ortadan kaldırmaktadır. Bu teknik, özellikle büyük ve karmaşık genetik yapıları inşa

etmek için mükemmel bir yöntemdir (Wang vd., 2015). Gibson klonlamanın temel prensibi, homolog uçlara sahip DNA parçalarını birleştirmek için ekzonükleaz, DNA polimeraz ve DNA ligaz enzimlerinin birlikte çalışmasıdır.

Bu yaklaşımda, ilk olarak DNA parçalarının homolog uçları tasarlanmaktadır. DNA parçalarının uçlarında bulunan bu homolog bölgeler, 20 ila 40 baz çifti uzunluğundaki tamamlayıcı dizilerdir. Ekzonükleaz, DNA polimeraz ve DNA ligaz olmak üzere üç temel enzimden oluşan Gibson reaksiyon karışımı, tasarlanan homolog uçlar ile birleştirilmektedir (Şekil 2.2.). Ekzonükleaz enzimi, ilk aşamada DNA'nın 5' uçlarını kademeli olarak parçalayarak tek sarmallı 3' uçların ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu işlem, uçların homolog dizilerle eşleşmesi için gereklidir. DNA polimeraz enzimi, ikinci aşamada eşleşen DNA segmentleri arasındaki boşlukları tamamlayarak eksik olan nükleotidleri doldurmaktadır. Son olarak, yeni sentezlenen DNA dizisinin fosfodiester bağları, DNA ligaz enzimi tarafından kovalent olarak birleştirilmektedir (Wang vd., 2015). Kullanılan bu enzimlerin koordinasyonu ile DNA parçalarının kusursuz şekilde bir araya geldiği rekombinant DNA molekülleri oluşturulmaktadır.



Şekil 2. 2. Gibson klonlama akışı-Created in BioRender

Gibson klonlama, sağladığı esnekliklerle geleneksel klonlama tekniklerinin ötesine geçmiştir. Bu teknik, birden fazla DNA parçasının aynı zamanda birleştirilmesini sağlamaktadır. Gibson klonlama, birden fazla gen içeren karmaşık bir genetik operonun oluşturulması veya bunun vektöre eklenmesi gibi zorlu işlemleri tek bir adımda kolayca gerçekleştirmek için kullanılabilir. Bunlara ek olarak, restriksiyon enzimlerine ihtiyaç duymaması sayesinde DNA üzerinde kesim bölgesi gerekliliğini ortadan

kaldırmaktadır. Tüm bu avantajlar, özellikle spesifik DNA dizileri ile çalışmak için oldukça faydalıdır. Bununla birlikte Gibson klonlama yüksek hız ve verimlilik yanında DNA dizaynında da daha fazla özgürlük sağlamaktadır (Bordat vd., 2015). Bu yöntem, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği alanlarında çeşitli avantajlar sunmaktadır. Gibson klonlama; sentetik biyoloji projelerinde karmaşık genetik yapıların geliştirilmesinde, gen düzenleme süreçlerinde ve rekombinant protein üretimi için genlerin vektörlere aktarılmasında oldukça önemlidir.

Sonuç olarak, Gibson klonlama, mevcut modern klonlama teknikleri arasında esnekliği ve etkinliği açısından öne çıkan bir yaklaşımdır (Li vd., 2018). Genetik mühendisliğinin zorlu uygulamalarında kolaylıkla kullanılabilen bu yöntem, araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Geleneksel klonlamanın aksine, restriksiyon enzimlerine duyulan bağımlılığı ortadan kaldırması ve karışık genetik yapıları meydana getirmedeki başarısı, Gibson klonlamayı moleküler biyolojinin vazgeçilmez bir parçası haline getirmektedir.

## **2.2. Gen Aktarım Yöntemleri**

Gen aktarım yöntemleri, genetik materyalin bir organizmadan diğerine aktarılmasını sağlayan yöntemlerdir. Genetik mühendisliği, biyoteknoloji ve tıp alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Brown, 2016). Bu yaklaşımlar, doğrudan ve dolaylı olarak iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Dolaylı yöntemler, gen aktarımı için virüsler, plazmitler veya *Agrobacterium tumefaciens* gibi biyolojik vektörler kullanılırken, doğrudan yöntemler elektroporasyon, gen tabancası ve mikroenjeksiyon gibi teknikleri içermektedir. Gen aktarım teknikleri hayvan ve bitki genetiğinin değiştirilmesinden, gen terapisi yardımıyla insan hastalıklarının tedavisine kadar çok sayıda alanda kullanılmaktadır. Kullanılacak tekniklerin seçimi taşınacak genin özelliklerine ve hedef organizmanın türüne bağlı olarak değişmektedir.

### **2.2.1. Doğrudan Gen Aktarım Yöntemleri**

Herhangi bir biyolojik vektör kullanılmadan, genetik materyalin hedef hücreye fiziksel veya kimyasal yöntemlerle aktarılması doğrudan gen aktarım yöntemleri kullanılarak yapılmaktadır. Genellikle bu teknikler, genetik materyalin doğrudan hücre zarını geçerek sitoplazmaya veya çekirdeğe ulaşmasını hedeflemektedir. Bu yöntemler farklı organizma türlerinde oldukça büyük bir uygulama alanına sahip oldukları için moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğrudan gen aktarım teknikleri genellikle kontrollü bir şekilde laboratuvar ortamında gerçekleştirilmektedir. Özellikle mikroorganizma, bitki ve hayvan hücrelerinde hedeflenen genetik değişikliklerin hızlı ve etkili bir şekilde elde edilmesinde bu yöntemler oldukça etkilidir. Yöntemler arasında elektroporasyon, mikroenjeksiyon, gen tabancası (biyolistik yöntem) ve ultra-sonikasyon yer almaktadır.

#### **2.2.1.1. Elektroporasyon**

Doğrudan gen aktarımı için kullanılan elektroporasyon yönteminde, genetik materyalin hücrelere aktarılması için elektrik şokları kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda, hücreler kısa süreli olarak yüksek voltajlı bir elektrik akımına maruz bırakılmaktadır. Bu elektrik akımı ile hücre zarında geçici porlar (delikler) oluşmaktadır. DNA veya RNA gibi genetik materyaller, oluşan bu porlar aracılığıyla hücreye girmektedir. Uygulanan elektrik akımı kesildiğinde hücre zarı kendi kendine onarım yapmaktadır. Böylelikle de aktarılan genetik materyal hücre içinde kalabilmektedir.

Bakterilerden memeli hücrelerine kadar, çok sayıda organizmaya gen aktarmak için elektroporasyon yöntemi kullanılmaktadır. Farklı genetik materyal türlerini taşıyabilmesi ve vektör gerektirmemesi nedeniyle kullanım açısından oldukça yüksek verimliliğe sahiptir. Tüm bunların sayesinde genetik modifikasyon, protein üretimi ve gen terapisi çalışmalarında bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır.

#### **2.2.1.2. Mikroenjeksiyon**

Mikroenjeksiyon, mikroskop altında bir mikropipet kullanılarak genetik materyalin doğrudan bir hücreye -genellikle çekirdeğe- ya da bir organizmanın yumurtasına enjekte edilmesi esasına dayanan bir tekniktir. Bu yöntem, hedeflenen

hücreye hassas bir şekilde müdahale etmeyi mümkün kılmaktadır ve bu sayede özellikle büyük hücreler üzerinde etkili bir şekilde çalışabilmektedir.

Genetik materyali içeren sıvı, mikropipet tarafından doğrudan çekirdek içine veya sitoplazmaya aktarılmaktadır. Hücrenin doğal mekanizmaları, DNA veya RNA'yı işleyerek istenen genetik değişiklikleri oluşturmaktadır. Genetik materyalin hücreye kesin bir şekilde taşınması ve çok çeşitli türlerde kullanılması avantajlarından biridir. Bu teknik transgenik organizmaların oluşturulmasında, hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda ve insan gen terapisi araştırmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır.

### **2.2.1.3. Gen Tabancası (Biyolistik Yöntem)**

Gen tabancası, genetik materyalin mikro partiküller aracılığıyla hücelere doğrudan aktarılmasını sağlayan bir gen aktarım yöntemidir. Bu yöntemde DNA, tungsten veya altın gibi küçük metal parçacıklarına bağlanmaktadır. Ardından, yüksek basınçlı bir gaz veya patlayıcı bir mekanizma kullanılarak bu parçacıkların hücelere "ateşlenmesi" gerekmektedir. Genetik materyalin sitoplazmaya veya çekirdeğe taşınması, parçacıkların hücre zarını geçmesiyle gerçekleşmektedir.

Gen tabancası tekniği, kalın hücre duvarlarına sahip bitki hücrelerinde veya gen aktarımı zor olan diğer hücreler tiplerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bitki genetiği araştırmalarında, genetiği değiştirilmiş bitkilerin geliştirilmesinde ve bazı hayvan dokularında gen aktarımı için tercih edilmektedir. Ancak pahalı ekipman gerektirmesi ve olası düşük aktarım verimliliği gibi sınırlamaları da mevcuttur.

### **2.2.1.4. Ultra Sonikasyon**

Doğrudan gen aktarım tekniklerinden biri olan ultra sonikasyon, hücreleri yüksek frekanslı ses dalgalarına maruz bırakarak gen aktarımını sağlamaktadır. Bu yöntem, hücre zarında geçici gözenekler açarak genetik materyalin hücre içine girmesine izin vermektedir. Bu yaklaşım hem hayvan hem de bitki hücrelerinde uygulanarak genellikle RNA'nın veya küçük DNA moleküllerinin hücelere aktarılmasında kullanılmaktadır.

Özellikleri arasında hızlı ve basit kullanımının olması dikkat çekicidir. Bununla birlikte, ses dalgalarının şiddeti dikkatlice ayarlanmalıdır. Dikkat edilmediği durumda hücre yapısına veya hücre zarına kalıcı olarak zarar verebilmektedir. Ultra sonikasyon

yöntemi gen aktarım çalışmaları dışında hücre lizatlarının oluşturulması gibi diğer moleküler veya biyoteknolojik uygulamalarda da sıklıkla kullanılmaktadır.

### **2.2.2. Dolaylı Gen Aktarım Yöntemleri**

Dolaylı gen aktarımı, genetik materyalin hedef hücreye aktarılması için biyolojik vektörleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler gen aktarımı için genellikle yüksek etkinlik ve spesifite sunmaktadır. Plazmitler, virüsler ve bakteriler gibi doğal taşıyıcılar genetik materyali hücreye taşımak için kullanılmaktadır. Bu taşıyıcılar aynı zamanda genetik materyali bir hücreye taşıırken istenilen genetik değişiklikleri de gerçekleştirmektedir. Dolaylı yöntemler daha kontrollü ve daha karmaşık basamaklara ihtiyaç duysa da bitki biyoteknolojisi, gen terapisi ve birçok genetik mühendisliği uygulamasında sıklıkla kullanılmaktadır.

#### **2.2.2.1. Plazmit Vektörleri ile Aktarım**

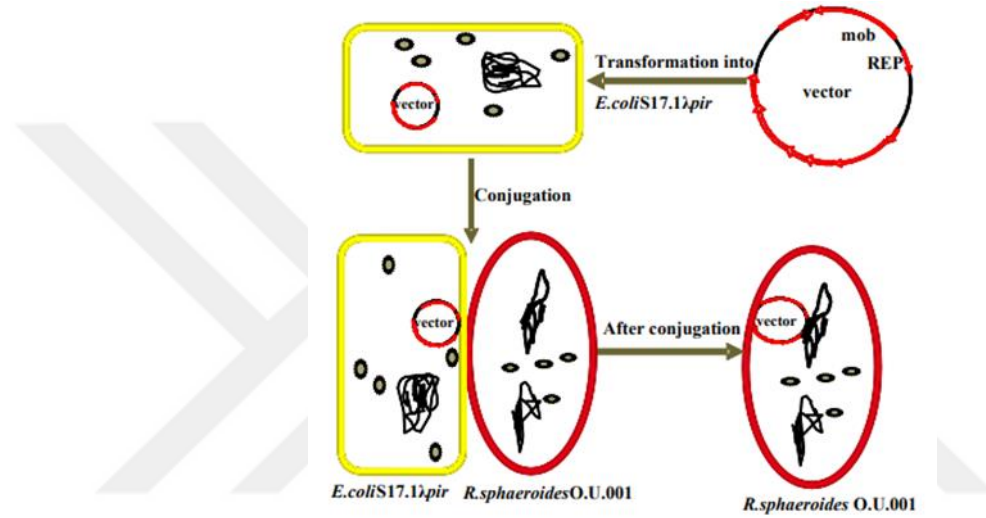
Gen aktarımı için dolaylı bir yöntem olan plazmit vektörleri ile gen aktarımında, genetik materyalin hedef hücreye taşınması için dairesel DNA molekülleri olan plazmitler kullanılmaktadır. Plazmitler, bakterilerin doğal formunda bulunan, bunun yanında genetik bilgi taşıyan küçük ve bağımsız DNA molekülleridir. Plazmit gibi vektörler, genetik mühendisliği kullanılarak istenilen genlerin düzenlenmesi, eklenmesi veya çıkarılması için kullanılmaktadır.

#### **2.2.2.2. Virüs Vektörleri ile Aktarım**

Virüs vektörleri ile gen aktarımı, genetik materyalin hücrelere aktarılması için virüsleri taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Virüslerin genetik materyallerini enfekte ettikleri hücrelere direkt olarak aktarabilmeleri sayesinde, genetik mühendisliği kullanılarak hedef genler istenilen organizmaya aktarılabilir. Gen terapisi ve genetiği değiştirilmiş hücreler oluşturmak için bu yöntem yaygın olarak kullanılmaktadır. Virüs vektörleri, hedef hücrelere özgü özellikleri ve yüksek aktarım verimliliği ile öne çıkmaktadır. Bunlara ek olarak etik ve güvenlik bakımından dikkatli bir şekilde kullanılması da gerekmektedir.

### 2.2.2.3. Konjugasyon

Bu teknikte genler, doğal olarak bir bakteri hücresinden diğerine hücre-hücre teması yoluyla transfer edilmektedir. Bu aşamada donör bakteri, alıcı bakterinin pili adı verilen özel bir yapısı aracılığıyla bağlanmaktadır (Şekil 2.3.). Bu bağ yardımı ile genetik materyal kolaylıkla aktarılabilmektedir. Metot, bakteriler arasında genetik çeşitlilik oluşturmanın yanında gen aktarımı için de genetik mühendisliği uygulamalarında kullanılabilmektedir. Plazmit tabanlı gen aktarımı için bu yöntem özellikle etkilidir.



Şekil 2. 3. *E. coli* S17-1(λpir) ve *C. sphaeroides* O.U.001 arasındaki konjugasyon süreci (Virolle vd., 2020).

### 2.2.2.4. Transdüksiyon

Transdüksiyon yönteminde, genetik materyal bir bakteriden diğerine virüsler aracılığıyla taşınmaktadır. Bu işlem, bakteriyofaj olarak bilinen virüsler tarafından gerçekleştirilir. Virüsler, enfekte ettikleri bakterilerden genetik materyali başka bir bakteriye aktarmaktadır. Genel ve özel olmak üzere iki farklı transdüksiyon çeşidi bulunmaktadır. Özel transdüksiyon sadece belirli genleri aktarırken, genel transdüksiyon herhangi bir bakteriyel geni taşıyabilmektedir. Genetik mühendisliği çalışmalarında gen taşıma aracı olarak da kullanılan bu yöntem, bakterilerin genetik çeşitliliğini de artırmaktadır.

### 2.2.2.5. Transformasyon

Bu yöntemde, hücreler çevresindeki serbest DNA'yı bünyelerine alarak gen aktarımı gerçekleştirmektedirler. Genetik materyal, bu aşamada hücre zarı yoluyla hücre içine girerek alıcı hücrenin genomuna entegre olmaktadır. Bu yöntem, laboratuvar ortamında kimyasal yöntemler veya elektroporasyon gibi tekniklerle de gerçekleştirilebilir, ancak doğal olarak belirli bakteri türleri bu aktarım yöntemine sahiptir. Transformasyon; rekombinant DNA teknolojisi, genetik mühendisliği ve genetik modifikasyon çalışmalarında oldukça fazla kullanılan bir yöntemdir.

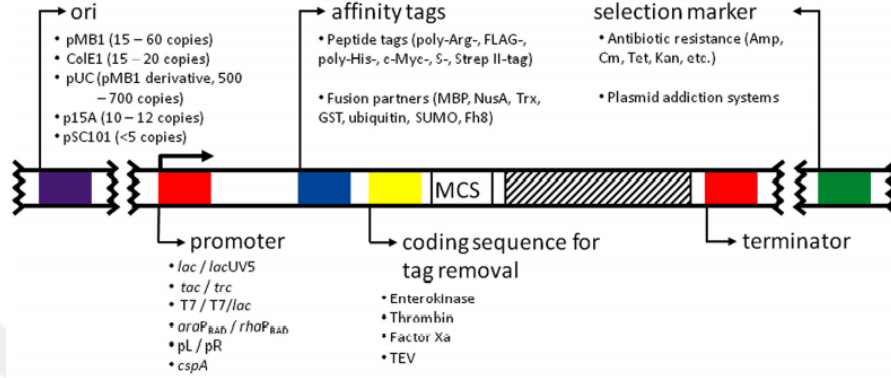
### 2.3.Vektörler

Biyoteknoloji ve genetik mühendisliğinde, genetik materyali bir hücreye veya organizmaya aktarmak için genetik vektörler kullanılır. Genetik materyalin hücre içinde kalıcı olarak bulunması ve istenilen genin eksprese edilmesi bu araçlarla mümkündür. Genetik vektörler, genetik materyalin (örneğin DNA dizisi veya bir gen) belirli bir proteinin üretilmesini veya belirli işlevleri gerçekleştirmesini sağlar (Darain vd., 2004). Bu sebeple vektörler, genetik modifikasyon, protein üretimi ve gen terapisi gibi farklı biyolojik süreçleri kontrol etmek için genetik mühendisliğinde kritik araçlardır (Jaschke vd., 2011).

Bazı vektörler hedef geni taşıırken, bir yandan da bu genlerin eksprese edilmesini sağlar. Ekspresyon vektörleri olarak bilinen bu vektörler, özellikle rekombinant protein üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalarda kritik öneme sahiptir. Hedef genin transkripsiyonu ve translasyonunu kontrol etmek için ekspresyon vektörleri genellikle bir seçici marker, ribozom bağlanma bölgesi (RBS), çoklu klonlama bölgesi (MCS) ve bir promotör içermektedir (Şekil 2.4.). İndüklenebilir promotörlerin varlığı, gen ekspresyonunun belirli çevresel sinyallerle kontrol edilmesini sağlar. Ekspresyon vektörlerinin gen taşıma kapasitelerini diğer vektörlerden ayıran temel özellikleri nedeniyle genetik mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılırlar.

Hedef geni taşımak ve hücrede kalabilmek için genetik vektörün belirli yapısal özelliklere sahip olması gerekir. Bunların en önemlilerinden birisi replikasyon orijini. Hücre içinde vektörün çoğaltılmasını sağlayan özel bir DNA dizisi replikasyon orijini olarak bilinir. Bu özellik, vektör hücreye girdikten sonra kopyalanarak yeni hücrelere aktarılmasını sağlar. Bu da hedef genin sürekli olarak replike olmasına olanak verir. İkinci

olarak, vektörün hücreye başarıyla girdiğini göstermek için seçici belirteçler kullanılır. Antibiyotik direnç genleri çoğunlukla bu belirteçleri oluşturur. Vektör taşımayan hücreler antibiyotiğe karşı savunmasız olurken, vektör taşıyan hücreler dirençli davranırlar. Bu yöntem sayesinde araştırmacılar sadece vektör taşıyan hücreleri seçebilir ve analiz edebilir.



Şekil 2. 4. Prokaryotik ekspresyon vektörü bileşenleri (Rosano & Ceccarelli, 2014).

MCS özel DNA bölgesi, hedef genin vektöre eklenmesini sağlar. Önemli bir bileşen olan bu bölge, çeşitli restriksiyon enzimleri için tanıma bölgesi içerdiğinden dolayı araştırmalarda hedef genin vektöre kolay bir şekilde eklenmesini sağlar (Inui vd., 2003a). Gen, bu bölgenin esnek yapısı sayesinde doğru pozisyonda ve doğru yönde yerleştirilir. Buna ek olarak promotör bölgesi, hedef genin eksprese edilmesini kontrol eden bir DNA dizisidir ve genetik vektörlerin bir diğer önemli parçasıdır (Shi vd., 2021). Genetik ifadenin hangi koşullarda ve hangi hücrede eksprese edileceği promotörler tarafından kontrol edilir. Bu da promotörlerin indüklenebilir özellikleri sayesinde mümkün hale gelir.

Genetik vektörler, sahip oldukları özelliklere göre gruplara ayrılmaktadır. Plazmit vektörler sıklıkla kullanılan türlerden biridir. Plazmit adı verilen küçük, dairesel DNA molekülleri, bakteriyel hücrelerde genetik modifikasyon ve protein üretimi ile ilgili araştırmalar için kullanılır (Inui vd., 2003a). Virüs vektörler, memeli hücreleri gibi daha karmaşık hücre sistemlerinde gen aktarmak için kullanılan bir diğer vektör türüdür. Kanseri araştırmaları ve gen terapisi gibi ileri seviyede biyoteknolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılır. Bakteriyel Yapay Kromozom (BAC) ve Maya Yapay Kromozom (YAC) gibi yapay kromozom vektörleri, daha büyük gen dizilerini taşımak için kullanılır. Daha fazla genetik veri taşıma kapasitesine sahip oldukları için bu vektörler genomik

çalışmalarda oldukça önemlidir. Genetik vektörler çok çeşitli araştırma, tıp ve biyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadır (Malhotra, 2009a). Gen ifadesi ve protein üretimi gibi alanlarda önemli bir araç olarak kullanılan bu vektörler, genetik materyali hücreye taşımak ve eksprese ettirmek için esnek bir yol sağlar (Brown, 2016). Hücre içindeki proteinlerin nasıl çalıştığını anlamak ve biyoteknolojik ürünler üretmek için bu yöntem oldukça önemlidir.

### 2.3.1.Plazmit Vektörler

Plazmit vektörler, genetik mühendisliğinde klonlama, gen aktarımı ve rekombinant protein üretimi gibi işlemlerde kullanılan, kendi kendine replike edilebilen dairesel DNA molekülleridir. Genetik materyalin aktarımında ve stabilitesinde sağladıkları kolaylık, plazmit vektörlerin genetik mühendisliğinde tercih edilmesinin en önemli nedenlerinden biridir. Bulundurduğu replikasyon orijini sayesinde, vektörlerin bağımsız olarak çoğalabilmesini sağlar ve bu da genetik materyalin kopya sayısını artırmaktadır. Yüksek miktarda gen ürünü elde etmenin gerekli olduğu durumlarda bu özellik önemli bir avantaj sağlamaktadır. Aynı zamanda, taşınabilir yapıları ve küçük boyutları sayesinde genetik modifikasyon süreçleri hızlanmaktadır. Bu sayede gen transferinin daha verimli olması sağlanmaktadır (Liu vd., 2023).

Plazmit vektörler bulundukları genetik bileşenler ile genlerin hedef organizmada etkili bir şekilde eksprese edilmesini sağlamaktadır. Genetik materyalin transkripsiyon ve translasyon aşamalarında kontrol edilebilirliği promotör, ribozom bağlanma bölgesi ve terminatör gibi düzenleyici diziler tarafından artırılmaktadır. Bu düzenleyici diziler ile gen ekspresyonunun optimizasyonu sağlanmakta ve istenmeyen gen ürünlerinin oluşması engellenmektedir. İndüklenebilir promotörler sayesinde çevresel faktörlere bağlı olarak belirli koşullarda genlerin ekspresyonunu mümkün kılan kontrollü gen üretimi de gerçekleştirilmektedir.

Konak hücrelerde seçici özellik gösterebilmeleri, plazmit vektörlerin bir diğer önemli özelliğidir. Antibiyotik direnç genleri gibi seçici işaret genleri taşıyan bu vektörler sayesinde, genetik materyalin aktarıldığı hücreler kolayca ayırt edilebilmektedir. Böylece çalışmanın doğruluğu yalnızca genetik modifikasyonun başarılı olduğu hücreler seçilerek artırılabilir. Ek olarak, vektörlerde bulunabilen raporlayıcı genler, gen ekspresyonunun doğrulanmasını ve rekombinasyon süreçlerinin başarı oranının artmasını sağlamaktadır.

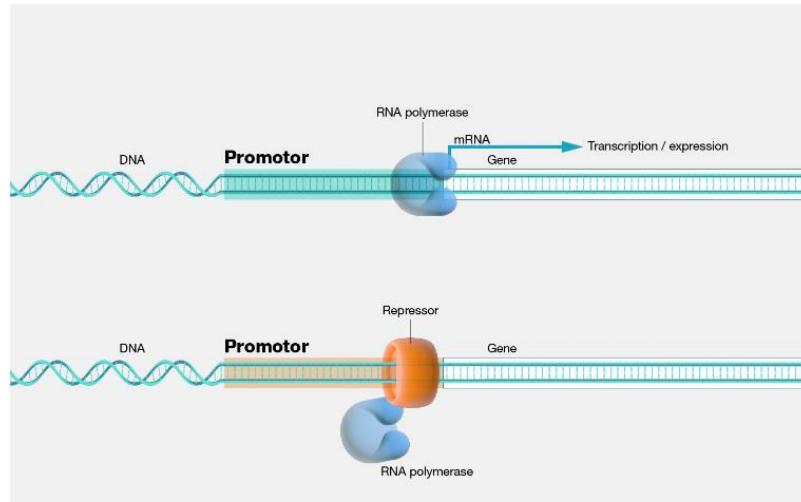
Biyoteknolojide plazmit vektörlerin işlevselliği sayesinde gen terapisi, protein mühendisliği ve tarımsal genetik modifikasyon dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalarda kullanımı oldukça yaygındır. Bu vektörlerin sağladığı esneklik ve verimlilik, rekombinant proteinlerin üretilmesinden genetik bozuklukların tedavisine kadar birçok alanda genetik mühendisliğinin gelişmesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, plazmit vektörler modern biyoteknolojinin en önemli araçlarından biridir.

## 2.4. Vektör Genetik Elementleri

### 2.4.1. Promotörler

Promotör, genetikte genlerin transkripsiyonunu başlatan bir DNA parçasıdır. Promotörler genlerin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın bölgelerde, DNA'nın yukarısında (5' bölgesine doğru) bulunurlar. Gen ile aynı DNA ipliği üzerinde lokalizedirler. Promotörler genellikle farklı nükleotid boylarına sahiptirler. 100 ila 1000 nükleotid çifti uzunluğunda değişirler (Çadircı, 2021). Uzunluk, transkripsiyonun genine ve ürününe, bölgeye alınan RNA polimeraz tipine veya sınıfına ve organizma türlerine büyük ölçüde bağlıdır.

Promotörler, RNA polimerazın sağlam bir şekilde bağlanabileceği, transkripsiyon işlemi için gerekli olan spesifik DNA parçalarını içerir (Yavuz, 2008). Gen ekspresyonu, promotör bağlanmasına bağlıdır. Bir RNA transkripti, bir proteini (mRNA) kodlayabilir veya kendi içerisinde tRNA veya rRNA gibi bir işleve sahip olabilir. Promotörler, ökaryot ve bakterilerde gen ekspresyonunu düzenler. Transkripsiyonun başlayabilmesi için, RNA polimerazın genin yakınında bulunan bir DNA'ya bağlanması gerekir (Şekil 2.5.).

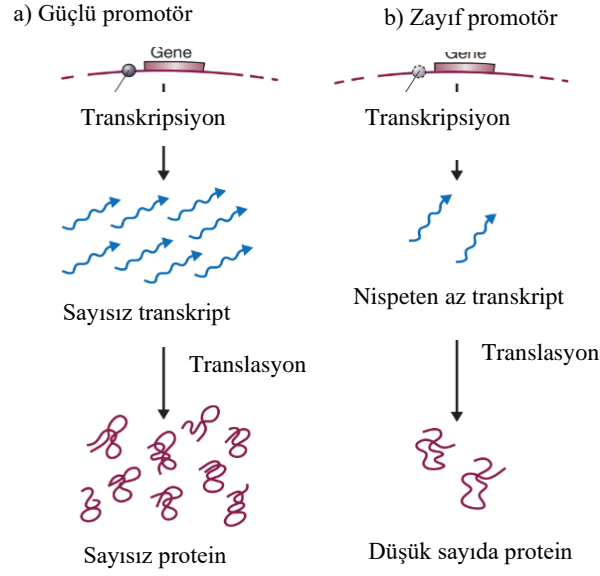


**Şekil 2. 5.** Promotörün DNA üzerindeki yerleşimi(Yavuz, 2008).

Promotörler; transkripsiyon verimliliği üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Güçlü promotörler, yüksek oranda transkripsiyon sağlayabilen ve translasyon ürünleri hücre tarafından önemli ölçüde gerekli olan genleri kontrol edebilen promotörlerdir (Şekil 2.6a). Aksine, nispeten verimsiz olan zayıf promotörler, ürünleri sadece küçük miktarlarda gerekli olan genlerin doğrudan transkripsiyonuna izin verir (Şekil 2.6). Bir ekspresyon vektörü, klonlanan genin mümkün olan en yüksek oranda replikasyonu için güçlü bir promotöre sahip olmalıdır (Shi vd., 2021). Bakterilerde kullanılan bazı promotörler Tablo 2.1.' de verilmiştir.

**Tablo 2. 1.** Araştırmalarda kullanılan yaygın bakteri promotörleri

Promotör ismi	Sekans	Tanım	Kaynak
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'	T7 bakteriyofajından elde edilen bir promotör	(LLC, t.y.-b)
Sp6	5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3'	Sp6 bakteriyofajından elde edilen bir promotör	(LLC, t.y.-b)
Lac	5'-TAGGCACCCCAGG-3'	Lac operonundan elde edilen bir promotör	(LLC, t.y.-a)
Tac	5'-TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATG-3'	Trp ve Lac UV5 promotör birleşimi	(LLC, t.y.-c)
Trc	5'-TTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATG-3'	Trp ve Lac UV5 promotör birleşimi	(LLC, t.y.-d)



Şekil 2. 6. Güçlü (a) ve zayıf promotörlerin (b) protein üretimine etki şeması(Brown, 2016).

#### 2.4.1.1.Promotör elementleri

- **Çekirdek promotör**

Transkripsiyonu başlatmak için gerekli olan ve transkripsiyon başlangıç bölgesi (TBB) olarak bilinen promotörün minimal bölgesidir. Bu promotör yaklaşık 34 bp'dir. RNA polimeraz için tanıma ve bağlanma bölgesi sağlar. Bu promotöre bağlanan RNA polimeraz üç başlık altında toplanabilir; RNA polimeraz I: rRNA'yı kodlayan genlerin ekspresyonunda; RNA polimeraz II: mRNA'yı ve küçük nükleer RNA'yı kodlayan genlerin ekspresyonunda; RNA polimeraz III: tRNA ve diğer küçük RNA'ları kodlayan genlerin ekspresyonunda yer alırlar. Çekirdek promotör, transkripsiyon faktörlerini bağlayan bir bölge olarak da bilinir.

- **Proksimal promotör**

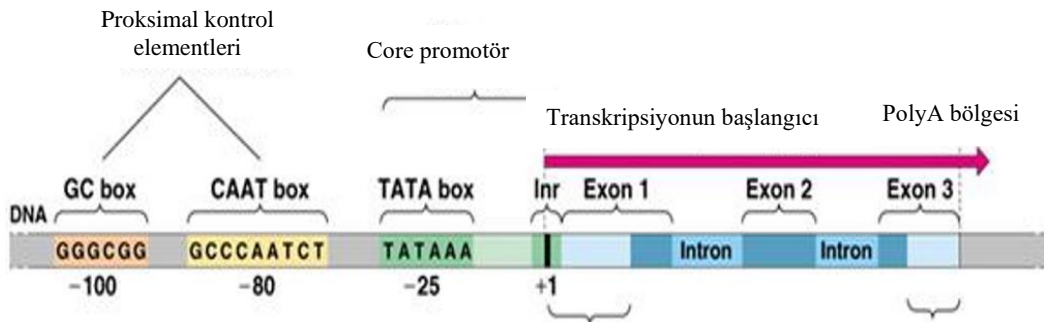
Primer düzenleyici elemanları içeren ve yaklaşık 250 bp ağırlığında olan, genin proksimal sekans ucudur. Spesifik olarak transkripsiyon faktörünü bağlayan bölge olarak bilinir.

- **Distal promotör**

Proksimal paramotörlere oranla daha zayıf etki gösterir. Düzenleyici elementleri içeren genin distal sekans bölgesi olduğundan dolayı daha çok bağlanma bölgesi bulundurmaktadır. Etkisi bağımsız olan enhancer gibi diğer regülatör bölgeleri kapsamamaktadır. Distal promotör aynı zamanda proksimal promotördür.

- **Ökaryotik Promotörler**

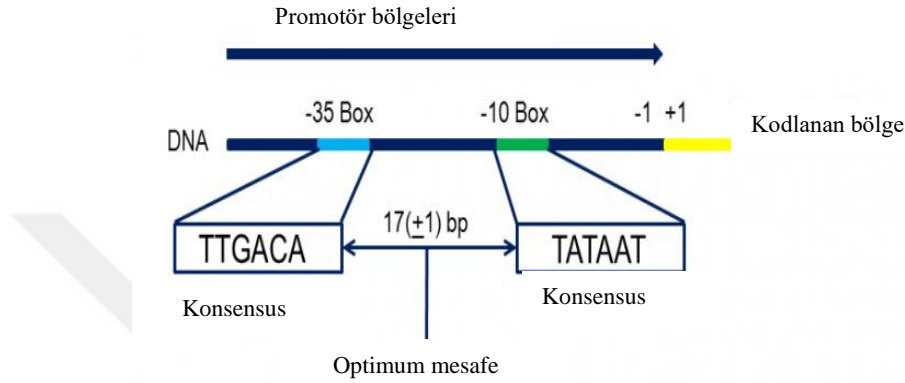
Ökaryotik promotörler çok çeşitlidir ve bu yüzden karakterize edilmesi zordur. Bu promotörler, çoğunlukla genin 5' ucu boyunca bulunur. Transkripsiyon başlangıç bölgesinden uzakta bulunan, farklı kilo bazlarda elementlere sahiptirler. Ökaryotlarda transkripsiyonel kompleks, DNA'nın kendi etrafında kıvrılmasını sağlar. Böylece transkripsiyon bölgesinden uzakta bulunan düzenleyici sekanslar için de yerleşim bölgesi sağlanır. Ökaryotik promotörlerin birçoğu, bir TATA kutusu (TATAAA) içerir (Şekil 2.7.). Bu kutu, RNA polimeraz transkripsiyon kompleksini oluşturmaya yardımcı olan TATA proteinini bağlar. TATA kutusu, transkript başlangıç alanına yakın olarak (50 baz içinde) bulunur. Ökaryotik promotör düzenleyici diziler, genellikle transkripsiyonel kompleks oluşumunda görev alırlar (Huo, 2011). Aynı zamanda transkripsiyon faktörleri olarak adlandırılan proteinleri de bağlarlar. Bunun bir örneği E-box (CACGTG sekansı) sekansıdır (Akköse vd., 2009).



Şekil 2. 7. Ökaryotik bir gen yapısı (Brown, 2016).

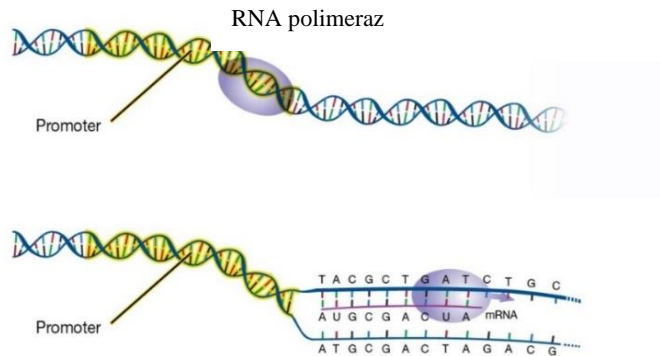
## ▪ Prokaryotik Promotörler

Promotörlerde, türler arasında korunmuş konsensus (korunmalı) diziler vardır. Bu promotör DNA dizileri, enzim için bir bağlanma bölgesi sağlar. Bakteriyeel promotörlerde -10 (TATAAT) ve -35 (TTGACA) olmak üzere iki konsensus dizi bulunmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8. Prokaryotik promotör bölgeleri (Yavuz, 2008).

-10 pozisyonundaki dizi, Pribnow kutusu veya -10 elementi şeklinde adlandırılır. Bu diziyi, çoğunlukla TATAAT'den oluşan 6 nükleotit oluşturur. Pribnow kutusu, prokaryotlarda transkripsiyon başlangıcı için gereklidir. -35 pozisyonundaki diğer sekans da TTGACA'dan oluşan altı nükleotitten oluşur ve cis-acting elementleri olarak adlandırılır. -35 ve -10 dizileri arasındaki en uygun aralık 17 bp'dir.



Şekil 2. 9. RNA polimerazın promotöre bağlanması (Shi vd., 2021).

Bu pozisyonların varlığı transkripsiyon oranının daha yüksek olmasına yardımcı olur. Bu her iki sekans da birçok promotörde bulunmasına rağmen, her bir sekanstaki 6 bazın sadece 3'ü promotörlerde bulunur (LaFleur vd., 2022). Bu zamana kadarki yapılan çalışmalarda her iki uçta da güçlü sekanslara sahip promotörler tanımlanmamıştır. Bu durumun, sigma faktörün çeşitli bağlanmaları meydana getirip, RNA polimerazın ekspresyonunu başlatmasını engellemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bazı promotörler, yapısal olarak -35 sekansının uç kısmında UP elementi (5'-TGNTATAAT-3') içerirler (Şekil 2.9.). -35 dizisinde bulunan UP elementi transkripsiyon için fazla bir önem arz etmez (Estrem vd., 1999). -10 ve -35 konumlarındaki promotörler, sadece prokaryotik RNA polimeraz ile etkileşime giren sigma -70 proteininden tanınır.

