T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA* L.) *ß-GLUKOZİDAZ* GENİNİN *PICHIA PASTORIS*'TE HÜCRE DIŞI İFADESİ

SERPİL DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT

İSTANBUL, 2015

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Serpil DEMİR tarafından hazırlanan tez çalışması 06.07.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Şenay Vural Korkut

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Yrd. Doç. Dr. Emel ORDU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL

Ahi Evran Üniversitesi _____

Bu çalışmanın bir bölümü, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2012-01-07-KAP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Öncelikle bana güvenip inanan, çalışmalarımda daima destekçi ve yol gösterici olan danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Şenay Vural KORKUT'a içten teşekkürlerimi sunarım. Hem kendilerini izleyerek hem de ihtiyaç duyduğum her an bilgilerine danışarak çok şey öğrendiğim sevgili hocalarım Dr. Günseli GÜN KURT ve Dr. Esra YÜCA'ya da en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın bir kısmı Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'ün yürütücüsü olduğu BAP projesinden desteklenmiştir, kendisine de teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi bu zorlu süreçte de en büyük güç ve moral kaynağım olan aileme ve bilhassa anneme çok teşekkürler ederim. Dönem ve proje arkadaşım Gözde ZEYTUN'a da desteğinden dolayı özellikle teşekkür ediyorum.

Temmuz, 2015

Serpil DEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ iv

İÇİNDEKİLER v

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

ÇİZELGE LİSTESİ xi

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.1.1 *ß-Glukozidaz*lar ve Sınıflandırılmaları 1
1.1.2 Enzimin İşlevleri ve Biyoteknolojik Kullanım Potansiyeli 3
1.1.2.1 Bitkilerde Savunma 3
1.1.2.2 Meyve Olgunlaşması ve Tat Bileşiklerinin Oluşumu 4
1.1.2.3 Bitkilerde Hücre Duvarı Metabolizması 5
1.1.2.4 Bitkilerde Abiyotik Strese Dayanıklılık 5
1.1.2.5 Biyokütle Yıkımı 5
1.1.2.6 *ß- Glukozidaz*ın Farmakolojik Kullanım Alanları 6
1.1.3 Zeytin 7
1.1.3.1 Zeytinin Sınıflandırılması, Özellikleri, Yayılışı 7
1.1.3.2 Oleuropein 9
1.1.4 Ekspresyon Sistemi Olarak *Pichia pastoris* 13
1.1.4.1 *Pichia pastoris* 'in Genel Özellikleri 13
1.1.4.2 aox1 Mutantlarının Fenotipi 14
1.1.5 *Pichia pastoris*'te rekombinant *ß-glukozidaz* üretimi 14
1.2 Tezin Amacı 15
1.3 Hipotez 15

BÖLÜM 2

MATERYAL METOT 16

2.1 Tamponlar, Çözeltiler ve Agaroz Jel 16
2.2 Besiyerleri 18
2.2.1 LS-LB (Low Salt Luria Broth) 18
2.2.2 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 18
2.2.3 YPDS + Zeosin Agar (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol) 19
2.2.4 BMGY (Buffered Rich Glycerol Medium) 19
2.2.5 YPM 19
2.3 Moleküler Markerlar 20
2.4 Kullanılan Enzimler ve Kitler 20
2.5 Vektör 21
2.6 Oligonükleotitler 23
2.7 Kullanılan Programlar ve Cihazlar 24
2.7.1 Primer 3 24
2.7.2 BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) 24
2.7.3 FinchTV 24
2.7.4 Cihazlar 24
2.8 PCR Raksiyonu 25
2.9 PCR Ürününün Agaroz Jelde Analizi ve Saflaştırılması 26
2.10 PCR Ürünü ve Ekspresyon Vektörünün Kesimi 26
2.11 Kesim Sonuçlarının Jelden Saflaştırılması ve Yoğunluklarının Ölçümü 27
2.12 PCR Ürününün Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu 27
2.13 Bakteriye Transformasyon 28
2.14 Pozitif Kolonilerin Analizi 28
2.15 Dizin Analizi 29
2.16 *Pichia Pastoris*'e Transformasyon 29
2.16.1 Rekombinant Ekspresyon Vektörünün Lineerizasyonu 29
2.16.2 Kimyasal Kompetent Maya Hücrelerinin Hazırlanması 30
2.16.3 Kimyasal Transformasyon 31
2.16.4 Rekonbinant Maya Hücrelerinde *ß-glukozidaz* Aktivitesinin Analizi 31
2.16.5 Yüksek Hacimde Büyütme 32
2.16.6 Protein Yoğunlaştırılması 32
2.16.7 Protein Miktar Tayini 32
2.16.8 Ni-IDA (Nikel İminodiasetik Asit) Saflaştırması 33
2.16.9 pNPG ile Aktivite Ölçümü 34
2.16.10 SDS-PAGE Analizi 35
2.16.11 Oleuropein Kullanılarak Enzim Aktivite Ölçümü 36

BÖLÜM 3

SONUÇLAR 39

3.1 PCR Sonuçlarının Analizi ve Jelden Ekstraksiyonu 39

3.2 Vektör ve ß-glukozidaz cDNA'sının Kesimi 39
3.3 PCR Ürününün Ligasyon ve Transformasyonu 41
3.4 Pozitif Kolonilerin Analizi 41
3.5 Dizin Analizi ve BLAST Sonuçları 42
3.6 Ekspresyon Sistemi *Pichia pastoris*'e Transformasyon 46
3.7 Transformant Maya Kolonilerinde Ekspresyon Analizi 47
3.8 Büyük Hacim Kültürlerde Büyüme Hızı ve Aktivite Değişimi 47
3.9 Bradford Ölçümü Sonuçları 48
3.10 pNPG ile Aktivite Ölçümü 51
3.11 Rekombinant Proteinin SDS PAGE ile Analizi 51
3.12 Oleuropein ile Aktivite Ölçümü 55

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 57

KAYNAKLAR 59

EK-A 67

S3 PLAZMİTİ DİZİLEME VE BLAST SONUÇLARI 67

A-1 Dizin Analizi Sonucu 67
A-2 BLAST Sonucu 69

EK-B 71

İnsertli Ekpresyon Vektörünün Dizin Analizi 71

B-1 5' *AOX1* primeriyle Dizileme Sonucu 71
B-2 3'*AOX1* Primeriyle Dizileme Sonucu 72

EK-C 73

C-1 pNPG Aktivite Ölçümü Sonucu 400 nm'deki Absorbanslar 73
C-2 DNS Ölçümü Sonucu 540 nm'deki Absorbanslar 74

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
bp	Baz çifti
kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
ng	Nanogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
rcf	Rölatif santrifugal kuvvet
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
U	Birim
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/ Hacim

KISALTMA LİSTESİ

BLAST	Ana Yerel Hizalama Arama Motoru
BMGY	Tamponlanmış Zengin Gliserol Besiyeri
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
DTT	DiTiyoTreitol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GH1	Glikohidrolaz Aile 1
IPTG	İzopropil β-D- tiogalaktozit
LS-LB	Low Salt-Luria Broth
MGY	Minimal Gliserol
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PAGE	Poli Akrilamit Jel Elektroforezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pNP-G	4-Nitrofenil-beta-D-glukopiranoside
RNA	Ribonükleik Asit
SDS	Sodyumdodesilsülfat
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D- galaktozit

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1. 1 *ß-glukozidaz*ın etki ettiği bağ (a) ve substratı (b) 1
Şekil 1. 2 GH1 ailesinden Pirinç (*Oryza sativa*) Os4BGlu12 apo protein yapısı asimetrik biriminin şerit diyagramı gösterimi [5] 3
Şekil 1. 3 Kurtbağrı (*Ligustrum obtusifolium*) bitkisinde oleuropein aktivasyonu için önerilmiş kimyasal model[8] 4
Şekil 1. 4 *Selülaz* [22] 6
Şekil 1. 5 Zeytinin dünya genelindeki dağılımı (37) 8
Şekil 1. 6 Zeytinin Türkiye'deki dağılımı (33), (34) 8
Şekil 1. 7 Oleuropeinin kimyasal yapısı [35] 9
Şekil 1. 8 Ligstrosid ve demetiloleuropeinin kimyasal yapıları [35] 10
Şekil 1. 9 Zeytin fenoliklerinin hidrolizi [37] 11
Şekil 2. 1 pPICZα B vektörünün haritası 21
Şekil 2. 2 pPICZα B vektörünün çoklu klonlama bölgesi 23
Şekil 2. 3 Ekspresyon vektörünün maya genomuna insersiyonu 30
Şekil 3. 1 Başlangıç pcr jelinin fotoğrafı. 39
Şekil 3. 2 Vektör ve insertte yapışkan uç oluşturma kesimi 40
Şekil 3. 3 Kesilmiş vektörün agaroz jel görüntüsü 40
Şekil 3. 4 Kesilmiş insertin agaroz jel görüntüsü 41
Şekil 3. 5 Transformant kolonilerde insert arama kesimi 42
Şekil 3. 6 Vektöre ligasyonu yapılan insertten okunan dizinin BLAST analizi 43
Şekil 3. 7 Vektöre ligasyonu yapılan insertten okunan dizinin BLAST analizi (devamı) 44
Şekil 3. 8 Vektöre ligasyonu yapılan insertten okunan dizinin BLAST analizi (devamı) 45
Şekil 3. 9 Boş vektör lineerizasyon kesimi sonuçları. 46
Şekil 3. 10 İnsertli vektör lineerizasyon kesimi sonucu 46
Şekil 3. 11 Koloni taraması aktivite ölçümü sonuç grafiği 47
Şekil 3. 12 Büyük hacimde büyütülen kolonilerde büyüme hızı grafiği 48
Şekil 3. 13 Büyük hacim kolonilerinde günlük aktivite ölçümü sonuçları 48
Şekil 3. 14 Bradford ölçümü protein standardı grafiği 49
Şekil 3. 15 Amonyumsülfatla konsantre edilen örneklerin PAGE jeli 52
Şekil 3. 16 His tag saflaştırma jeli 53
Şekil 3. 17 Ekspresyon kültürü örneklerinin SDS-PAGE jel görüntüsü. 54
Şekil 3. 19 DNS ölçümü glukoz standardı grafiği 55

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1. 1 Zeytin (*Olea europaea*) bitkisinin sınıflandırılması 7
Çizelge 2. 2 Kullanılan moleküler markerlar 20
Çizelge 2. 2 Kullanılan kitler 20
Çizelge 2. 3 Kullanılan enzimler 20
Çizelge 2. 4 Oligonükleotitler 23
Çizelge 2. 5 Kullanılan cihazlar 24

ÖZET

ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA* L.) *ß-GLUKOZİDAZ* GENİNİN *PICHIA PASTORIS*'TE HÜCRE DIŞI İFADESİ

Serpil DEMİR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

*ß- Glukozidaz*lar tüm canlı gruplarında bulunan yaygın bir enzim grubudur. Glikozit veya oligosakkaritlerin indirgen olmayan uçlarındaki ß-D-glukozil kökünün hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Reaksiyon sonucunda bitkilerde biyotik hasara karşı caydırıcı kimyasallar, abiyotik strese uyum için aktive edilmiş hormonlar, hücre duvarı lignifikasyonu için monomerler, aromatik tat bileşikleri; mikroorganizmalarda selülozik biyokütlenin yıkımıyla oluşan glukoz; memelilerde diyetle alınan flavonoid glikozitlerin emilebilir aglikonları ya da yaşlı kan elemanlarının hücre zarı lipitlerinin yıkım ürünleri gibi çok çeşitli bileşikler oluşur. Türkiye'nin en önemli kültür bitkilerinden biri olan zeytin (*Olea europaea L*.) böcek ve patojen istilasına ve UV ışınımına karşı koruyucu bir fenolik bileşik olan oleuropeini özellikle yapraklarında bol miktarda üretir. Bu bileşik ham zeytin meyvesinin acılığından da sorumludur ve olgunlaşma sırasında *özgün ß-glukozidaz*lar tarafından hidrolizlenmesi ile acılık giderilir. Hidroliz ürünlerinden biri olan oleuropein aglikonu antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik vb. farmokolojik özellikleriyle dikkat çekmektedir. Oleuropeinden, *ß-glukozida*zın da dahil olduğu hidroliz tepkimeleri sonucu üretilen hidroksitirozol de çok güçlü bir antioksidan bileşiktir ve aynı zamanda antikarsinojenik, kalp hastalıklarından koruyucu özellikler göstermektedir. *ß-glukozidaz*, zeytin endüstrisinin yan ürünü olan yapraktan ve atık işleme suyundan yüksek katma değerli fenolik bileşiklerin üretiminde ve zeytin

acılığının giderilmesinde kullanım alanı bulabilecek bir enzimdir.Bu çalışmada, laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarda zeytin yaprağından klonlanan *ß-glukozidaz* geni güçlü bir ökaryotik ekspresyon sistemi olan *Pichia pastoris*'e klonlanmış ve ekstraselüler ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Olea europaea L.*, *ß-glukozidaz*, yaprak, oleuropein, hidroksitirozol, *Pichia pastoris*, klonlama, heterolog ekspresyon.