Promotörlerin anlaşılması ve üzerinde yapılan çalışmaların devam etmesi, promotör kaynaklı sorunların anlaşılıp çözüme kavuşturulmasında fayda sağlamaktadır. Çünkü promotör mutasyonları gen ekspresyonunu önemli biçimde azaltır/artırır. Bu yüzden ki promotörlerdeki veya transkripsiyon faktörlerindeki varyasyonlar çeşitli hastalıklara neden olur. Bu gelişmiş bir alandır ve birçok farklı hastalığı anlamaya yardımcı olur. Bazı insan hastalıklarında, DNA mutasyonları kodlayıcı bölgeler yerine promotör bölgelerde yer almaktadır. Bu tür bilgilerin edinilmesi, promotör kaynaklı hastalıkların düzeltilmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

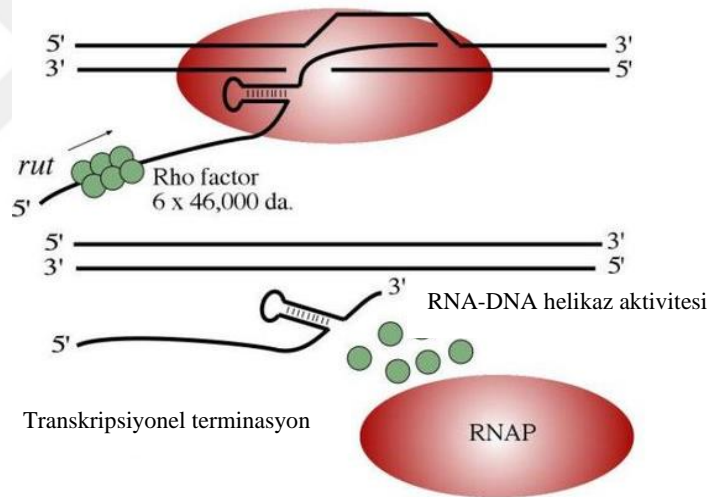
#### **2.4.2. Transkripsiyon terminatör çeşitleri**

Transkripsiyon sonlandırma, gen ekspresyonunun önemli bir düzenleyici adımıdır (Mitra vd., 2011). RNA sonlandırmasında önemli bir rol oynayan gen ifadesindeki son basamağıdır. Bu, özellikle 'gen açısından zengin' bakteri genomu için önemlidir (Anton vd., 2008). Transkripsiyonun sonlandırılması, bakteri genlerinin düzgün ifadesi ve birçok durumda bakteriyel gen ifadesinin düzenlenmesi için esastır (Peters vd., 2011a).

Bir DNA şablonunu kopyalayan tüm RNA polimerazlar, belirli bir DNA bölgesi veya bölgesinde ürün RNA'yı sonlandırmalı, parçalamalı ve serbest bırakmalıdır. Bu süreçte yer alan RNA yapısı, metin tanımlama sonlandırıcı olarak adlandırılır (Mitra vd., 2011). İki tip bakteriyel transkripsiyonel terminatörün gen ekspresyonunu kontrol ettiği bilinmektedir (Peters vd., 2011a). Ayrıntılı araştırmaların yapıldığı bakterilerde terminasyon, Rho-bağımlı ve Rho-bağımsız (intrensek) olmak üzere iki mekanizma ile sağlanır (Mitra vd., 2011).

### 2.4.2.1.Rho-bağımlı sonlandırma

Rho'ya bağlı transkripsiyon sonlandırmaları, mRNA-DNA-RNA polimeraz transkripsiyon kompleksini bozmak için, RNA helikaz aktivitesine sahip, hegzamerik Rho faktörü olarak bilinen büyük bir proteine ihtiyaç duyar (Frommer vd., 2009). Rho'ya bağımlı sonlandırıcılar, Rho adı verilen bir RNA helikazının aracılık ettiği ayrışma bölgeleridir ve bu sonlandırıcılar bakteri ve fajlarda bulunur (Peters vd., 2011a). Faktöre bağımlı sonlandırma, Rho ve Nus faktörleri gibi proteinlere dayanır. Rho'ya bağımlı terminasyon, translasyonel durdurma kodonlarının aşağı akışında meydana gelir. Bu tip sonlandırmada Rho faktörü, RNA üzerindeki belirli bir bölgeye (70-80 bazlık kısım) sıkıca bağlanır ve ribonükleotit trifosfatları nükleotit difosfatlara hidrolize eder. Rho ATPaz aktivitesine sahiptir (Şekil 2.10.) ve RNA polimeraza kadar ilerleyerek DNA/RNA hibridini ayırır (Jaschke vd., 2011).



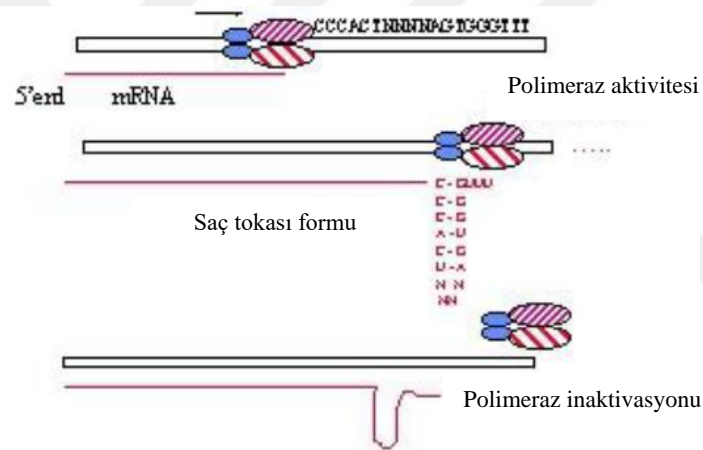
Şekil 2. 10. Rho bağımlı terminasyon (Omay, 2020).

Burada üretilen enerji, Rho faktörünü mRNA üzerindeki DNA açıklığına yönlendirir ve orada durur. Açıklık, RNA-polimerazın daha da ilerlemesini engeller ve RNA'nın salınmasına yardımcı olur. Bundan sonra RNA polimeraz, mRNA ve Rho faktörü birlikte serbest kalırlar. Diğer bir sonlandırma faktörü olan Nus A gen ürünü proteini de zincirin serbest kalmasına yardımcı olur. Bazı meydana gelen olaylarda sentez terminasyonun bölgesini de geçebilir. Bununla birlikte ileriye hareket edebilir ve ekspresyon biraz daha devam edebilir. Bir başka sonlandırma dizisine ulaşıncaya sentez

durağan hale gelir. İkinci sonlandırma dizisine ulaşıldığında sentez durur (Peters vd., 2011b).

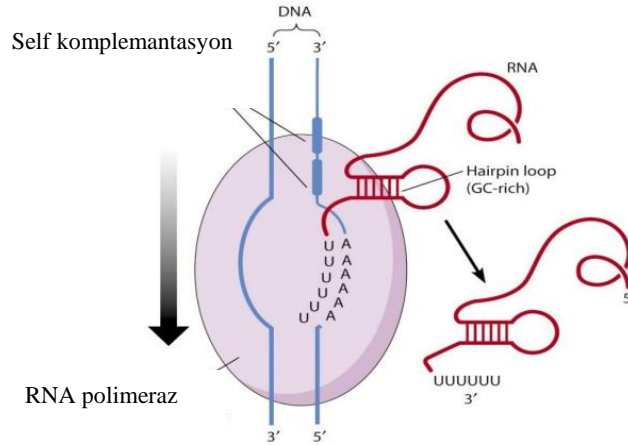
#### 2.4.2.2.Rho bağımsız sonlandırma

Bu tür bir terminasyonda, RNA polimeraz enzimi (merkezi enzim) sonlandırıcı alan ile karşılaşınca sentez durağan hale gelir. Terminatör bölgesinde iki yapısal belirteç vardır. Bunlardan biri G-C bazlarından oldukça bol olan, karşılıklı olarak birleşmiş bir sap ile bunun ucunda tek iplikçik ilmek ve bu sapın altında 6 urudin bazından meydana gelen terminatör dizi bölgesidir. Palindromik bölgenin okunması sonucunda oluşan RNA tekrar dizilerinin kendileri ile baz eşleşmesi yapmaları ile oluşan stem-loop, GC baz içeriğince zengin dizilerde meydana gelir (Şekil 2.11.).



Şekil 2. 11. Rho bağımsız terminasyon- GC baz içeriği (Omay, 2020).

Stem-loop RNA polimerazın durmasına neden olur (Jun vd., 2013). G-C açısından zengin bölgeye ulaştığında yavaşlar ve durağan hale gelir. Çünkü bazlar arasındaki bağlar fazla güçlü ve karardır ve açılması zordur (Mitra vd., 2011). Diğerleri ise 6 adet A bazından (poli A) oluşmaktadır. A ile U dizileri arasındaki bağ kararsız olup RNA zincirinin bırakılmasını sağlarlar (Şekil 2.12.).



Şekil 2. 12. Rho bağımsız terminasyon- poliA kuyruğu (Omay, 2020).

### 2.4.3. Etiket peptit ve proteinler

Rekombinant protein üretiminde çok çeşitli protein etiketi kullanılmaktadır. Protein etiketleri, rekombinant proteinlerin çözünürlüğünü iyileştirmede, protein saflaştırmasını kolaylaştırmada ve protein ekspresyonu ve saflaştırması sırasında proteinleri izlemeye, oldukça kullanışlı ve faydalı ve bir araçtır (Kimple vd., 2013). Bir protein etiketi, ilgilenilen proteinle ilişkili bir füzyon proteininin bir alt alanına veya peptit dizisine karşılık gelir. Protein regülasyonu, yapısı ve fonksiyonu ile ilgili çalışmalar büyük ölçüde rekombinant proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılmasına dayanmaktadır. Birçok rekombinant protein, füzyon proteinleri şeklinde eksprese edilip bir afinite/epitop etiketi (His, GST vb.) içerirler (Darain vd., 2004). Etiket, genellikle ekspresyon için gerekli proteinin N veya C ucunu kodlayan bir hedef gene bağlı spesifik bir amino asidi kodlayan kısa bir DNA dizisidir.

Afinite etiketleri, konakçı hücrelerin toplam proteininden, elde edilmek istenen rekombinant proteinin tek aşamada saflaştırılabilmesi için kullanılır (Uchinomiya vd., 2013). Afinite etiketleri, rekombinant proteinlerin N veya C terminaliyle bağlantı kuran peptitler/proteinlerdir. Bu etiketler proteinin saflaştırılmasında görev yaparlar. Bazı afinite etiketleri zorlu protein hedeflerinde çözünürlük arttırıcılar olarak da işlev görürler. Afinite etiketleri protein/etki alanı etiketleri ve epitop etiketleri olmak üzere iki ana kategoriye ayrılırlar. Protein etiketleri hem çözünürlük arttırıcılar hem de afinite saflaştırıcısı olarak görev yaparlar (Erard vd., 2013). Epitop etiketleri ise bir kromatografi reçinesine karşı, yüksek afiniteye sahip küçük peptitlerdir.

Protein etiketleri, bir rekombinant proteine genetik olarak aktarılan peptit dizileridir. Etiketler, çeşitli amaçlar için proteinlere eklenirler. Hedef proteinin her iki ucuna da eklenebilirler. Bu nedenle ya C- ya da N-ucuna özel olabilirken hem C- hem de N- ucuna da özgü olabilirler. Bazı etiketler ayrıca ilgilenilen proteinin içindeki sitelere de eklenir ve bunlara “dahili etiketler” de denir. Afinite etiketleri, afinite teknolojisi kullanılarak biyolojik ham kaynaklarından saflaştırılabilmeleri için proteinlere eklenir. Çözünür proteinin saflaştırılması ve ekspresyonu için kullanılan bazı füzyon etiketler aşağıdaki gibidir (Costa vd., 2014).

- Poly His etiketi
- Maltoz bağlama proteini (MBP)
- Glutasyon S transferaz proteini (GSP)
- Kalmodulin Bağlayıcı Protein (CBP)
- Streptavidin / Biyotin Bazlı Etiket
- Tioredoksin A (TrxA)
- Küçük ubiquitin benzeri değiştirici [Small ubiquitin-like modifier (SUMO)]

#### **2.4.3.1.Poli-His Etiketi**

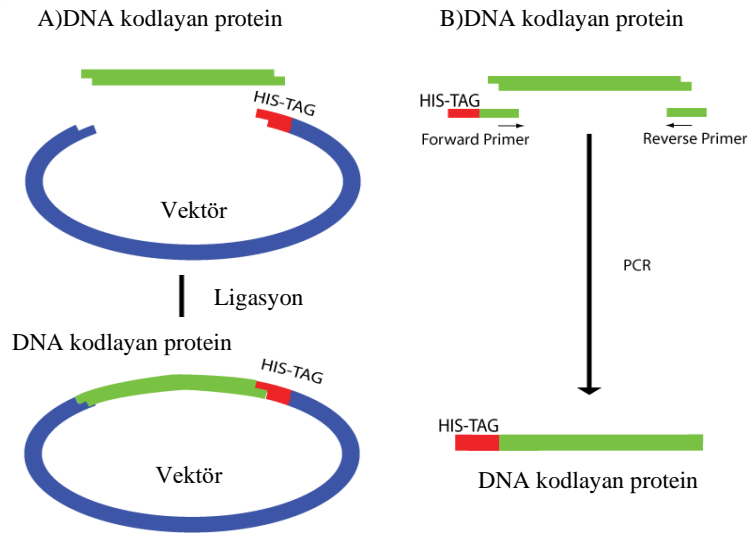
Rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında en yaygın kullanılan etiketler, karboksil (C) veya amino (N) uçlarına dâhil edilen histidin etiketleridir. Bir polihistidin etiketinde histidin rezidülerinin sayısı 3 ile 10 arasında değişkenlik gösterir (Pina vd., 2014). Çoğunlukla 6 defa peş peşe tekrar eden histidin amino asitlerinden meydana gelen 6 histidin etiketi kullanılır.

Poli histidin etiketi, metal matrislere bağlanan ve oldukça çok kullanılan bir protein etiketidir. İlgili proteini kodlayan genin N-terminalinde metiyoninden sonra eklenir ve durdurma kodonundan hemen önce biter. His etiketinin hangi uca eklendiği, büyük ölçüde proteinin özelliklerine ve etiket çıkarma yöntemine bağlıdır (Malhotra, 2009b). Bir proteine 6x his (heksahistidin) gibi bir etiket ekleyerek, protein normalde var olmayan bir bağlanma afinitesine sahip olabilir. Genel olarak, etiketin varlığı, karışımdaki proteinler arasında bu tür afinite özelliğine sahip olan tek rekombinant olduğundan dolayı, saflaştırmayı büyük ölçüde kolaylaştırır.

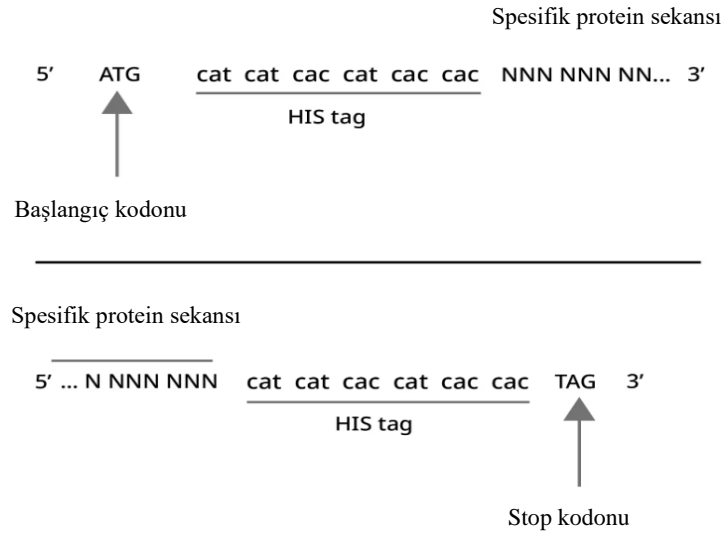
Küçük boyutundan dolayı toksik değildir ve proteinin immünojenikliğini veya fizikokimyasal özelliklerini etkilemez. Bu "işaretleme" işlemi ile histidin etiketli protein,

matris ile daha güçlü bir bağlantı sağlar (örneğin bakteri ekstraktındaki diğer moleküllere kıyasla) ve tek bir saflaştırmada nispeten saf bir protein elde edilmesine izin verir. Nikel ve diğer metal iyonları için yüksek afiniteye ve seçiciliğe sahip bir amino asit olan (en azından) 6-histidin rezidülerinden oluşan bir motiften oluşurlar (Malhotra, 2009b). Bu iyonlar, kompleks oluşturdukları şelatlayıcı ajanlar aracılığıyla matrise bağlanabilir.

Bu aktiviteye küçük bir belirteç olduğu (ve bu nedenle çok yıkıcı olmadığı) ve yalnızca proteinin birincil yapısına bağlı olduğu gerçeği eklenirse neden tercih edilen seçim olduğunu görmek kolaydır. Polihistidin sistemi; bakteri, maya, bitki hücresi ve memeli hücre sistemleri dahil olmak üzere çeşitli ekspresyon sistemlerinde rekombinant proteinleri saflaştırmak için başarıyla kullanılmaktadır. Histidin etiketi en yaygın ve en basit kullanılan saflaştırma etiketlerinden biridir. Bu etiket çoğu durumda protein fonksiyonunu bozmadığı ve ikinci bir saflaştırma gerekli değildir. Polihistidinleri eklemeye kullanılan iki yöntem vardır. En basit yol, proteini kodlayan DNA fragmanını His-etiketini kodlayan vektöre entegre etmektir (Şekil 2.13A.) Başka bir seçenek, start veya stop kodonunun yanında tekrarlanan histidin kodonları (CAT veya CAC) içeren primerlerle (Şekil 2.14.) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulamaktır (Şekil 2.13.).



Şekil 2. 13. Polihistidin etiketlerinin eklenmesi (Malhotra, 2009b).



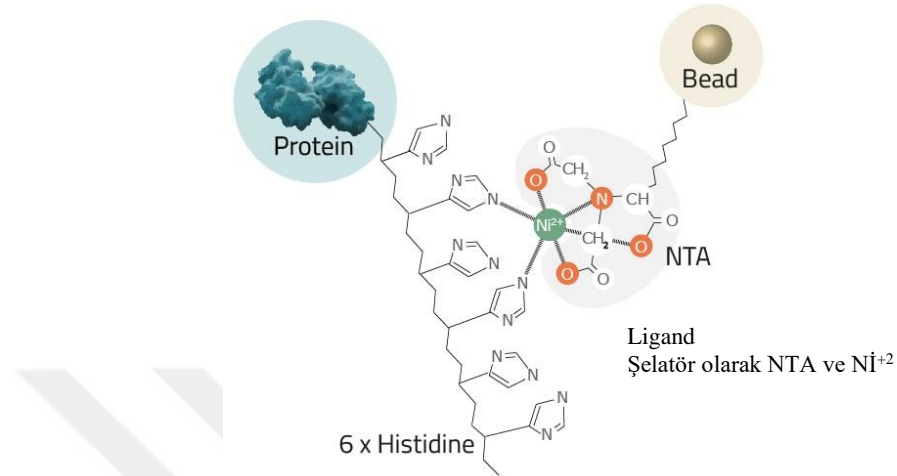
**Şekil 2. 14.** 6xHis etiketi eklemek için PCR kullanarak hazırlanmış primer örneği (Malhotra, 2009b).

#### 2.4.3.2. His etiketli proteinin saflaştırılması

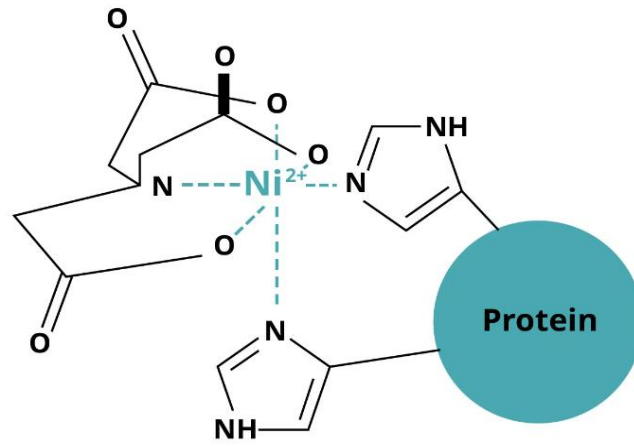
Protein saflaştırması, ölçekten bağımsız olarak oldukça spesifik ve sağlam yöntemler gerektirir. Araştırmacıların, etiketleri bir hücrede veya hücre lizatında bulunan binlerce başka proteinden ilgilendikleri bir proteini seçici olarak çıkarmasına olanak tanır (Pina vd., 2014). Poli His etiketli proteinleri saflaştırabilmek için, hareketsiz metal afinite kromatografisi (IMAC) yöntemi sıklıkla tercih edilir. Bu yöntem; negatif yüklü His etiketi ve matriks üzerinde immobilize geçiş metal iyonları ( $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) arasındaki interaksiyona bağlı olarak metal bağlama peptitlerini elde etmek için kullanılır (Siemann vd., 2002). Örneğin; bir kromatografi kolonuna  $\text{Ni}^{+2}$  iyonları Ni-NTA (nikel nitrilotriasetikası) resin şeklinde sabitlenirse kolon içinden geçen 6xHis etiketi taşıyan proteinler rezine bağlı kalır ve diğerleri kolondan çıkar (Şekil 2.15.).

Histidin etiketinin (His-tag), nikel ve kobalt iyonlarına afinitesi bulunmaktadır. Dolayısıyla, nikel veya kobalt iyonları reçineye bağlanarak histidin etiketli proteinleri bağlayan bir afinite alanı oluşturur. Saflaştırılan protein tek histidin etiketli protein olduğundan, karışımdaki diğer tüm proteinler kolondan bağlanmadan geçer ve geriye yalnızca reçineye bağlı histidin etiketli protein kalır (Şekil 2.16.). Bu protein daha sonra yıkama (elüsyon) adı verilen bir işlemle kolondan uzaklaştırılır. Bir histidin etiketi kullanılırsa, elüsyon için imidazol kullanılır (Booth vd., 2018). Çünkü bu bileşiğin halka yapısı histidin halka yapısına benzerdir ve nikel iyonlarına bağlanabilmek için histidin etiketleri ile rekabet eder. Eluatın ana bileşeni olan arzu edilen protein, ikinci bir

saflaştırma aşaması kullanılarak (boyut dışlama kromatografisi veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi) diğer istenmeyen ikincil safsızlıklardan kolaylıkla ayrılabilir. Hedef protein, imidazol rekabeti veya düşük pH ile ılımlı koşullar altında elüe edilebilir.



**Şekil 2. 15.** Bir Ni-NTA reçine kolonu kullanarak 6xHis etiketli füzyon proteinlerinin saflaştırılması (Booth vd., 2018).



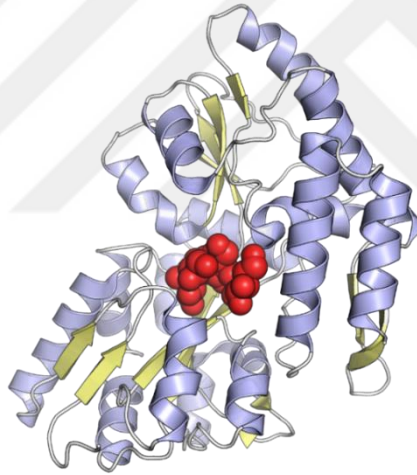
**Şekil 2. 16.** Nikel (Ni<sup>2+</sup>) şelatlı reçinenin his etiketli rekombinant proteine seçici bağlanması (Malhotra, 2009a).

Bu etiketleme yöntemi, rekombinant proteinin kolayca saflaştırılmasına ve tanımlanmasına izin verdiği için oldukça yararlıdır. Histidin etiketinin proteine özgü bir antikor veya prob kullanmadan rekombinant proteinleri saptama ve saflaştırma yeteneği, bu yöntemi rekombinant DNA teknolojisinde daha popüler hale getirir (Booth vd., 2018). Bu etiketleme yöntemi, rekombinant proteinin kolay saflaştırılmasına ve saptanmasına izin verdiği için özellikle yararlıdır. Ek olarak, rekombinant proteinleri proteine özgü bir

antikor veya prob kullanmadan tespit etme ve saflaştırma yeteneği ve His etiketli proteinleri içeren analizlerde kullanılmak üzere His etiketli antikorların mevcudiyeti, 6xHis etiketlerini daha da popüler hale getirir (Booth vd., 2018).

### 2.4.3.3. Maltoz bağlama proteini (MBP)

Maltoz bağlama proteini, *E. coli* K12 *malE* geni tarafından kodlanan 42 kDa'lık bir proteindir. MBP füzyon proteinleri, afinite çapraz bağlı amilozun tek adımlı saflaştırılması için kullanılır. Bakterilerde aşırı eksprese edilen füzyon proteinlerinin (özellikle ökaryotik proteinlerin) çözünürlüğünü içsel şaperon aktivitesi göstererek artırabilir (Zhao vd., 2013). Bu afinite etiketi, protein ekspresyon problemini çözmek için kullanılır, çünkü MBP ile etiketli proteinler toksisiteyi azaltabilir, ekspresyon seviyesini ve protein çözünürlüğünü artırabilir (Şekil 2.17.).



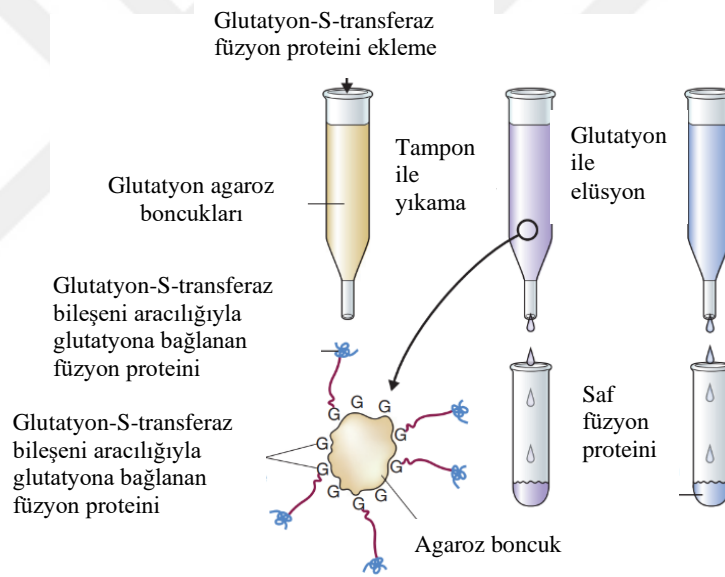
Şekil 2. 17. Maltoz bağlama proteini (Duan vd., 2001).

Bu etiketin ana amacı füzyon proteininin çözünürlüğünü arttırmaktır. Bu özelliği sebebiyle membran veya lipofilik proteinlerin saflaştırılması için kullanılabilecek bir etikettir (Kimple vd., 2013). MBP tabanlı saflaştırma, 6X-His etiketi ile elde edilmesi zor olan zar proteininin doğru ekspresyonunu sağlayabilir. New England Biolabs'tan pMAL serisi, Amerika Birleşik Devletleri'nden pMAL serisi ve Roche, İsviçre'den pIVEX serisi dâhil olmak üzere, MBP füzyon proteinlerinin üretimi için çeşitli vektörler ticari olarak temin edilebilir. Bu etiket de protein saflaştırması için iyi bir verim sunmaktadır.

#### 2.4.3.4. Glutasyon S-transferaz proteini (GSP)

*Schistosoma japonicum*' dan elde edilen 26 kDa'lık bir protein olan GSP, füzyon proteinlerinin tek aşamalı olarak saflaştırılmasında etiket olarak kullanılır. Prokaryotik ifadelerde kullanım için en uygundur çünkü GSP' ler, ökaryotik organizmalarda bulunan fakat bakterilerde çok da yaygın olarak bulunmayan çok işlevli bir sitozolik protein ailesidir.

Füzyon proteinleri, immobilize glutasyonun üzerinde afinite kromatografisi kullanılarak lizattan saflaştırılabilir. Bağlı protein, nötr pH'ta serbest indirgenmiş glutasyon (10-40 mM) kullanılarak ayrıştırılabilir (Şekil 2.18.). Bazı proteinler için GSP, çözünürlük etiketi görevi de görebilir. GSP etiketi, rekombinant proteini hücre içi proteaz aktivitesinden koruyarak stabilize eder.



**Şekil 2. 18.** Bir glutasyon-S-transferaz füzyon proteinini saflaştırmak için afinite kromatografisinin kullanılması (Brown, 2016).

Bununla birlikte, bazı GSP füzyon proteinlerinin çözünmez olduğu durumlarda, GSP' nin zayıf bir çözünürlük artırıcı olduğu kabul edilir. GSP etiketi, enzim testi veya immunoassay ile kolayca saptanabilir (Zhao vd., 2013). Füzyon proteinlerinin GSP etiketinin trombin veya faktör Xa gibi bölgeye özgü bir proteaz ile ayrılması önerilmektedir. GE Healthcare, Birleşik Krallık'tan pGEX serisi gibi GSP ekspresyon vektörleri, çoğunlukla etiket ile protein arasında spesifik proteaz saflaştırma bölgeleri bulundurur. GSP etiketli proteinlerin, aşı araştırmalarında protein-DNA etkileşimleri,

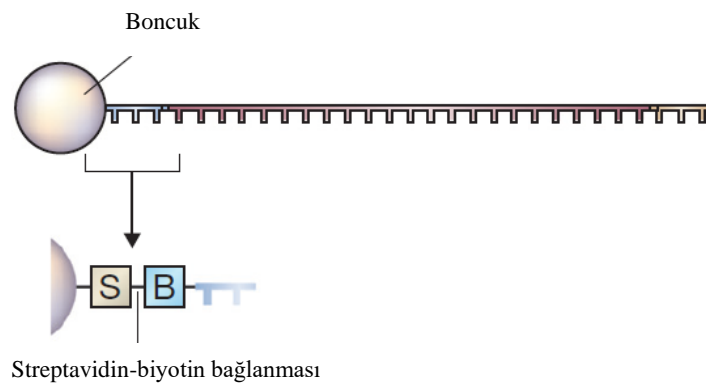
protein-protein etkileşimleri ve antijenler çalışmalarında da yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu avantajlarının yanında, GSP etiketinin histidinden daha büyük bir boyutu olması nedeniyle çalışması zor bir belirteçtir.

#### 2.4.3.5. Kalmodulin Bağlayıcı Protein (CBP)

Kalmodulin, neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde var olan EF-el yapısına sahip 17 kDa' luk bir proteindir. Bu etiket, bir saflaştırma markörü olarak miyosin hafif zincir kinazın (MLCK) C-terminal alanını kullanır. Düşük kalsiyumda, CBP, reçineye bağlı kalmodulin için yüksek bir afiniteye sahiptir. Daha küçük boyut (4 kDa) ve hafif elüsyon koşulları ile iyi bir afinite, hassas veya seçici bir proteinle çalışırken CBP etiketlerini kullanılabilir bir seçeneğe dönüştürür (Zhao vd., 2013).

#### 2.4.3.6. Streptavidin / Biotin Bazlı Etiket

Streptavidin, *Streptomyces avidinii* bakterisinden elde edilen tetramerik (dört alt birim) proteindir. Biotin-streptavidin birleşiminin ayrışma katsayısı (Kd) 10–14 mol/L 'dür. Streptavidin, moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.19.). Çünkü biotine olan olağanüstü afinitesine ek olarak biyotin bağlanması aşırı pH, sıcaklık, organik çözücüler, denatüre edici maddeler (guanidin klorür gibi), deterjanlar (SDS, Triton gibi) ve proteolizden etkilenmez (Zhao vd., 2013).



Şekil 2. 19. Streptavidin-biyotin bağlantıları ile boncuklara bağlanma (Brown, 2016).

Streptavidin, çeşitli biyomoleküllerin saflaştırılması ve saptanmasında oldukça çok kullanılır. Güçlü streptavidin-biotin bağı, farklı biyomolekülleri birbirine veya katı bir yüzeye bağlayabilir. Hedef protein, streptavidine bağlanan Strep etiketi olarak bilinen

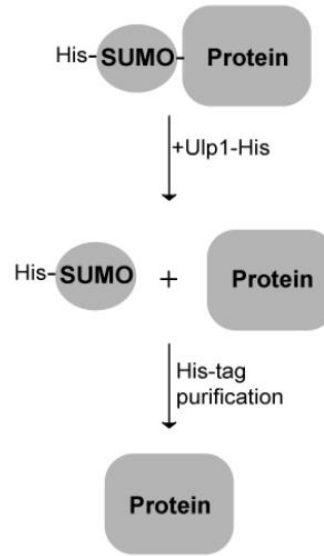
kısa bir peptite (9 amino asit) kaynaştırılır. Protein, elüsyon tamponunda biotin kullanılarak ayrıştırılır (Zhao vd., 2013). Bu sistem, düşük ekspresyonlu proteinler için bile yüksek saflaştırma verimliliği sağlar.

#### **2.4.3.7.Tioredoksin A (TrxA)**

Tioredoksinler, tiyodisülfid değişimi ile disülfür bağlarını indirgeyen evrensel oksidoredüktazlardır. *E. coli* tioredoksinlerinden biri olan TrxA, 11.6 kDa'lık bir proteindir. Kolayca aşırı eksprese edilebilmektedir. Toplam hücresel proteinin %40' ına kadar aşırı eksprese edildiğinde bile çözünür formda kalır. Bu sebeple rekombinant proteinde inklüzyon cisimciklerinin oluşumunu önlemek için bir belirteç olarak çok faydalıdır (Zhao vd., 2013). TrxA, kendine özgü afinite özelliklerinden yoksundur, bu nedenle proteini saflaştırmak için His6 etiketi gibi ek bir füzyon etiketi gerektirir.

#### **2.4.3.8.Küçük ubikutin benzeri değiştirici (SUMO)**

SUMO proteini, maya (Smt3'ü kodlayan bir gen) ve omurgalılarda (SUMO-1, SUMO-2 ve SUMO-3'ü kodlayan üç gen) bulunur. SUMO proteinleri küçüktürler ve çoğu yaklaşık 100 amino asit uzunluğunda ve 12 kDa ağırlığındadır (Hay, 2005). SUMO, protein taşınımının düzenlenmesi için gerekli olan ve ökaryotik hücreler için transkripsiyonu kontrol etmede görevli olan 100 amino asit dizisinden oluşan “Küçük Ubikutin Benzeri Değiştiricinin” kısaltmasıdır. Bir N-terminal füzyonu olarak protein stabilitesini ve çözünürlüğünü iyileştirdiği bilinmektedir (Pina vd., 2014).



**Şekil 2. 20.** SUMO etiketli protein saflaştırılması (Amer vd., 2016).

SUMO proteinleri, katlanmış yapıda ubikuitine benzer, ancak ubikuitinin amino asit dizisine sadece yaklaşık %20 homolojiye sahiptir. SUMO genlerinin sayısı ökaryotlar arasında değişiklik gösterir. SUMO proteinleri, ubikuitin ile aynı şekilde substrat proteinlerine konjuge edilir. GSP ve MBP' den farklı olarak SUMO, füzyon proteinlerinin saflaştırılmasında rol oynamaz. Bu amaçla, füzyon proteinlerinin saflaştırılmasını kolaylaştırmak için SUMO etiketine eklenen bir His6 dizisi kullanılır (Zhao vd., 2013). Etiket daha sonra, özellikle SUMO yapısını tanıyan SUMO proteaz kullanılarak saflaştırmadan sonra çıkarılabilir (Şekil 2.20.).

## 2.5. Floresan Proteinler

Floresan proteinler, belirli dalga boylarındaki ışığı emebilen ve daha uzun dalga boylarında da ışık yayan biyolojik makromoleküllerdir. Bu özelliklerinden dolayı doğal ve genetiği değiştirilmiş floresan proteinler biyolojik araştırmalarda ve biyoteknolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Keşfedilen ilk ekspresyon proteini ve floresan proteinler arasında en yaygın olarak kullanılanı, 1962 yılında *A. victoria* adlı denizanasında izole edilen yeşil floresan proteindir (GFP) (Şekil 2.21.) (Nienhaus, 2008). GFP, genetik etiketleme ve hücre içi süreçlerin görsel olarak izlenmesi için biyolojide en önemli araçlar arasında yer alır.

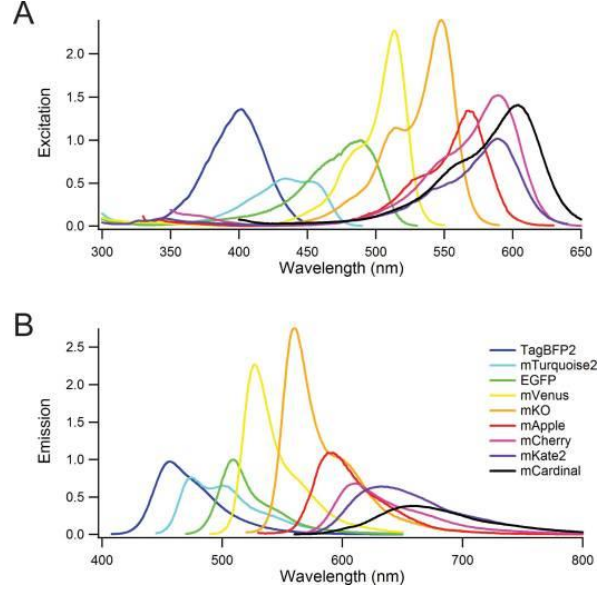


Şekil 2. 21. *Aequorea Victoria* (Tsien, 1998).