ABSTRACT

EXTRACELLULAR EXPRESSION OF OLIVE (*OLEA EUROPAEA* L.) *ß-GLUCOSIDASE* GENE IN *PICHIA PASTORIS*

Serpil DEMİR

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

*ß- glucosidase*s are ubiquitous among all domains of living organisms. They catalyze the hydrolysis of the ß-D-glucosyl residue at the non-reducing ends of the oligosaccharides and glycosides. Reaction causes various compounds such as, deterrent chemicals against biological damage, activated hormones for adaptation to abiotic stress, monomers for cell wall lignification, aromatic taste compounds in plants; glucose from the destruction of cellulosic biomass in the microorganisms; absorbable aglycones of dietary flavonoid glycosides or destruction products of cell membrane lipids which belong to aged blood cells in mammals. Being one of Turkey's the most important cultivar plants *Olea europaea L.* produces large amounts of oleuropein especially within leaves, a phenolic compound against insect or pathogen invasion and UV radiation. Oleuropein is predominant in unripe olive fruit and is responsible for pungency and is hydrolyzed by specific *ß-glucosidase*s during ripening. Oleuropein aglycon is one of the hydrolysis products and is outstanding with its antimicrobial, antidiabetic, antioxidant etc pharmacological properties. Hydroxytyrosol is one of the components of oleuropein and is a product of hydolysis reactions involving *ß-glucosidase*. It is a potent antioxidant compound exhibiting anticarsinogenic and cardiovascular preventative properties. *ß-glucosidase* has potential uses for debittering olive fruits and valorization of abundant olive leaves and olive mill waste water which are byproducts of olive industry. In this research, *ß-glucosidase* gene

which has been previously constructed from olive leaf has been extracellularly expressed in *Pichia pastoris*, a eukaryotic expression system.

Keywords: *Olea europaea L.*, *ß-glucosidase*, oleuropein, *Pichia pastoris*, hydroxytyrosol, olive leaf, cloning, heterologous expression.

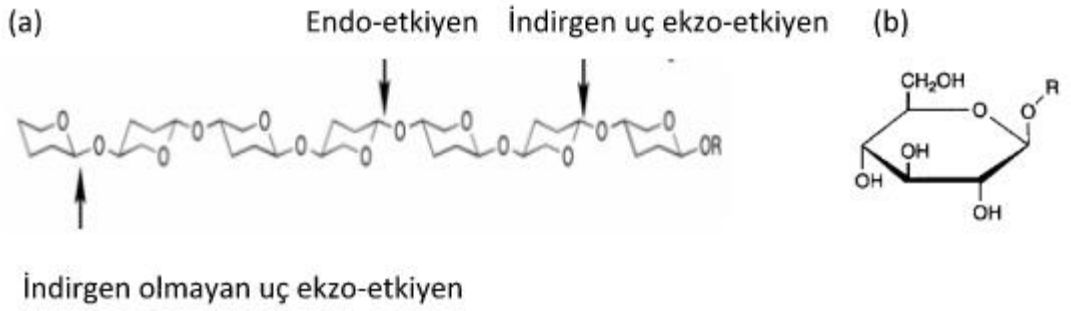
BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 *ß-Glukozidaz*lar ve Sınıflandırılmaları

*ß-glukozidaz*lar (ß-D-glukopiranosid glukohidrolazlar) tüm canlı gruplarında evrensel bir dağılım gösterirler. Selülozik biyokütle yıkımı, siyanojenez, glukozile flavonoidlerin serbest bırakılması, lignoselülozdan etanol üretimi, fitohormon aktivasyonu gibi biyolojik süreçlerde çok önemli rol oynarlar. Glikozit ve oligosakkaritlerin indirgen olmayan uçlarındaki ß-D-glukozil kökünün hidrolizini sağlarlar, sonuçta serbest bir ß-D-glukoz oluşur. Ekzo-tip glikozit hidrolaz enzimleridirler, (Şekil 1.1).



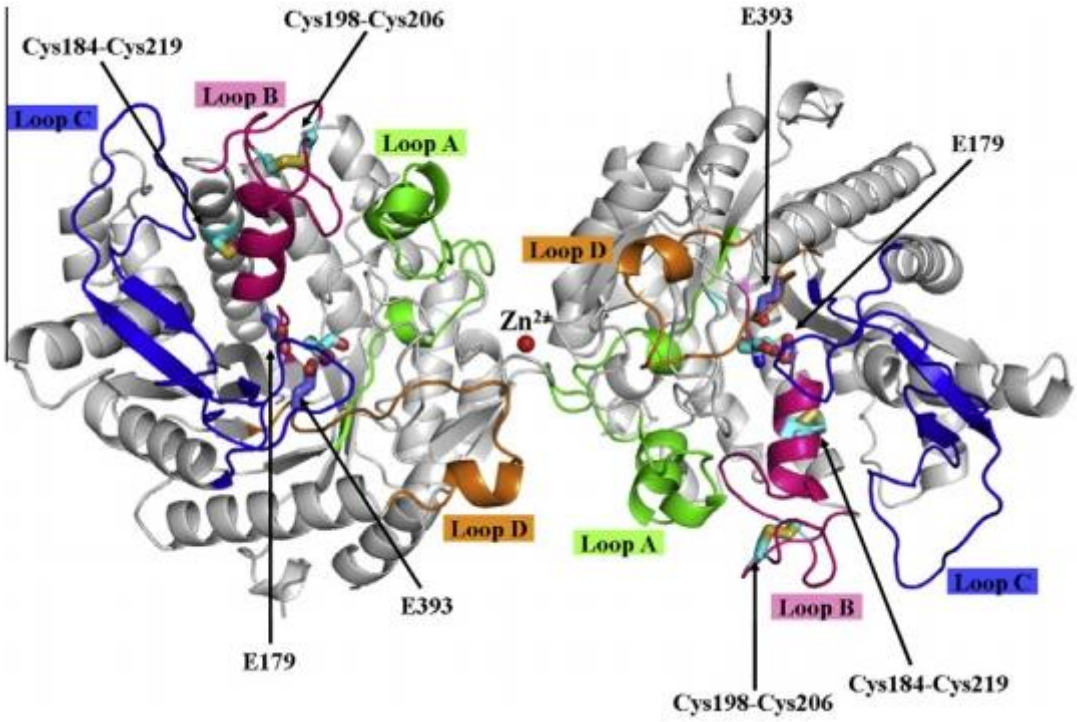
Şekil 1. 1 *ß-glukozidaz*ın etki ettiği bağ (a) ve substratı (b)

Katalizlediği reaksiyon çeşidine göre E.C.3.2.1.21 olarak sınıflandırılmışlardır. ß bağıyla bağlı D-glukozil kökleri çok çeşitlidir. Örneğin, bademdeki glukozit "amigdalin"i hidrolizleyen Amigdalin Hidrolaz, E.C.3.2.1.117 numarasına sahiptir. Henrissat , amino asit dizinleri ve üç boyutlu yapıyı esas alan, substrat özgüllüğü ve reaksiyon

mekanizmasını içeren bütüncül bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. Buna göre oluşturulan glikozit hidrolaz enzim ailelerindeki enzimler için homoloji modellemeleri yapılması hedeflenmiştir[1]. Bu amaçla kurulan CAZy (Carbohydrate Active Enzymes database, http://www.cazy.org/) veri tabanında güncel olarak 133 glikozit hidrolaz ailesi listelenmiştir ve sürekli güncellenmektedir. Üç boyutlu yapıları, katalitik kökleri ve mekanizmaları arasında belirgin benzerlikler olan aileler ise "klan " ismi verilen geniş gruplarda sınıflandırılmıştır.

Şimdiye dek tanımlanmış olan *ß-glukozidaz*lar bu enzim ailelerinden GH1, GH3, GH5, GH9, GH30 ve GH116 içinde sınıflandırılmaktadır [2]. Daha önceki bir çalışmada zeytin yaprağından izole edilen cDNA ya dayanan *ß- glukozidaz* enziminin (Genbank erişim numarası AHB37683.1) yapı analiz çalışmalarına göre enzim GH1 ailesinin özelliklerini göstermektedir [3]. Bu çalışmaya göre enzimin cep şekilli substrat tanıma bölgesindeki korunmuş aminoasitler *ß-glukozidaz* aktivitesini, korunmamış aminoasit kökleri ise aglikon özgüllüğünü desteklemektedir. Ayrıca aktif bölgeyi içeren $(ß/α)_8$ –fıçı protein alanı bulunmaktadır. Bu yapı tabiatta çok yaygın olarak görülür ve neredeyse daima enzim şeklindedir [4],(Şekil 1. 2).

Bu enzimle aynı amino asit dizisine çevirimi yapılan, Ayvalık varyetesine ait bir cds dizisi de bulunmaktadır(GenBank erişim numarası: KF623043.1) .



Şekil 1. 2 GH1 ailesinden Pirinç (*Oryza sativa*) Os4BGlu12 apo protein yapısı asimetrik biriminin şerit diyagramı gösterimi [5]

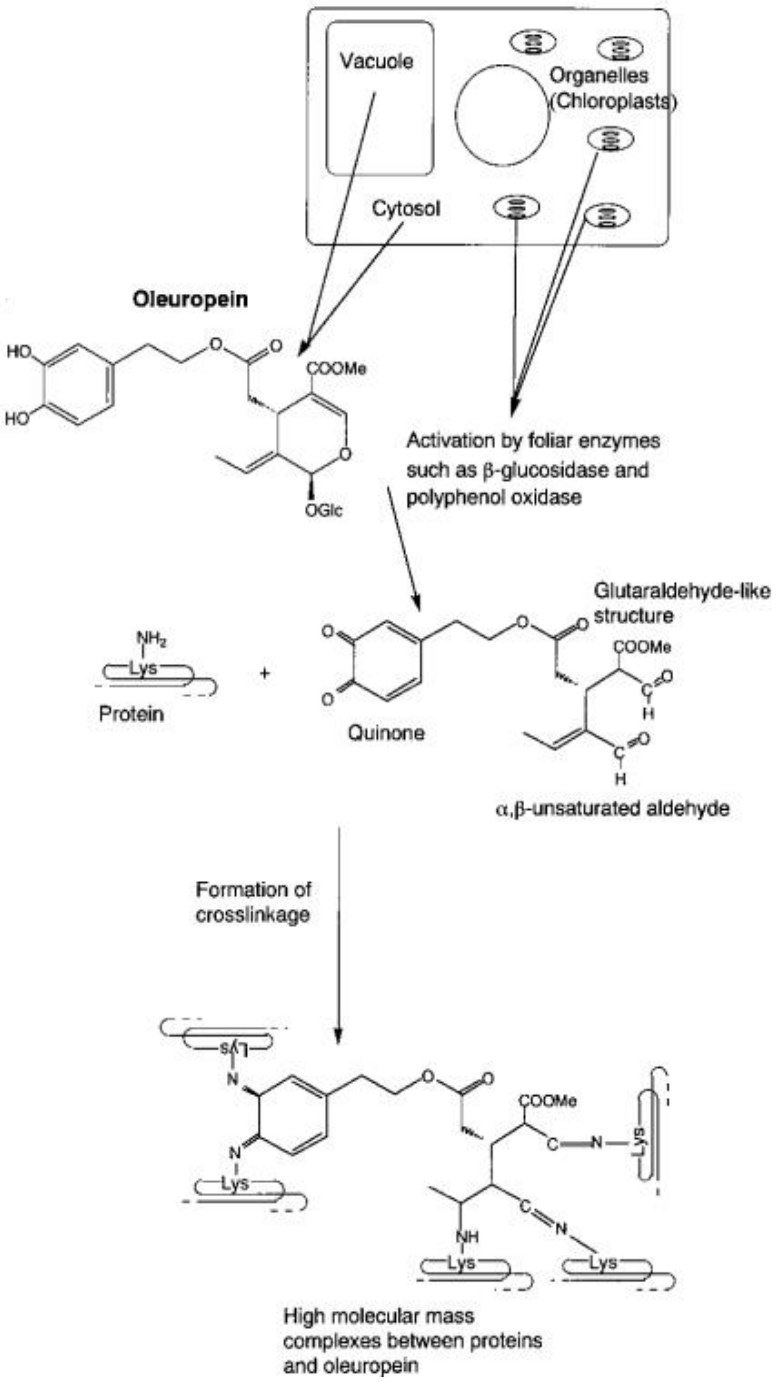
1.1.2 Enzimin İşlevleri ve Biyoteknolojik Kullanım Potansiyeli

1.1.2.1 Bitkilerde Savunma

Bitki savunma mekanizmalarından biri ikincil bileşiklerdir. Bu bileşikler çoğunlukla glukozile edilip etkinsizleştirilerek depo edilirler. Herbivor veya patojenlerin saldırısı sonucu gerçekleşen doku bozulması üzerine normalde ayrı bir bölmede tutulan *ß-glukozidaz*la temasa geçerler. Hidroliz sonucu serbest kalan aglikon kısım zehirli bir bileşiktir. Bitkilerde yaygın olarak bulunan siyanojenik glukozitlerden zehirli HCN oluşturulması buna örnektir [6], [7].

Zeytin bitkisinin önde gelen fenolik bileşiği olan oleuropein, aynı aileden kurtbağrı bitkisinde de bulunur ve bir savunma mekanizması olarak, yüksek özgüllükteki *ß-glukozidaz* tarafından aktif bir protein denature edici bileşiğe dönüşümü başlatılır [8], (Şekil 1.3).

Benzer şekilde zeytin meyvesinde bulunan oleropein, *ß-glukozidaz* ile yıkıldığında oluşan hidrolitik bileşikler böcek istilasına karşı koruma ve direnç sağlar [9] .



Şekil 1. 3 Kurtbağrı (*Ligustrum obtusifolium*) bitkisinde oleuropein aktivasyonu için önerilmiş kimyasal model[8]

1.1.2.2 Meyve Olgunlaşması ve Tat Bileşiklerinin Oluşumu

Olgunlaşma sırasında hücre duvarında etkinliğinin artışı ve kompleks glikanları yıkabilmesi meyve yumuşamasında rolü olabileceğini göstermektedir [10].

Çay, üzüm, portakal, şeftali, çilek, elma, mango gibi pek çok bitkide, glikozitleşmiş halde bulunan maskelenmiş tat bileşikleri *ß-glukozidaz*la hidrolizlenip serbest tat oluşturucu aglikon bileşikler oluşturulur [11], [12]. Bu enzimlerin, katalitik özelliklerinin geliştirilerek içeceklerin tatlarının artırılmasında kullanım potansiyelleri vardır [13].