Floresan proteinler, 238-239 amino asit uzunluğundaki polipeptit zincirlerinden oluşur ve üç boyutlu bir yapıya sahiptir. Protein yapısı, genellikle beta yapraklardan meydana gelen silindirik bir yapı olan beta barrel olarak bilinir (Shaner vd., 2005). Bu silindirin iç kısmında protein katlanması nedeniyle sıkıca kapanan bir bölge vardır. Bu bölge, floresan etkisinin kaynağı olan kromofor molekülünün bulunduğu yerdir (Nienhaus, 2008). Üç ana amino asidin (serin, tirozin ve glisin) post-translasyonel bir modifikasyonu kromoforu oluşturur. Bu değişiklik, belirli amino asitler zincir içinde birbirleriyle reaksiyona girerek bir halkalı yapı oluşturur ve bu da ışık emici bir bileşen meydana getirir. Kromofor oluşumu, bir enzim gerektirmeden proteinin kendi kendine oluşmasını içerir. Protein katlandıktan sonra kromofor beta barrel'in merkezinde stabilize olur ve çevresel faktörlerden korunur (Chudakov vd., 2010). Bu, kromoforun düzenli ve sürekli floresans yayabilmesine olanak tanır.

Floresan proteinlerin ışığı iki ana adım aracılığıyla yayılır (Greb & DeRose, 2023).

- Eksitasyon-Uyarım: Protein, belirli dalga boyunda bulunan yüksek enerjili bir fotonu emer. Fotoda oluşan enerji sayesinde, protein kromoforu uyarır.
- Emisyon-Işık yayımı: Uyarılmış durumda bulunan kromofor, fazla enerjiyi yayarak tekrar düşük enerji seviyesine geri döner. Protein, bu değişikliği farklı bir dalga boyunda ışık olarak yansıtır (Şekil 2.22.).



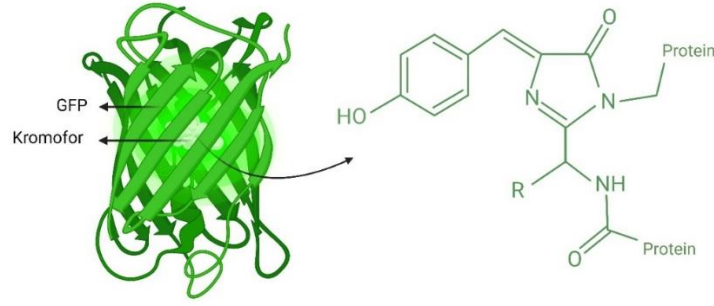
Şekil 2. 22. Yaygın olarak kullanılan birkaç floresan proteinin, görünür bölgedeki uyarma ve emisyon spektrumları (Cranfill vd., 2016).

Floresan proteinler, bu özellikleri sayesinde canlı hücrelerde hücresel yapıların veya belirli proteinlerin izlenmesine yardımcı olurlar. Bu proteinlerin, biyolojik süreçler sırasında floresansın gözlenmesi yoluyla *in vivo* koşullarda hücresel aktiviteleri işaretlemek için kullanılması mümkündür.

### 2.5.1. Yeşil Floresan Protein (GFP)

GFP, yaklaşık 509 nm dalga boyunda mavi veya morötesi ışığı absorbe ederek yeşil ışık yayar. Emilen ve yayılan ışığın dalga boyu, kromoforun çevresindeki amino asitlerin diziliminden ve özelliklerinden etkilenir. Protein mühendisliği, bu yapıyı değiştirerek floresan proteinlerin çeşitli renklerde (mavi, kırmızı, sarı vb.) üretilmesini sağlamıştır.

Floresan proteinler ilk kez denizanası *Aequorea victoria*'da keşfedilip izole edilen Yeşil Floresan Protein (GFP) ile tanınmıştır (Şekil 2.23.). Floresan proteinler doğada genellikle deniz canlılarında, özellikle de mercan ve denizanalarında bulunmaktadır. *A. victoria*, biyoluminesans organlarında doğal olarak GFP bulundurur. Kalsiyum varlığında aequorin adı verilen başka bir protein bu organları aktive eder. GFP, aequorin tarafından yayılan mavi ışığı emer ve ardından yeşil ışık olarak yeniden yayılır.



Şekil 2. 23. GFP yapısı -Created in BioRender

Bu biyoluminesans süreci, denizanalarının çevreden gelen belirli sinyallere tepki vermesine yardımcı olur. Buna ek olarak bazı mercan türleri farklı renklerde floresan proteinler üretir. 2008 yılında GFP'nin keşfi ve biyoteknolojideki kullanımını Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür (Chalfie vd., 1994). Bu buluşun ardından, çeşitli renklerde izole edilen floresan proteinlerin genetik mühendislik yoluyla değiştirilmesi sonucunda geniş bir renk yelpazesine sahip floresan proteinler üretilmiştir. Bu yeni floresan proteinler, farklı dalga boylarında ışık yayarak birkaç biyolojik süreci veya molekülü aynı anda gözlemlene kolaylığı sağlamaktadır (Tablo 2.2.).

**Tablo 2. 2.** GFP çeşitleri (Piston D., 2023)

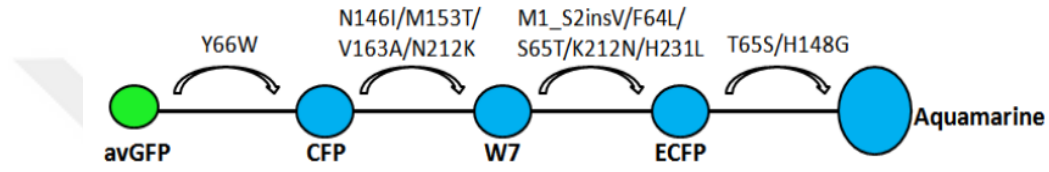
Protein (Kısaltma)	Uyarma Maksimum (nm)	Emisyon Maksimum (nm)	Molar Yok Olma Katsayısı	Kuantum Verimi	İn vivo yapı	Bağlı parlaklık (EGFP 'nin%' si)
EGFP	484	507	56,000	0.60	Monomer*	100
Emerald	487	509	57,500	0.68	Monomer*	116
Superfolder GFP	485	510	83,300	0.65	Monomer*	160
Azami Green	492	505	55,000	0.74	Monomer	121
mWasabi	493	509	70,000	0.80	Monomer	167
TagGFP	482	505	58,200	0.59	Monomer*	110
TurboGFP	482	502	70,000	0.53	Dimer	102
AcGFP	480	505	50,000	0.55	Monomer*	82
ZsGreen	493	505	43,000	0.91	Tetramer	117
T-Sapphire	399	511	44,000	0.60	Monomer*	79

GFP' nin üzerinde uygulanan mutasyon teknikleri ile çeşitli renklerde ışık yayabilen floresan protein varyantları oluşturulmuştur. Oluşan proteinler arasında, Camgöbeği Floresan Protein (CFP), Sarı Floresan Protein (YFP), Evoglow Floresan Protein ve Kırmızı Floresan Protein (RFP) gibi floresans proteinler bulunmaktadır.

### 2.5.2. Camgöbeği Floresan Protein (CFP)

Camgöbeği floresan proteini (CFP), *A. victoria*'nın GFP yapısındaki çeşitli mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir floresan protein grubudur. CFP türevlerindeki önemli bir mutasyon, kromoforun bir fenol bileşeni yerine bir indol bileşeni ile oluşmasına neden olan Y66W mutasyonudur (Ceylan vd., 2020). Bu mutasyon, kromoforun merkezinde var olan tirozinin triptofana dönüşümü sonucu oluşturulmuştur.

CFP türleri, floresans rezonans enerji transferine dayalı lokalizasyon ve etkileşim çalışmalarında kullanılmaktadır. Förster rezonans enerji aktarımı (FRET) ve floresan proteinlere bağlı biyokimyasal görüntüleme teknikleri; canlı hücrelerde spesifik moleküler ve kimyasal etkileşimleri takip etmek için farmakolojik, biyolojik ve klinik çalışmalarda yer alır. CFP'ler, canlı hücre görüntüleme için FRET donörleri olarak büyük ölçüde kullanılmaktadır. Akuamarin proteini, *A. victoria* GFP'den (avGFP) türetilen ve mutant ECFP T65S ve H148G'den elde edilen CFP ailesinin bir üyesi olan 27 kDa'lık bir floresan proteindir (Şekil 2.24.). Akuamarin 430 nm'lik bir uyarıma ve 474 nm'lik bir emisyonu sahiptir (Ceylan vd., 2020).



Şekil 2. 24. *A. victoria* GFP'nin *Aquamarine* floresan proteinine mutasyonu (Erard vd., 2013).

Bu mutasyonlar, kromofor boşluğunun sertliğini geri kazanmaya ve ana zincir yapısını sağlam tutmaya yardımcı olur. Akuamarin ayrıca olağanüstü pH kararlılığına, pH 4 ila 10 arasında değişmeyen flüoresan özelliklere ve çevresel etkilere karşı düşük duyarlılığa sahiptir. Çeşitli memeli hücre sistemlerinde parlak ve verimli ekspresyon sağlamanın yanı sıra, uzun floresan ömürleri ile hücre içi lokalizasyon ve füzyon çalışmaları için uygun özelliklere sahiptir (Tablo 2.3.). Lakin bu proteinler, GFP'de bulunan floresansın yalnızca %25-40'ına sahip oldukları için yaygın bir şekilde kullanılmazlar.

**Tablo 2. 3.** CFP çeşitleri (Piston., 2023).

Protein (Kısaltma)	Uyarma Maksimum (nm)	Emisyon Maksimum (nm)	Molar Yok Olma Katsayısı	Kuantum Verimi	İn vivo yapı	Bağlı parlaklık (EGFP 'nin% 'si)
ECFP	439	476	32,500	0.40	Monomer*	39
mECFP	433	475	32,500	0.40	Monomer	39
Cerulean	433	475	43,000	0.62	Monomer*	79
mTurquoise	434	474	30,000	0.84	Monomer*	75
CyPet	435	477	35,000	0.51	Monomer*	53
AmCyan1	458	489	44,000	0.24	Tetramer	31
Midori-Ishi Cyan	472	495	27,300	0.90	Dimer	73
TagCFP	458	480	37,000	0.57	Monomer	63
mTFP1 (Teal)	462	492	64,000	0.85	Monomer	162

### 2.5.3. Sarı Floresan Protein (YFP)

Sarı floresan proteini (YFP), GFP'nin bir başka mutant bir varyantıdır. Sarı floresan protein ailesi, yeşil floresan proteinin kristal yapısının treonin rezidüsü 203'ün (Thr203) kromofora yakın olduğu görüldükten sonra ortaya çıkarılmıştır (Chudakov vd., 2010).

Bu treonin tortusu, kromoforun uyarılmış dipol momentine stabilite katmak için mutasyona uğratılmıştır. Bu, floresan proteinin uyarma ve emisyon dalga boylarında 20 nm'lik bir değişiklik ile sonuçlanarak daha uzun dalga boylarına sebep olmuştur. YFP üzerinde çalışmalar yapılarak, geliştirilmiş sarı floresan protein (EYFP) elde edilmiştir (Chudakov vd., 2010). GFP ve YFP birçok durumda, iki molekülün iki farklı floresan proteini ile etiketlendiği çift görüntüleme gerçekleştirmek için kullanılır. Sonuç olarak, dinamiklerini görselleştirmek ve değerlendirmek için birlikte görüntülenebilirler. YFP, en parlak floresan proteinlerden biridir ve çeşitli görüntüleme amaçları için yaygın olarak kullanılır (Tablo 2.4.).

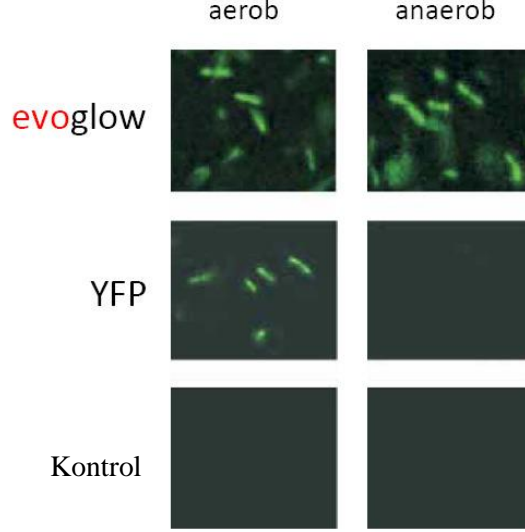
**Tablo 2. 4.** YFP çeşitleri (Piston D., 2023).

Protein (Kısaltma)	Uyarma Maksimum (nm)	Emisyon Maksimum (nm)	Molar Yok Olma Katsayısı	Kuantum Verimi	İn vivo yapı	Bağlı parlaklık (EGFP 'nin% 'si)
EYFP	514	527	83,400	0.61	Monomer*	151
Topaz	514	527	94,500	0.60	Monomer*	169
Venus	515	528	92,200	0.57	Monomer*	156
mCitrine	516	529	77,000	0.76	Monomer	174
YPet	517	530	104,000	0.77	Monomer*	238
TagYFP	508	524	64,000	0.60	Monomer	118
PhiYFP	525	537	124,000	0.39	Monomer*	144
ZsYellow1	529	539	20,200	0.42	Tetramer	25
mBanana	540	553	6,000	0.7	Monomer	13

#### 2.5.4. Evoglow Floresan Protein

Floresan raportör proteinleri, canlı hücrelerin ve dokuların in vivo gerçek zamanlı görüntülenmesine olanak sağlar. Bu proteinler, in vitro floresan etiketleme için değerli invazif olmayan moleküler araçlardır. GFP gibi mevcut haberci proteinlerin önemli bir dezavantajı vardır. Kromoforların sentezi için bir kofaktör olarak moleküler oksijene ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple anaerobik sistemlerde kullanılmaları mümkün değildir.

Bu sorunun üstesinden gelebilmek için, bir dizi flavin mononükleotid (FMN) bazlı floresan proteinler olan Evoglow geliştirilmiştir (Drepper vd., 2007). Evoglow proteinleri bu yeniliğin sayesinde hem aerobik hem de anaerobik biyolojik sistemlerde floresan haberciler olarak kolaylıkla kullanılabilir (Şekil 2.25.).



Şekil 2. 25. *In vivo*-floresan Evoglow proteinler, geleneksel Sarı Floresan Protein (YFP) ile karşılaştırıldığında (Drepper vd., 2007).

### 2.5.5. Kırmızı Floresan Protein (RFP)

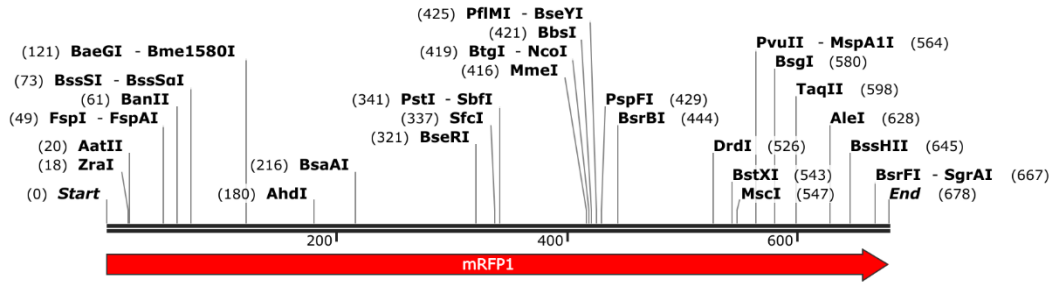
Yeşil floresan proteinin (GFP) keşfinden bu zamana kadar, birçok floresan protein spektral özelliklerle izole edilmiş ve biyokimyasal belirteçler olarak kullanılmıştır (Campbell vd., 2002a). Kırmızı Floresan Protein (RFP), *in vivo* gen ekspresyonunu izlemek ve diğer proteinleri etiketlemek gibi hücreden hücreye interaksyonları incelemek için yaygın olarak kullanılan bir proteindir. RFP'ler mevcut konfokal veya geniş alanlı mikroskoplarda görüntülenebilir ve ayrıca daha yüksek penetre edilebilirliğe sahiptir. RFP' nin en geniş uyarma ve emisyon değerleri 580 nm ve 610 nm'dedir (Shi vd., 2021).

Kırmızı floresan proteinin ve varyantlarının yeşil floresan proteinlerle kombinasyon halinde kullanılması, canlı dokularda ve hücrelerde incelenen olaylar için çok sayıda renk seçeneği sağlamıştır. Kırmızı floresan protein *Discosoma* mercanından izole edilmiştir (Şekil 2.27.). Bu kırmızı floresan protein orijinal olarak drFP583 olarak adlandırılmaktadır (Shi vd., 2021). Ancak genellikle DsRed olarak bilinir. DsRed, olgunlaşma hızının çok yavaş olması (~12 saat) ve tetramer yapısının istenmeyen protein oluşumuna neden olabilmesi nedeniyle laboratuvarlarda pek kullanışlı değildir. Bu sebeple 33 amino asit değiştirilerek yeni nesil bir monomerik kırmızı floresan proteini oluşturulmuş ve bu proteine mRFP1 adı verilmiştir (Tablo 2.5.). Hızla olgunlaşan mRFP1, DsRed ile ilgili sorunların birçoğunun üstesinden gelmektedir.

Monomerik Kırmızı Floresan Protein (mRFP1), *Discosoma* türü mercanlardan elde edilen DsRed proteininin bir mutasyonudur (Şekil 2.26.). Canlı hücre görüntüleme ve floresan füzyon proteinleri çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. mRFP1, DsRed'in oligomerik yapısından kaynaklanan kısıtlamaları aşmak için tasarlanmıştır ve 33 farklı mutasyonla monomerik hale getirilmiştir (Tablo 2.6.). Bu tek parçalı yapı sayesinde, hücre içi lokalizasyon çalışmalarında proteinlerin normal işlevlerini bozmadan kullanılabilirler. Ayrıca, mRFP1'in hızlı olgunlaşma süresi ve yüksek stabilitesi, gen ekspresyon analizlerinden çoklu floresan görüntülemeye kadar çok çeşitli uygulamalara izin vermektedir.

**Tablo 2. 5.** Kırmızı floresan protein özellikleri (Campbell vd., 2002b).

<b>Floresan Proteinin Adı</b>	mRFP1
<b>Amino Asit Dizilimi</b>	MASSDVIKEFMRFKVRMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQ TAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFQYGSKAYVKHPADIPDYLK LSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLR GTNFPDGPVMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMRL KLKDGGHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNE DYTIVEQYERAEGRHSTGA
<b>Molekül Formülü</b>	C <sub>967</sub> H <sub>1673</sub> N <sub>277</sub> O <sub>323</sub> S <sub>8</sub>
<b>Molekül Ağırlığı</b>	25.4 kDa



**Şekil 2. 26.** mRFP1 yapısı (678 bp)

mRFP1, yaklaşık 26,7 kDa moleküler ağırlığa sahip 236 amino asitten oluşan bir proteindir. Uyarılma dalga boyu 584 nm ve emisyon dalga boyu 607 nm'dir. Bu özellikleri sayesinde, GFP ve YFP gibi diğer floresan proteinlerle beraber kullanıldığında spektral ayrışma için mükemmel bir etiket halini almaktadır. mRFP1, hızlı olgunlaşma özelliği sayesinde hücre içindeki süreçlerin etkili bir şekilde izlenebilmesini sağlamaktadır. Bunun yanı sıra gen ekspresyon seviyelerinin analizinde bir raporlayıcı gen olarak

kullanılabilmeye de olanak sunmaktadır. Ek olarak, canlı hücre görüntüleme uygulamalarında biyolojik süreçlerin gerçek zamanlı olarak izlenmesine ve hücrelerin yaşam döngüsü boyunca izlenmesine olanak tanımaktadır.



Şekil 2. 27. *Discosoma mercanti*

**Tablo 2. 6.** RFP çeşitleri (Piston , 2023).

Protein (Kısaltma)	Uyarma Maksimum (nm)	Emisyon Maksimum (nm)	Molar Yok Olma Katsayısı	Kuantum Verimi	<i>İn vivo</i> yapı	Bağlı parlaklık (EGFP 'nin% 'si)
mRuby	558	605	112,000	0.35	Monomer	117
mApple	568	592	75,000	0.49	Monomer	109
mStrawberry	574	596	90,000	0.29	Monomer	78
AsRed2	576	592	56,200	0.05	Tetramer	8
mRFP1	584	607	50,000	0.25	Monomer	37
JRed	584	610	44,000	0.20	Dimer	26
mCherry	587	610	72,000	0.22	Monomer	47
HcRed1	588	618	20,000	0.015	Dimer	1
mRaspberry	598	625	86,000	0.15	Monomer	38
dKeima-Tandem	440	620	28,800	0.24	Monomer	21
HcRed-Tandem	590	637	160,000	0.04	Monomer	19
mPlum	590	649	41,000	0.10	Monomer	12
AQ143	595	655	90,000	0.04	Tetramer	11

Kırmızı floresan protein (RFP), sunduğu bir dizi avantaj nedeniyle araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. İlk avantaj olarak, RFP' nin emisyon spektrumu yaklaşık 580-610 nm olarak, yeşil floresan protein gibi kısa dalga boylu proteinlere kıyasla daha uzundur. Bu nedenle derin doku görüntülemeleri ve canlı hücre analizleri için çok faydalıdır. RFP' nin yüksek foto stabilitesi uzun süre floresan sinyalin korunmasını sağlar. Bu sebeple uzun süreli takip ve görüntüleme gerektiren deneylerde önemli bir avantaj olmaktadır. Oluşturduğu yüksek parlaklık seviyesi ile düşük konsantrasyonlarda bile yüksek sinyaller üretebilmektedir. Bunun sayesinde de deneylerin sinyal gücünü artırır ve sonuçları daha güvenilir hale getirir.

RFP; GFP ve diğer floresan proteinlerin spektral örtüşme riskini azalttığı için çoklu etiketleme çalışmalarında kullanılabilir. Bu durumda, birden fazla proteinin aynı

anda izlenmesi mümkündür. Ek olarak, ökaryotik ve bakteriyel sistemlerde basitçe ifade edilebilmesi, RFP'ye genetik modifikasyonlar ile ilgili araştırmalarda esnek bir çalışma alanı sunar. Bu proteinin bakteriyel sistemlerde düşük toksisite ile çalışması, araştırma süreçlerinin güvenilirliğini artırır. Çünkü hücrel mekanizmalara minimal seviyede müdahale etmektedir. Bunlara ek olarak RFP'nin bazı varyantları, düşük pH koşullarında da stabil kalabilmektedir. Bu avantaj da RFP'yi daha geniş bir çalışma alanı için kullanılabilir hale getirmektedir.

RFP' den türetilmiş varyantlar, daha hızlı bir olgunlaşma süreci geçirerek daha yüksek verimle çalışır ve tüm bunların neticesinde de deney süreleri kısaltarak çalışma verimliliği artmaktadır. Kırmızı floresan protein, bu özellikleri dikkate alındığında, özellikle çoklu etiketleme, derin doku görüntüleme ve bakteriyel ekspresyon sistemlerinde çokça tercih edilen bir araç haline gelmiştir

#### **2.5.5.1. RFP Olgunlaşma Süreci**

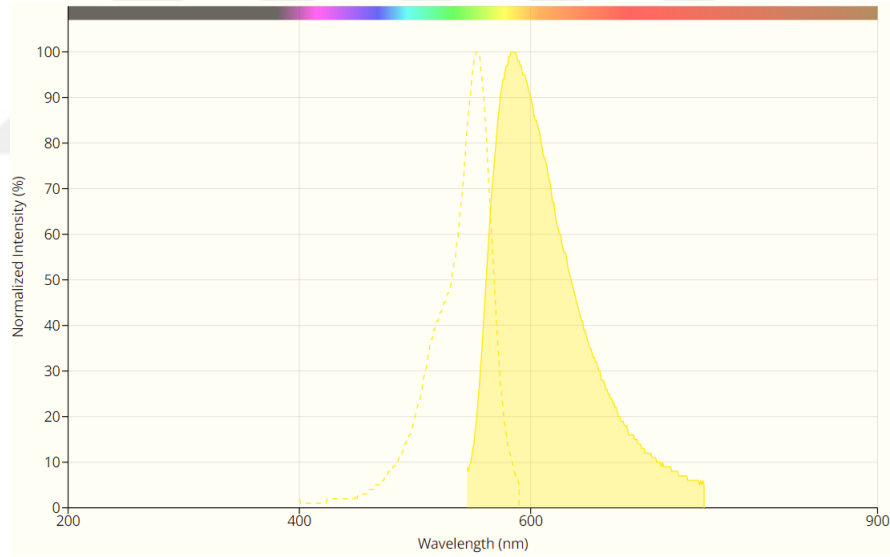
Olgunlaşma mekanizması bakımından RFP, floresan proteinler arasında oldukça avantajlıdır. Amino asit zincirinde yer alan önemli üç amino asidin (Gln65, Tyr66 ve Gly67) kimyasal değişiklikleri, bu işlemin başlangıcıdır. Birincisi, bu amino asitlerin peptid omurgası içinde bir döngü oluşturarak kromoforu meydana getirdiği siklikleşme reaksiyonudur. Bu kromofor henüz tam olarak floresan değildir, çünkü protein içindeki çevresel faktörler onu ileri modifikasyonlara sürükler.

Oksijen, kromoforun tam olarak olgunlaşabilmesi için ihtiyaç duyulan önemli bir araçtır. Oksijen varlığı ile meydana gelen oksidasyon reaksiyonları, kromoforun içinde bulunan çift bağların oluşmasını sağlar (Evdokimov vd., 2006). Bu, kırmızı floresansın ortaya çıkması için gerekli olan önemli bir aşamadır. Oksidasyon, kromoforun yapısının kırmızı ışık yaymasına neden olur. Bu noktada, yapısal olarak ortaya çıkan uzamış konjugasyon sistemi, protein içinde kırmızı ışığın emilimini ve yayılmasını sağlar. Bu yöntem, RFP' nin yeşil spektrumdan kırmızı spektruma kaymasına ve karakteristik bir kırmızı floresans sinyali üretmesine imkân verir.

Kromoforun çevresindeki protein zincirinin konformasyonu, gelişme sürecinde meydana gelen yapısal değişikliklerden etkilenir. Bunun sonucunda, kromofor daha uzun bir floresan sinyal üretir ve daha stabil bir hale gelir (Shu vd., 2006). RFP, GFP' den daha uzun süre olgunlaşır ve genellikle birkaç saat ile birkaç gün sürer. Bu işlem, proteinin varyantına ve çevresel koşullara göre değişebilir. Bir takım genetik

modifikasyonlar ile mRFP1 veya DsRed gibi daha hızlı olgunlaşan varyantlar türetilmiştir.

Özetle, kırmızı floresan proteinlerin olgunlaşma süreci çeşitli moleküler etkileşimleri ve kimyasal reaksiyonları içerir. Bu işlemin sonunda, floresan proteinler floresan hale gelir ve hücre içinde veya dışında görüntüleme ve analiz için kullanılabilir. RFP' nin tam anlamıyla işlevsel olabilmesi için gerçekleştirdiği olgunlaşma süreci, proteinin içinde bulunan kromofor yapısında değişikliklerle tamamlanır (Evdokimov vd., 2006). Protein bu olgunlaşmanın devamında ideal eksitasyon ve emisyon dalga boylarında güçlü bir kırmızı floresan sinyali üretmeye başlar (Şekil 2.28.). Araştırmalarda belirteç görevi gören floresan proteinler; floresan yoğunluğuna bağlı olarak bunları ölçerek, canlı hücredeki önemli hedef moleküllere kaynaşmış floresan proteinin lokalizasyonunu görselleştirerek ve protein tarafından oluşturulan yeni varyantların aktivitesini ve ekspresyonunu inceleyerek hücredeki gen ekspresyonunu tespit etmeye önemli ölçüde yardımcı olur (Shu vd., 2006).



Şekil 2. 28. RFP emisyon-eksitasyon grafiği (Spectrum [RFP (TagRFP)] | AAT Bioquest, t.y.)

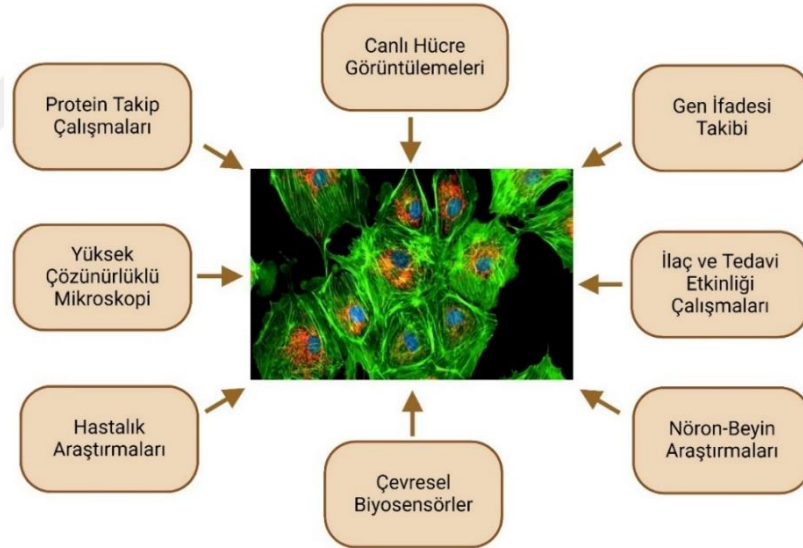
## 2.6.Floresan Proteinlerin Kullanım Alanları

Floresans proteinlerinin daha parlak, daha foto stabil ve daha geniş bir spektrumda floresans yayabilmesi için protein mühendisliği kullanılmaktadır. Gerçekleştirilen mutasyonlar ile foto stabiliteyi artırmak için yapılan çalışmalar, proteinlerin daha yoğun

bir şekilde floresans yaymalarına olanak sağlar (Tunç & Tunç, 2020). Bu değişimler, özellikle uzun süreli canlı hücre görüntüleme çalışmaları için önemli bir avantajdır.

Floresan proteinler, sahip oldukları benzersiz özellikler sayesinde biyoteknoloji ve moleküler biyoloji çalışmaları için önemli bir araç haline almıştır. Canlı hücrelerde belirli yapıların dinamik olarak izlenmesi ve işaretlenmesi için floresan proteinler sıklıkla tercih edilir. Floresans mikroskobu kullanılarak, gen mühendisliği yoluyla belirlenen proteinlere füzyonlanması sağlanan floresan proteinlerin, hücre içinde oluşturduğu hareket ile birbirleriyle kurdukları etkileşim ve lokalizasyonu izlenebilmektedir.

Floresan proteinlerin raporlayıcı olarak kullanılabilmesi sayesinde, takip edilmesi istenilen genlerin ne zaman ve nerede eksprese edildiği gözlenebilmektedir. Bu proteinlerin promotor bölgelerine füzyonlanması, gen ekspresyon çalışmaları için oldukça önemli bir uygulamadır (Shaner vd., 2005). Aktif olan genin bulunduğu hücrede üretilen proteinin floresans yayması sonucunda gen ekspresyonu görsel olarak takip edilebilmektedir.



Şekil 2.29. Floresan proteinlerin kullanım alanları-Created in BioRender

Şekil 2.29.' da gösterildiği gibi floresan proteinlerin kullanım alanlarından birisi de protein-protein etkileşimlerini tespit etmektir. Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) yöntemi sayesinde iki protein arasındaki etkileşim takip edilebilmektedir. İki floresan proteinin yakın olması durumunda, bir proteinden yayılan ışık diğer protein tarafından emilerek oluşan enerjinin aktarılmasına olanak sağlanır (Durhan vd., 2022). Bunun sonucunda hücre içindeki protein-protein etkileşimleri canlı olarak

gözlemlenebilir. Tüm bu kullanım alanlarına ek olarak floresan proteinler, *in vivo* görüntüleme tekniklerinde özellikle de hastalık teşhis ve tedavisi için sıklıkla kullanılmaktadırlar (Piston D., 2023). Örneğin, floresan proteinlerle işaretlenmiş hücreler, kanser hücrelerinin yayılmasını izlemek ve ilaçların etkisini değerlendirmek için kullanılabilir.

Sinir biliminde kalsiyum ve voltaj değişikliklerine duyarlı floresan proteinlerin kullanılmasıyla nöronlarda bulunan ağların gerçek zamanlı takip edilebilmesi oldukça dikkat çekmektedir. Çevresel biyosensör geliştirme çalışmaları, toksinlere veya ağır metaller tepki veren floresan proteinler aracılığıyla kirleticileri su ve toprak örneklerinde hızlı bir şekilde tespit edebilmektedir. Ek olarak, floresan proteinler, yapay fotosentez ve biyoyakıt üretimi gibi yenilenebilir enerji araştırmalarında ışığa duyarlı özellikleri sayesinde enerji dönüşümü prototiplerinde kullanılmaktadır.

Gelecekte floresan proteinlerin daha karmaşık biyolojik sistemlerin analizinde ve sentetik biyoloji uygulamalarında önemli bir rol oynaması beklenmektedir. Araştırmacılar, daha geniş bir spektrumda daha parlak ve daha stabil floresan proteinler için çalışmalarına devam etmektedirler. Floresan proteinlerin biyoteknolojik uygulamadaki kullanımı, canlı hücrelerde ve organizmalarda daha hassas izleme ve işaretleme tekniklerinin geliştirilmesi yoluyla daha da ilerleyecektir.

## **2.7.Cereibacter sphaeroides (Rhodobacter sphaeroides) O.U.001**

### **2.7.1. Hücre Fabrikası Olarak Cereibacter sphaeroides**

*Cereibacter sphaeroides*, sahip olduğu fizyolojik ve genetik özellikleri sayesinde biyoteknoloji alanında oldukça önemli bir model organizma olarak dikkat çekmektedir. Patojenik olmayan yapısı, genetik manipülasyonlara açıklığı ve çeşitli metabolik özellikleri sayesinde rekombinant protein üretimi gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için iyi bir sistem sağlar.

Bu organizma, metabolik olarak oldukça esnek ve hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyüebilmektedir. Işık varlığında fotosentetik büyüme yapabilir ve kemotrofik metabolizma yoluyla da çoğalabilmektedir (Verméglio & Joliot, 1999). Bu özelliklerinin yanında karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve atmosferik azot (N<sub>2</sub>) fiksasyon yeteneği ile sürdürülebilir biyoteknolojik üretim platformları için umut vaat eden bir mikrobiyal araç

olarak görülmektedir. *C. sphaeroides*, organik asitler ve monosakkaritler gibi ucuz ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak yüksek hücre yoğunluklarına ulaşabilmektedirler (Mackenzie vd., 2007). Endüstriyel ölçekte yürütülecek biyoprosesler, bu durumdan ekonomik açıdan önemli faydalar elde etmektedir.

Bu bakteri üzerine yapılan kapsamlı genetik araştırmalar da elektroporasyon ve konjugasyon gibi tekniklerin DNA transferi için etkili olduğunu göstermektedir (Mackenzie vd., 2007). Sekanslanmış genomu ve transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarının büyük ölçüde aydınlatılması, hedef gen ekspresyonunun kontrollü bir şekilde düzenlenmesine olanak sağlamaktadır.

### 2.7.2.Fiziksel özellikleri

*Rhodopseudomonas sphaeroides* ve ardından *Rhodobacter sphaeroides* olarak bilinen bakteri türü, günümüzde *Cereibacter sphaeroides* olarak adlandırılmakta olup, NCBI taksonomi veritabanında da bu güncel ismiyle yer almaktadır (Shi vd., 2021). *Cereibacter sphaeroides* 2.4.1, filogenetik olarak farklı alfa proteobakterilerin  $\alpha$ -3 mor kükürtsüz bakteriler grubun da yer alır (Tablo 2.7.). *C. sphaeroides* katı gıda atığı ve gıda işleme atık sularından elde edilen biyohidrojen üretebilen gram negatif bir bakteridir (Rodriguez vd., 2016). Hücreler, özellikle karmaşık ortamlarda oldukça değişken morfolojiye sahiptir. Hücreler küreselden ovaldir ve sıklıkla çiftler halinde veya bir boncuk zinciri olarak ortaya çıkar.

**Tablo 2. 7.** *Cereibacter sphaeroides*'in sistematik sınıflandırılması

Alem	Bacteria
Şube	<i>Pseudomonadota</i>
Sınıf	<i>Alphaproteobacteria</i>
Takım	<i>Rhodobacterales</i>
Aile	<i>Paracoccaceae</i>
Cins	<i>Cereibacter</i>
Tür	<i>Cereibacter sphaeroides</i>

*C. sphaeroides* bulundurduğu flagellası sayesinde hareket edebildiği için üreme sıvısında kolaylıkla, karıştırmaya ihtiyacı duyulmadan kalabilmektedir. Aynı zamanda dibe çökmeden üreyebilme yeteneğine sahiptir. Bu sebepten dolayı üretim maliyeti oldukça düşük olmaktadır. Ortamın alkali hale gelmesiyle, genç kültürlerde aktif olarak hareketlilik gösteren hücreler, yaşla birlikte hareketliliğini kaybederler.

Çubuk şeklinde bulunan *C. sphaeroides* aerobik büyümeden, fotoheterotrofik büyümeye geçtiği zaman çubuk şeklinden kokobasile dönüşmektedir. Tek tek hücrelerin boyutu son derece değişkenlik gösterir. Hücrelerin boyutları da değişkendir; kapsülsüz çapları 0,7 ila 4 A arasında farklılık gösterir (Van Niel, 1944). *C. sphaeroides*'in elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 2.30.'da gösterilmektedir (Van Niel, 1944). Kùltürler yaşlandıkça, balçık tabakası oluşumu sebebiyle viskoz hale gelirler.



Şekil 2. 30. *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (Seifert vd., 2012).

Bakterilerin büyüebileceği pH aralığı geniştir ve en az pH 6'dan 8,5'e kadar değişkenlik gösterir. Optimum sıcaklık 29-30°C'de olmalıdır (Van Niel, 1944). Geniş metabolik aktivitelere ve fotosentez, litotrofi, aerobik, anaerobik, fermentatif, fotoheterotrofik, fotolitotrofik solunum dâhil olmak üzere çok çeşitli enerji edinme mekanizmalarına sahiptir (Van Niel, 1944). Böylece farklı çevre koşullarında üremesini kolayca devam ettirebilir.