1.1.2.3 Bitkilerde Hücre Duvarı Metabolizması

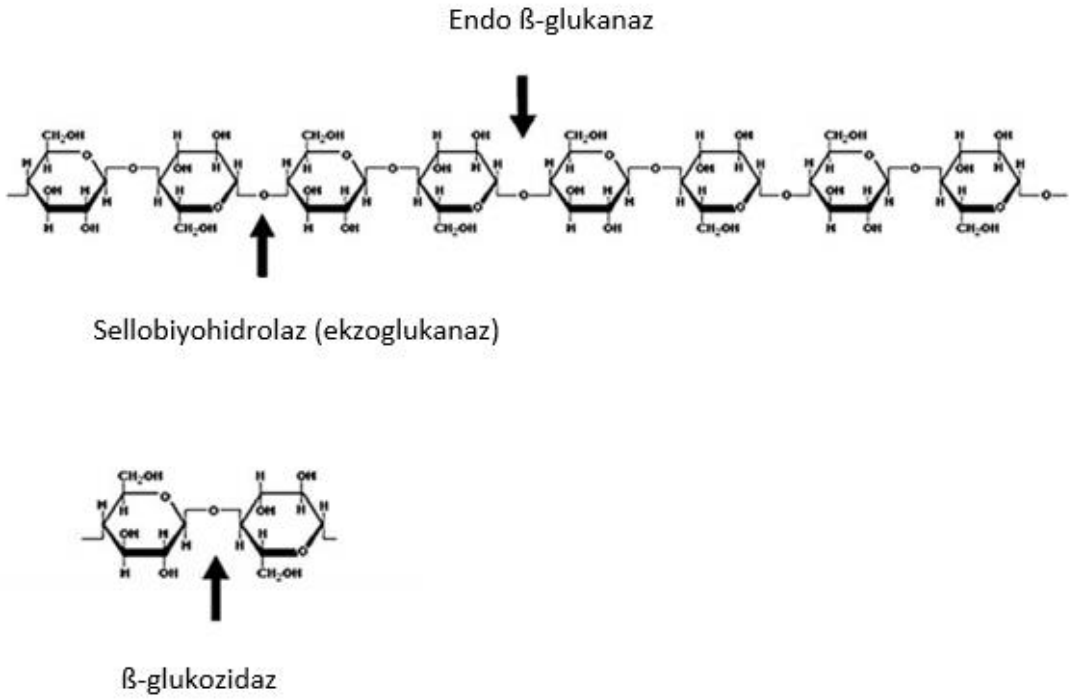
Hücre duvarı lignifikasyonunda, monolignol glukozitlerinden monolignollerin (lignin monomerleri) serbest bırakılmasında görevli özgül *ß-glukozidaz*ların görev aldığı düşünülmektedir[14], [15].

1.1.2.4 Bitkilerde Abiyotik Strese Dayanıklılık

Bitkilerde kuraklık, soğuk ve tuzluluk gibi abiyotik streslere cevap olarak absisik asit miktarını artırmanın bir yolu, absisik asit-glukoz konjugatının *ß-glukozidaz* enzimleriyle hidrolizidir [16], [17]. Ayrıca karanlık, yaşlanma, susuzluk gibi fotosentezi engelleyen stres durumlarında hücre duvarı polisakkaritlerinin katabolizmasını sağlayan *ß-glukozidaz*ların aktivitesinde artış olmaktadır. Bu durumun da bitkilerin enerji ihtiyaçlarını gidermede alternatif şeker kaynağı olarak bu polisakkaritleri kullanmalarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir [18], [19].

1.1.2.5 Biyokütle Yıkımı

Temiz ve yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak dikkat çeken lignoselülozdan biyoyakıt üretiminde *ß- glukozidaz*lar önemli rol oynamaktadır. Lignoselülozik biyokütle bitkisel kaynaklıdır ve bu teknolojide bitkinin tüm kısımları işlenir, tarımsal ve odun işlenmesinden oluşan atıklar da kullanılabilir [20]. Biyokütlenin en az %40'ı selülozdan oluştuğu için hidroliz yapan enzimlerden en önemlisi selülazdır. Selülaz; ekzoglukanaz (sellobiyohidrolaz), endoglukanaz ve *ß-glukozidaz*dan oluşan bir çoklu enzim kompleksidir (Şekil 1. 4). *ß-glukozidaz* hidrolizin son basamağını katalizler ve toplam tepkimenin hızını belirler ayrıca son ürün olan glukozun ters geri besleme etkisi altındadır. Optimum miktarda ve glukoz direnci yüksek selülaz üreten genetik olarak dönüştürülmüş yapılar oluşturulması konusunda çok sayıda çalışma vardır [21].



Şekil 1. 4 *Selülaz* [22]

1.1.2.6 *ß- Glukozidaz*ın Farmakolojik Kullanım Alanları

ADEPT (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy, Antikorla Yönlendirilmiş Enzim-Öncül ilaç Tedavisi), görece non-toksik bir öncül ilacın seçici olarak tümör hücrelerindeki bir enzim tarafından etkin toksik şekline dönüştürülmesi esasına dayanır. Bunun için aktive edici enzim monoklonal bir antikorla tümör hücresine yönlendirilir [23]. *ß-glukozidaz*lar, glukozile edilerek etkisizleştirilmiş öncül ilacın tümör hücresinde aktifleştirilmesi için kullanım potansiyeline sahiptir [24].

Sağlığa pek çok yararı olan flavonoidler önemli bitki kimyasallarıdır. Örneğin, östrojen benzeri yapı gösteren soya izoflavonları DNA'da oksidatif strese karşı direnç artırma [25], postmenopozal dönemde meme kanseri riskini azaltma [26], kanserli yumurtalık hücre hattında apoptozisi uyarma [27], diyabetik kobaylarda serum insülin düzeyini yükseltme gibi çeşitli yararlı etkiler gösterir. Soyada izoflavonların çoğu glukozidik

şekilde bulunur, ince bağırsakta ß glukozidazın dâhil olduğu bir biyotransformasyon işlemiyle daha hızlı emilen ve biyoaktif serbest aglikon elde edilir [28].

1.1.3 Zeytin

1.1.3.1 Zeytinin Sınıflandırılması, Özellikleri, Yayılışı

Zeytinin taksonomik hiyerarşisi aşağıdaki gibidir [29]:

Çizelge 1. 1 Zeytin (*Olea europaea*) bitkisinin sınıflandırılması

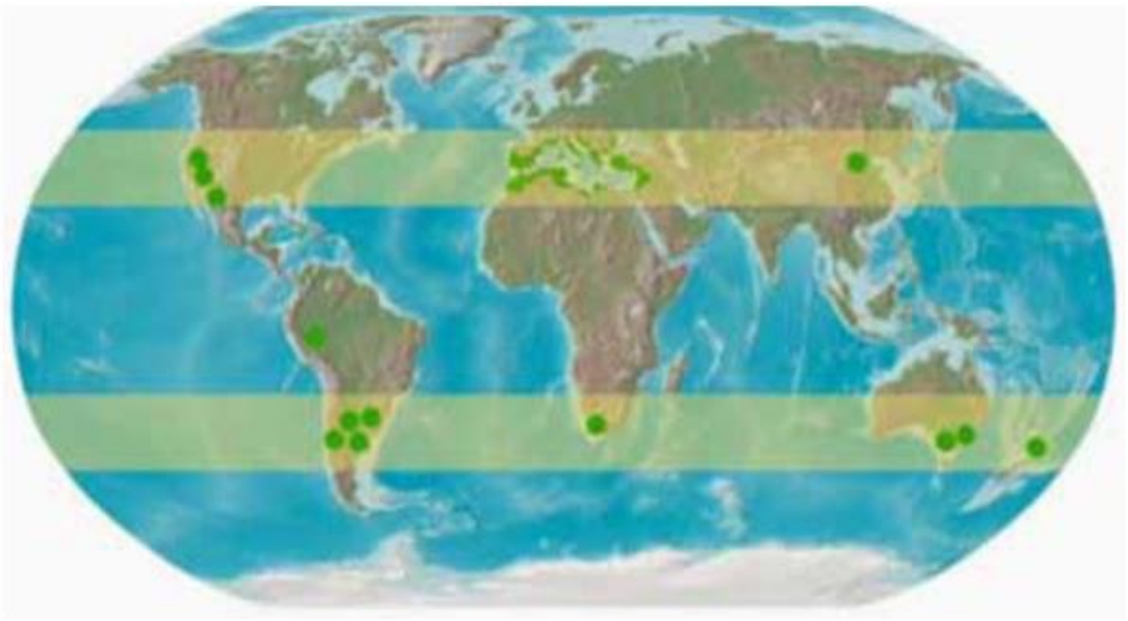
Alem	*Plantae*
Altalem	*Tracheobionta*
Bölüm	*Magnoliophyta*
Sınıf	*Magnoliopsida*
Altsınıf	*Asteridae*
Takım	*Scrophulariales*
Aİle	*Oleaceae*
Cins	*Olea*
Tür	*Olea europaea L.*

Zeytin, Akdeniz Havzasının yerli bir bitkisidir. İlk ortaya çıkış noktası Doğu Akdeniz olan zeytinin kültüre edilmesi M.Ö. 4. binyıla tarihlenmektadir. Zeytin üretimi ve zeytinyağı endüstrisi, Akdenizi çevreleyen ülkelerde çok erken dönemlerde yerleşmiştir [30].

Zeytin ağacı gri-yeşil yapraklarıyla herdem yeşil; küçük, beyaz ve kokulu çiçekleri ilkbaharda çok sayıda polen üreten, 1000 yıldan uzun yaşayabilen dayanıklı bir ağaçtır. Yetişkin bir ağaç 8-10 m. boylanabilir.

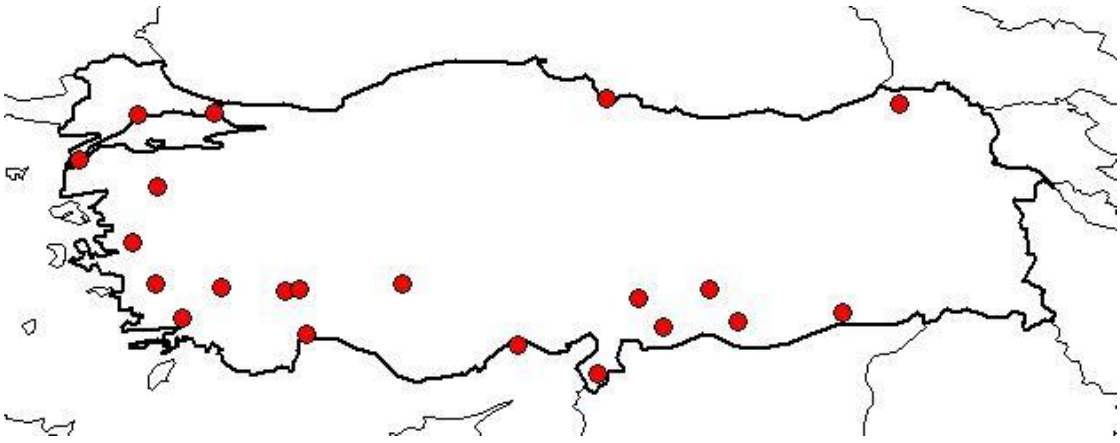
30-45 ˚ enlemleri arası ılıman ve subtropikal bölgeler zeytin yetiştiriciliği için uygun çevresel şartlara sahiptir (Şekil 1.5) . Yumuşak kış şartlarına ve sıcak-kuru yaz şartlarına

sahip Akdeniz havzası ülkelerinde yoğun olarak yetişir. Doğal yayılım alanları dışında Afrika, Amerika, Avustralya, Çin gibi ülkelerde de tarımı yapılmaktadır. -7 C den düşük sıcaklıklar ağaca zarar verir [31]. Yıllık 220 mm gibi düşük yağış miktarında yaşayabilir, silisli veya kalkerli toprakta yetişebilir [32].



Şekil 1. 5 Zeytinin dünya genelindeki dağılımı (37)

Türkiye'de zeytin yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır, (Şekil 1.6). Tarım bakanlığının FAO ve TÜİK kaynaklı verilerine göre 2013 yılında 806.000 hektar alandaki zeytin bahçelerinden zeytin meyvesi üretim miktarı 1.676.000 ton olarak gerçekleşmiştir. 2012 yılı itibarıyla Türkiye, dünya üretimindeki %11 lik payı ile 4. sıradaki ülkedir.

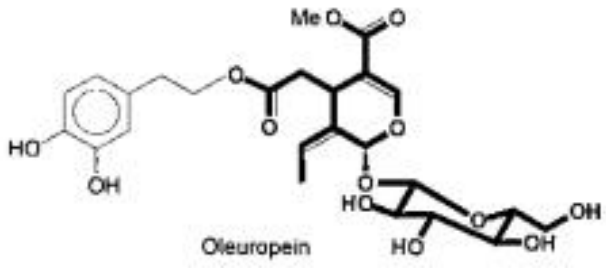


Şekil 1. 6 Zeytinin Türkiye'deki dağılımı (33), (34)