*C. sphaeroides* gibi anaerobik veya aerobik ortamlar da büyüeyebilen bakteriler yapılarında bulunan pigmentlere göre ortamlarda farklı renkte görünürler. *C. sphaeroides* fotosisteminde, bakteriye rengini veren karotenoidler, sferoiden (SE) ve sferoidenon (SO) içerir. Oksijenin varlığı, karotenoid tiplerini düzenleyerek bakterinin rengini belirler (Yüksel, 2022). Bakteriler aerobik olarak kültürlendiğinde, hücrelerdeki baskın karotenoid SO 'dur ve havaya maruz kalma sırasında renklerini kademeli olarak kırmızı-pembeye dönüştürür (Van Niel, 1944). Bakteriler anaerobik koşullarda çoğaltıldığında, hücrelerde baskın olan karotenoid SE 'dir ve kültürün rengi sarı- kahverengidir (Yelisev vd., 1996). Farklı karbon ve nitrojen kaynakları kullanabilir ve nitrojen kaynakları eksildiği zaman N<sub>2</sub> fiksasyonu yapabilirler (Kars & Alparslan, 2013).

Birçok farklı karbon substratları üzerinde büyüeyebilen ve farklı elektron alıcılarına da sahip olan *C. sphaeroides* uyumlu metabolizmaya sahip olduğu için endüstriyel uygulamalar da çok yönlü görev alan bir bakteridir (Mougiakos vd., 2019). Bu özellikleri *C. sphaeroides*'e birçok özellik katar. Oksijensiz fotosentez, azot ve karbon fiksasyonu ve membran biyoenerjisi gibi metabolik olayların anlaşılmasında model organizmalar olarak kullanılmaktadırlar (Kars & Alparslan, 2020).

### 2.7.3.Genetik özellikleri

*C. sphaeroides* 2.4.1 suşu iki dairesel kromozoma (~ 0.9 Mbp ve ~ 3 Mbp) ve beş ekstra kromozomal plazmite sahiptir (Suwanto & Kaplan, 1992). *C. sphaeroides*'in tüm doğal suşları, en az bir endojen plazmit içerir. Bazı suşların boyutları 42 ile 140 kb arasında değişkenlik gösterebilir. Suşlar, altı farklı plazmit türü taşıyabilmektedir (Suwanto & Kaplan, 1992).

*C. sphaeroides* 2.4.1'in genomik bileşimi üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bakterinin tüm genomu tamamen dizilip yayımlanmıştır (Mougiakos vd., 2019). *C. sphaeroides* 2.4.1'in ilk olarak iki kromozoma, kromozom I (2973 kb) ve kromozom II'ye (911 kb) ve beş ekstra kromozomal replikona (pRS241a (113.6 kb), pRS241b (104 kb), pRS241c (100 kb), pRS241d (99 kb), pRS241e (42 kb)) sahip olduğu gösterilmiştir. *C. sphaeroides*'in zengin genom bileşimi, metabolik karmaşıklığa da yol açmıştır. *C. sphaeroides*'e gen transferi çeşitli şekillerde denenip en etkili yolun konjugasyon veya diparental çiftleşme olduğu sonucuna varılmıştır.

Konjugasyon, *C. sphaeroides*'te DNA transferi için en yaygın kullanılan tekniktir. Transfer, *C. sphaeroides* ile özelleştirilmiş *E. coli* donörü arasında gerçekleşir. Donör ve alıcının katı yüzey üzerinde karıştırılması ve sonrasında alıcının bir antibiyotik direnç markörü ile seçilmesiyle gerçekleştirilen yöntemdir. Transfer fonksiyonu bir yardımcı plazmitten veya konakçı olan *E. coli* S.17-1'den elde edilir (Suwanto & Kaplan, 1992).

*C. sphaeroides* üzerinde heterolog gen ifadeleri veya türler arası gen ifadeleri de çalışılmıştır. Çoğu bakteriyel PNS (mor kükürtsüz) geni, *E. coli*'de ifade edilmiştir. Ek olarak, bir PNS bakterisinden gelen genlerin diğer PNS bakterilerinde ifade edildiği çalışmalar da vardır (Kars & Alparslan, 2020). Genom dizi analizinin yapılmış olması sebebiyle, genetik modifikasyonlar oldukça kolay uygulanabilir (Kars & Alparslan, 2020). Katma değeri yüksek olan, (Hidrojen, 5-aminolevulinik asit, B12 vitamini, Koenzim Q10, Polihidroksibütirat (PHB) vb.) gibi ürünleri doğal olarak sentezleyebilir

(Sasaki vd., 2005). Bir diğ er önemli özelliğ i ise, *E. coli* gibi birçok gram negatif bakterilerin aksine, *C. sphaeroides*'in immün reaksiyonlara sebep olmayış ıdır. *C. sphaeroides* bu özellikleri sayesinde, biyoteknolojik uygulamalarda oldukça kullanılabilir hale gelmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, PNS bakterilerin biyoteknolojik süreçlerde daha çok kullanılacağını göstermektedir. *C. sphaeroides*'in tüm genom sekansının bilinmesi sayesinde, çalışmalarda oldukça sık kullanılan model bakteri haline gelmiştir.

## 2.8.Cereibacter sphaeroides için Kullanılan Vektörler

Bir ekspresyon vektörü, spesifik bir geni bir hedef hücreye sokmak ve ilgili gen ürününü üretmek üzere hücresel mekanizmayı yönlendirmek için kullanılır. İfade yapıları olarak da adlandırılan ekspresyon vektörleri, bir tür plazmittir. Spesifik bir gen, ekspresyon vektörleri kullanılarak konakçı hücreye dahil edilir; burada vektör, hücrelerin transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarını kullanarak transforme edilmiş genin ekspresyonunu kolaylaştırır. Ekspresyon vektörleri, içine bir protein veya RNA'nın sokulduğu bir DNA segmentinden bir gen ürünü üretmek için kullanılır (Huo, 2011).

Bir ekspresyon vektörü, verimli gen ekspresyonuna yol açan güçlendiriciler ve promotör bölgeleri gibi düzenleyici sekanslar içerir. İnsülin benzeri protein konak hücrede ifade edildikten sonra, ürün konak hücre proteinlerinden saflaştırılmalıdır. Bu işlemde, eklenen protein ya bir histidin (His etiketi) ya da başka bir protein ile etiketlenir. Konak hücreye eklenen genin verimli ifadesini elde etmek için, ifade vektörüne aşağıdaki ifade sinyalleri eklenmelidir;

- Güçlü bir promotör
- Güçlü bir sonlandırma kodonu
- Promotör bölgesi ve klonlanmış gen arasında mesafe
- Bir transkripsiyon başlatma dizisi

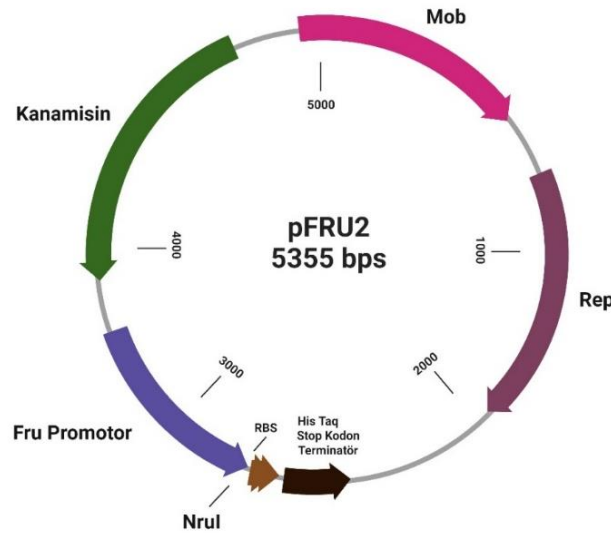
Bir klonlama vektörü, bir konakçı hücrede stabil şekilde muhafaza edilebilen küçük DNA parçasıdır. Klonlama vektörleri, taşıyıcı DNA molekülleri görevini görürler. Klonlanan genin birden çok kopyasını oluştururken hücreleri genleri eklemek için kullanılırlar. Tüm klonlama vektörlerinin dört özelliğ i vardır;

- Taşıdıkları yabancı DNA parçası ile çoğalırlar.

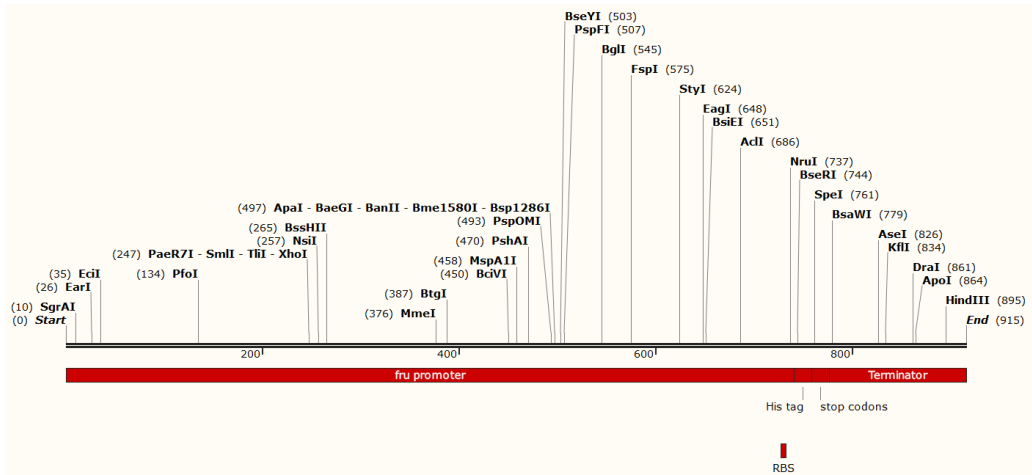
- Vektörde yalnızca bir kez var olan birçok kesim alanı içerirler.
- Konak genomunda normalde bulunmayan antibiyotik direnç genleri şeklinde bir seçim belirteci taşırlar.
- Konakçı hücreden geri alınmaları nispeten kolaydır.

### 2.8.1.pFRU2

pFRU2 vektörü, 5355 baz çifti uzunluğunda bir ekspresyon vektörüdür. Bu vektörde promotor olarak fruktoz promotoru, afinite işareti olarak 6-histidin etiketi, antibiyotik olarak kanamisin bulunmaktadır (Şekil 2.31.). Promotoru indüklenebilir bir promotor olan bu vektörde indüksiyon için fruktoza ihtiyaç vardır (Şekil 2.32.). Aerobik ve anaerobik koşullarda çalışabilen vektör bu özelliği sebebiyle fotosentetik bakterilerde avantaj sağlamaktadır.



Şekil 2. 31. pFRU2 vektör yapısı-Created in BioRender



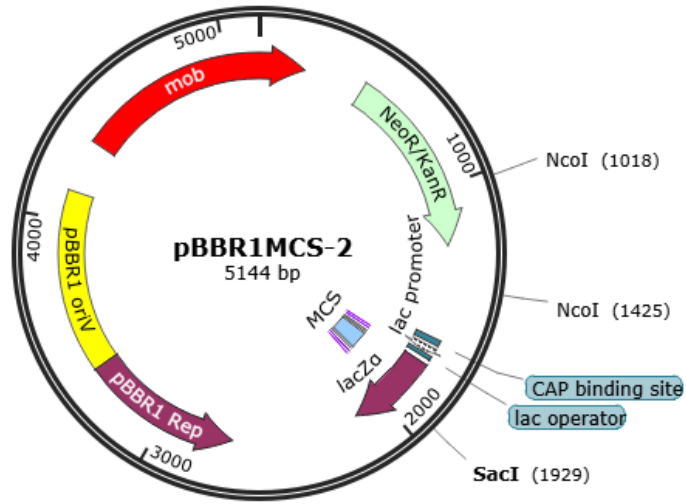
Şekil 2. 32. pFRU2 vektörünün indüklenebilir yapısı

## 2.8.2. pBBR1MCS

pBBR1MCS vektör serisindeki ilk vektör olan pBBR1MCS, bir kloramfenikol dirençli (CmR) plazmittir. Aynı zamanda geniş konakçı aralığı (bhr) olan bir plazmitidir (Obranić vd., 2013a). Pek çok Gram-negatif bakteri doğal olarak kloromfenikol dirençlidir. Bu özelliğe ek olarak vektörün her biri farklı bir antibiyotik seçim markörüne sahip dört plazmit varyantı geliştirilmiştir. Bu plazmitlerin boyutu küçüktür (<5.3 kb) ve lacZa geninde geniş bir çoklu klonlama bölgesine (MCS) sahiptir. Ayrıca bu plazmitler mobilize edilebilirler ve farklı plazmit uyumsuzluk grupları ile uyumluluk gösterebilirler(Obranić vd., 2013a). Tüm bu faydalı özellikler göz önüne alındığı zaman, pBBR1MCS plazmitleri, *Cereibacter sp.*, *Acidithiobacillus sp.*, *Brucella sp.*, *Bartonella bacilliformis*, *Pseudomonas putida* ve *Burkholderia sacchari* gibi farklı bakteri türlerini içeren çeşitli çalışmalarda kullanılabilir. Geliştirilen dört farklı pBBR1MCS varyantı aşağıda verilmiştir.

### 2.8.2.1.pBBR1MCS-2

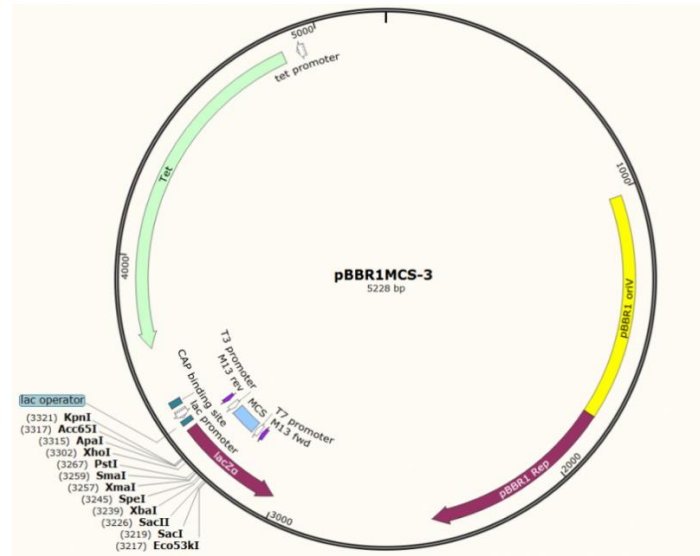
pBBR1MCS serisinden olan pBBR1MCS-2, kanamisine dirençli bir plazmittir (Obranić vd., 2013b). *E. coli* kaynaklı lac promotoruna sahip bir vektördür. Plazmit boyutu 5144 bp'dir (Şekil 2.33.).



Şekil 2. 33. pBBR1MCS-2 yapısı (Obranić vd., 2013b).

### 2.8.2.2.pBBR1MCS-3

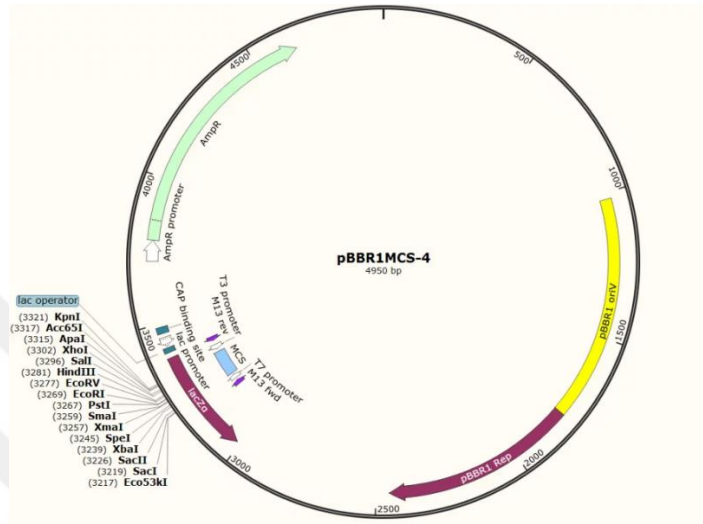
pBBR1MCS serisinden olan pBBR1MCS-3, tetrasikline dirençli bir plazmittir (Obranić vd., 2013b). Lac, T3 veya T7 promotörüne sahip olabilirler. Plazmit boyutu 5228 bp'dir (Şekil 2.34.).



Şekil 2. 34. pBBR1MCS-3 yapısı (Obranić vd., 2013b).

### 2.8.2.3. pBBR1MCS-4

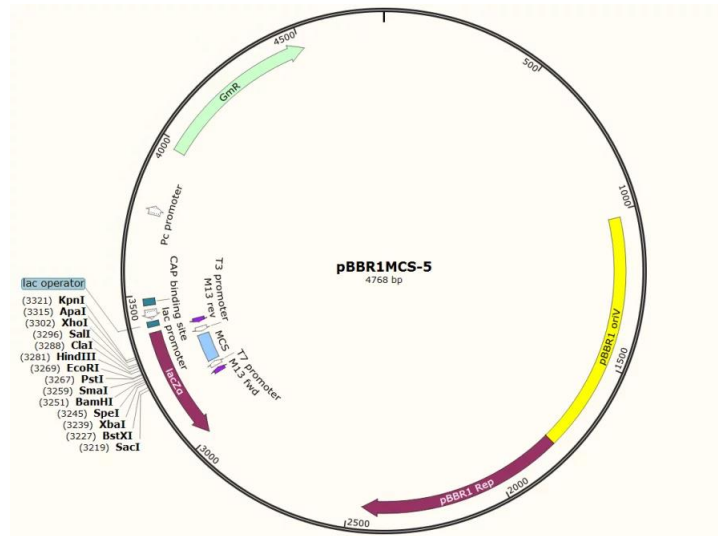
pBBR1MCS serisinden olan pBBR1MCS-4, ampisiline dirençli bir plazmittir (Obranić vd., 2013b). Lac, T3 veya T7 promotörüne sahip olabilirler. Plazmit boyutu 4950 bp'dir (Şekil 2.35.).



Şekil 2. 35. pBBR1MCS-4 yapısı (Obranić vd., 2013b).

### 2.8.2.4. pBBR1MCS-5

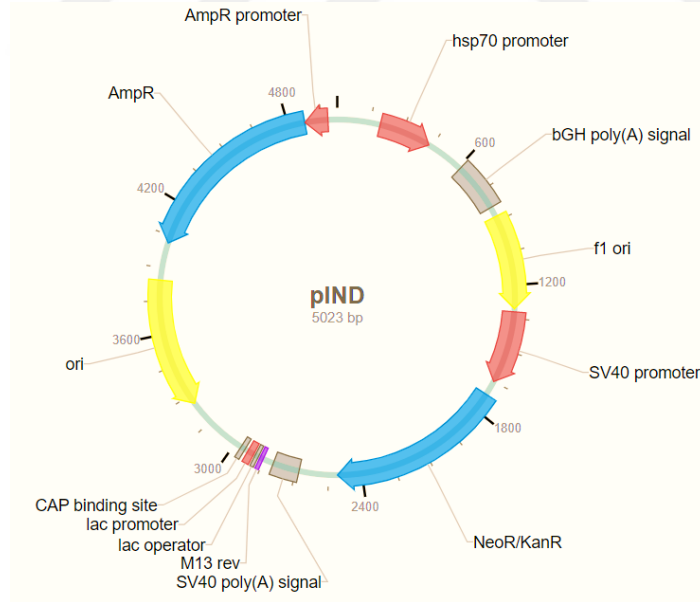
pBBR1MCS serisinden olan pBBR1MCS-5, gentamisin dirençli bir plazmittir (Obranić vd., 2013b). Lac, T3 veya T7 promotörüne sahip olabilirler. Plazmit boyutu 4768 bp'dir (Şekil 2.36.).



Şekil 2. 36. pBBR1MCS-5 yapısı (Obranić vd., 2013b).

### 2.8.3. pIND

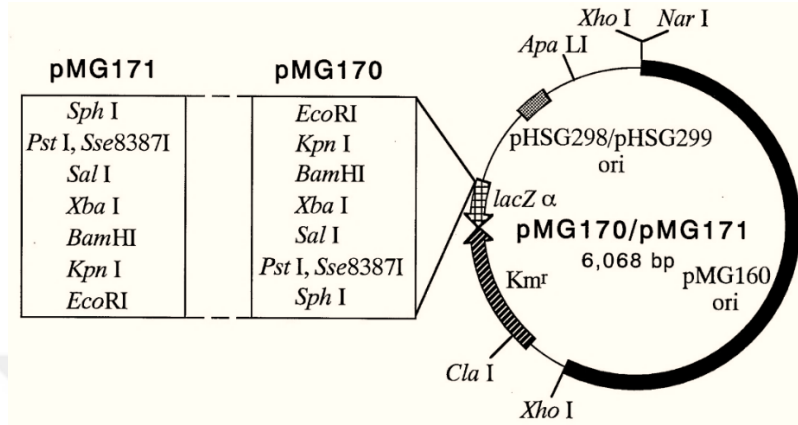
pIND, ampisilin dirençli bir plazmittir. Minimal ısı şoku promotörüne sahiptir (Ind vd., 2009). Plazmit boyutu 5023 bp'dir (Şekil 2.37.).



Şekil 2. 37. pIND yapısı (Ind vd., 2009).

### 2.8.4. pMG170/pMG171

pMG170 ve pMG171 kanamisine dirençli bir plazmitlerdir (Inui vd., 2003b). Bu plazmidlerin her ikisi de 6068 bp uzunluğundadır (Şekil 2.38.).



Şekil 2. 38. pMG170/pMG171 yapısı (Inui vd., 2003b).

## 2.9. *Cereibacter sphaeroides*'de Kullanılan Promotorler

### 2.9.1. fruBKA Operonu Promotoru

fruBKA operonu, fruktoz metabolizmasında rol alan genleri içererek fruktoz varlığında indüklenebilir özellik göstermektedir. Bu özellik sayesinde çevresel şeker varlığına bağlı olarak gen ekspresyonu kontrol edilebilir. *C. sphaeroides*'e özgü bir indüklenebilir ekspresyon vektörünün oluşturulmasında bu promotör kullanılmıştır (Coşkun, 2017). FruBKA promotörü ile bu vektörde hedef genlerin ekspresyonunu fruktoz varlığında indüklenebilmektedir. Ek olarak protein saflaştırma işlemlerini kolaylaştırmak için vektöre altı histidin aminoasiti içeren bir etiket bölgesi de dahil edilmiştir. Bu promotörün kullanılması, *C. sphaeroides*'te gen ekspresyonunun hassas bir şekilde ayarlanmasını sağlayarak bakterinin metabolik esnekliği ve adaptasyon yeteneğini desteklemektedir.

### 2.9.2. Cer Operonu Promotoru

CerM ve CerN proteinleri, *C. sphaeroides*'te quorum sensing (hücre yoğunluğuna bağlı iletişim) sistemini düzenlemektedir. CerN, LuxR benzeri bir transkripsiyonel

düzenleyici olarak çalışırken CerM'in aktivitesini dengelemektedir. Bakterinin çevresel koşullara adaptasyonunda bu dinamik çok önemlidir. Quorum algılama mekanizması, CerM ve CerN proteinlerini kodlayan genlerin promotor bölgeleri tarafından yürütülür (Hernández-Valle vd., 2024). Bu promotorlar, CerM ve CerN proteinlerinin sentezi üzerinde kontrol sağlamaktadır. Bu, bakterinin çevresel sinyallere uygun şekilde tepki vermesine yardımcı olmaktadır.

### 2.9.3. puf Promotoru

*C. sphaeroides*'in protein ekspresyonu için geliştirilen BioBrick™ uyumlu vektör sistemi, bakterinin puf promotorunu kullanarak etkili bir ekspresyon ortamı sağlamaktadır. Bu sistemde, DsRed olarak bilinen kırmızı floresan protein, puf promotorunun çeşitli bölümleriyle kontrol edilen ekspresyon seviyelerini değerlendirmek için kullanılmıştır (Tikh vd., 2014). Heterolog protein ekspresyonunda, puf promotorunun 3' ucunun önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir. Bu bölgelerin kullanılması hem aerobik hem de anaerobik koşullarda yüksek DsRed üretimi sağlamıştır. Bu sonuçlar, *C. sphaeroides*'te karmaşık biyomoleküllerin üretimi için bir temel sağlamaktadır.

## 2.10. *Cereibacter sphaeroides*'de Kullanılan Transkripsiyon Terminatörleri

### 2.10.1.BBa\_J95029

iGEM (International Genetically Engineered Machine) Parts Registry' nde kayıtlı olan BBa\_J95029, transkripsiyonu tamamlamak için kullanılan bir terminatördür. Bu bileşen, ardışık iki terminale sahip bir çift terminal sistemi sağlamaktadır. BBa\_J95029, özellikle BBa\_B0012 ve BBa\_B0011 terminatörlerinin kombinasyonu kullanılarak oluşturulmuştur. Gen ekspresyonu, bu iki terminatör sistemi tarafından etkili bir şekilde kontrol edilerek istenmeyen gen etkileşimleri bu şekilde önlenmektedir. Çift terminatör yapısının bir sonucu olarak, genetik mühendislik ve sentetik biyolojide oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu terminatör sayesinde, transkripsiyonun sonlanmasında yüksek verimlilik sağlanarak genetik materyalin güvenli ve güvenilir bir şekilde ekspresyonu gerçekleştirilmektedir. İfade edilen sinyal dizisi aşağıda verilmektedir.

5'- GATCCGGTGGATGACCTTTTGAATGACCTTTAATAGATTATATTACT  
AATTAATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTCA  
CAAACGGTTTACAAGCATAAAGCTTGCTCAATCAATCACC- 3'

### 2.10.2. SV40 (Simian Virus 40) poly(A) sinyali

SV40 poly(A) sinyali, Simian Virüs 40 (SV40)'ın 3' uç transkripsiyon sonlandırmasını sağlayan bir DNA dizisidir. Bu dizi mRNA'nın poliadenilasyonunu kontrol etmektedir. mRNA'nın stabilitesini artıran bu sinyal, aynı zamanda translasyon verimliliğini de artırmaktadır. SV40 poly(A) sinyali erken veya geç durumda olabilmektedir. Geç sinyal, transkripsiyon sonlandırmada daha iyi performans göstermektedir. İkincil RNA yapıları da bu sinyalin etkinliğinde önemli bir rol oynamaktadır. SV40 poly(A) sinyali, gen mühendisliği ve sentetik biyoloji uygulamalarında ökaryotik hücrelerde yüksek gen ekspresyonu sağlamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu sinyalin doğru anlaşılması, genetik mühendislik ve biyoteknolojide daha etkili ve verimli uygulamaların geliştirilmesine izin vermektedir. İfade edilen sinyal dizisi aşağıda verilmektedir.

5'- AATAAAA- 3'

### 2.10.3. Bovine growth hormone (bGH) poly(A) sinyali

Ökaryotik gen ekspresyon vektörlerinde sıklıkla kullanılan bir transkripsiyon sonlandırma ve mRNA stabilizasyon sinyalidir. Sığıır büyüme hormonu (bGH) geninin doğal polyadenilasyon bölgesinden bGH poly(A) sinyali elde edilmektedir. Bu sinyal, mRNA'nın 3' ucunda poliadenilasyon gerçekleşmesini sağlamaktadır. Hedef proteinin yüksek düzeyde üretimine katkıda bulunan bu sinyal, mRNA'nın hücre içindeki stabilitesini artırarak translasyon verimliliğini artırmaktadır. Ökaryotik ekspresyon sistemlerinde yaygın olarak kullanılan bGH poly(A) sinyali, güçlü promotörlerle birlikte çalıştırıldığında rekombinant protein üretiminde etkili bir şekilde kullanılabilir. Genetik mühendislik uygulamalarında, özellikle memeli hücrelerinde gen ekspresyonunu optimize etmek için bu özellikleri sayesinde tercih edilmektedir. İfade edilen sinyal dizisi aşağıda verilmektedir.

5'- AAUAAA- 3'

## 2.11. *Cereibacter sphaeroides* Gen ekspresyon Çalışmaları

Rekombinant proteinler, biyoloji ve biyotıpta önemli bir rol oynamaktadır. Şu anda, *E. coli* ve maya, rekombinant proteinlerin üretimi için en yaygın kullanılan heterolog ekspresyon sistemleridir. Bununla birlikte, *E. coli* ve maya sistemlerinin zar proteinlerini üretme kabiliyeti sınırlıdır (Cheng vd., 2015).

Bir ifade sistemi olarak, *C. sphaeroides*'in bazı benzersiz avantajları vardır. İlk olarak, bu bakteri, aerobik ve aerobik solunum, fermantasyon ve anaerobik fotosentez dahil olmak üzere birçok büyüme moduna sahiptir ve dünya çapında yaygınlık göstermektedir. İkincisi, bu bakteri oda sıcaklığında, hava geçirmez bir kaptaki on yıldan fazla yaşayabilir. En önemlisi olarak, *C. sphaeroides*'te eksprese edilen heterolog proteinler gerçek zamanlı ve hızlı bir şekilde değerlendirilebilirler. Tüm bu avantajlar, *C. sphaeroides*'in mükemmel bir protein ekspresyon sistemi olabileceğini kesin olarak göstermektedir.

### 2.7.1. Membran proteininin heterolog ekspresyonu

L. Cheng ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *C. sphaeroides* sistemi, membran proteinlerini eksprese etmek için kullanılmıştır. Bu sistemin protein ifade kapasitesini geliştirmek için, *C. sphaeroides* LH2 kompleksinin bir araya gelmesinde çok önemli bir rol oynayan *Puc* geni aşırı ifade edilmiştir.

*Puc* geninin silinmesi, LH2 kompleksinin verimsiz oluşumuna ve heterolog protein ekspresyonunun başarısızlığına neden olur, bu da *PucC* proteininin heterolog protein ekspresyonu için temel bir element olabileceğini düşündürür. Ancak, *C. sphaeroides* ile heterolog protein ekspresyonu arasındaki ilişkiye odaklanan bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu yüzden bu çalışmada, *C. sphaeroides*'te *pucC* geninin aşırı eksprese edilmesiyle heterolog bir proteinin ekspresyon seviyesini artırma üzerine odaklanılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda *pucC* aşırı ekspresyonunun, *C. sphaeroides* ekspresyon sistemi üzerindeki heterolog protein ifade seviyelerini artırabileceğini göstermektedir (Cheng vd., 2015).

### 2.7.2. Zar taşıma proteinlerinin heterolog ekspresyonu

Feng Qi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; sırasıyla *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium glutamicum* organizmalarından alınan üç zar taşıma proteini (AcPcaK, KpPcaK ve CgPcaK), CoQ10 sentezinin gerekli bir ara ürünü olan hücre dışı 4-hidroksibenzoik asidin (4HBA) alımını arttırmak için, *C. sphaeroides* GY-2'de heterolog olarak ayrı ayrı ifade edilmiştir. Oldukça redoks aktif bir bileşik olan Koenzim Q10 (CoQ10); ilaç, gıda ve sağlık endüstrilerindeki önemli uygulamaları sebebiyle artan bir ilgi görmektedir. CoQ10 biyosentezinde yer alan metabolik yollar bilinmesine rağmen, doğal üretici *C. sphaeroides*'te CoQ10 üretimini arttırmak için mühendislik stratejilerinin geliştirilmesine ilişkin çok az rapor bulunmaktadır. Bu doğal üreticinin CoQ10 üretimi üzerindeki etkisini ortaya çıkarmak için deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Qi vd., 2017).

Yapılan bu çalışma, CoQ10 üretimini iyileştirmek için kullanılan tekniği doğrulamakta ve daha fazla iyileştirme için çalışma alanlarını genişletmektedir. Kullanılan stratejinin, CoQ10'un biyoteknolojik üretimini artırmada etkili olduğu kanıtlanmış ve bu nedenle endüstriyel uygulamalar da dahil olmak üzere daha fazla gelişme vaat etmektedir.

### 2.7.3. Glutamil-tRNA redüktaz geninin heterolog ekspresyonu

Gökhan Kars ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; C4 yoluna ek olarak ikinci bir 5-ALA üretim yolu (C5 yolu), eksik *glutamil-tRNA redüktaz* geninin *C. sphaeroides*'te heterolog ekspresyonu ile sağlanmıştır (Kars & and Alparslan, 2014). Biyoteknolojide değerli bir ürün olarak bilinen 5-ALA tetrapirrolporfirin, B12 vitamini ve klorofilin öncüsüdür. Özellikle bir antikanser ajanı, bir bitki büyüme uyarıcısı ve biyolojik olarak parçalanabilen bir herbisit ve pestisit olarak kullanılabilir. Özellikle bir antikanser ajanı, bir bitki büyüme uyarıcısı ve biyolojik olarak parçalanabilen bir herbisit ve pestisit olarak kullanılabilir.

5-aminolevulinik asidin (5-ALA) sentez yolları, süksinil-CoA ve glisini (C4 yolu) veya glutamatı (C5 yolu) kullanır. *C. sphaeroides* C4 yolu ile 5 ALA sentezlese de glutamil-tRNA redüktazın dışında, C-5 yolu enzimlerini kodlayan genlere de sahiptir. *C. sphaeroides*'in yapısında bulunmayan Glutamil-tRNA redüktaz geni, *Rhodospirillum rubrum*'dan klonlanmış ve *C. sphaeroides*'te ifade edilmiştir. Böylece C5 yolu, gerekli tüm genleri birleştirdikten sonra işlevsel hale gelmiştir. Böylece, yeni bir fikir uygulanarak; daha fazla 5-ALA üreten yeni ve benzersiz bir bakteri türü geliştirilmiştir.

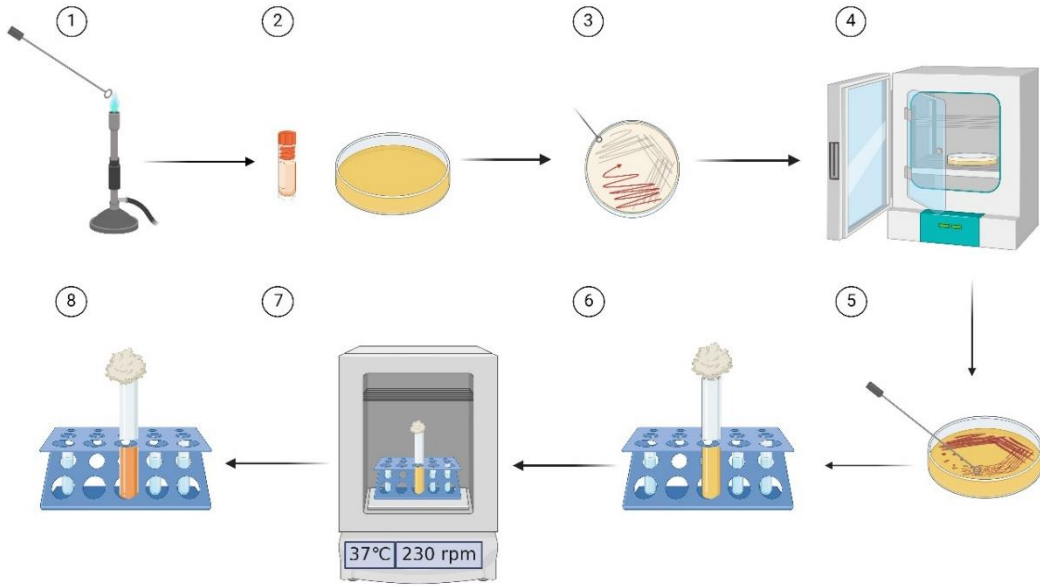
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, kırmızı floresan proteinin (RFP) ekspresyonu için bakteriyel klonlama, transformasyon, konjugasyon ve ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, genetik materyal uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak indüklenebilir bir ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Rekombinant plazmitin doğruluğu, agaroz jel elektroforezi ve DNA sekanslama yöntemleriyle doğrulanmıştır. Daha sonra, rekombinant plazmit, kimyasal yöntemle *E. coli* hücrelerine aktarılmış ve seçici antibiyotik içeren medyumlarda çoğaltılmıştır. Gen ekspresyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla, konjugasyon yöntemiyle plazmit *C. sphaeroides* suşuna transfer edilmiştir. Kullanılan malzemeler, yöntemler ve protokoller aşağıda detaylandırılmıştır.

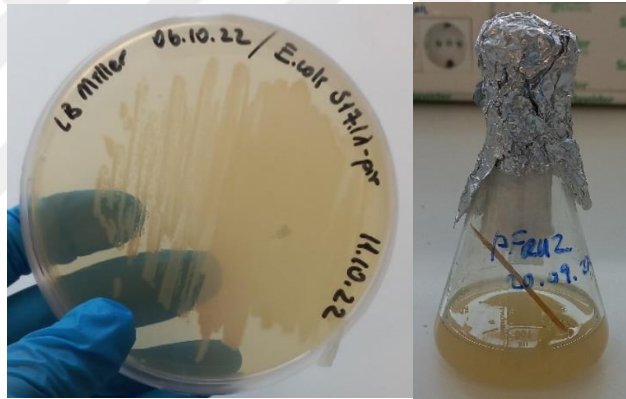
#### 3.1. Klasik Klonlama Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması

##### 3.1.1. pFRU2' nin Klonlama İşlemi İçin Hazırlanışı

Bu çalışmada, daha önce -80°C'de gliserol stoklarında muhafaza edilen pFRU2 vektörü kullanıldı. Çalışma öncesinde, plazmitin yeniden aktifleştirilmesi amacıyla uygun şartlar altında saklandığı gliserol stoklarından çalışmaya başlandı. Bu amaçla, stok kültür, %20 gliserol içeren -80°C saklama ortamından çıkarılarak buz üzerinde çözdürülüp steril çalışma koşullarında LB (Luria-Bertani) agar plaklarına ekildi. Plakalar, kanamisin (50 µg/mL) içeren seçici ortamda, 37°C'de 16-18 saat boyunca inkübe edilerek tek kolonilerin büyümesi sağlandı. İnkübasyon sonrasında elde edilen tek kolonilerden biri seçilip LB sıvı besiyeri içerisinde, kanamisin varlığında, 37°C'de 200 rpm hızında çalkalamalı inkübasyona alındı (Şekil 3.1.). İnkübasyonun ardından kültür, plazmit izolasyonu için uygun hale getirildi (Şekil 3.2.).



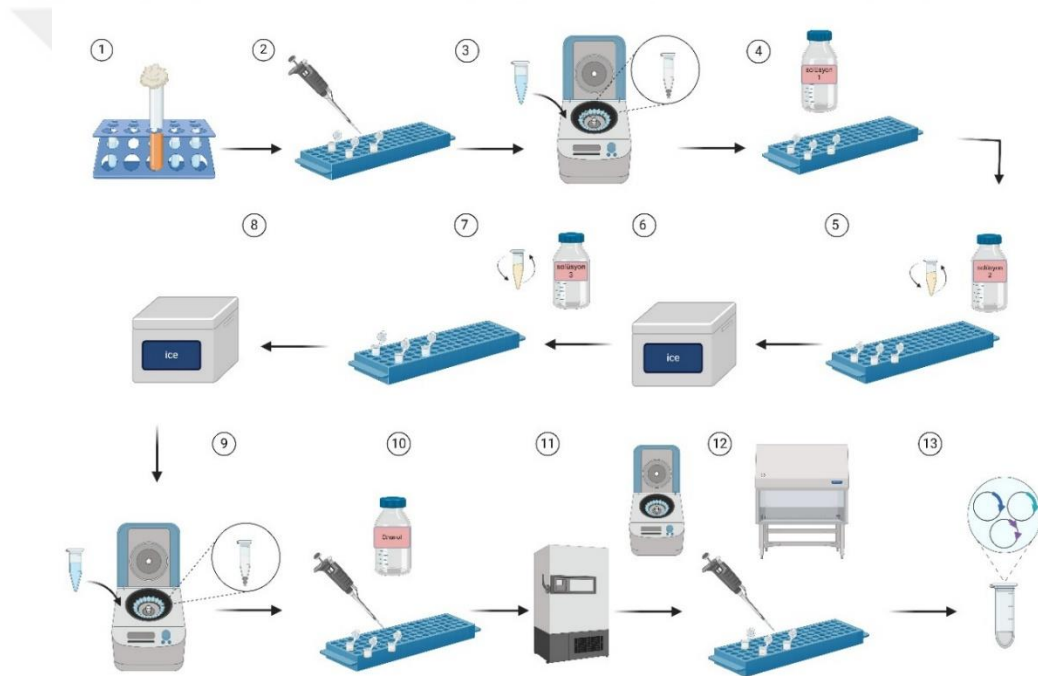
Şekil 3. 1.-80°C'den bakteri aktiveleme süreci-Created in BioRender



Şekil 3. 2. pFRU2 plazmidini içeren *E. coli S17-1 λpir*' in stoktan aktive edilmesi

- 1) Bir gün önceden sıvı besiyerinde kültüre edilmiş bakteriden 1,5 ml ependorfa alındı ve 5 dk 6500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- 2) 300 µl Solüsyon I eklenerek pelet resuspe edildi.
- 3) 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 4) Üzerine 300 µl Solüsyon II eklendi. Ependorf hızlı bir şekilde 10 kez ters-düz edildi (süspansiyon bu aşamada açık ve viskoz bir görünümdedir).
- 5) 5 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 6) Üzerine 300 µl Solüsyon III eklendi. Ependorf hızlı bir şekilde 10 kez ters-düz edildi.

- 7) 15 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 8) 13000 rpm, +4°C' de 15 dk santrifüj edildi.
- 9) Süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir ependorfa alındı (pelete dokunmamak önemlidir). Bu aşamada aktarılan süpernatant hacmi ölçüldü.
- 10) Süpernatant hacminin 2 katı soğuk EtOH eklendi.
- 11) -20°C'de 10 dk inkübe edildi.
- 12) 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- 13) Pelet 10 dk laminar kabin içerisinde kurutulduktan sonra 50 µl steril suda çözündürülerek -20°C' de stoklandı.



Şekil 3. 3. Plazmit izolasyon süreci-Created in BioRender

Plazmit izolasyonunun ardından, DNA'nın saflığını, bütünlüğünü ve konsantrasyonunu değerlendirmek amacıyla kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi. Bu kapsamda, izole edilen DNA'nın boyutunu ve bütünlüğünü analiz etmek için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Saflık ve konsantrasyon ölçümleri ise spektrofotometrik yöntemle (Nanodrop cihazı ile) yapıldı.

### 3.1.1.1. Agaroz Jel Elektrofözezi

İzole edilen plazmit DNA, agaroz jel elektrofözezinde yürütölerek görölntölendi. Bunun için %1'lik (w/v) agaroz jel hazırlandı. Jelin hazır edilmesi esnasında 25x20 cm boyutlarında jel tankı kullanıldı. Jel hazırlığı için 1 g agaroz, 100 ml 1X TAE (Tris-asetat-EDTA) tamponu (0,04 M Tris, 0,04 M asetat ve 0,001 M EDTA, pH 8) içinde çölzölerek mikrodalga fırında eritildi. Elde edilen karışım yaklaşık 60°C'ye kadar soğutuldu. İşlem sonunda jel tanka ilave edildi ve soğumaya bırakıldı. İzolatların takibini sağlamak için 3 µl Novel Juice (LD001-1000) yükleme boyası, 5 µl hacimdeki izolatlar ile karıştırıldı. İzolasyon ürünlerinin gen fragman boyunu anlamak amacıyla örneklerden önceki kuyucuğa Gene Ruler DNA Ladder Mix (SM0333) yüklendi. DNA örnekleri, elektrofözez tankının negatif (-) yüklü ucuna yüklendikten sonra, elektrik akımı uygulanmasıyla pozitif (+) kutba doğru, konsantrasyon ve molekül büyüklüklerine bağlı olarak hareket etti. Örneklerin bant uzunlukları, referans olarak kullanılan DNA merdiveni ile karşılaştırılarak belirlendi. Jel elektrofözezi, 90 V elektrik akımıyla 60 dakika boyunca gerçekleştirildi. BlooKTM LED Transilluminator görüntölleme cihazı ile jeldeki bantlar UV ışığı altında görölntölendi.

### 3.1.1.2. Konsantrasyon Ölçümü

İzole edilen plazmit DNA'ların konsantrasyonlarını ve saflıklarını belirlemek için nanodrop cihazı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

- 1) Bilgisayardaki cihaz programından dsDNA concentration and purity-320 nm protokolü seçildi.
- 2) Plate üzerine örnekler iki kontrollü şekilde konuldu. Plate alkolle temizlendi. İlk 2 kuyucuğa blank olarak 2 µl ultra saf su konuldu.
- 3) Alt kuyucuklara da paralel olarak, 2'şer µl plazmit örnekleri konuldu.
- 4) Cihazda okuma gerçekleştirildi.

### 3.1.1.3. *NruI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim

Klonlama işlemi için pFRU2 vektörünün uygun restriksiyon bölgelerinden kesilmesi gereklidir. Bu amaçla vektör, *NruI* (Thermo Scientific-er0111) restriksiyon enzimi kullanılarak kesildi. Enzim protokolünde kullanılması gereken DNA miktarının 0.1-0.5 µg/mL olarak belirtilmesi üzerine komponentlerin miktar hesaplamaları yapıldı. Kesim işlemi için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.1). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C’ de 16 saat boyunca inkübe edildi. İşlem sonunda agaroz jel elektroforezi ve konsantrasyon ölçümü ile kesim kalitesi kontrol edildi.

**Tablo 3. 1.** *NruI* enzimi kesim komponentleri

İçerik	Miktar (µL)
10X Tampon O	2
<i>NruI</i>	1
Plazmit DNA	17
Toplam	20

### 3.1.1.4. Kesilen plazmit DNA’nın Defosforilasyonu

*NruI* enzimi ile lineer hale getirilmiş vektörün, ligasyon esnasında kendi kendine ligasyonunu önlemek için alkaline fosfotaz (Thermo Scientific- EF0654) enzimi kullanılarak defosforile edildi. Ölçülen konsantrasyon dikkate alınarak, enzim protokolünde belirtildiği üzere komponentlerin gerekli hesaplamaları yapıldı. İşlem için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.2.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C’ de 10 dk, inaktivasyon için de 75°C’de 5 dk olmak üzere ısı bloğunda inkübe edildi.

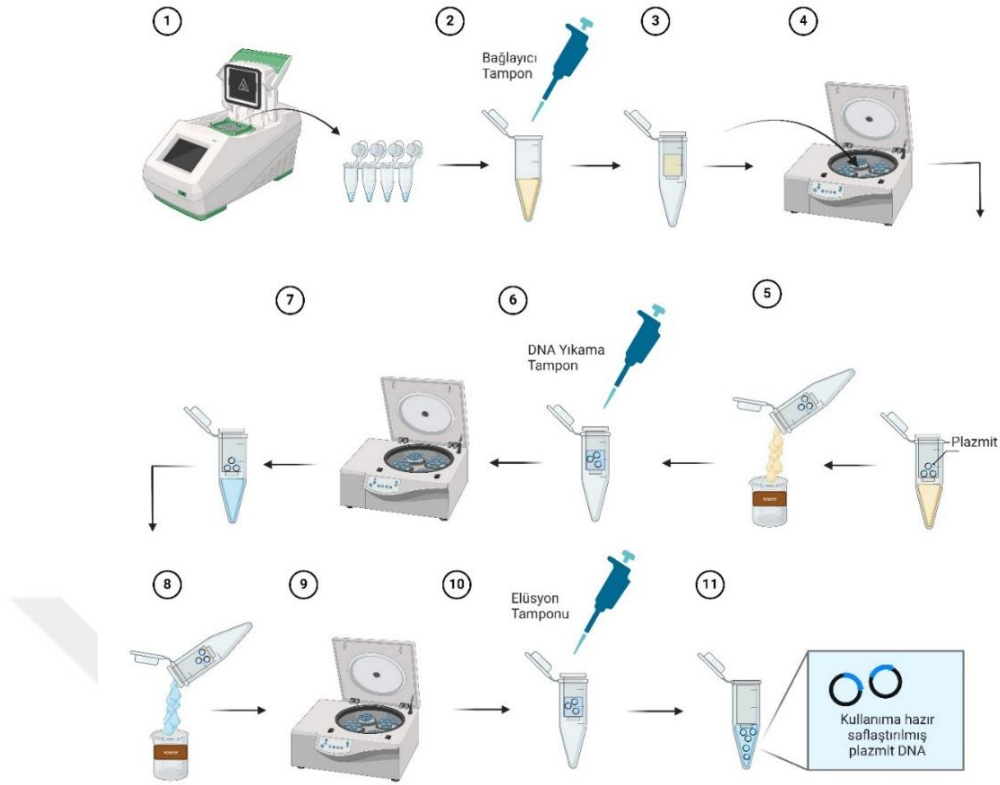
**Tablo 3. 2.**Alkaline fosfotaz enzim komponentleri

<b>İçerik</b>	<b>Miktar (µL)</b>
10X FastAP™ Tampon	2
FastAP™ Alkaline Fosfotaz	1
Plazmit DNA	1
dH <sub>2</sub> O	16
Toplam	20

### 3.1.1.5. pFRU2 Plazmit DNA Purifikasyonu

Defosforile edilen plazmit, Thermo Scientific Gen PCR Purification Kit-Gel Extraction Kit (K0692) ile purifie edildi (Şekil 3.3.). Purifikasyon aşaması kit prosedüründe belirtildiği üzere aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

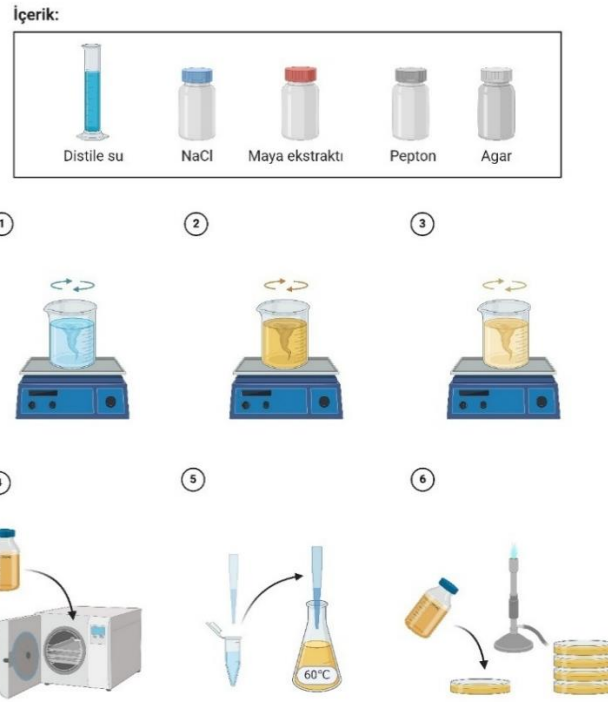
- 1) DNA örneğine 1:1 oranında Bağlayıcı Tampon eklendi. Pipetaj yapılarak tamamen karıştırıldı.
- 2) Oluşan karışımın tamamı nazik bir şekilde kolona aktarıldı.1 dk 12000 G’de santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı kısım atıldı.
- 3) Kolona 700 µl Yıkama Tamponu eklendi. 1 dk 12000 G’de santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı kısım atıldı.
- 4) Yıkama Tamponunun kalıntılarından tamamen kurtulmak için 1 dk 12000 G’ de santrifüj edildi.
- 5) Kolon 1,5 ml ‘lik steril ependorfa alındı. Üzerine nazik bir şekilde 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi. 1 dk 12000 G’de santrifüj edildi. Kolon atılıp ürün -20°C’ de stoklandı.



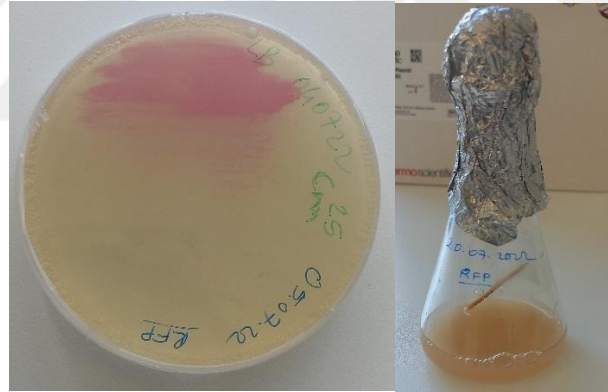
Şekil 3. 4. Plazmit purifikasyon süreci-Created in BioRender

### 3.1.2. RFP Geninin Klonlama İşlemi İçin Hazırlanışı

Klonlama çalışmalarında, kullanılacak olan konakçı *E. Coli* suşlarının büyütülmesi ve çoğaltılması için Luria-Bertani (LB) besiyeri kullanıldı. LB besiyeri, bakterilerin optimal büyümesini sağlayan ve genetik çalışmalar için sıklıkla tercih edilen bir ortamdır. Besiyerinin temel bileşenleri ve hazırlık süreci aşağıda görselleştirilmiştir (Şekil 3.4.) Besiyeri 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. RFP plazmiti içeren *E. coli* suşları, -80°C’den çıkarıldıktan sonra çözündürülerek taze hazırlanmış antibiyotik içeren katı LB plakalarına, bir gece sonrasında da sıvı LB besiyerine inoküle edildi (Şekil 3.5.).



Şekil 3. 5. LB hazırlama süreci-Created in BioRender

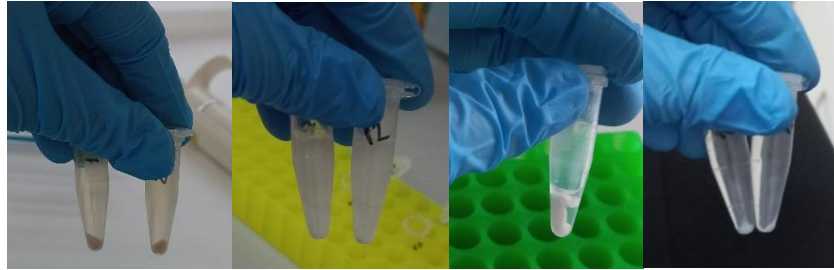


Şekil 3. 6. pSB1C3-BBa\_J04450 plazmitini içeren *E. coli* S17-1 *λpir*' in stoktan aktifleştirilmesi

### 3.1.2.1. pSB1C3-BBa\_J04450 Plazmit İzolasyonu

Thermo Scientific – GeneJet Plazmit MiniPrep kiti kullanılarak inoküle edilen kültürden izolasyon yapıldı. İlk olarak bakteri toplaması gerçekleştirildi. 1.5 µl'lik ependorf tüplere 3 kez bakteri kültürü konularak (set aralarında 2 dk 8000 rpm de santrifüj) toplam 4.5 ml kültür kullanıldı. Prosedür, firmanın önerdiği protokol çerçevesinde aşağıdaki gibi yapıldı (Şekil 3.6.).

- 1) 250 µl Yeniden Süspansiyon Solüsyonu (Resuspension Solution) ile hücre peleti süspanse edildi. Tamamen süspanse olması için vorteks ya da pipetaj uygulandı.
- 2) 250 µl Lizis Solüsyon (Lysis Solution) eklendi. Solüsyon vizkoz ve hafif açık berrak hale gelene kadar 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı.
- 3) 350 µl Nötralizasyon Solüsyonu (Neutralization Solution) eklendi. 4-6 kez alt üst edilerek karıştırıldı.
- 4) Hücre enkazı ve kromozomal DNA'yı peletlemek amacıyla numuneler, 5 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüj edildi.
- 5) Süpernatant spin kolona transfer edildi.
- 6) 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken toplanan sıvı kısım döküldü.
- 7) 500 µl Yıkama Solüsyonu (Wash Solution) eklendi. 30-60 saniye 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken toplanan sıvı kısım döküldü.
- 8) 7. adım tekrar edildi.
- 9) Yıkama Solüsyonunun kalıntılarından kurtulmak için 1 dk santrifüj edildi.
- 10) Spin kolon 1.5'luk ependorf tüpe konuldu. Plazmit DNA'nın spin kolon membranından elute edilmesi için 50 µl Elüsyon Tamponu (Elution Buffer) eklendi.
- 11) 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dk da 12000 g'de santrifüj edildi.
- 12) Spin kolon atıldı ve saflaştırılmış plazmit DNA, ependorf tüpe konularak -20°C'de depo edildi. İzole edilen plazmit DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları, agaroz jel elektroforezi ve konsantrasyon ölçümü ile kontrol edildi.



Şekil 3. 7. pSB1C3-BBa\_J04450 plazmit izolasyon aşamaları

### 3.1.2.2. Primer Tasarımı ve Validasyonu

Bu çalışmada, kırmızı floresan proteini (RFP) kodlayan genin amplifikasyonu, (PCR) yöntemiyle gerçekleştirildi. İzole edilen plazmit, PCR ile çoğaltılarak RFP geni elde edildi ve klonlama öncesi hazırlıklara başlandı.

Amplifikasyondan önce primer tasarımı, NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan hedef genin dizisini kullanarak oluşturuldu. Bu aşamada Primer3 olarak da bilinen primer tasarım programı kullanıldı. Tasarlanan primerler, PCR işlemi sırasında kullanıldı. Tasarımı yapılan primerler firmaya gönderilerek sentezletirildi. Primerlere ait bilgiler Tablo 3.3'te belirtilmektedir.

**Tablo 3.3.** Tasarlanan primerler

Primerin Adı	Nükleotit Dizisi	Tm (°C)	GC Oranı (%)	Uzunluk (bp)
RFP Sol Primer	5'-ATGGCTTCCTCCGAAGACGT-3'	50.25	60	20
RFP Sağ Primer	5'-TTAAGCACCGGTGGAGTGAC-3'	50.60	58	20

### 3.1.2.3. RFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu

PCR, DNA'nın spesifik bir bölgesinin DNA polimeraz enzimi yardımıyla çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu işlem, hızlı sıcaklık değişiklikleriyle gerçekleştirilen döngülerden oluşur. PCR döngüsü üç temel aşamadan meydana gelir:

- Denatürasyon: Kalıp DNA zincirlerinin birbirinden ayrıldığı bu aşama, 95°C'de gerçekleştirilir.
- Bağlanma (Annealing): Kalıp DNA'nın ayrılmış zincirlerine, çoğaltılması hedeflenen gen bölgesine özgü primerler bağlanır. Bu aşama primerlerin tasarımına bağlı olarak genellikle 50-65°C arasında gerçekleştirilir.
- Uzama (Extension): DNA polimeraz enzimi, bağlanan primerleri uzatarak tamamlayıcı DNA zincirlerini sentezler. Bu işlem 72°C'de yapılır ve zincir uzatma hedeflenen gen bölgesine bağlı olarak farklı sürelerde tamamlanır.

Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Thermo Scientific- Pfu DNA Polimeraz-EP0571) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Çalışmada, izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. Tasarlanan primerlerin etkinliği ve spesifikliği

doğrulandıktan sonra optimize edilen koşullarda (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5) reaksiyon gerçekleştirildi.

**Tablo 3. 4.**PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,5
10X Pfu Tampon MgSO <sub>4</sub> ile	2,5
Primer R (10 pmol/µl)	1
Primer L (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	1
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	1
Toplam	25

**Tablo 3. 5.**PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

#### 3.1.2.4. Amplifiye Edilen RFP Geninin Purifikasyonu

Agaroz jel elektroforezi kullanılarak amplifikasyon ürününün kalitesi değerlendirildikten sonra, Thermo Scientific Gen PCR Purification Kit-Gel Extraction Kit (K0692) ile purifie edildi. Purifikasyon aşaması kit prosedüründe belirtildiği üzere aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- 1) PCR örneğine 1:1 oranında Bağlayıcı Tampon eklendi. Pipetaj yapılarak tamamen karıştırıldı.
- 2) Oluşan karışımın tamamı nazik bir şekilde kolona aktarıldı.1 dk 12000 G'de santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı kısım atıldı.

- 3) Kolona 700 µl Yıkama Tamponu eklendi. 1 dk 12000 G'de santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı kısım atıldı.
- 4) Yıkama Tamponunun kalıntılarında tamamen kurtulmak için 1 dk 12000 G' de santrifüj edildi.
- 5) Kolon 1,5 ml 'lik steril ependorfa alındı. Üzerine nazik bir şekilde 50 µl Elüsyon Tampon eklendi. 1 dk 12000 G'de santrifüj edildi. Kolon atılıp ürün -20°C' de stoklandı.
- 6) Fosforilleme aşaması öncesi PCR ürünlerinin konsantrasyon ve saflığını belirlemek için, nanodrop cihazı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

### 3.1.2.5. Purifie Edilen RFP Geninin Fosforillenmesi

PCR ürünleri, ligasyonda kullanılmak üzere T4 Polinükleotid kinaz (PNK) (Thermo Scientific-EP0602) enzimi ile fosforile edildi. Konsantrasyon dikkate alınarak, enzim protokolünde belirtildiği üzere komponentlerin gerekli hesaplamaları yapıldı. İşlem için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.6.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C' de 20 dk, inaktivasyon için de 75°C'de 10 dk olmak üzere ısı bloğunda inkübe edildi.

**Tablo 3. 6.**T4 Polinükleotid kinaz enzim komponentleri

İçerik	Miktar (µL)
10X Tampon A	2
T4 Polinükleotid kinaz	1
PCR ürünü (1-20 pmol)	15
ATP (10 µM)	2
Toplam	20

### 3.1.2.6. Fosforillenen RFP Geninin Purifikasyonu

Fosforillenen PCR ürünleri, Thermo Scientific Gen PCR Purification Kit-Gel Extraction Kit (K0692) ile purifie edildi. Purifikasyon aşaması kit prosedüründe belirtildiği üzere aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

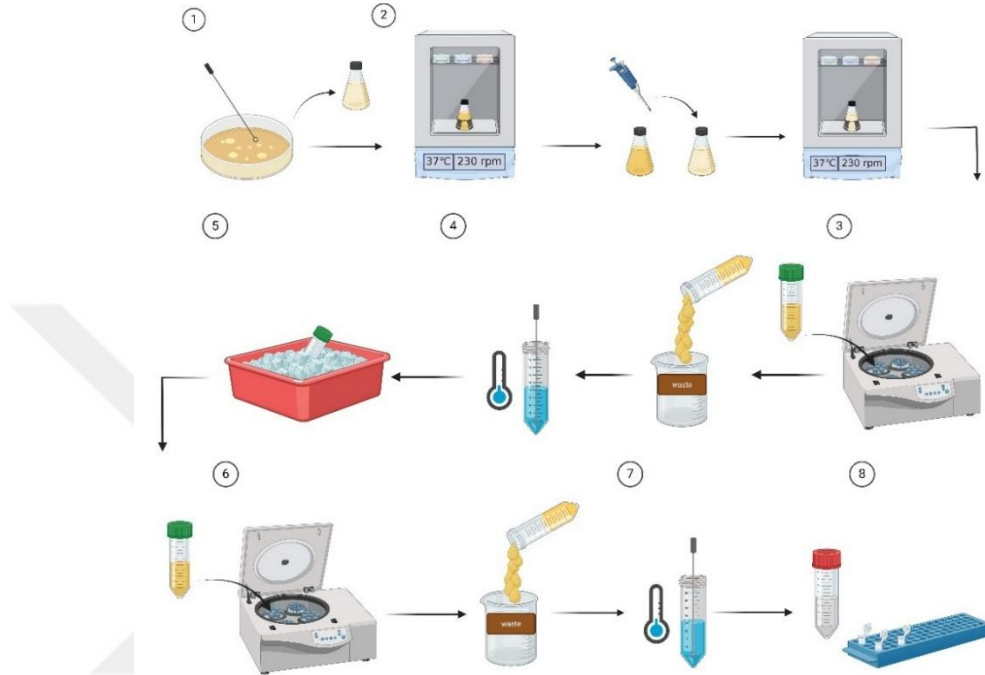
- 1) PCR ürününe 1:1 oranında Yıkama Tamponu eklendi. Pipetaj yapılarak tamamen karıştırıldı.
- 2) Oluşan karışımın tamamı nazik bir şekilde kolona aktarıldı. 1 dk 12000 G'de santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı kısım atıldı.
- 3) Kolona 700 µl Yıkama Tamponu eklendi. 1 dk 12000 G'de santrifüj edildi. Tüpte toplanan sıvı kısım atıldı.
- 4) Yıkama Tamponunun kalıntılarında tamamen kurtulmak için 1 dk 12000 G' de santrifüj edildi.
- 5) Kolon 1,5 ml 'lik steril ependorfa alındı. Üzerine nazik bir şekilde 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi. 1 dk 12000 G'de santrifüj edildi. Kolon atılıp ürün -20°C' de stoklandı.

### 3.1.3. Kompetan Hücre Hazırlama

Çalışmada konakçı bakteri olarak kullanılacak *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir suşunun transformasyon için uygun hale getirilmesi amacıyla, CaCl<sub>2</sub> kimyasal yöntemi uygulandı. Bu işlem ile bakterilerin zar geçirgenliği artırılarak rekombinant plazmitin hücre içine alınması kolaylaştırıldı (Şekil 3.5.).

- 1) 100 µl taze besiyerine, bir gece önceden kültive edilmiş bakteriden 0,5 ml eklendi ve nazik bir şekilde karıştırıldı.
- 2) 230 rpm, 37°C'de 3 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.
- 3) Üründen 10'ar ml 15 ml'lik iki falcona aktarıldı. 4000 rpm, +4°C'de 10 dk santrifüj edildi.
- 4) Süpernatant uzaklaştırılıp her bir pelet 2 ml soğuk CaCl<sub>2</sub> ile çözündürüldü.
- 5) Çözünen ürünler 30 dk buz üzerinde bekletildi.
- 6) 4000 rpm, +4°C'de 10 dk santrifüj edildi.

- 7) Süpernatant uzaklaştırılıp her bir pelet tekrardan 1,2 ml soğuk  $\text{CaCl}_2$  ile çözündürüldü.
- 8) Hazır hale gelen kompetan hücreler, steril 15 ml'lik falkonda birleştirilerek  $-80^\circ\text{C}$ 'de stoklandı.



Şekil 3. 8. Kompetan hücre hazırlama süreci-Created in BioRender

### 3.1.4. RFP Geninin pFRU2'ye Ligasyonu

Ligasyon işlemi öncesinde vektör (pFRU2) ve insert (RFP) örneklerinin konsantrasyon ve saflığını belirlemek için, nanodrop cihazı ile spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Ligasyon işlemi için hazırlanmış pFRU2 ve RFP, uygun molar oranlarda karıştırılarak ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon işlemi için Thermo Scientific T4 DNA Ligaz (EL0014) kullanıldı. Insert ve vektör oranı, Ligation Calculator yazılımı kullanılarak hesaplandı. İşlem için kullanılacak component miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.7.). Yapılan hesaplamalar sonucunda, küt uçlu klonlama için 5:1 oranı kullanılarak optimum ligasyon verimi sağlandı. Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda  $22^\circ\text{C}$ ' de 1 saat, inaktivasyon için de  $65^\circ\text{C}$ 'de 10 dk olmak üzere ısı bloğunda inkübe edildi.

**Tablo 3.** 7.T4 DNA Ligaz enzim komponentleri

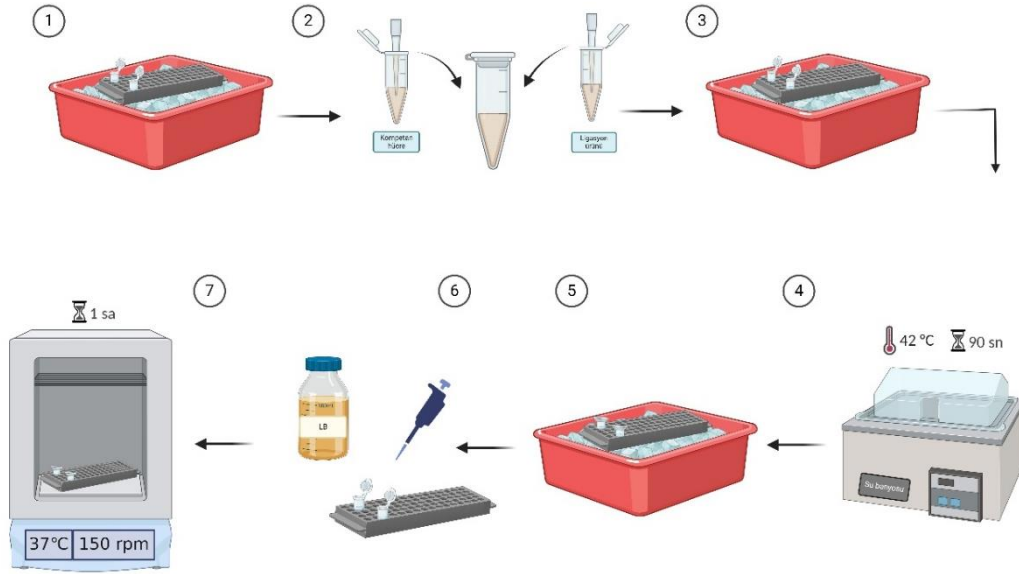
İçerik	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
10X T4 Ligaz Tampon	2
%50 PEG	2
Vektör (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	5
İnsert (63,31 ng/ $\mu\text{L}$ )	0,52
T4 DNA Ligaz	1
dH <sub>2</sub> O	9,5
Toplam	20

### 3.1.5. Transformasyon

Çalışmada CaCl<sub>2</sub> aracılı kimyasal transformasyon, *E. coli* suşlarına gen transferinin genel bir yolu olarak kullanıldı. pFRU2 vektörüne klonlanan RFP geni, aşağıdaki prosedür kullanılarak uygun konak bakteriye aktarıldı (Şekil 3.5.).

- 1) 2 adet 1,5 ml'lik steril ependorf buz üzerinde soğutuldu. Daha önceden hazırlanan kompetan hücreden 100  $\mu\text{l}$  ependorflara alındı.
- 2) Kompetan hücre üzerine 10'ar  $\mu\text{l}$  ligasyon ürününden eklendi ve nazikçe karıştırıldı.
- 3) Karışım 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
- 4) Ardından 42°C'de 90 saniye ısı şoku uygulandı.
- 5) 5 dk buz üzerinde tekrardan inkübe edildi.
- 6) Süre sonunda 900  $\mu\text{l}$  taze besiyeri ependorflar üzerine eklenip nazikçe pipetaj yapıldı.
- 7) Ependorflar parafilm ile sarılıp 150 rpm, 37°C'de 1 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası daha önceden hazırlanmış olan kanamisin içeren LB plakalarına, transformasyon ürünü yayma ekim yöntemi ile ekildi. Transformasyon ürününden 200  $\mu\text{l}$  plakalar üzerine bırakılarak drigalski özesi ile yayıldı. Hazırlanan plakalar 37°C'de gece boyu inkübe edildi.



Şekil 3. 9. Transformasyon süreci-Created in BioRender

### 3.1.6. Klon Yön Tayini

#### 3.1.6.1. Koloni PCR Analizi (cPCR)

Rekombinantları taramak, doğrulamak veya doğru klonu bulmak için koloni PCR yapıldı. Bunun için 1.5 ml'lik steril bir ependorf tüpe 100  $\mu$ L steril su konuldu. Agar plakaları üzerinde çoğalan 6 koloni öze yardımı ile tüplere konuldu ve pipetleme ile çözüldürüldü. Koloniler suda çözüldükten sonra, süspansiyonlar 10 dakika boyunca 95°C'de inkübe edildi. Daha sonra hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. gDNA'yı içeren süpernatantlar steril ependorf tüplere aktarıldı. Hazırlanan örnekler, kalıp DNA olarak kullanılarak PCR yapıldı. Kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne- 01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. PCR komponentleri Tablo 3.8. ve 3.9.'da verildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 8.** PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L (10 pmol/µl)	1
Kontrol-1R (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 9.** PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.1.6.2. pFRU2-RFP Plazmit İzolasyonu

Klon yön tayini yapabilmek için Thermo Scientific – GeneJet Plazmit MiniPrep kiti kullanılarak, transforme edilen ve uygun koşullarda çoğaltılan kültürden izolasyon yapıldı. İlk olarak bakteri toplaması gerçekleştirildi. 1.5 µl'lik ependorf tüplere 3 kez bakteri kültürü konularak (set aralarında 2 dk, 8000 rpm'de santrifüj) toplam 4.5 ml kültür kullanıldı. Prosedür, firmanın önerdiği protokol çerçevesinde aşağıdaki gibi yapıldı.

- 1) 250 µl Yeniden Süspansiyon Solüsyonu (Resuspension Solution) ile hücre peleti süspanse edildi. Tamamen süspanse olması için vorteks ya da pipetaj uygulandı.
- 2) 250 µl Lizis Solüsyon (Lysis Solution) eklendi. Solüsyon vizkoz ve hafif açık berrak hale gelene kadar 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı.
- 3) 350 µl Nötralizasyon Solüsyonu (Neutralization Solution) eklendi. 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı.

- 4) Kromozomal DNA'yı ve hücre enkazını peletlemek amacıyla numuneler, 5 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüj edildi.
- 5) Ardından süpernatant spin kolona transfer edildi.
- 6) 1 dk 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken toplanan sıvı kısım döküldü.
- 7) 500 µl Yıkama Solüsyonu (Wash Solution) eklendi.30-60 saniye 12000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken toplanan sıvı kısım döküldü.
- 8) 7. adım tekrar edildi.
- 9) Yıkama Solüsyonunun kalıntılarından kurtulmak için 1 dk santrifüj edildi.
- 10) Spin kolon 1.5'luk ependorf tüpe konuldu. Plazmit DNA'nın spin kolon membranından elute edilmesi için 50 µl Elüsyon Tamponu (Elution Buffer) eklendi.
- 11) 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2 dk da 12000 g'de santrifüj edildi.
- 12) Spin kolon atıldı ve saflaştırılmış plazmit DNA, ependorf tüpe konularak - 20°C'de depo edildi.
- 13) İzole edilen plazmit DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları, agaroz jel elektroforezi ve nanodrop cihazı ile kontrol edildi.

### 3.1.6.3. *NcoI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim

Yön tayini amacıyla klonda, Thermo Scientific *NcoI* (ER0571) restriksiyon enzimi ile kesim yapıldı. Bu işlem için Clon Manager programından en uygun enzim seçildi. Enzim protokolünde kullanılması gereken DNA miktarının 0.1-0.5 µg/mL olarak belirtilmesi üzerine komponentlerin miktar hesaplamaları yapıldı. Kesim işlemi için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.8.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C' de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim kalitesi agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edildi.

**Tablo 3. 10.** *NcoI* enzimi kesim komponentleri

İçerik	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
10X Tango Tampon	2
<i>NcoI</i>	2
DNA	10
dH <sub>2</sub> O	6
Toplam	20

#### 3.1.6.4. Primer Tasarımı ve Validasyonu

Klon yön tayini için, Clon Manager ile oluşturulmuş construct üzerinden Primer3 (Primer Design) programı kullanılarak primer tasarımı gerçekleştirildi. Daha önceden tasarlanmış ve valide edilmiş RFP Sol Primer ile kullanılmak üzere Kontrol-1R primeri, firmaya gönderilerek sentezletirildi. Tasarlanan bu primere ait bilgiler ve diziler Tablo 3.9’te belirtilmektedir.

**Tablo 3. 11.** Tasarlanan primer

Primer Adı	Nükleotit Dizisi	T <sub>m</sub> (°C)	GC Oranı (%)	Uzunluk (bp)
Kontrol-1R	5’- GACCGGGTCGAATTTGCTTT-3’	59.12	50	20

#### 3.1.6.5. Klon Yön Tayini PCR Analizi

Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne- 01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Çalışmada, daha önceden 4 farklı klondan izole edilen genomik DNA’lar kalıp olarak kullanıldı. Tasarlanan primerin etkinliği ve spesifikliği doğrulandıktan sonra uygun koşullarda (Tablo 3.10. ve Tablo 3.11.) reaksiyon gerçekleştirildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 12.** PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L (10 pmol/µl)	1
Kontrol-1R (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 13.** PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.1.6.6. *HincII* Restriksiyon Enzim Kesimi

Daha önceden 4 farklı klondan izole edilen örneklerden 3 kez PCR yapıldı. Aranılan doğru yönün hangi klonda olduğunu tam olarak tespit edebilmek amacıyla Thermo Scientific *HincII* (ER0491) restriksiyon enzimi ile de kesim gerçekleştirildi. Kesim işlemi öncesinde nanodrop cihazı ile kullanılacak örneklerin konsantrasyonları ölçüldü. Enzim protokolünde kullanılması gereken DNA miktarının 0.1-0.5 µg/mL olarak belirtilmesi üzerine komponentlerin miktar hesaplamaları yapıldı. Kesim işlemi için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.12.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C' de 3 saat boyunca inkübe edildi. Kesim kalitesi agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edildi.