1.1.3.2 Oleuropein

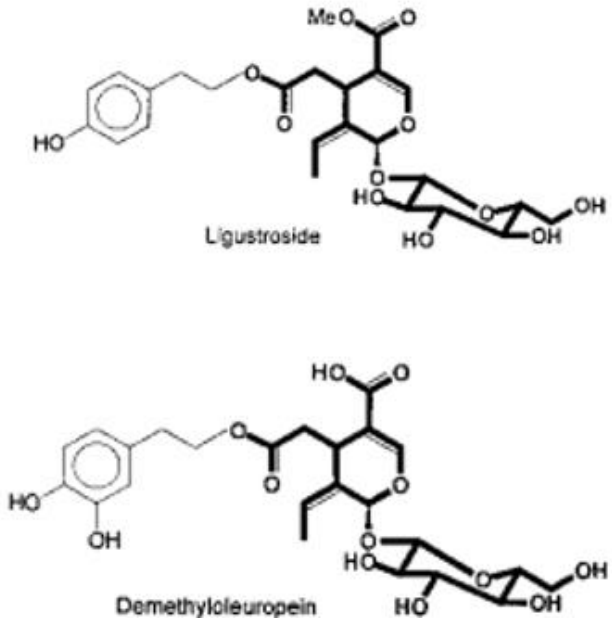
Akdeniz havzası, görece sıcaklık ve UV ışınımı gibi çevresel stresleri içerir. Bu bölgelerde yetişen zeytin gibi bitkilerin kendilerini koruyabilmek için antioksidan bileşiklere ihtiyaçları vardır [33], [34].

Zeytinde yaygın olarak bulunan fenolik bileşik oleuropeindir. Kuru madde bazında konsantrasyonu ham meyvede 140 mg/g, yaprakta 60-90 mg/g değerlerine ulaşabilir [38]. Oleuropein, sekoiridoid ailesinden bir bileşik olarak tanımlanmıştır ve Oleaceae familyasında pek çok bitkide görülür [35]. Elenolik asit ve hidroksitirozolün heterosidik esteridir, glukozidik veya aglikon şeklinde bulunabilir.



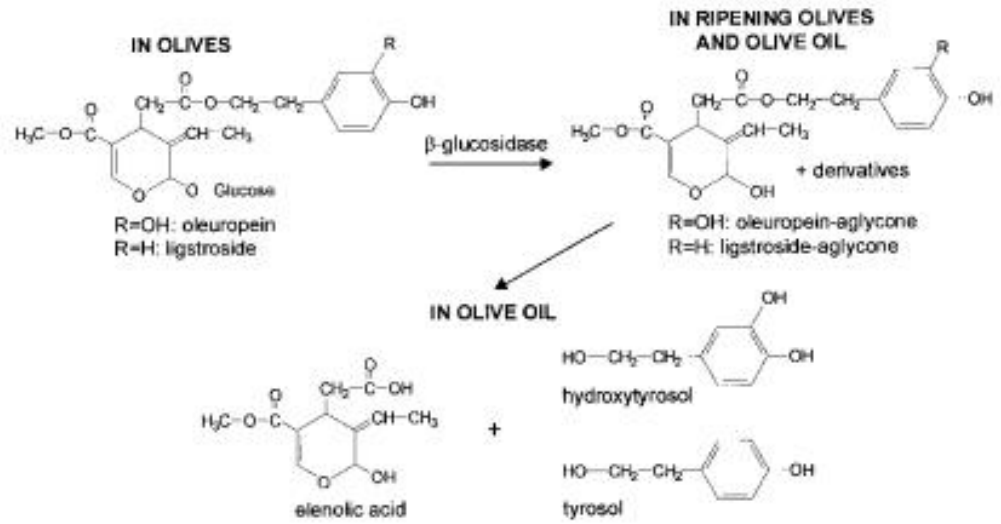
Şekil 1. 7 Oleuropeinin kimyasal yapısı [35]

Ağacın patojenlere ve böcek istilasına karşı dirençli olmasını sağlar. Acı bir tat veren oleuropein, meyve olgunlaşması sırasında kimyasal ya da enzimatik olarak daha küçük ve tat veren fenolik bileşiklere hidrolizlenir [36]. Zeytin meyvesinin diğer önemli fenolikleri glukozile şekilde bulunan ligstrosit ve demetiloleuropeindir. Bu bileşiklerin hidroliziyle oluşan aglikon ürünler zeytin yağının önemli fenolik bileşenleridir.



Şekil 1. 8 Ligstrosid ve demetiloleuropeinin kimyasal yapıları [35]

Fenolik bileşiklerin hidrolizini kontrol eden temel enzimatik sistem, mekanik ya da patojen hasarı sonucu etkinlik gösteren endojen *ß-glukozidaz* havuzudur. Zeytin meyvesinden saflaştırılan *ß-glukozidaz* enziminin oleuropeine karşı özgüllüğü, çok yaygın kullanılan yapay substrat pNP-G ile kıyaslandığında 200 kat olarak ölçülmüştür [36] . Zeytin yaprağından tütün bitkisine klonlanıp üretilen rekombinant *ß-glukozidaz* enziminin, aktivite ölçümü yapılan 2 diğer substrat (rutin ve luteolin) üzerine etkinliği, oleuropeinle kıyaslandığında ihmal edilebilecek düzeylerde çıkmıştır [3].



Şekil 1. 9 Zeytin fenoliklerinin hidrolizi [37]

Zeytinin esas olarak oleuropeinden kaynaklanan acılığının giderilip yenilebilir hale getirilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu süreçlerde zeytinin karakteristik tat ve dokusunu kazandığı, alkali ve salamura işlemleri uygulanır. NaOH (kostik) ile alkali işlem oleuropeinin hidrolizlenmesini sağlar. Ardından gelen salamura aşamasında maya ya da bakteri kaynaklı laktik asit fermantasyonu görülür. Oleuropein ve hidroksitirozol glukozit gibi suda çözünen fenolikler zeytinden salamuraya difüze olur ve biotransformasyonla değişime uğrarlar [38]. Spontane fermantasyonun yanı sıra kontrollü fermantasyonun sofralık zeytin oluşumuna etkisini bildiren pek çok çalışma mevcuttur. Zeytin işlenmesi sırasında Lactobacillus plantarum ile birlikte *ß-glukozidaz* kullanılmasının , tüketicilerin tercih ettiği tat kalitesinde ürün elde edilmesini sağladığı bildirilmiştir [39] .

Sıkma veya santrifüjlemeyle zeytinyağı üretimi ve sofralık zeytin üretimi sırasında, pek çok kullanım alanı bulabilen önemli miktarda fenolik bileşik su fazına geçmektedir [40]. Önemli miktarda oleuropein de bu atık suyun bir parçasıdır. Örnek bir çalışmada, zeytin atık suyundan, güçlü bir antioksidan olan hidroksitirozolün oleuropeinden elde edilmesinde, ilk basamağında mantar kaynaklı *ß-glukozidaz*ın görev aldığı ardışık tepkimelerden faydalanılmıştır [41]. Zeytin *ß–glukozidaz*ının doğal substratı olan oleuropeine karşı katalitik etkinliği, başka kaynaklardan (badem) elde edilen ticari enzimlere göre önemli derecede üstündür [36]. Zeytin fenoliklerinin

transformasyonunda zeytin *ß-glukozidaz*ının kullanılması en akılcı yol olarak görünmektedir.