**Tablo 3. 14.** *HincII* enzimi kesim komponentleri

İçerik	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
10X Tango Tampon	2
<i>HincII</i>	1
DNA	8
dH <sub>2</sub> O	9
Toplam	20

**Şekil 3. 10.** Kesim yapılan örneklerin ısı bloğunda inkübasyonu

### 3.1.6.7. İzolatların PCR Analizi

Yapılan kesim ve PCR işlemleri sonrası üzerinde çalışmaya devam edilecek iki klon seçildi. Seçilen bu iki klondan aynı koşullarda plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmit DNA'lar kalıp olarak kullanılarak RFP-L/R primerleri ile PCR yapıldı. Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne- 01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Kullanılan PCR komponentleri Tablo 3.13. ve Tablo 3.14.'de verildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 15.**PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L (10 pmol/µl)	1
RFP-R (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 16.** PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.1.6.8. *PstI* ve *HincII* Restriksiyon Enzimleri ile Çift Kesim

Klon yön tayini için *PstI* ve *HincII* restriksiyon enzimleri kullanılarak çift kesim işlemi uygulandı. Vektör ve gen üzerinde bulunan enzim tanıma bölgelerine yönelik yapılan işlemde, klon yön tayini çalışmaları devam etti. Kesim işleminde kullanılacak komponentlerin miktarları Thermo Scientific “Double Digest Calculator” yazılımı kullanılarak hesaplandı. Kesim işlemi için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.15.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C’ de 16 saat boyunca inkübe edildi. Kesim kalitesi agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edildi.

**Tablo 3. 17.** *PstI* ve *HincII* enzimi kesim komponentleri

İçerik	Miktar (µL)
1X Tango Tampon	2
<i>HincII</i>	1
<i>PstI</i>	2
DNA	14
dH <sub>2</sub> O	1
Toplam	20

### 3.1.6.9. Primer Tasarımı ve Validasyonu

Klon yön tayini için, Clon Manager ile oluşturulmuş construct üzerinden Primer3 (Primer Design) programı kullanılarak primer tasarımı gerçekleştirildi. Primerler, vektör sekansı kalıp alınarak ve RFP genini vektörden başlayarak çoğaltacak şekilde tasarlandı. Tasarlanan primerler firmaya gönderilerek sentezletirildi. Tasarlanan bu primerlere ait bilgiler ve diziler Tablo 3.16.'da belirtilmektedir.

**Tablo 3. 18.** Tasarlanan primerler

Primer Adı	Nükleotit Dizisi	T <sub>m</sub> (°C)	GC Oranı (%)	Uzunluk (bç)
RFP-L-seq	5'-CCTTGATGCTGACGGTCATG-3'	58.99	55	20
RFP-R-seq	5'-TCCACCGGATCTCACTTAACT-3'	58.18	47	21

### 3.1.6.10. Kesim Sonrası PCR Analizi

Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne- 01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Primerlerin validasyonu tamamlandıktan sonra, daha önceden izole edilen örneklerden PCR yapıldı. Tasarlanan primerlerin etkinliği ve spesifikliği doğrulandıktan sonra, daha önceden izole edilen DNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak uygun koşullarda (Tablo 3.17. ve Tablo 3.18.) reaksiyon gerçekleştirildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 19.** PCR içeriği

<b>İçindekiler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L-seq (10 pmol/µl)	1
RFP-R-seq (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 20.** PCR döngüsü

<b>Döngü ismi</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.1.6.11. Dizileme Öncesi PCR Analizi

Dizileme işlemi öncesinde, pFRU2' ya klonlanan RFP geninin varlığından tekrar emin olmak için RFP-L/R primerleri ile PCR işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne- 01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Kullanılan PCR komponentleri Tablo 3.19. ve Tablo 3.20. 'de verildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 21.** PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L (10 pmol/µl)	1
RFP-R (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 22.** PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.1.6.12. RFP Geni Klonlanmış pFRU2'nin Dizi Analizi

Klonlanan genin, varlığının ve yönünün kesinleştirilmesi amacıyla, RefGen Biyoteknoloji firmasına RFP klonlanan plazmit sekanslattırıldı. Sekans işlemine hazırlık için; yedi kez Thermo Scientific – GeneJet Plazmit MiniPrep kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen 350 µl izolat, Thermo Scientific Gen PCR Purification Kit-Gel Extraction Kit (K0692) kullanılarak purifie edildi. Agaroz jel elektroforezi ve nanodrop cihazı kullanılarak purifie edilen ürünün kalite kontrolü tamamlandı. Sekans için hazır hale getirilen ürün firmaya teslim edildi.

### 3.2. Gibson Assembly Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması

Bu çalışmada, kırmızı floresan proteini (RFP) kodlayan genin fruktoz ile indüklenebilen ekspresyon vektörüne eklenmesi için bir diğer klonlama yöntemi olan Gibson Assembly metodu kullanıldı. Bu yöntem, DNA parçalarının ekzonükleaz, polimeraz ve ligaz enzimleri kullanılarak birleştirilmesi esasına dayanır ve hızlı, verimli bir klonlama stratejisi sunar.

### 3.2.1. Primer Tasarımı ve Validasyonu

Gibson Assembly klonlama yöntemi için, Clon Manager ile oluşturulmuş insert construct'ı üzerinden manuel olarak primer tasarımı gerçekleştirildi. Tasarlanan primerler firmaya gönderilerek sentezletirildi. Tasarlanan bu primerlere ait veriler ve diziler Tablo 3.21.'de belirtilmektedir.

**Tablo 3. 23.** Tasarlanan primerler

Primer Adı	Nükleotit Dizisi	GC Oranı (%)	Uzunluk (bç)
GibsonRFP-F	5'*TGAATCCATGAGCGATCTGGGGAGGAGTCGA TGGCTTCCTCCGAAGACGT-3'	56	50
GibsonRFP-R	5'*TACTAGTCAATGGTGTGATGGTGTGTCGTT AAGCACCGGTGGAGTGAC-3'	50	50

\* pFRU2 vektörüne homolog olacak şekilde tasarlanan diziler

### 3.2.2. Gibson Assembly Reaksiyonu için RFP Fragmanının Hazırlanması

RFP fragmanının, vektörle verimli bir şekilde birleşebilmesi için uçlarının belirli bir dizilimle tasarlanması gerekmektedir. Bu amaçla hedef gen olan RFP, vektörle homolog bölgeler içerecek şekilde tasarlanmış Gibson primerleri kullanılarak amplifiye edildi. İzole edilen pSB1C3-BBa\_J04450 plazmitinden PCR ile çoğaltılan RFP fragmanı, Gibson Assembly için gerekli olan tamamlayıcı uçlara sahip hale getirilerek vektör ile uyumlu bir şekilde birleştirilmesine olanak sağlandı. Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Thermo Scientific- Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase-F-530S) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Çalışmada, daha önceden izolasyonu gerçekleştirilen genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. Tasarlanan primerlerin etkinliği ve spesifikliğı doğrulandıktan sonra uygun koşullarda (Tablo 3.20. ve Tablo 3.21.) reaksiyon gerçekleştirildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ve nanodrop cihazı ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 24.** PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	13
5X Phusion™ HF Tampon	4
GibsonRFP-F (10 pmol/µl)	1
GibsonRFP-R (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	0,3
dNTP (10 µM)	0,5
Phusion™ Plus DNA Polimeraz	0,2
Toplam	20

**Tablo 3. 25.**PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	98	30 saniye	1
Denatürasyon	98	10 saniye	30
Bağlanma	66	30 saniye	30
Sentez	72	20 saniye	30
Son Sentez	72	10 dakika	1

### 3.2.3. Gibson Assembly Reaksiyonu için pFRU2 Vektörünün Hazırlanması

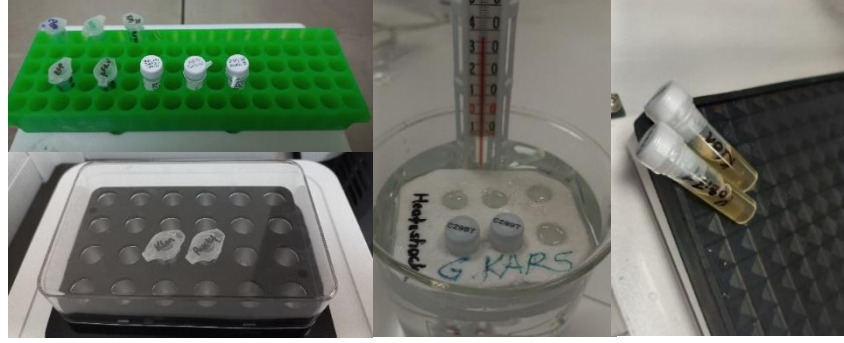
Vektör, Gibson reaksiyonunun kurulabilmesi için lineer hale getirildi. Bu amaçla, *NruI* (Thermo Scientific-er0111) restriksiyon enzimi kullanılarak vektör kesildi. Enzim protokolünde kullanılması gereken DNA miktarının 0.1-0.5 µg/mL olarak belirtilmesi üzerine komponentlerin miktar hesaplamaları yapıldı. Kesim işlemi için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.24.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C' de 16 saat boyunca inkübe edildi. Kesim kalitesi agaroz jel elektroforezi ve nanodrop kullanılarak kontrol edildi.

**Tablo 3. 26.** *NruI* enzimi kesim komponentleri

İçerik	Miktar (µL)
10X Tampon O	2
<i>NruI</i>	1
Plazmit DNA	17
Toplam	20

### 3.2.4. Gibson Assembly Reaksiyon

RFP geni, Gibson Assembly reaksiyonu için GibsonRFP-F ve GibsonRFP-R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR ile hazır hale getirildi. Vektör olarak kullanılacak pFRU2 ise, plazmid izolasyonunun ardından *NruI* enzimi ile lineer hale getirildi. Hazırlanan ürünler Thermo Scientific Gen PCR Purification Kit-Gel Extraction Kit (K0692) ile purifie edildi. Purifikasyonu tamamlanan vektör ve insert'in konsantrasyonları nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçülen konsantrasyonlar dikkate alınarak reaksiyon için gerekli olan komponent miktarları hesaplandı. Reaksiyon için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.24.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın (NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit-E5520S) önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 50°C' de 15 dakika boyunca inkübe edildi (Şekil 3.8.). HiFi DNA Assembly protokolü kapsamında, deneysel reaksiyonun doğruluğunu ve verimliliğini kontrol etmek amacıyla bir pozitif kontrol reaksiyonu da gerçekleştirildi. Pozitif kontrol, pUC19 vektörü ve kitte bulunan kontrol gen ile gerçekleştirildi. Reaksiyon için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.25.). Pozitif kontrolün reaksiyon karışımı, genel reaksiyonla aynı koşullarda inkübe edildi.



Şekil 3. 11. Gibson Assembly reaksiyon aşamaları

Tablo 3. 27. Gibson Assembly reaksiyon komponentleri

İçerik	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
dH <sub>2</sub> O	6,3
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10
Vektör (pFRU2)	3,3
İnsert (RFP)	0,4
Toplam	20

Tablo 3. 28. Gibson Assembly pozitif kontrol reaksiyon komponentleri

İçerik	Miktar ( $\mu\text{L}$ )
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10
Vektör (pUC19)	5
İnsert	5
Toplam	20

### 3.2.5. Transformasyon

Gibson Assembly reaksiyonu sonucunda elde edilen rekombinant DNA, *E. coli* 5-*alpha* bakteriyel hücrelerine ısı şoku yöntemi ile aktarıldı. Transformasyon işlemi, aşağıdaki prosedür kullanılarak gerçekleştirildi.

1. Kompetan hücreler buz üzerine çıkarıldı.
2. 2  $\mu\text{L}$  Gibson reaksiyon ürünü ile kompetan hücre pipetaj yapılarak karıştırıldı.
3. Karışım 30 dk buz üzerinde inkübe edildi.
4. Ardından karışım, 42°C'de 30 saniye bekletilerek ısı şoku uygulandı.

5. Tekrardan 2 dk buz üzerinde inkübe edildi.
6. Süre sonunda, oda sıcaklığında bulunan SOC besiyerinden 950 µL eklenip nazikçe karıştırıldı.
7. Karışım, 37°C’de, 250 rpm’de, 60 dk boyunca çalkalamalı inkübatör kullanılarak inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası daha önceden hazırlanmış olan kanamisin içeren LB plakalarına, transformasyon ürünü yayma ekim yöntemi ile ekildi. Transformasyon ürününden 100 µl plakalar üzerine bırakılarak drigalski özesi ile itinaî bir şekilde yayıldı. Hazırlanan plakalar 37°C’de gece boyu inkübe edildi.

### 3.2.6. Klon Yön Tayini

#### 3.2.6.1. Klon Yön Tayini PCR Analizi

Rekombinantları taramak, doğrulamak veya doğru klonu bulmak için koloni PCR yapıldı. Klon yön tayini yapabilmek için Thermo Scientific – GeneJet Plasmid MiniPrep kiti kullanılarak, transforme edilen ve uygun koşullarda çoğaltılan 4 farklı klondan plazmit izolasyon yapıldı. Kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne-01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. PCR komponentleri Tablo 3.26. ve 3.27.’de verildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 29.** PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L (10 pmol/µl)	1
Kontrol-1R (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 µM)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 30.** PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.2.6.2. *PstI* ve *HincII* Restriksiyon Enzimleri ile Çift Kesim

Klon yön tayini için *PstI* ve *HincII* restriksiyon enzimleri kullanılarak çift kesim işlemi uygulandı. Vektör ve gen üzerinde bulunan enzim tanıma bölgelerine yönelik yapılan işlemde, klon yön tayini çalışmaları devam etti. Kesim işleminde kullanılacak komponentlerin miktarları Thermo Scientific “Double Digest Calculator” yazılımı kullanılarak hesaplandı. Kesim işlemi öncesinde nanodrop cihazı ile kullanılacak örneklerin konsantrasyonları ölçüldü. İşlem için kullanılacak komponent miktarları aşağıdaki tabloda belirtildi (Tablo 3.28.). Reaksiyon karışımı, üretici firmanın önerdiği sıcaklık ve süre doğrultusunda 37°C’ de 5 saat boyunca inkübe edildi. Kesim kalitesi agaroz jel elektroforezi ve nanodrop kullanılarak kontrol edildi. Kesim kalitesi agaroz jel elektroforezi kullanılarak kontrol edildi.

**Tablo 3. 31.** *PstI* ve *HincII* enzimi kesim komponentleri

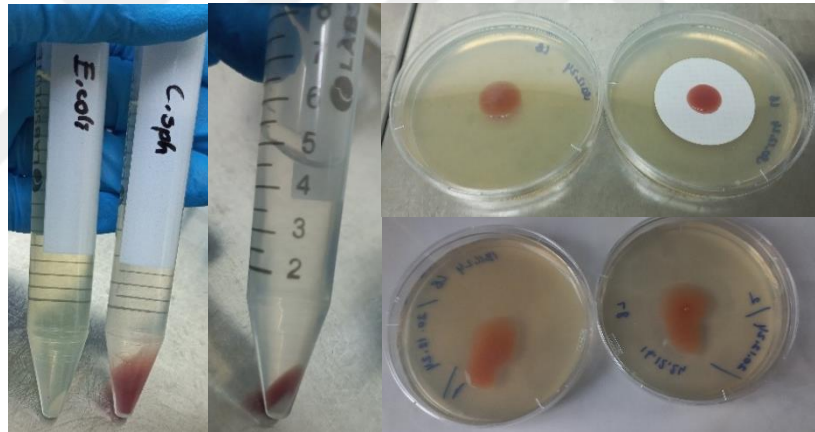
İçerik	Miktar (µL)
1X Tango Tampon	2
<i>HincII</i>	1
<i>PstI</i>	2
DNA	13
dH <sub>2</sub> O	2
Toplam	20

### 3.2.6.3. RFP Geni Klonlanmış pFRU2'nin Dizi Analizi

Klonlanan genin, varlığının ve yönünün kesinleştirilmesi amacıyla, BMLabosis firmasına RFP klonlanan plazmit sekanslattırıldı. Sekans işlemine hazırlık için; 1 numaralı klondan, Thermo Scientific – GeneJet Plazmit MiniPrep kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı. Elde edilen izolat, Thermo Scientific Gen PCR Purification Kit-Gel Extraction Kit (K0692) kullanılarak purifie edildi. Agaroz jel elektroforezi ve nanodrop cihazı kullanılarak purifie edilen ürünün kalite kontrolü tamamlandı. Sekans için hazır hale getirilen ürün firmaya teslim edildi.

### 3.3. Vektörün *C. sphaeroides*'e Konjugasyon ile Aktarılması

Bu çalışmada, *E. coli* S17.1  $\lambda$ pir ve *C. sphaeroides* O.U.001 arasında plazmid transferini sağlamak amacıyla konjugasyon yöntemi uygulandı (Şekil 3.10).



Şekil 3. 12. Donör ve reseptör bakteri arasında oluşan konjugasyon aşamaları

1. *C. sphaeroides*, kanamisin içeren LB sıvı besiyerinde 30°C'de; *E. coli* ise kanamisin içeren LB sıvı besiyerinde 37°C'de gece boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakıldı.
2. Donör suşun kültür optik yoğunluğu 0.5, reseptör suşun kültür optik yoğunluğu 0.5-0.7 olacak şekilde taze kültürler hazırlandı.
3. Kültürlerden 10'ar mL, 6500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler peletlendi.
4. Süpernatant atıldı ve hücreler 2,5 mL 'şer steril B&P (Biebl ve Pfennig) besiyeri ile çözündürüldü.

5. Çözündürülen kültürler birleştirilerek 7000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pelet 1 ml B&P besiyerinde süspanse edildi.
7. Süspansiyon, daha önceden hazırlanmış katı B&P besiyerine üzerinde bulunan 0.22 µm filtre kağıdına spot şeklinde bırakıldı ve 6 saat 30 °C de inkübe edildi.
8. 6 saat inkübasyon sonrası spot, katı besiyerinden alınıp 1 ml sıvı B&P besiyerinde süspanse edildi.
9. Süspansiyondan farklı dilüsyonlar hazırlanarak, kanamisin içeren katı B&P besiyerlerine yayma yöntemiyle ekildi.
10. Plakalar 30 °C’ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakıldı.

48-72 saat inkübasyon sonrası büyüyen koloniler tek tek seçildi. Konjugasyonun başarılı olup olmadığını doğrulamak için; plazmit izolasyonu, PCR analizi, RNA izolasyonu, qPCR analizi, konfakol mikroskop ile görüntüleme deneyleri yapıldı.

### **3.3.1. Konjugantlardan Plazmit İzolasyonu ve PCR Analizi**

Konjugantlardan seçilen kolonilerden, Thermo Scientific – GeneJet Plazmit MiniPrep kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı. Konjugasyon işleminin başarılı olup olmadığını değerlendirmek amacıyla, konjugasyon sonrası bakterilerden RFP-L/R primerleri ile PCR analizi gerçekleştirildi. Bu işlem, RFP geninin alıcı bakteri genomuna başarılı bir şekilde aktarıldığını doğrulamak için yapıldı. Bu çalışmada kullanılan PCR reaksiyonu, üretici firmanın (Solis Biodyne- 01-01-00500) protokolüne uygun olarak hazırlandı. Çalışmada, izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. Reaksiyon içeriği ve PCR koşulları Tablo 3.29. ve 3.30.’de gösterildi. PCR ürününün kalitesi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

**Tablo 3. 32.** PCR içeriği

İçindekiler	Hacim ( $\mu$ l)
dH <sub>2</sub> O	17,3
Hot FIREPol 10X Tampon B1	2,5
RFP-L (10 pmol/ $\mu$ l)	1
RFP-R (10 pmol/ $\mu$ l)	1
Kalıp DNA	1
dNTP (10 $\mu$ M)	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5
Hot FIREPol DNA Polimeraz	0,2
Toplam	25

**Tablo 3. 33.** PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık ( $^{\circ}$ C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	30
Bağlanma	55	30 saniye	30
Sentez	72	1 dakika	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

### 3.4. RFP Gen İfade Analizi

Konjugasyon sonrası RFP geninin yalnızca bakteriye aktarıldığını değil, aynı zamanda ekspresse edilip edilmediğini belirlemek amacıyla RNA izolasyonu ve kantitatif PCR (qPCR) analizi gerçekleştirildi. RNA izolasyonu için, Direct-zol RNA Miniprep Plus (ZYMO Research-R2071) kiti kullanıldı. Konjuge edilen bakterilerden kanamisin içeren B&P besiyerine ekim yapıldı. Oluşan kültürden yapılan izolasyon aşamaları aşağıda verildi.

1. Kültürden 100 mg hücre peleti elde etmek için 13000 rpm'de, +4 $^{\circ}$ C'de 3 dk santrifüj yapıldı ve oluşan süpernatant atıldı.
2. Her bir tüpteki pelet, 25  $\mu$ l hazırlanan lizozim ve TES tamponu karışımı ile süspanse edildi.
3. Karışım 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve her 5 dakikada bir pipetaj yapıldı.
4. Ardından üzerine 1 mL Tri Reagent eklenerek pipetaj yapıldı ve karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

5. Süre sonunda 200 µL kloroform eklenip 15 saniye alt üst ederek karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. Ardından 13000 rpm'de, +4 °C' de 15 dk santrifüj yapıldı. RNA içeren süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
7. Süpernatanta eşit hacimde etanol (%95-100) eklenip dikkatli bir şekilde karıştırıldı. Karışımdan 700 µL, ZYMO-spin IIICG kolonuna aktarıldı ve 13000 rpm'de, +4 °C' de 4 dk santrifüj yapıp kolonda toplanan sıvı atıldı.
8. Kolona 400 µL RNA Yıkama Tamponu eklenip 13000 rpm'de, 26°C'de 4 dk santrifüj yapıldı.
9. RNaz içermeyen bir tüpe 5 µL DNazI (false pozitif sonucu önlemek için), 75 µL DNA Sindirim Tamponu (Digestion Buffer) eklenip karıştırıldı. Karışım doğrudan kolon matrixine eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
10. Kolona 400 µL Directzol-RNA Ön Yıkama Tamponu (PreWash Buffer) eklenip 13000 rpm'de, 26°C'de 4 dk santrifüjlendi. Toplanan sıvı kısım atılıp bu adım tekrarlandı.
11. Kolona 700 µL RNA Yıkama Tamponu (Wash Buffer) eklenip 13000 rpm'de, 26°C'de 4 dk santrifüjlendi. Daha sonra kolon steril bir ependorf tüpe aktarıldı.
12. RNA'yı elde etmek için kolon matrixine 50 µL DNaz/RNaz İçermeyen Su (DNaz/RNaz Free Water) eklendi ve 13000 rpm'de, 26°C'de 4 dk santrifüjlendi.
13. Elde edilen RNA -20°C'de stoklandı.

#### 3.4.1. cDNA (Tamamlayıcı DNA) Sentezi

Gen ekspresyon analizinde kullanılacak cDNA'yı elde etmek için Jena Bioscience Script Reverse Transcriptase (PCR-505S) cDNA sentez kiti kullanıldı. Konjugantlardan seçilen kolonilerden total RNA izole edilerek konsantrasyonları ölçüldü ve bu RNA'lar cDNA sentezinde kullanıldı. Öncelikle, RNA molekülündeki olası ikincil yapıları açmak ve primerlerin bağlanmasını sağlamak amacıyla yapılan konsantrasyon hesaplamaları sonucunda, her bir cDNA sentez reaksiyonu için 1 µg RNA ile 1'er µl RFP-L ve R primerleri 70°C'de 5 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası devam eden cDNA sentez reaksiyonu komponentleri Tablo 3.31.' de verildi.

**Tablo 3. 34.** cDNA sentez komponentleri

<b>İçindekiler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
5X SCRIPT RT Tampon	4
dNTP (10 mM)	1
DTT	1
SCRIPT Reverse Transkriptaz	1
Toplam	7

RNA örnekleri ısı bloğunda 50°C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, örneklerin enzimatik aktivitesini durdurmak amacıyla 70°C’de 10 dakika daha inkübasyona bırakıldı. Sentezlenen cDNA’lar, sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

### 3.4.2. Eş Zamanlı PCR (qPCR)

Eş zamanlı PCR, kantitatif sonuçlar üreten bir PCR yöntemidir. Nükleik asit amplifikasyonu ile aynı anda artan floresans sinyali ölçmektedir. Yöntemde çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresans ışığı veren SYBR Green I boyası kullanılır. Bu aşamada RFP geni için tasarlanan RFP-R/L primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi. İşlem için FastStart Essential DNA Green Master (Roche-06 402 712 001) kiti kullanıldı. Kullanılan PCR içeriği ve PCR programı Tablo 3.32.ve Tablo 3.33.’da verildi.

**Tablo 3. 35.** PCR içeriği

<b>İçindekiler</b>	<b>Hacim (µl)</b>
dH <sub>2</sub> O	3
2X Master Mix	10
RFP-R (10 pmol/µl)	1
RFP-L (10 pmol/µl)	1
Kalıp DNA	5
Toplam	20

**Tablo 3. 36.** PCR döngüsü

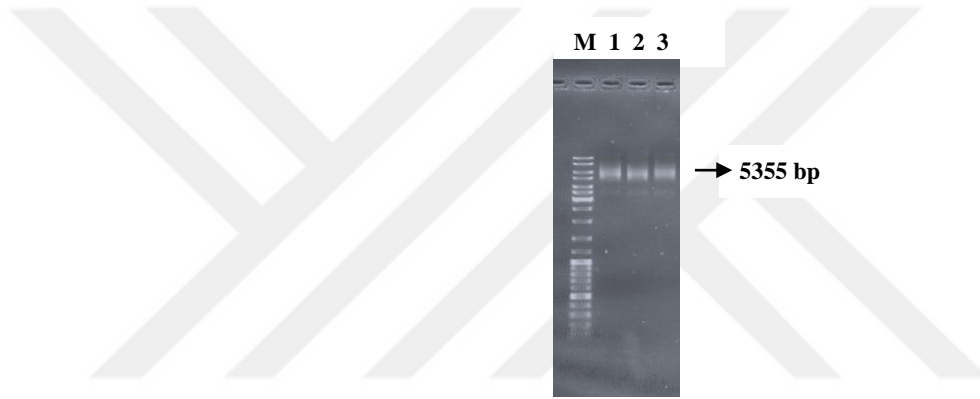
<b>Döngü ismi</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
İlk Denatürasyon	90	10 dakika	1
Denatürasyon	95	10 saniye	30
Bağlanma	60	10 saniye	30
Sentez	72	10 saniye	30
Son Sentez	72	5 dakika	1

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Klasik Klonlama Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması

#### 4.1.1. pFRU2 Plazmit İzolasyonu

pFRU2 vektörünün izolasyonu başarıyla gerçekleştirildi. İzole edilen plazmid DNA'sının bütünlüğünü ve varlığını doğrulamak amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı. Jel görüntüsü (Şekil 4.1.) incelendiğinde, belirlenen moleküler ağırlıkta bir bant gözlemlendi. Bandın yoğunluğu ve keskinliği, izolasyon işleminin başarılı olduğunu kanıtladı.



Şekil 4. 1. İzole edilen pFRU2 agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2-3: pFRU2)

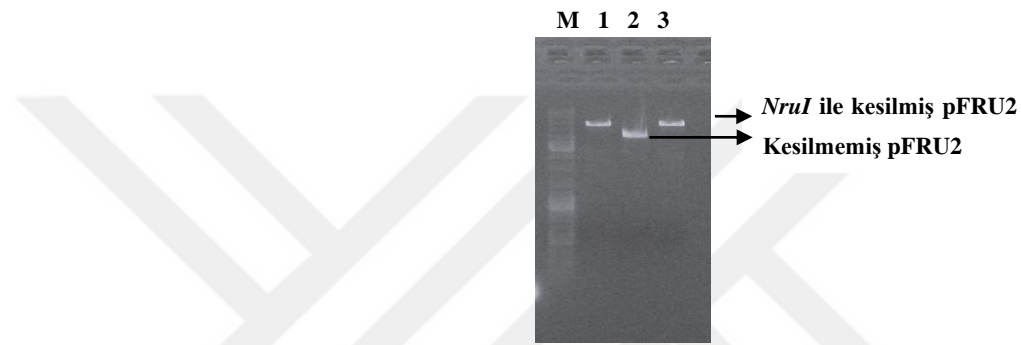
İzole edilen pFRU2 vektörünün DNA konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.1.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek izolasyonun verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

Tablo 4. 1. İzole edilen pFRU2 konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280
1	44,56	1,856
2	56,65	1,896
3	47,63	1,824

#### 4.1.2. pFRU2'nin Restriksiyon Enzim Kesimi

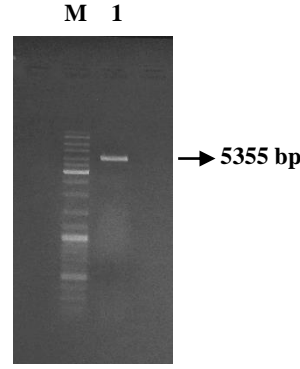
pFRU2 vektörünün linear hale getirilmesi amacıyla *NruI* restriksiyon enzimi ile kesim işlemi yapıldı. Kesim sonrası DNA'nın doğruluğunu ve verimliliğini değerlendirmek için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Jel görüntüsü (Şekil 4.2.) incelendiğinde, kesilmemiş pFRU2 vektörünün süperkoil formda olduğu, *NruI* ile yapılan kesim sonrası ise vektörün linearize olduğu ve beklenen moleküler ağırlığa sahip bir bant oluşturduğu gözlemlendi. Bu sonuç, *NruI* enziminin vektörü başarılı bir şekilde linear hale getirdiğini gösterdi.



Şekil 4. 2. *NruI* ile yapılan kesim sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker,1-3: *NruI* ile kesilmiş pFRU2,2: Kesilmemiş pFRU2)

#### 4.1.3. pFRU2'nin Purifikasyonu

*NruI* ile gerçekleştirilen kesimin ardından, DNA saflaştırma işlemi yapıldı. Saflaştırılan plazmid DNA'sı, agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Jel görüntüsü (Şekil 4.3.) incelendiğinde, saflaştırılmış DNA'nın yüksek saflıkta olduğu ve beklenen moleküler ağırlıkta, net bir bant oluşturduğu gözlemlendi. Bu sonuç, DNA saflaştırma işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve kontaminasyon olmadığını doğruladı.



**Şekil 4. 3.** *NruI* ile kesildikten sonra purifie edilen pFRU2 agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: Purifie edilmiş pFRU2)

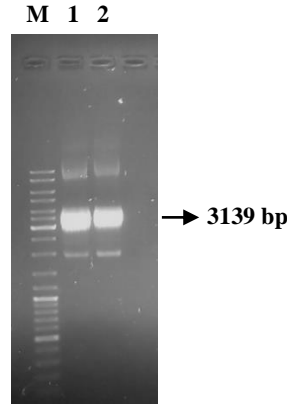
Purifie edilen pFRU2 vektörünün DNA konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.2.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek purifikasyonun verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

**Tablo 4. 2.** Purifie edilen pFRU2 konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280
1	57,68	1,856

#### 4.1.4. pSB1C3-BBa\_J04450 Plazmit İzolasyonu

RFP geninin bulunduğu pSB1C3-BBa\_J04450 plazmit izolasyonu başarıyla gerçekleştirildi. İzole edilen plazmid DNA'sının bütünlüğünü ve varlığını doğrulamak amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulandı. Jel görüntüsü (Şekil 4.4.) incelendiğinde, belirlenen moleküler ağırlıkta (3139 bp) bir bant gözlemlendi. Bandın yoğunluğu ve keskinliği, izolasyon işleminin başarılı olduğunu kanıtladı.



**Şekil 4. 4.** RFP genini içeren pSB1C3-BBa\_J04450 plazmitinin izolasyonu sonucu elde edilen agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker,1-2: pSB1C3-BBa\_J04450)

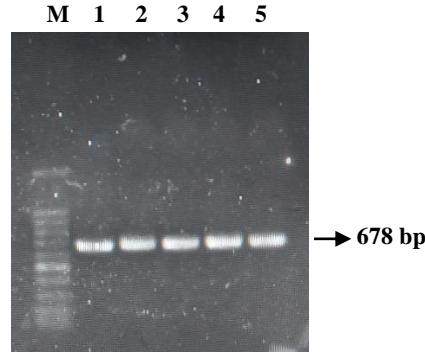
İzole edilen RFP plazmit DNA konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.3.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek izolasyonun verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

**Tablo 4. 3.** İzole edilen pSB1C3-BBa\_J04450 plazmitinin konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/µL)	260/280
1	81,54	1,963
2	90,47	1,955

#### 4.1.5. RFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu

RFP geninin amplifikasyonu için RFP-R/L primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR sonrası, agaroz jel elektroforezi ile amplifikasyon ürünleri analiz edildi. Jel görüntüsü (Şekil 4.5.) incelendiğinde, beklenen boyutta bir bant gözlemlendi ve bu da RFP geninin başarıyla amplifiye edildiğini kanıtladı. Amplifikasyon bandı, hedef bölgenin doğru şekilde amplifiye edildiğini ve primerlerin hedef bölgeye özgün olduğunu doğruladı. Bandın yoğunluğu ve netliği, PCR reaksiyonunun verimli olduğunu ve primerlerin doğru çalıştığını gösterdi.



Şekil 4. 5. Amplifiye edilen RFP geninin agaroz jel görüntüsü (M: Sizer™ DNA Marker,1-2-3-4-5: RFP geni)

#### 4.1.6. RFP Geninin Purifikasyonu

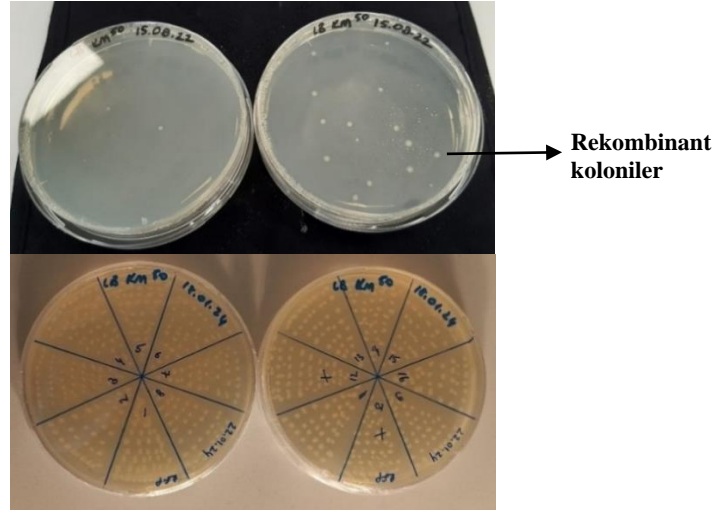
Purifie edilen RFP plazmit DNA konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.4.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek purifikasyonun verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

Tablo 4. 4. Purifie edilen RFP geninin konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/µL)	260/280
1	85,96	1,865
2	96,45	1,823
3	83,14	1,924
4	79,16	1,932
5	86,57	1,965

#### 4.1.7. Ligasyon Ürününün *E. coli* S17-1( $\lambda$ pir)'e Transformasyonu

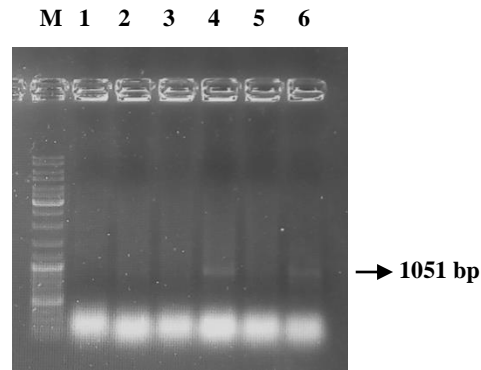
pFRU2 vektörü ve RFP geninin transformasyonu, CaCl<sub>2</sub> aracılı kimyasal transformasyon yöntemi kullanılarak başarıyla gerçekleştirildi. *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir hücreleri, pFRU2-RFP konstrüksiyonu ile transform edilerek kanamisin içeren LB agar plakasına ekildi. Seçici besiyeri sayesinde, sadece kanamisin dirençli hücreler büyüyüp koloniler oluşturdu. Plakalar (Şekil 4.6.) incelendiğinde, bakteriyel koloni oluşumu gözlemlendi ve bu da transformasyonun başarılı olduğunu kanıtladı.



Şekil 4. 6. *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir konakçı hüresine transforme edilmiş pFRU2-RFP konstruktünün plaka görüntüsü

#### 4.1.8. Klon Yön Tayini Koloni PCR Analizi

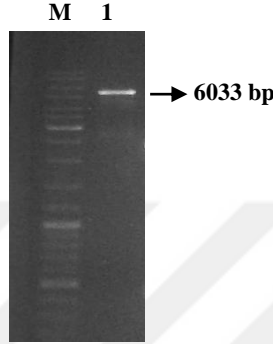
Klon yön tayini amacıyla yapılan koloni PCR işleminde, pFRU2-RFP konstrüksiyonunun doğrulanması için PCR yapıldı. Agaroz jel elektroforezi ile analiz edilen PCR ürünleri (Şekil 4.7.) incelendiğinde, beklenen amplifikasyon bandı net olarak gözlemlenemedi. Ancak, bantlarda bazı zayıf ve belirsiz sinyaller tespit edildi. Bu sonuç, klon yön tayini çalışmalarının devam edeceğini ve daha fazla optimizasyon gerektiğini gösterdi.



Şekil 4. 7. Transformantlardan yapılan koloni PCR agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker,4-6: Tahmini pFRU2-RFP konstrüktü)

#### 4.1.9. Transformantlardan Yapılan Plazmit İzolasyonu

Klon yön tayini çalışmalarını desteklemek amacıyla, transformant kolonilerden plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen plazmidler, klon doğrulama ve yön tayini deneylerinde kullanılmak üzere hazırlandı. İzolasyonun başarılı olup olmadığını değerlendirmek için agaroz jel elektroforezi yapıp elde edilen sonuçlar Şekil 4.8.'de gösterildi.



Şekil 4. 8. İzole edilen pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: pFRU2-RFP konstrüktü)

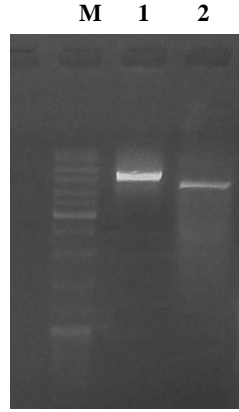
İzole edilen plazmit DNA konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.5.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek izolasyonun verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

Tablo 4. 5. İzolatların konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280
1	65,91	1,865

#### 4.1.10. Transformantların Restriksiyon Enzim Kesimi

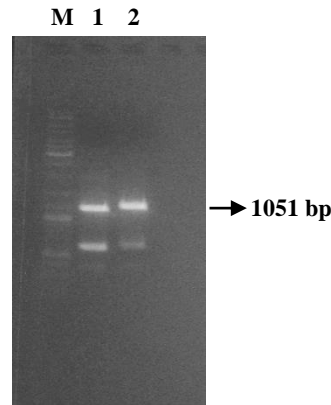
Klon yön tayini amacıyla, pFRU2-RFP konstrüksiyonunun doğruluğunu doğrulamak için *NcoI* restriksiyon enzimi ile kesim yapıldı. Ancak, agaroz jel elektroforezi ile analiz edilen kesim ürünlerinde, beklenen bantlar (1167- 407- 4459 bp) net bir şekilde gözlemlenemedi. Şekil 4.9.'de gösterilen jel görüntüsü, kesimin tam olarak gerçekleşmediğini ya da kesimin verimliliğinde bir sorun olduğunu işaret etti. Bu durum, enzimatik kesimin yetersiz olmasının yanı sıra, vektörde bulunan *NcoI* tanıma bölgesinin mutasyona uğramış veya yapısal olarak bozulmuş olabileceğini düşündürdü.



**Şekil 4. 9.** *NcoI* ile kesilen pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1,2: Örnekler)

#### 4.1.11. Klon Yön Tayini PCR Analizi

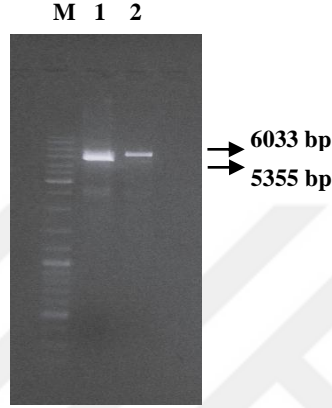
Klon yön tayini için, RFP-L ve Kontrol-1R primerleri ile yapılan PCR sonucunda, beklenen amplifikasyon bandı doğru pozisyonda gözlemlenirken bununla birlikte, beklenmeyen ikinci bir bant da görüldü. Bu durum, potansiyel bir primer dimeri, non-spesifik amplifikasyon ya da başka bir sorun olabileceğini düşündürdü. Şekil 4.10.'daki jel görüntüsünde, her iki bandın belirginliği, PCR reaksiyonunun çalıştığını ancak beklenmeyen amplifikasyonların doğrulanması gerektiğini gösterdi.



**Şekil 4. 10.** Klon yön tayini amacıyla yapılan PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: pFRU2-RFP konstrüktü)

#### 4.1.12. Transformantların Restriksiyon Enzim Kesimi

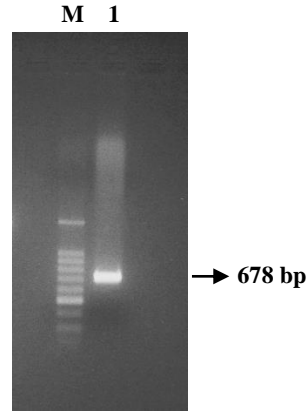
Klon doğrulama sürecinde, *HincII* restriksiyon enzimi ile kesim yapıp elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. (Şekil 4.11.). Jel görüntüsünde, klonlanmış vektörün lineer hale geldiği ve klonlanmamış vektöre kıyasla belirgin bir boy farkı gösterdiği gözlemlendi. Bu fark, vektöre eklenen RFP geninin varlığını destekleyen önemli bir bulgu olarak değerlendirildi.



Şekil 4. 11. *HincII* ile kesilen pFRU2 ve pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: *HincII* ile kesilen pFRU2, 2: *HincII* ile kesilen pFRU2-RFP konstrüktü)

#### 4.1.13. RFP Geninin PCR Analizi

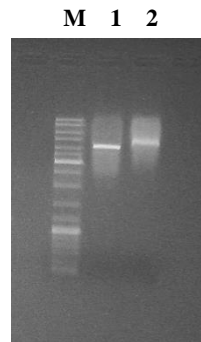
Klon doğrulama sürecinin bir parçası olarak, RFP'nin varlığını belirlemek amacıyla PCR analizi gerçekleştirildi. RFP-L/R primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucunda, agaroz jel elektroforezinde beklenen büyüklükte belirgin bir bant elde edildi (Şekil 4.11.). Bu sonuç, vektör içerisinde RFP geninin bulunduğunu doğrulayan önemli bir bulgu olarak değerlendirildi.



**Şekil 4. 12.** RFP-L/R primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: Sizer™ DNA Marker, 1: RFP geni)

#### 4.1.14. Restriksiyon Enzimleri ile Yapılan Çift Kesim

Klon yön tayini sürecinde, *PstI* ve *HincII* enzimleri ile çift kesim işlemi uygulandı. Bu enzimlerden *PstI*, vektör üzerinde spesifik bir bölgeyi keserken, *HincII* enziminin de RFP gen dizisi içerisinde hedef bölgeyi kesmesi beklendi. Bu deneyde, klonlanan genin doğru yönde olup olmadığı, kesim sonrası oluşan fragmanların agaroz jel elektroforezi ile analiz edilerek belirlenmesi amaçlandı. (Şekil 4.12.). Ancak, analiz edilen kesim ürünlerinde, beklenen bantlar (1604- 4429 bp) gözlemlenemedi. Jel görüntüsünde bant paternleri incelenerek kesim sonuçlarının değerlendirilmesine devam edildi.

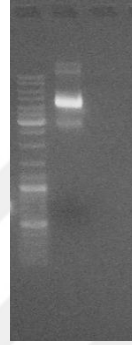


**Şekil 4. 13.** *PstI* ve *HincII* enzimleri ile yapılan çift kesim sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: Örnekler)

#### 4.1.15. Enzim Kesimi Sonrası PCR Analizi

Klon doğrulama sürecinde, yeni tasarlanan RFP-L/R-seq primerleri ile PCR analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.13.). Ancak, agaroz jel elektroforezinde beklenen bant doğru yerde gözlemlenemedi (911 bp). Bu durum, vektör üzerinde bulunan olası mutasyonların primer bağlanmasını etkilediğini düşündürdü. Elde edilen sonuçlar, primer tasarımının ve hedef bölgenin yeniden değerlendirilmesini gerektirdi.

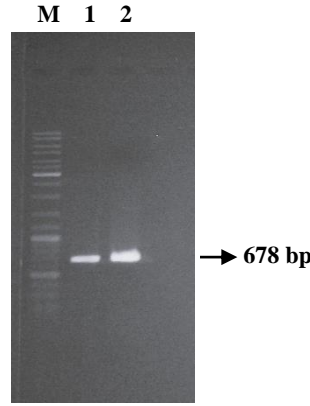
M 1



Şekil 4. 14. RFP-L/R-seq primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker,1: Örnekler)

#### 4.1.16. RFP Geninin Amplifikasyon Analizi

Önceki PCR sonuçlarının değerlendirilmesine devam edebilmek ve elde edilen verileri doğrulamak amacıyla, RFP-L/R primerleri ile yeniden PCR analizi gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda, beklenen büyüklükte bant elde edildi ve RFP geninin varlığı böylelikle doğrulandı (Şekil 4.14.). Bu bulgu, klonlanan vektörde RFP'nin mevcut olduğunu destekledi.



Şekil 4. 15. RFP-L/R primerleri ile gerçekleştirilen PCR sonucu oluşan agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker,1-2: RFP geni)

#### 4.1.17. RFP Geni Klonlanan pFRU2 Vektörünün Dizi Analizi

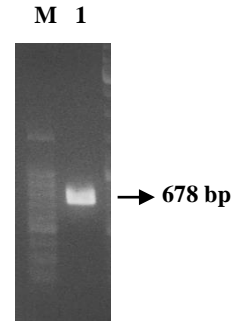
Çalışmada, geleneksel klonlama yöntemiyle RFP geninin pFRU2 vektörüne aktarılması hedeflendi. Ancak, yapılan klon yön tayini deneylerinde tutarsızlıklar saptandı. Bu durumu açıklığa kavuşturmak amacıyla rekombinant vektör sekans analizine tabi tutuldu. Analiz sonucunda, kullanılan pFRU2 vektöründe mutasyonlar tespit edildi. Bu mutasyonların klonlama sürecini olumsuz yönde etkileyerek başarılı bir klon elde edilmesini engellemiş olabileceği değerlendirildi. Bu nedenle, alternatif bir yaklaşım olarak Gibson Assembly yöntemi kullanılarak klonlama işlemi tekrar gerçekleştirildi. Elde edilen sekans verileri tez eklerinde sunuldu.

#### 4.2. Gibson Assembly Yöntemi ile RFP Geninin Klonlanması

##### 4.2.1. RFP Geninin PCR ile Amplifikasyonu

Gibson Assembly yöntemiyle klonlama sürecine devam edebilmek için, öncelikle RFP geni PCR ile çoğaltıldı ve elde edilen ürünlerin doğruluğu çeşitli analizlerle incelendi. Bu aşamada, Gibson yöntemi için kritik öneme sahip olan ekleme bölgelerini içeren özel primerler kullanıldı. Bu primerler, amplifikasyon sonrası oluşturulan DNA parçalarının homolog rekombinasyon yoluyla birleşmesini sağlamak amacıyla tasarlandı. Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra, elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi (Şekil 4.15.). Elektroforez sonuçları, DNA'nın doğru boyutta olup olmadığını ve istenmeyen amplifikasyon ürünlerinin oluşup oluşmadığını

belirlemek için analiz edildi. Beklenen büyüklükte bantların gözlemlenmesi, PCR sürecinin başarılı geçtiğini ve hedeflenen DNA fragmanlarının elde edildiğini doğruladı.



**Şekil 4. 16.** PCR ile çoğaltılan RFP geninin agaroz jel görüntüsü (M: Sizer™ DNA Marker, 1: RFP geni)

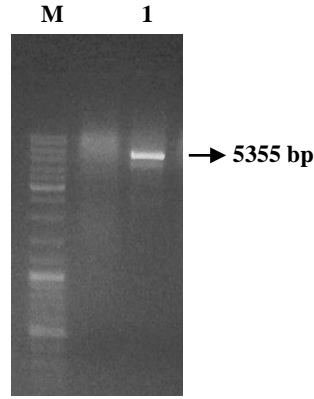
PCR ile çoğaltılan RFP geninin konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.6.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek PCR verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

**Tablo 4. 6.** PCR ile amplifiye edilen RFP geninin konsantrasyon sonucu

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280
1	148,23	1,913

#### 4.2.3. pFRU2 Vektörünün Restriksiyon Enzim Kesimi

Gibson Assembly yönteminin uygulanabilmesi için, pFRU2 vektörü izole edilerek saflaştırıldı ve *NruI* restriksiyon enzimi ile kesim işlemi gerçekleştirildi. Kesim sonrası elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 4.16.). Jel görüntüsünde, vektörün başarılı bir şekilde lineer hale getirildiği gözlemlendi.



**Şekil 4. 17.** *NruI* ile kesilen pFRU2' nin agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1: pFRU2)

*NruI* ile kesilen pFRU2 vektörünün konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.7.'de sunuldu. DNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek kesim verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

**Tablo 4. 7.** *NruI* ile kesilen pFRU2' nin konsantrasyon sonucu

Örnek	Konsantrasyon (ng/µL)	260/280
1	44,20	1,847

#### 4.2.4. Kompetan *E. coli* 5-*alpha*' ya Ligasyon Ürününün Transformasyonu

Gibson Assembly yöntemi kullanılarak, *NruI* ile lineer hale getirilmiş pFRU2 vektörü ve PCR ile çoğaltılmış RFP geni, homolog bölgeler aracılığıyla birleştirildi. Bu aşamada, Gibson yöntemi için özel olarak tasarlanmış primerlerin sağladığı örtüşen diziler, vektör ve hedef genin doğru şekilde birleşmesini kolaylaştırdı. Elde edilen rekombinant DNA, daha sonra uygun reseptör hücrelere transforme edildi. Transformasyon işlemi, rekombinant vektörün hücre içine alınmasını sağlamak amacıyla dikkatlice optimize edilmiş protokollerle gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası, hücreler kanamisin içeren seçici besiyerine yayıldı ve uygun inkübasyon koşullarında çoğalmaya bırakıldı. Seçici antibiyotik içeren besiyeri, yalnızca rekombinant vektörü taşıyan hücrelerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını sağlayarak klonlama sürecinin başarısının ön değerlendirilmesinde önemli bir rol oynadı. İnkübasyonun sonunda, seçici ortamda başarılı koloniler gözlemlendi (Şekil 4.17). Koloni oluşumu, transformasyonun başarılı olduğunu ve rekombinant vektörün hücreler tarafından alındığını güçlü bir

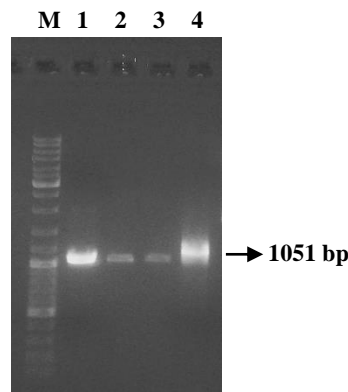
şekilde destekledi. Kolonilerin doğrulama analizleri ile rekombinant yapının varlığının kesinleştirilmesi için çalışmalara devam edildi.



Şekil 4. 18. Kompetan *E. coli* 5-*alpha*'ya transforme edilmiş pFRU2-RFP konstrüktünün plaka görüntüsü

#### 4.2.5. Gibson Assembly PCR Analizi

Gibson Assembly sonrası elde edilen transformantlardan, rekombinant vektörün doğrulanması amacıyla RFP-L ve Kontrol-1R primerleri kullanılarak PCR analizi gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda, beklenen büyüklükte bantların gözlemlenmesi, RFP geninin başarılı bir şekilde klonlandığını gösterdi (Şekil 4.18.). Bu sonuçlar, rekombinant vektörün transformant hücreler içerisinde bulunduğunu doğruladı ve klonlama sürecinin başarılı olduğunu destekledi.



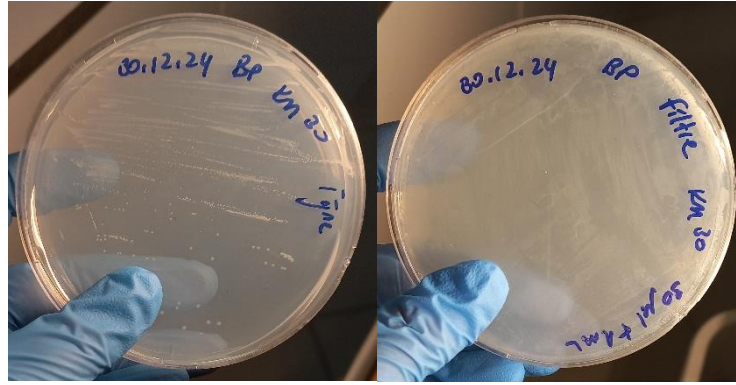
Şekil 4. 19. PCR ile çoğaltılan pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M:SM0333 DNA Marker, 1-2-3-4: pFRU2-RFP konstrüktü)

#### 4.2.6. RFP Geni Klonlanan pFRU2 Vektörünün Dizi Analizi

Gibson Assembly yöntemiyle gerçekleştirilen klonlama işleminin başarısını kesinleştirmek amacıyla, RFP'nin klonlandığı pFRU2 vektörü sekans analizi ile doğrulandı. PCR amplifikasyonu ve homolog rekombinasyon süreçleri sırasında baz değişiklikleri, ekleme veya delesyon gibi istenmeyen mutasyonlar meydana gelebileceğinden, klonlamanın doğru yönde gerçekleştiğini anlamak ve herhangi bir mutasyon olup olmadığını belirlemek için sekans analizi kritik bir adım oldu. Sekans analizi sonucunda, RFP geninin hedeflenen bölgeye doğru yönde ve eksiksiz şekilde klonlandığı tespit edildi. Bu sonuç, klonlamanın başarılı olduğunu güçlü bir şekilde destekledi. Ayrıca, dizileme verilerinde herhangi bir mutasyon veya çerçeve kayması gözlemlenmedi, bu da klonlanan genin yapısal bütünlüğünü koruduğunu gösterdi. Bu doğrulama aşaması, sonraki gen ekspresyon çalışmaları açısından büyük önem taşır, çünkü yanlış yönde klonlanmış veya mutasyon içeren bir gen, protein sentezini olumsuz etkileyebilirdi. Sonuç olarak, Gibson Assembly yöntemi ile gerçekleştirilen klonlamanın başarılı olduğu, sekans analizi ile kesin olarak doğrulanıp elde edilen sekans verileri, analizlerin şeffaflığını sağlamak amacıyla tez eklerinde sunuldu.

#### 4.3. Vektörün *C. sphaeroides*'e Konjugasyon ile Aktarılması

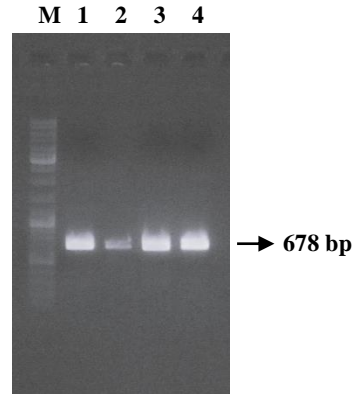
Rekombinant vektörün alıcı hücrelere aktarılması amacıyla, donör suş *E. coli* S17- $\lambda$  pir ile alıcı suş *C. sphaeroides* arasında konjugasyon işlemi gerçekleştirildi. Konjugasyon işlemi sonrasında, kanamisin içeren seçici besiyerine ekim yapıldı ve alıcı hücrelerin antibiyotik varlığında büyüüp büyümediği gözlemlendi. Kanamisin direncini sağlayan seleksiyon geni, rekombinant vektör üzerinde yer aldığı için yalnızca vektörü başarılı bir şekilde almış hücrelerin seçici ortamda hayatta kalması beklendi. İnkübasyonun sonunda, seçici besiyerinde başarılı kolonilerin geliştiği gözlemlendi (Şekil 4.19). Bu sonuç, rekombinant vektörün *C. sphaeroides* hücrelerine başarıyla aktarıldığını ve hücrelerin antibiyotik seçiliminde hayatta kalarak rekombinant yapıyı taşıdığını güçlü bir şekilde destekledi. Bu aşamanın başarılı olması, rekombinant bakterinin elde edildiğini ve sonraki analizler için uygun hale getirildiğini doğruladı. Plazmidin alıcı hücre içinde stabil olup olmadığını ve hedeflenen bölgelere doğru entegrasyon gösterip göstermediğini belirlemek için plazmid izolasyonu, PCR analizi ve sekanslama gibi doğrulama çalışmalarına devam edildi.



Şekil 4. 20. *E. coli* 5-alpha ile *C. sphaeroides* arasında oluşan konjugasyon görüntüsü

#### 4.3.1. Konjugasyon Sonrası PCR Analizi

Konjugasyon sonrası elde edilen konjugantlardan, RFP geninin varlığını doğrulamak amacıyla önce plazmit izolasyonu, ardından da RFP-L/ R primerleri ile PCR analizi gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda, beklenen büyüklükte bant gözlemlendi ve RFP geninin başarılı bir şekilde konjugant hücrelerde bulunduğu doğrulandı (Şekil 4.20.). Bu sonuçlar, konjugasyon işleminden sonra *C. sphaeroides* hücrelerinde RFP geninin varlığını kesin olarak ortaya koydu ve klonlama sürecinin başarılı bir şekilde tamamlandığını gösterdi.

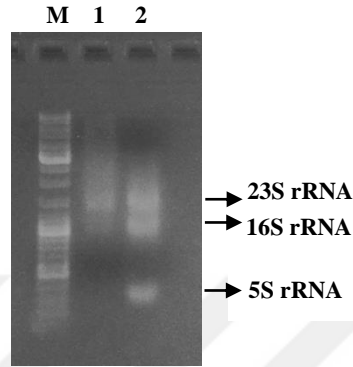


Şekil 4. 21. PCR ile çoğaltılan pFRU2-RFP konstrüktünün agaroz jel görüntüsü (M:SM0333 DNA Marker, 1-2-3-4: RFP geni)

#### 4.4. RFP Gen İfade Analizi

Konjugasyon sonrası elde edilen konjugantlardan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Taze konjugant hücrelerinden saf bir şekilde RNA izolasyonu yapıp elde edilen RNA, sonraki analizler için uygun kalitede hazır hale getirildi. Bu işlem, RFP

gen ekspresyonunu incelemek ve RNA düzeyinde varlığını doğrulamak için yapıldı. İzolat saflık ile bütünlüğün değerlendirilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 4.21). Elektroforez sonucunda, 23S ve 16S rRNA bantlarının belirgin ve kesintisiz olduğu gözlemlendi. Bu bantların net bir şekilde görünmesi, RNA'nın bozulmadan elde edildiğini ve yüksek kalitede olduğunu gösterdi.



**Şekil 4. 22.** Konjugantlardan yapılan total RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (M: SM0333 DNA Marker, 1-2: Total RNA)

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.7.'de sunuldu. RNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek izolasyonun verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

**Tablo 4. 8.** Konjugantlardan yapılan total RNA izolasyonu konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280
1	61,68	2,025
2	54,78	2,101
3	78,63	2,135
4	85,60	2,014

#### 4.4.1. cDNA Sentezi

Sentezlenen cDNA'ların konsantrasyonu ve saflık oranı, NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Ölçüm sonuçları Tablo 4.7.'de sunuldu. cDNA konsantrasyonu ve A260/A280 oranı incelenerek sentezin verimliliği olumlu bir şekilde değerlendirildi.

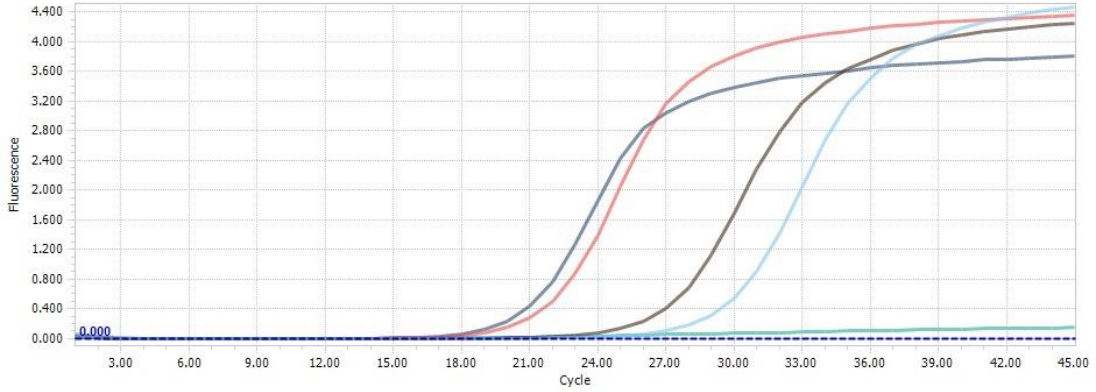
**Tablo 4. 9.** cDNA konsantrasyon sonuçları

Örnek	Konsantrasyon (ng/μL)	260/280
1	1256,96	1,901
2	1486,83	1,897
3	1563,47	1,854
4	1358,25	1,832

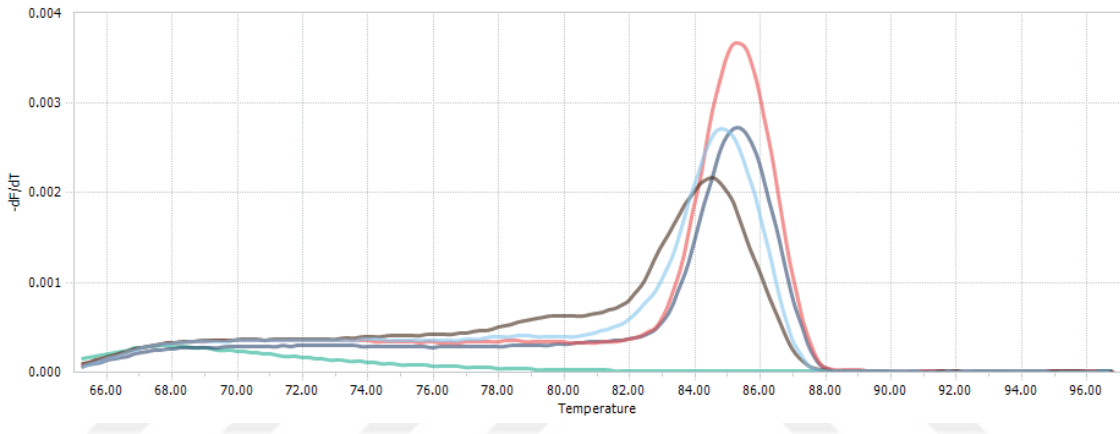
#### 4.4.2. qPCR Ekspresyon Grafikleri

qPCR analizi, RFP gen ekspresyonunu değerlendirmek amacıyla gerçekleştirildi. Bu analiz, RFP mRNA seviyelerinin ölçülmesiyle gen ekspresyonunun doğrulanmasını sağladı. Vektörde bulunan promotörün indüklenebilmesi amacıyla fruktoz içeren ve içermeyen örnek gruplarında RFP gen ekspresyonu analiz edildi. Her iki grupta da amplifikasyon eğrileri hem fruktoz içeren hem de içermeyen koşullarda RFP gen ekspresyonunun gerçekleştiğini gösterdi. Ancak, iki grup arasında belirgin bir Ct farkı gözlemlenmedi. Negatif kontrol olarak, RFP genini içermeyen pFRU2 vektörü kullanıldı ve bu kontrolde herhangi bir amplifikasyon sinyali gözlemlenmedi. Bu sonuç, elde edilen sinyallerin non-spesifik amplifikasyondan veya arka plan sinyalinden kaynaklanmadığını doğruladı.

Amplifikasyon eğrileri (Şekil 4.22.), örneklerde RFP gen ekspresyonunun gerçekleştiğini 19,89 ile 28,26 arasında değişen Ct değerleri ile gösterdi. Melting curve (erime eğrisi) analizi (Şekil 4.23.) incelendiğinde, tek bir belirgin pik elde edilerek amplifikasyonun spesifik olduğunu kanıtladı. Non-spesifik amplifikasyon veya primer-dimer oluşumu gözlemlenmedi.



**Şekil 4. 23.** Dört farklı örnekte gerçekleştirilen gen ekspresyon analizi sonucu oluşan amplifikasyon eğrisi



**Şekil 4. 24.** Dört farklı örnekte gerçekleştirilen gen ekspresyon analizi sonucu oluşan erime eğrisi

Gibson Assembly yöntemiyle oluşturulan rekombinant yapının konjugasyon sonrası alıcı hücrelere başarıyla aktarıldığı ve RFP geninin mRNA düzeyinde varlığı RNA izolasyonu ve qPCR analizleri ile doğrulanmıştır. Dört örnek üzerinde yapılan qPCR analizlerinde, fruktozlu ortamda çoğaltılan örneklerin Ct değerleri yaklaşık 19 iken, fruktozsuz ortamda çoğaltılan örneklerin Ct değerleri yaklaşık 28 olarak bulunmuştur. Bu fark, fruktoz varlığında RFP geninin belirgin şekilde indüklendiğini göstermektedir. Dolayısıyla, fruktoz promotörünün ekspresyonu etkili bir şekilde tetiklediği ve transkripsiyon seviyesinde gen ifadesini artırdığı sonucu çıkarılmıştır.

Ancak, protein seviyesinde RFP' nin tespit edilememesi nedenlerinden biri, transkripsiyonun gerçekleşmesine rağmen translasyonel süreçlerde yaşanan problemler olabilir. Promotor ve gen arasındaki uyumsuzluk, mRNA sentezinin gerçekleşmesine rağmen protein üretiminin azalmasına veya proteinin kararlılığının düşmesine yol açabilir. Deneysel bulgularda, RFP mRNA'sının varlığına rağmen proteinin tespit edilememesi, translasyonel seviyede bir engelin varlığını düşündürmektedir. Bu durum,

promotorun, RFP geninin optimal translasyonu için gerekli olan 5' UTR (5' Untranslated Region) veya diğer düzenleyici bölgelerle uyumsuz olmasından kaynaklanabilmektedir. Örneğin, tütün etch virüsünün 5' UTR bölgesinin, farelerde eritropoietini ifade eden mRNA'ya eklendiğinde, farklı memeli hücre tiplerinde mRNA'nın translasyonunu artırdığı bildirilmiştir (Yılmaz, 2021). Sonuç olarak, promotor ve gen arasındaki uyumsuzluk, RFP proteininin sentezlenmemesinin olası bir nedeni olarak değerlendirilmektedir. Bu hipotezi test etmek için, promotor bölgesinin optimizasyonu veya hedef gene daha uygun bir promotor seçimi gibi stratejiler izlenebilir. Ayrıca, mRNA'nın 5' UTR bölgesinin optimizasyonu, ribozomların mRNA'ya bağlanmasını kolaylaştırarak translasyon etkinliğini artırabilir.

Translasyonun gerçekleşmemesindeki olası nedenlerden biri, kullanılan promotorun *C. sphaeroides*'te yeterince etkin çalışmaması iken, diğer bir kritik faktör de RBS dizisinin bu organizmada verimli translasyonu destekleyememesi olabilmektedir. Promotorun konak hücrede yeterince etkin çalışmaması, mRNA sentez düzeyini düşürebileceği gibi, transkripsiyon başlangıç bölgesinin beklenenden farklı olmasına da neden olabilir. Promotorun RNA polimeraz tarafından tanınmasındaki farklılıklar, RBS'nin optimal konumda bulunmamasına yol açarak ribozomun bağlanma verimliliğini azaltabilir. Bu durum translasyonun başlamasını engelleyebilir veya ciddi oranda düşürebilir. Literatürde, heterolog ekspresyon sistemlerinde promotor ve RBS arasındaki uyumsuzluğun protein sentezi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Salis vd., 2009). Özellikle, RBS'nin konak organizmaya uygun olmaması veya ikincil RNA yapılarının oluşumu, ribozom bağlanma sürecini olumsuz etkileyerek translasyonu durdurabilir (Mutalik vd., 2013). Benzer şekilde, yapılan çalışmalar promotor-RBS kombinasyonlarının organizmaya özgü optimize edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Salis vd., 2009).

Buna ek olarak, RBS'nin hemen sonrasında yer alan dizilerde, ribozomun ilerlemesini engelleyebilecek mRNA ikincil yapılarının bulunması translasyon verimliliğini olumsuz etkileyebilir. mRNA üzerinde oluşan "stem-loop" yapıları, ribozomun hareketini yavaşlatabilir veya tamamen durdurabilir. Bu durum ribozomal duraklama (stalling) olarak tanımlanmakta olup, sentezin yarım kalmasına ya da ribozom kompleksinin çözülmesine yol açabilir (Liutkute vd., 2020). Bu tür yapıların özellikle GC içeriği yüksek bölgelerde daha sık olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, RFP transkriptinde bu tür yapıların bulunmasının olası olduğu ve ribozomal ilerlemeyi baskılamış olabileceği düşünülmektedir.

Bir diğerk olası sebebin, kodon optimizasyonu eksikliğinden kaynaklanıyor olabileceği düşünölmüştür. *C. sphaeroides*'in kendi endojen proteinlerini üretirken tercih ettiğı kodonların, RFP geninin kodon kullanım profili ile uyumlu olup olmadığı araştırılmıştır. Literatürde, tRNA havuzunun organizmaya özğü olduğu ve nadiren kullanılan kodonların ribozomun duraklamasına neden olabileceğı belirtilmiştir (Omay, 2020). Bu çalışmada, RFP geninin hangi bakteri için optimize edilmiş diziyle klonlandığı bilinmediğinden, *C. sphaeroides*'in translasyon mekanizması için ideal bir kodon dağılımına sahip olup olmadığı belirsiz olmuştur. Hedef organizmanın nadiren kullandığı kodonlar sıkça bulunuyorsa, ilgili tRNA'ların düşük seviyede olması nedeniyle ribozom translasyon sırasında duraklayabilir ve protein sentezi tamamlanamayabilir.

Ayrıca translasyonla eşzamanlı protein katlanması (co-translational folding) sürecindeki aksaklıklar da proteinin doğru bir şekilde katlanamamasına ve fonksiyonel olamamasına neden olabilir. Floresan proteinler gibi yapısal olarak hassas proteinlerde bu durum özellikle önemlidir. Yanlış katlanan proteinler, fonksiyonel özelliklerini kaybetmenin ötesinde, hücre içinde dengesiz hale gelerek hızlıca yıkıma uğrayabilir. Bu çalışmada RFP proteininin translasyon sürecinde doğru katlanamaması, fonksiyonel olmayan bir yapıya sahip olmasına ve bu nedenle floresan sinyalinin tespit edilememesine yol açmış olabilir.

qPCR sonuçları RFP gen ekspresyonunun gerçekleştiğini göstermesine rağmen, protein düzeyinde herhangi bir floresan sinyali tespit edilmemiştir. Bu durum, proteinin hiç sentezlenmemiş olabileceğini düşündürse de farklı olasılıklar da göz önünde bulundurulmalıdır. RFP proteini sentezlenmiş ancak yanlış katlanarak inklüzyon cisimcikleri şeklinde birikmiş olabilir. İnküzyon cisimcikleri, genellikle rekombinant proteinlerin çözünemez agregatları olarak ortaya çıkar ve biyolojik aktivlik göstermezler (Fatima vd., 2021). Ayrıca, protein üretimi gerçekleşmiş olsa dahi, hatalı katlanma veya post-translasyonel modifikasyon eksiklikleri nedeniyle fonksiyonel bir yapı kazanamamış olabilir. Dolayısıyla, RFP' nin varlığına rağmen floresan sinyalinin gözlemlenememesi, proteinin fonksiyonel olmamasından kaynaklanıyor olabileceğı düşünöldü.

Bu olasılıkları doğrulamak veya ek bilgiler elde etmek amacıyla, protein varlığının farklı yöntemlerle analiz edilmesi gerekmektedir. Çalışmada kullanılan vektör, proteinin N-terminalinde His-tag ve SUMO füzyon bölgelerini içermektedir. Bu nedenle, ileriki çalışmalarda protein ekspresyonunu doğrulamak için His-tag veya SUMO' ya özğü antikorlarla Western blot analizi gerçekleştirilebilir. Western blot sonucunda, ilgili

bantların tespit edilmesi halinde RFP proteininin varlığı doğrulanabilir. Ayrıca, RFP proteini SUMO etiketi ile sentezlendiğinden, bu füzyon proteini için yapılan analizlerde de RFP' nin varlığı dolaylı olarak gözlemlenebilir. Eğer protein sentezlenmiş ancak floresan sinyali gözlemlenmemişse, bu durum proteinin yanlış katlandığını veya post-translasyonel modifikasyonların eksik olduğunu gösterebilir. Western blot analizi ile elde edilecek veriler, proteinin ekspresyon seviyesinin belirlenmesine ve katlanma/işlevsellik durumunun daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak, elde edilen veriler transkripsiyonun başarılı olduğunu, ancak translasyon veya translasyon sonrası süreçlerde bir engel olduğunu göstermektedir. Promotor ve RBS uyumsuzluğu, kodon optimizasyonu eksikliği ve protein stabilitesine yönelik faktörler birlikte ele alındığında, proteinin sentezlenmemesinin birden fazla potansiyel nedeni olduğu ortaya çıkmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, kodon optimizasyonu yapılmış bir RFP dizisinin kullanılması veya nadir kodonlar için ek tRNA sağlayan vektör sistemleriyle deneylerin tekrarlanmasını gerektirebilir. Ayrıca, farklı bir promotor ve RBS kombinasyonu kullanılarak translasyon verimliliğinin artırılıp artırılamayacağı değerlendirilebilir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Bu çalışmanın temel amacı, fruktoz ile indüklenebilen ekspresyon vektörüne kırmızı floresan protein (RFP) klonlayarak, bu sistemin *C. sphaeroides* hücrelerinde ekspresyonunu gözlemlemek olmuştur. Bu hedef doğrultusunda atılan her adımda elde edilen başarılar, araştırmanın verimliliğini ve doğruluğunu kanıtlamıştır.

İlk olarak, RFP geninin PCR ile çoğaltılması ve doğrulama aşamasında elde edilen sonuçlar son derece tatmin edici olmuştur. Beklenen boyutlarda bantlar agaroz jel elektroforezinde gözlemlenmiş ve genin doğru şekilde çoğaltıldığı doğrulanmıştır. Bu adım, klonlama sürecinin temelini oluşturan önemli bir gelişmedir. Ardından, Gibson Assembly yöntemi ile RFP geninin pFRU2 vektörüne klonlanması gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, *NruI* restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilmiş pFRU2 vektörü ve PCR ile çoğaltılmış RFP geni, başarılı bir şekilde birleştirilmiştir. Klonlama işlemi sonrasında, transformasyon gerçekleştirilerek bu rekombinant vektörler, uygun *C. sphaeroides* hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon ve konjugasyon işlemi, genetik materyalin *C. sphaeroides* hücrelerine doğru bir şekilde aktarılmasını sağlamış ve başarılı kolonilerin gelişmesiyle sonuçlanmıştır. Bu bulgular, rekombinant vektörün hücrelere başarılı bir şekilde aktarıldığını ve bu sürecin doğru bir şekilde ilerlediğini göstermiştir.

Sonrasında, RNA izolasyonu gerçekleştirilerek, hücre içindeki transkripsiyonel faaliyetler doğrulanmıştır. İzole edilen RNA'nın kalitesi ve saflığı, agaroz jel elektroforezi ile doğrulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen veriler, RFP geninin başarılı bir şekilde transkribe olduğunu ve RNA düzeyinde beklentilere uygun sonuçlar elde edildiğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, genin ekspresyonunun ilk aşamasının doğru işlediğini, yani transkripsiyonun başarılı olduğunu kesin bir şekilde göstermektedir.

Ancak, protein seviyesinde RFP' nin tespit edilememesi, bu çalışmanın önemli bir zorluğu olarak öne çıkmıştır. Proteinin tespit edilememesi, transkripsiyonun başarılı olduğu ancak translasyon veya sonrasındaki süreçlerde bazı engellerle karşılaşıldığını göstermektedir. Bu durum, daha önce tartıştığımız promotor ve RBS uyumsuzluğu, kodon optimizasyonu eksikliği ve protein stabilitesine yönelik sorunlar gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmış olabilmektedir. Özellikle, *C. sphaeroides*'in translasyonel mekanizmasıyla uyumsuz olan nadir kodonların sıkça bulunması, ribozomların bu

kodonlarla karşılaşarak duraklamasına ve dolayısıyla proteinin sentezinin tamamlanamamasına yol açmış olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, kullanılan promotor ve RBS dizilerinin *C. sphaeroides* için uygun olmaması, bu mikroorganizma ile uyumsuz bir translasyon verimliliği yaratmış olabileceği değerlendirilmiştir.

Tüm bunlara ek olarak, proteinin hiç sentezlenmemiş olabileceği düşünülse de farklı olasılıkların da göz önünde bulundurulması gerekmektedir. RFP proteini sentezlenmiş ancak yanlış katlanarak inklüzyon cisimcikleri şeklinde birikmiş olabilir. Inklüzyon cisimcikleri, genellikle rekombinant proteinlerin çözünemez agregatları olarak ortaya çıkar ve biyolojik aktiflik göstermezler. Eğer *C. sphaeroides*' in endojen şaperon sistemleri RFP' nin doğru katlanmasını desteklemekte yetersiz kaldıysa, proteinin çözünemez yapılar oluşturarak bu cisimciklerde birikmiş olması muhtemeldir. Ayrıca, protein üretimi gerçekleşmiş olsa dahi, hatalı katlanma veya post-translasyonel modifikasyon eksiklikleri nedeniyle fonksiyonel bir yapı kazanamamış olabilir. Dolayısıyla, RFP' nin varlığına rağmen floresan sinyalinin gözlemlenememesi, proteinin fonksiyonel olmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Bu sonuç, RFP proteininin sentezinde ciddi bir engel oluşturmuş ve çalışmanın tam amacına ulaşmasını engellemiştir. Ancak, bu engel ilerleyen çalışmalarda kodon optimizasyonu yapılmış bir RFP dizisi kullanılarak aşılabilecek önemli bir gelişmedir. *C. sphaeroides*'e özgü tRNA havuzunun göz önünde bulundurulması, tRNA seviyelerinin artırılması veya uygun promotor ve RBS dizilerinin seçilmesi, gelecekte proteinin başarıyla ekspresyonunu sağlamak için kritik adımlar olacaktır.

Özetle, elde edilen veriler, RFP geninin başarılı bir şekilde transkribe olduğunu, ancak translasyon veya translasyon sonrası engeller nedeniyle proteinin sentezlenemediğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu bulgular, gelecekteki çalışmalar için önemli ipuçları sunmakta olup kodon optimizasyonu, uygun promotor ve RBS kombinasyonları gibi faktörlerin dikkatle ele alınması gerektiğini göstermektedir. Bu çalışma, proteinin ekspresyonu için daha uygun koşullar oluşturulması gerektiğini vurgulamaktadır ve ilerleyen araştırmalar, bu engellerin üstesinden gelmeye yönelik stratejiler geliştirebilir.

## 5.2. Öneriler

- *C. sphaeroides* için kodon optimizasyonu yapılmış bir RFP dizisi kullanılarak gen ekspresyonu sağlanabilir ve translasyon verimliliği artırılabilir.
- Farklı promotor ve ribozomal bağlanma bölgesi (RBS) kombinasyonları kullanılarak, translasyon verimliliği artırılabilir.
- *C. sphaeroides*'in yabancı proteinlerin katlanmasına ve stabilitesine etkisi daha ayrıntılı bir şekilde araştırılıp şaperon proteinleri veya uygun katlanma yardımcıları kullanılarak protein stabilitesi artırılabilir.
- Fruktozun ekspresyon üzerinde etkisini daha detaylı incelemek için, farklı fruktoz konsantrasyonları ve zaman dilimleri ile yapılan deneyler tekrar edilebilir. Bu, fruktozun ekspresyonu daha etkin bir şekilde indükleyip indüklemediğini netleştirmeye yardımcı olabilir.
- Proteinin sentezi yalnızca RNA düzeyinde değil, protein düzeyinde de daha ayrıntılı bir şekilde analiz edilebilir. Bu amaçla, Western blot gibi yöntemlerle His-tag ve SUMO etiket peptitlerine özgü antikorlar kullanılarak proteinin varlığı doğrulanabilir.
- *C. sphaeroides* dışında başka bakteri suşlarında da benzer çalışmalara devam edilerek, farklı sistemlerde başarılı bir ekspresyon sağlanıp sağlanamayacağı değerlendirilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Akköse, S., Gündüz, U., Yücel, M., & Eroglu, I. (2009). Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(21), 8818-8827. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.040>
- Amer, B. R., Macdonald, R., Jacobitz, A. W., Liauw, B., & Clubb, R. T. (2016). Rapid addition of unlabeled silent solubility tags to proteins using a new substrate-fused sortase reagent. *Journal of Biomolecular NMR*, 64(3), 197-205. <https://doi.org/10.1007/s10858-016-0019-z>
- Anton, B. P., Saleh, L., Benner, J. S., Raleigh, E. A., Kasif, S., & Roberts, R. J. (2008). RimO, a MiaB-like enzyme, methylthiolates the universally conserved Asp88 residue of ribosomal protein S12 in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 1826-1831. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708608105>
- Baltacı, A. M., & Arslan, M. (2020). Bitki Islahında Crispr/Cas9 Uygulamaları. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 3(2), Article 2.
- Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., & Chruszcz, M. (2018). Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. *ACS Omega*, 3(1), 760-768. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01598>
- Bordat, A., Houvenaghel, M.-C., & German-Retana, S. (2015). Gibson assembly: An easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virology Journal*, 12(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0315-3>
- Brown, T. A. (2016). *Gene Cloning and DNA Analysis*.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2002a). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 7877-7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.082243699>
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2002b). A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 7877-7882. <https://doi.org/10.1073/pnas.082243699>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263(5148), 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Cheng, L., Chen, G., Ding, G., Zhao, Z., Dong, T., & Hu, Z. (2015). Overexpression of pucC improves the heterologous protein expression level in a *Rhodobacter*

- sphaeroides expression system. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 4058-4067. <https://doi.org/10.4238/2015.April.27.21>
- Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*, 90(3), 1103-1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
- Coşkun, V. (2017). *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., de Gruiter, H. M., Kremers, G.-J., Davidson, M. W., Ustione, A., & Piston, D. W. (2016). Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 13(7), 557-562. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3891>
- Çadırcı, B. H. (2021). *Rekombinant DNA Teknolojisi* [Text.Chapter]. Akademisyen Yayınevi Kitap DOI Portalı. <https://books.akademisyen.net/index.php/akya/catalog/view/347/344/8606>
- Darain, F., Ban, C., & Shim, Y.-B. (2004). Development of a new and simple method for the detection of histidine-tagged proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(4), 857-863. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.03.028>
- Dickinson, D. J., & Goldstein, B. (2016). CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering. *Genetics*, 202(3), 885-901. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182162>
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauß, U., Guterl, J.-K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W., & Jaeger, K.-E. (2007). Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nature Biotechnology*, 25(4), 443-445. <https://doi.org/10.1038/nbt1293>
- Duan, X., Hall, J. A., Nikaido, H., & Quijcho, F. A. (2001). Crystal structures of the maltodextrin/maltose-binding protein complexed with reduced oligosaccharides: Flexibility of tertiary structure and ligand binding. *Journal of Molecular Biology*, 306(5), 1115-1126. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4456>
- Durhan, S. T., Sezer, E. N., Son, Ç. D., & Küçük Baloğlu, F. (2022). *Fast Screening of Protein-Protein Interactions Using Förster Resonance Energy Transfer (FRET-) Based Fluorescence Plate Reader Assay in Live Cells*. <https://doi.org/10.1177/00037028221140914>
- Erard, M., Fredj, A., Pasquier, H., Beltolngar, D.-B., Bousmah, Y., Derrien, V., Vincent, P., & Merola, F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Molecular BioSystems*, 9(2), 258-267. <https://doi.org/10.1039/C2MB25303H>
- Esposito, D., Garvey, L. A., & Chakiath, C. S. (2009). Gateway Cloning for Protein Expression. İçinde S. A. Doyle (Ed.), *High Throughput Protein Expression and Purification: Methods and Protocols* (ss. 31-54). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3_3)

- Estrem, S. T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z. W. S., Niu, W., Ebright, R. H., & Gourse, R. L. (1999). *Bacterial promoter architecture: Subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase  $\alpha$  subunit*.
- Evdokimov, A. G., Pokross, M. E., Egorov, N. S., Zaraisky, A. G., Yampolsky, I. V., Merzlyak, E. M., Shkoporov, A. N., Sander, I., Lukyanov, K. A., & Chudakov, D. M. (2006). Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein.
- EMBO reports*, 7(10), 1006-1012. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400787>
- Fatima, K., Naqvi, F., & Younas, H. (2021). A Review: Molecular Chaperone-mediated Folding, Unfolding and Disaggregation of Expressed Recombinant Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 79(2), 153-174. <https://doi.org/10.1007/s12013-021-00970-5>
- Frommer, W. B., Davidson, M. W., & Campbell, R. E. (2009). Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2833. <https://doi.org/10.1039/b907749a>
- Greb, C., & DeRose, J. (2023). *Introduction to Fluorescent Proteins*. <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/fluorescent-proteins-introduction-and-photo-spectral-characteristics/>
- Güler Kara, H., Kosova, B., Doğan, E., Bozok ÇetiNtaş, V., & Şentürk, Ş. (2022). CRISPR-Cas Functional Genetic Screening: Traditional Review. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 42(4), 311-322. <https://doi.org/10.5336/medsci.2022-88507>
- Hay, R. T. (2005). SUMO: A history of modification. *Molecular Cell*, 18(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.012>
- Hernández-Valle, J., Vega-Baray, B., Poggio, S., & Camarena, L. (2024). CerM and Its Antagonist CerN Are New Components of the Quorum Sensing System in *Cereibacter sphaeroides*, Signaling to the CckA/ChpT/CtrA System. *MicrobiologyOpen*, 13(6), e012. <https://doi.org/10.1002/mbo3.70012>
- Huo, J. (2011). *Design of a BioBrick™ Compatible Gene Expression System for Rhodobacter sphaeroides*.
- Ind, A. C., Porter, S. L., Brown, M. T., Byles, E. D., De Beyer, J. A., Godfrey, S. A., & Armitage, J. P. (2009). Inducible-Expression Plasmid for *Rhodobacter sphaeroides* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6613-6615. <https://doi.org/10.1128/AEM.01587-09>
- Inui, M., Nakata, K., Roh, J. H., Vertès, A. A., & Yukawa, H. (2003a). Isolation and Molecular Characterization of pMG160, a Mobilizable Cryptic Plasmid from *Rhodobacter blasticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 725-733. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.725-733.2003>

- Inui, M., Nakata, K., Roh, J. H., Vertès, A. A., & Yukawa, H. (2003b). Isolation and Molecular Characterization of pMG160, a Mobilizable Cryptic Plasmid from *Rhodobacter blasticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 725-733. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.725-733.2003>
- Jaschke, P. R., Saer, R. G., Noll, S., & Beatty, J. T. (2011). Modification of the Genome of *Rhodobacter sphaeroides* and Construction of Synthetic Operons. İçinde *Methods in Enzymology* (C. 497, ss. 519-538). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385075-1.00023-8>
- Jefferies, M., & Hacıömeroğlu, M. (2010). Gateway Klonlama Teknolojisine Genel Bakış Daha Hızlı, Daha Kolay, Daha Etkin Bir Klonlama Yöntemi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67(1), Article 1.
- Jun, S. H., Warner, B. A., & Murakami, K. S. (2013). RNA Polymerase Reaction in Bacteria. İçinde *Encyclopedia of Biological Chemistry* (ss. 167-172). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00629-0>
- Kars, G., & Alparslan, Ü. (2013). Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a biorefinery concept. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(34), 14488-14494. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.050>
- Kars, G., & Alparslan, Ü. (2020). Evaluation of High Concentrations of Sugar Beet Molasses as Substrate for Hydrogen and 5-Aminolevulinic Acid Productions. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 32(4), 398-404. <https://doi.org/10.7240/jeps.647523>
- Kars, G., & Alparslan, Ü. (2014). Heterologous expression of glutamyl-tRNA reductase gene in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 to enhance 5-aminolevulinic acid production. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(6), 1034-1041. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.978170>
- Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science*, 73(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>
- Kuduğ Ceylan, H., İMamoğlu, R., & Gökçe, İ. (2020). Siyan (mavi) Floresan Protein Aquamarine'nin Biyoreaktörde Üretilmesi ve Saflaştırılması. *European Journal of Science and Technology*, 300-305. <https://doi.org/10.31590/ejosat.660492>
- LaFleur, T. L., Hossain, A., & Salis, H. M. (2022). Automated model-predictive design of synthetic promoters to control transcriptional profiles in bacteria. *Nature Communications*, 13(1), 5159. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32829-5>
- Li, L., Jiang, W., & Lu, Y. (2018). A Modified Gibson Assembly Method for Cloning Large DNA Fragments with High GC Contents. İçinde M. K. Jensen & J. D. Keasling (Ed.), *Synthetic Metabolic Pathways: Methods and Protocols* (ss. 203-209). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7295-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7295-1_13)

- Liu, W., Huang, Y., Zhang, H., Liu, Z., Huan, Q., Xiao, X., & Wang, Z. (2023). Factors and Mechanisms Influencing Conjugation In Vivo in the Gastrointestinal Tract Environment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/ijms24065919>
- Liutkute, M., Samatova, E., & Rodnina, M. V. (2020). Cotranslational Folding of Proteins on the Ribosome. *Biomolecules*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/biom10010097>
- LLC, G. B. (t.y.-a). *Lac promoter Sequence and Map*. Geliş tarihi 21 Mart 2025, gönderen [https://www.snapgene.com/plasmids/basic\\_cloning\\_vectors/lac\\_promoter](https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/lac_promoter)
- LLC, G. B. (t.y.-b). *T7 promoter Sequence and Map*. Geliş tarihi 19 Mart 2025, gönderen [https://www.snapgene.com/plasmids/basic\\_cloning\\_vectors/T7\\_promoter](https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/T7_promoter)
- LLC, G. B. (t.y.-c). *Tac promoter Sequence and Map*. Geliş tarihi 21 Mart 2025, gönderen [https://www.snapgene.com/plasmids/basic\\_cloning\\_vectors/tac\\_promoter](https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/tac_promoter)
- LLC, G. B. (t.y.-d). *Trc promoter Sequence and Map*. Geliş tarihi 21 Mart 2025, gönderen [https://www.snapgene.com/plasmids/basic\\_cloning\\_vectors/trc\\_promoter](https://www.snapgene.com/plasmids/basic_cloning_vectors/trc_promoter)
- Mackenzie, C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, Á., & Kaplan, S. (2007). Postgenomic Adventures with *Rhodobacter sphaeroides*. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 283-307. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093402>
- Malhotra, A. (2009a). Chapter 16 Tagging for Protein Expression. İçinde *Methods in Enzymology* (C. 463, ss. 239-258). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63016-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63016-0)
- Malhotra, A. (2009b). Chapter 16 Tagging for Protein Expression. İçinde R. R. Burgess & M. P. Deutscher (Ed.), *Methods in Enzymology* (C. 463, ss. 239-258). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63016-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63016-0)
- Mitra, A., Kesarwani, A. K., Pal, D., & Nagaraja, V. (2011). WebGeSTer DB—a transcription terminator database. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl\_1), D129-D135. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq971>
- Mougiakos, I., Orsi, E., Ghiffary, M. R., Post, W., de Maria, A., Adiego-Perez, B., Kengen, S. W. M., Weusthuis, R. A., & van der Oost, J. (2019). Efficient Cas9-based genome editing of *Rhodobacter sphaeroides* for metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1255-1>
- Mutalik, V. K., Guimaraes, J. C., Cambray, G., Lam, C., Christoffersen, M. J., Mai, Q.-A., Tran, A. B., Paull, M., Keasling, J. D., Arkin, A. P., & Endy, D. (2013). Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nature Methods*, 10(4), 354-360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2404>

- Nienhaus, G. U. (2008). The Green Fluorescent Protein: A Key Tool to Study Chemical Processes in Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(47), 8992-8994. <https://doi.org/10.1002/anie.200804998>
- Obranić, S., Babić, F., & Maravić-Vlahoviček, G. (2013a). Improvement of pBBR1MCS plasmids, a very useful series of broad-host-range cloning vectors. *Plasmid*, 70(2), 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.04.001>
- Obranić, S., Babić, F., & Maravić-Vlahoviček, G. (2013b). Improvement of pBBR1MCS plasmids, a very useful series of broad-host-range cloning vectors. *Plasmid*, 70(2), 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.04.001>
- Omay, Z. (2020). *Molecular studies on the cloning and expression of human beta interferon gene in E. coli* [masterThesis, Fen Bilimleri Enstitüsü]. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/597051>
- Patel, B. (2009). Simple, Fast, and Efficient Cloning of PCR Products with TOPO® Cloning Vectors. *BioTechniques*, 46(7), 559-559. <https://doi.org/10.2144/000113200>
- Peters, J. M., Vangeloff, A. D., & Landick, R. (2011a). Bacterial Transcription Terminators: The RNA 3'-End Chronicles. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), 793-813. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.036>
- Peters, J. M., Vangeloff, A. D., & Landick, R. (2011b). Bacterial Transcription Terminators: The RNA 3'-End Chronicles. *Journal of Molecular Biology*, 412(5), 793-813. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.036>
- Pina, A. S., Batalha, I. L., & Roque, A. C. A. (2014). Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: An overview. İçinde N. E. Labrou (Ed.), *Protein Downstream Processing* (ss. 147-168). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-977-2_14)
- Piston D. (2023). *Introduction to Fluorescent Proteins*. Nikon's MicroscopyU. <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescent-proteins>
- Qi, F., Zou, L., Jiang, X., Cai, S., Zhang, M., Zhao, X., & Huang, J. (2017). Integration of heterologous 4-hydroxybenzoic acid transport proteins in *Rhodobacter sphaeroides* for enhancement of coenzyme Q10 production. *RSC Advances*, 7(28), 17346-17352. <https://doi.org/10.1039/C7RA02346D>
- Rodriguez, E. A., Tran, G. N., Gross, L. A., Crisp, J. L., Shu, X., Lin, J. Y., & Tsien, R. Y. (2016). A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein. *Nature Methods*, 13(9), 763-769. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3935>
- Salis, H. M., Mirsky, E. A., & Voigt, C. A. (2009). Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nature Biotechnology*, 27(10), 946-950. <https://doi.org/10.1038/nbt.1568>

- Sasaki, K., Watanabe, M., Suda, Y., Ishizuka, A., & Noparatnaraporn, N. (2005). Applications of photosynthetic bacteria for medical fields. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 481-488. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.481>
- Seifert, K., Thiel, M., Wicher, E., Włodarczak, M., Łaniecki, M., Seifert, K., Thiel, M., Wicher, E., Włodarczak, M., & Łaniecki, M. (2012). Microbiological Methods of Hydrogen Generation. İçinde *Biogas*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/33563>
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905-909. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
- Shi, T., Zhang, L., Liang, M., Wang, W., Wang, K., Jiang, Y., Liu, J., He, X., Yang, Z., Chen, H., Li, C., Lv, D., Zhou, L., Chen, B., Li, D., Zhang, L.-X., & Tan, G.-Y. (2021).
- Screening and engineering of high-activity promoter elements through transcriptomics and red fluorescent protein visualization in *Rhodobacter sphaeroides*. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(4), 335-342. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.09.011>
- Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y., & Remington, S. J. (2006). Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits. *Biochemistry*, 45(32), 9639-9647. <https://doi.org/10.1021/bi060773l>
- Siemann, S., Schneider, K., Dröttboom, M., & Müller, A. (2002). The Fe-only nitrogenase and the Mo nitrogenase from *Rhodobacter capsulatus*: A comparative study on the redox properties of the metal clusters present in the dinitrogenase components. *European Journal of Biochemistry*, 269(6), 1650-1661. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2002.02804.x>
- Suwanto, A., & Kaplan, S. (1992). A self-transmissible, narrow-host-range endogenous plasmid of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Physical structure, incompatibility determinants, origin of replication, and transfer functions. *Journal of Bacteriology*, 174(4), 1124-1134. <https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1124-1134.1992>
- Tikh, I. B., Held, M., & Schmidt-Dannert, C. (2014). BioBrick™ compatible vector system for protein expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7), 3111-3119. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5527-8>
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509-544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Tunç, E., & Tunç, E. (2020). İn vivo floresan görüntüleme ve in vivo uygulamalarda kullanılan florofor bileşikler. *Pamukkale Medical Journal*. <https://doi.org/10.31362/patd.589329>
- Uchinomiya, S., Nonaka, H., Wakayama, S., Ojida, A., & Hamachi, I. (2013). In-cell covalent labeling of reactive His-tag fused proteins. *Chemical Communications*, 49(44), 5022. <https://doi.org/10.1039/c3cc41979g>

- Van Niel, C. B. (1944). The Culture, General Physiology, Morphology, And Classification Of The Non-Sulfur Purple And Brown Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 8(1), 1-118. <https://doi.org/10.1128/br.8.1.1-118.1944>
- Verméglio, A., & Joliot, P. (1999). The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends in Microbiology*, 7(11), 435-440. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01625-x](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01625-x)
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
- Wang, J.-W., Wang, A., Li, K., Wang, B., Jin, S., Reiser, M., & Lockey, R. F. (2015). CRISPR/Cas9 Nuclease Cleavage Combined with Gibson Assembly for Seamless Cloning. *BioTechniques*, 58(4), 161-170. <https://doi.org/10.2144/000114261>
- Xu, R., & Qingshun, L. Q. (2008). Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway® TOPO vector system. *Plant Methods*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-4>
- Yavuz, A. (2008). *Promotorlar ve Parazitolojide Kullanımları*.
- Yavuz, İ. (2008). *Promotorlar ve Parazitolojide Kullanımları*.
- Yılmaz, E. (2021). Aşı Teknolojisinde Yeni Umutlar: mRNA Aşıları. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 55(2), 265-284. <https://doi.org/10.5578/mb.20219912>
- Yüksel, N. (2022, Nisan 26). *Translasyon Hızını Etkileyen Parametreler*. Dr.Bioengineer. <https://www.drbioengineer.com/post/translasyon-hızını-etkileyen-parametreler>
- Zhao, X., Li, G., & Liang, S. (2013). Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>
- Zimmer, M. (2002). Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews*, 102(3), 759-782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>

**EKLER****EK-1.** Geleneksel Klonlama Sonrası Sekans Analizi

5'GCAAGGCCGAAGGCCGCGCAGTCGATCAACAAGCCCCGGAGGGGCCACT  
TTTTGCCGGAGGGGGAGCCGCGCCGAAGGCGTGGGGGAACCCCGCAGGGG  
TGCCCTTCTTTGGGCACCAAAGAACTAGATATAGGGCGAAATGCGAAAGAC  
TTAAAAATCAACAACCTTAAAAAAGGGGGGTACGCAACAGCTCATTGCGGCA  
CCCCCGCAATAGCTCATTGCGTAGGTAAAGAAAATCTGTAATTGACTGCC  
ACTTTTACGCAACGCATAATTGTTGTCGCGCTGCCGAAAAGTTGCAGCTGAT  
TGCGCATGGTGCCGCAACCGTGCGGCACCCCTACCGCATGGAGATAAGCAT  
GGCCACGCAGTCCAGAGAAATCGGCATTCAAGCCAAGAACAAGCCCGGTCA  
CTGGGTGCAAACGGAACGCAAAGCGCATGAGGCGTGGGCCGGGCTTATTGC  
GAGGAAACCCACGGCGGCAATGCTGCTGCATCACCTCGTGGCGCAGATGGG  
CCACCAGAACGCCGTGGTGGTCAGCCAGAAGACACTTTCCAAGCTCATCGG  
ACGTTCTTTGCGGACGGTCCAATACGCAGTCAAGGACTTGGTGGCCGAGCG  
CTGGATCTCCGTTCGTGAAGCTCAACGGCCCCGGCACCGTGTCCGCCTACGTG  
GTCAATGACCGCGTGGCGTGGGGCCAGCCCCGCGACCAGTTGCGCCTGTGC  
GTGTTCAAGTGCCGCCGTGGTGGTTGATCACGACGACCAGGACGAATCGCTG  
TTGGGGCATGGCGACCTGCGCCGCATCCCGACCCTGTATCCGGGCGAGCAG  
CAACTACCGACCGGCCCGGCGAGGAGCCGCCCAGCCAGCCCGGCATTCCG  
GGCATGGAACCAGACCTGCCAGCCTTGACCGAAACGGAGGAATGGGAACG  
GCGCGGGCAGCAGCGCCTGCCGATGCCCGATGAGCCGTGTTTTCTGGACGA  
TGGCGAGCCGTTGGAGCCGCCGACACGGGTCACGCTGCCGCGCCGGTAGCA  
CTTGGGTTGCGCAGCAACCCGTAAGTGCCTGTTCCAGACTATCGGCTGTAG  
CCGCCTCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCA  
TGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACG  
GATTCACCGTTTTTATCAGGCTCTGGGAGGCAGAATAAATGATCATATCGTC  
AATTATTACCTCCACGGGGAGAGCCTGAGCAAACCTGGCCTCAGGCATTTGA  
GAAGCACACGGTCACACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCA  
ATAGACATAAGCGGCTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGACGACCGGGTC  
GAATTTGCTTTCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGC  
GTAGCAACCAGGCGTTTAAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGC  
CCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGAT

TTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATGATCCGATGGTGATTGATT  
GAGCAAGCTTTATGCTTGTAACCGTTTTGTGAAAAAATTTTTAAAATAAAA  
AAGGGGACCTCTAGGGTCCCCAATTAATTAGTAATATAATCTATTAAAGGTC  
ATTCAAAAGGTCATCCACCGGATCTCACTTAACTACTAGTCAATGGTGATGG  
TGATGGTGTCGCGACTCCTCCCCAGATCGCTCATGGATTCACCTTACCGAAT  
TGTGGAAACGTTTCCACTTGATTTTTCGCTGAGATGACCTTTTCGGCCGCCG  
CTCGGGATCTTCTTGCCCTGGGAACGCCCGCGCGTCATTCTCGGCGCCGATC  
CAAGTGGAACGATTGCGCATGACCGTCAGCATCAAGGATGTGCCCGTGC  
GGCGGGCGTTGCGCCCTCCACCGTTTCGCGGGCGCTGGGAAAGGGGCCCGT  
CAGCGCGGAAGTGCGGACACTGGTCGAGGCAGCGGTGGCCGCGACGGGAT  
ACCGGCCAACCTCTCGGCCCGCCGGCTGCGCTCGCAGGCTCCGACCACCG  
TGGGTCTGGTGCTGGCCGACATCCGCAACCCGTTCTTCACGCGCCTGAGCTT  
TGGCGTCGAGGATGCAGCCTACCGCGCGGGCCTCCGGGTCTTTCTCTGCAAC  
ACCGACGAGGACCCGGCGCGGAGGCGATGCATCTCGAGATGATGGCGGG  
CGAACGGGTGAGCGGGCTGATCCTTGCCCCACCCGCCAGTTGCAGCCCGA  
GGCTCTGAAACGGCTCAGGATGCCGGTGGTGCTGGTGGATCGCGTCCCGGA  
AGGCGCCGGCTGCGATGCCGTACGCTGGACAACGAGGGGGCGATGCGGG  
CGCTCGTCGATCATGTGGTGGCGGGCGGGCGGCGGGGATCTCGGGCCTCT  
TCGGGGCGAACAGCTTCACCGGCGAGGCGCGGAATCTAGATTTGCCATGG  
GGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAG  
CCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCATAGAAGGCGGGC  
GTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCGGTCATTT  
CGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGG  
CGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGG  
TCAGCCCATTGCGCCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTA  
TGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAG  
AAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGG  
TCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACA  
GTTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGAC  
AAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGG  
TGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCA  
TCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGA  
TCCTGCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGA  
CAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATA

GCCGCGCTGCCTCGTCCTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTT  
GACAAAAAGAACCGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCAT  
CAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCAC  
CCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAA  
CGATCCTCATCCTGTCTCTTGATCAGATCTTGATCCCCTGCGCCATCAGATCC  
TTGGCGGCAAGAAAGCCATCCAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACC  
AGAGGGCGCCCCAGCTGGCAATTCCGGTTCGCTTGCTGTCCATAAAACCGC  
CCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCCACTGCAAGCTACCTGCTTTCTCTTT  
GCGCTTGCGTTTTCCCTTGTCAGATAGCCCAGTAGCTGACATTCATCCCAG  
GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGCCC GCGTTCCTGCTGGCGCTGGGCC  
TGTTTCTGGCGCTGGACTTCCCGCTGTTCCGTCAGCAGCTTTTCGCCACGG  
CCTTGATGATCGCGGCGGCCTTGGCCTGCATATCCCGATTCAACGGCCCCAG  
GGCGTCCAGAACGGGCTTCAGGCGCTCCCGAAGGTCTCGGGCCGTCTCTTG  
GGCTTGATCGGCCTTCTTGCGCATCTCACGCGCTCCTGCGGCGGCCTGTAGG  
GCAGGCTCATAACCCTGCCGAACCGCTTTTGTGTCAGCCGGTTCGGCCACGGCTT  
CCGGCGTCTCAACGCGCTTTGAGATTCCCAGCTTTTCGGCCAATCCCTGCGG  
TGCATAGGCGCGTGGCTCGACCGCTTGCGGGCTGATGGTGACGTGGCCCAC  
TGGTGGCCGCTCCAGGGCCTCGTAGAACGCCTGAATGCGCGTGTGACGTGC  
CTTGCTGCCCTCGATGCCCCGTTGCAGCCCTAGATCGGCCACAGCGGCCGCA  
AACGTGGTCTGGTCGCGGGTCATCTGCGCTTTGTTGCCGATGAACTCCTTGG  
CCGACAGCCTGCCGTCCTGCGTCAGCGGCACCACGAACGCGGTTCATGTGCG  
GGCTGGTTTTCGTCACGGTGGATGCTGGCCGTCACGATGCGATCCGCCCCGTA  
CTTGTCGCCAGCCACTTGTGCGCCTTCTCGAAGAACGCCGCCTGCTGTTCT  
TGGCTGGCCGACTTCCACCATTCCGGGCTGGCCGTCATGACGTA CTGACCG  
CCAACACAGCGTCCTTGCGCCGCTTCTCTGGCAGCAACTCGCGCAGTCGGCC  
CATCGCTTCATCGGTGCTGCTGGCCGCCAGTGCTCGTTCTCTGGCGTCCTG  
CTGGCGTCAGCGTTGGGCGTCTCGCGCTCGCGGTAGGCGTGCTTGAGACTG  
GCCGCCACGTTGCCATTTTCGCCAGCTTCTTGATCGCATGATCGCGTATG  
CCGCCATGCCTGCCCTCCCTTTTGGTGTCCAACCGGCTCGACGGGGGCAGC  
GCAAGGCGGTGCCCTCCGGCGGGCCACTCAATGCTTGAGTATACTCACTAGA  
CTTTGCTTCGCAAAGTCGTGACCGCCTACGGCGGCTGCGGGCGCCCTACGGGC  
TTGCTCTCCGGGCTTCGCCCTGCGCGGTGCTGCGCTCCCTTGCCAGCCCGT  
GGATATGTGGACGATGGCCGCGAGCGGCCACCGGCTGGCTCGCTTCGCTCG  
GCCCGTGGACAACCCTGCTGGACAAGCTGATGGACAGGCTGCGCCTGCCCA

CGAGCTTGACCACAGGGATTGCCACCGGCTACCCAGCCTTCGACCACATA  
CCCACCGGCTCCAACCTGCGCGGCCTGCGGCCTTGCCCCATCAATTTTTTTAA  
TTTTCTCTGGGGAAAAGCCTCCGGCCTGCGGCCTGCGCGCTTCGCTTGCCGG  
TTGGACACCAAGTGGAAGGCGGGTCAAGGCTCGCGCAGCGACCGCGCAGC  
GGCTTGGCCTTGACGCGCCTGGAACGACCCAAGCCTATGCGAGTGGGGGCA  
GTCGAAGGGCGAAGCCCGCCCGCCTGCCCCCGAGCCTCACGGCGGCGAGT  
GCGGGGGTTCCAAGGGGGCAGCGCCACCTTGGGCAAGGCCGAAGGCCGCG  
CAGTCGATCAACAAGCCCCGGAGGGGCCACTTTTTGCCGGAGGGGGAGCCG  
CGCCGAAGGCGTGGGGGAACCCCGCAGGGGTGCCCTTCTTTGGGCACCAA  
GAACTAG



**EK-2.1** Gibson Assembly Yöntemi Sonrası Sekans Analizi

5'GAAANGGGAATTCCTTGGANTCGGCGCCGAGAATGACGCGCGGGCGTTCC  
 CAAGGCAAGAAGATCCCGAGCGGGCGGCCGAAAAGGTCATCTCAGCGAAAA  
 ATCAAGTGGAACGTTTCCACAATTCGGTAAGGTGAATCCATGAGCGATCT  
 GGGGAGGAGTCGATGGCTTCCTCCGAAGACGTTATCAAAGAGTTCATGCGT  
 TTCAAAGTTCGTATGGAAGGTTCCGTTAACGGTCACGAGTTCGAAATCGAA  
 GGTGAAGGTGAAGGTCGTCCGTACGAAGGTACCCAGACCGCTAAACTGAAA  
 GTTACCAAAGGTGGTCCGCTGCCGTTTCGCTTGGGACATCCTGTCCCCGCAGT  
 TCCAGTACGGTTCCAAAGCTTACGTTAAACACCCGGCTGACATCCCGGACTA  
 CCTGAAACTGTCCTTCCCGGAAGGTTTCAAATGGGAACGTGTTATGAACTTC  
 GAAGACGGTGGTGTGTTACCGTTACCCAGGACTCCTCCCTGCAAGACGGT  
 GAGTTCATCTACAAAGTTAAACTGCGTGGTACCAACTTCCCGTCCGACGGTC  
 CGGTTATGCAGAAAAAAACCATtAGCTTCCACCGAACGTATGTACCCGGAAG  
 ACGGTGCTCTGAAAGGTGAAATCAAATGCGTCTGAAACTGAAAGACGGTG  
 GTCACTACGACGCTGAAGTTAAAACCACCTACATGGCTAAAAAACCGGTTC  
 AGCTGCCGGGTGCTTACAAAACCGACATCAAACCTGGACATCACCTCCCACA  
 ACGAAGACTACACCATCGTTGAACAGTACGAACGTGCTGAAGGTCGTCACT  
 CCACCGGTGCTTAAACGACACCATCACCATCACCATTGACTAGTAGTTAAGTG  
 AGATCCGGTGGATGACCTTTTGAATGACCTTTAATAGATTATATTACTAATT  
 AATTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTATTTTAAAAATTTTTTCACAAA  
 CGGTTTACAAGCATAAAGCTTGCTCAATCAATCACCATCGGATCATTTTGTT  
 AAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCATTAGGCC  
 GTACTGCGATGAATGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGGAGTTATTG  
 GTGCCC3'

..... RFP

**EK-2.2.** Gibson Assembly Yöntemi Sonrası Sekans Analizi

5' ACCGGTGGAGTGACGACCTTCAGCACGTTTCGTA CTGTTCAACGACCCTGTT  
TAGTTCGTTGTGGGAGGTGATGTCCAGTTTGATGTCGGCTTTGTAAGCACCC  
GGCAGCTGAACCGGTTTTTTAGCCATGTAGGTGGTTTTAACTTCAGCGTCGT  
AGTGACCACCGTCTTTCAGTTTCAGACGCATTTTGATTTACCTTTCAGAGC  
ACCGTCTTCCGGGTACATACGTTTCGGTGGAAGCTTCCCAACCCATGGTTTTT  
TTCTGCATAACCGGACCGTTCGGACGGGAAGTTGGTACCACGCAGTTTAACTT  
TG TAGATGAACTCACCGTCTTGCAGGGAGGAGTCCTGGGTAACGGTAACAA  
CACCACCGTCTTCGAAGTTCATAACACGTTCCCATTTGAAACCTTCCGGGAA  
GGACAGTTTCAGGTAGTCCGGGATGTCAGCCGGGTGTTTAAACGTAAGCTTTG  
GAACCGTACTGGA ACTGCGGGGACAGGATGTCCAAGCGAACGGCAGCGG  
ACCACCTTTGGTAACTTTCAGTTTAGCGGTCTGGGTACCTTCGTACGGACGA  
CCTTCACCTTCACCTTCGATTTGAACTCGTGACCGTTAACGGAACCTTCCA  
TACGAACTTTGAAACGCATGAACTCTTTGATAACGTCTTCGGAGGAAGCCAT  
CGACTCCTCCCCAGATCGCTCATGGATTCACCTTACCGAATTGTGGAAACGT  
TTCCACTTGATTTTTCGCTGAGATGACCTTTTCGGCCGCCGCTCGGGATCTTC  
TTGCCTTGGGAACGCCGCGCGTCATTCTCGGCGCCGATCCAAGTGGA AAC  
GATTGCGCATGACCGTCAGCATCAAGGATGTCGCCCGTGCGGCGGGCGTTG  
CGCCCTCCACCGTTTCGCGGGCGCTGGGAAAGGGGCCCGTCAGCGCGGAAG  
TGCGGACACTGGTTCGAGGCAGCGGTGGC3'

..... RFP