Oleuropein, insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinden ve tıbbi potansiyelinden dolayı yoğun olarak çalışma konusu olan bir fitokimyasaldır. Antibakteriyel [42], antiviral [43] ve antimikoplasmal etki gösterir [44]. Oleuropein ve türevleri in-vitro ve ex-vivo olarak antioksidan özellik göstermektedir [45]. İn vitro LDL oksidasyonunu etkilemesinin koroner kalp hastalıklarından koruma etkisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir [46]. Meme kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri gibi bazı kanserlerde ex-vivo hücre çoğalmasını önleyen ve hücre ölümünü sağlayan etkiler göstermektedir [47], [48], [49].

Oleuropeinin *ß-glukozidaz* ile hidrolizi ile aglikon elde edilir [40], bu bileşik sızma zeytinyağında yaygın olarak bulunan fenollerden biridir [50] ve ticari olarak satılmamaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, zeytinyağının diyetle alınan toplam yağın önemli bir kısmını oluşturduğu akdeniz ülkelerinde koroner kalp hastalıkları [51] ve belli kanser tiplerinin sıklığının düşük olduğunu göstermektedir [52].

Oleuropein aglikonu alzheimer modeli transgenik farelerde hafıza ve davranış performansında gelişme ve beyinde plak oluşumunda azalma sağlamıştır [53]. Tip 2 diyabetin karakteristik özelliği olan amilin peptidi amiloid birikiminin kobay adacık ß hücrelerine sitotoksik etkisini azaltmıştır [54]. Farelerde Tip II kollajenle uyarılmış romatoid artritte iyileşme sağlamıştır [55]. Omurilik hasarlı model farelerde doku hasarını azaltmış, motor fonksiyon kaybında iyileşme sağlamış, travma sonrası apoptozu engellemiştir [56]. Pek çok hastalığa karşı muhtemel koruyucu etkileri ile son yılların dikkat çeken araştırma konularından biridir.

Zeytin ağacı yetiştiriciliğinde, üretilen her 100 kg zeytin için budamadan ve hasattan kaynaklanmak üzere 3-5 kg kadar olduğu tahmin edilen yaprak yan ürün olarak elde edilmektedir. Endüstriyel kullanım alanı hayvan yemi ve fitoterapi ile kısıtlı olan zeytin yaprağı, doğada oleuropeinin *ß-glukozidaz* ve estaraz aracılığıyla hidrolizi sonucu üretilen hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol) için de zengin bir kaynaktır [57]. Doğadaki en güçlü antioksidanlardan biri olarak kabul edilen hidroksitirozol insan vücudunda serbest radikalleri engelleme potansiyelinin yanı sıra gıdalarda koruyucu olarak kullanılan sentetik maddelerin de yerini alabilecek doğal bir madde olmaya

adaydır [58], [59]. Hipoallerjenik [59], kanserli hücrelerde apoptozu uyarma [60] ve hücre çoğalmasını inhibe etme [61], kobayda damarlarda bozukluk gibi etkileri olan kan leptin düzeyini düşürme, diyete bağlı metabolik sendromu önleme ve mitokondriyel anomalileri azaltma [62], aortu oksidatif strese karşı koruma [63] vb. etkileri ile yoğun olarak çalışılan ve potansiyel katma değeri yüksek bir fenoliktir. Saf ürünün fiyatı 8000 dolar/g dolaylarındadır [www.sigmaaldrich.com] oysa zeytin yaprağından elde edilen saf olmayan şekildeki ürünün gram fiyatı 15 dolar seviyelerindedir [64]. Oleuropeinin enzimatik hidroliziyle hidroksitirozol üretilmesine yönelik pek çok çalışma olmasına rağmen [65], [66] bilgimize göre zeytinin kendi *ß-glukozidaz* enzimiyle şimdiye kadar yapılmış bir çalışma yoktur.

1.1.4 Ekspresyon Sistemi Olarak *Pichia pastoris*

1.1.4.1 *Pichia pastoris* 'in Genel Özellikleri

P. pastoris, yüksek ökaryotik ekpresyon sistemlerindeki protein işlenmesi, protein katlanması ve posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirmek gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra *E. coli* ya da *S. cerevisiae* gibi manipülasyonu kolay olan bir canlıdır. Diğer ökaryotik ekspresyon sistemlerine göre hızlı, kolay ve daha ucuzdur ve genellikle daha yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşır.

P. pastoris metilotrofik bir mayadır, tek C kaynağı olarak metanolü metabolize edebilir. Metanol metabolizmasının ilk basamağı olarak ALKOL OKSİDAZ enzimiyle moleküler oksijen kullanılarak metanol formaldehide oksitlenir. Reaksiyon sonucu hidrojen peroksit de oluşur.

$$\text{Metanol} + O_2 \xrightarrow{\text{Alkol Oksidaz}} \text{Formaldehit} + H_2O_2 \qquad (1.1)$$

Alkol Oksidazın oksijene afinitesi düşüktür. *P. pastoris* bu durumu telafi etmek için enzimi çok miktarda üretir. Heterolog proteinin ekspresyonunu yönetmek için kullanılan promotor bu enzime aittir.

P. pastoris' te *AOX1* ve *AOX2* olmak üzere alkol oksidaz enzimi kodlayan 2 gen vardır. Hücredeki alkol oksidaz etkinliğinin çoğu *AOX1* genine dayandırılabilir. *AOX1* geninin ifadesi sıkı olarak düzenlenir ve metanolle yüksek seviyelerde üretim uyarılabilir.

Metanollü ortamda büyüyen hücrelerde tipik olarak çözünen proteinlerin ≥%30'u alkol oksidazdır. *AOX2* geni *AOX1* genine 97% homoloji gösterir. Ancak metanollü ortamda büyüme *AOX1* genine göre çok daha yavaştır. Bu yavaş büyüme Mut^{s} (*aox1*) hattının ayırımına olanak verir [67], [68].

AOX1 geninin ifadesi transkripsiyon düzeyinde kontrol edilir. Metanollü ortamda büyütülmüş hücrelerde polyA^{+} RNA ların yaklaşık 5%'i *AOX1* geninden kaynaklanır. Bu genin düzenlenmesi 2 aşamalı bir süreçtir: Bir represyon/derepresyon ve bir indüksiyon mekanizması. Kısaca, uyarıcı metanol bulunsa bile glukozlu ortamda büyüme transkripsiyonu baskılar. Bu yüzden metanolle optimum indükleme için gliserollü ortamda büyütme önerilir. Yalnız gliserollü ortamda büyütme (derepresyon) ekpresyon için yeterli değildir, indükleyici metanolün varlığı zorunludur [69], [70].

Üretilen proteini sekresyon yolağına yönlendirmek için S. cerevisiae faktör prepro peptidine ait sekresyon sinyal dizisi en yüksek başarıyı göstermiştir [71], [72].

Heterolog proteinleri salgısal olarak üretmenin en büyük avantajı, *P. pastoris*'in çok az miktarda doğal protein salgılamasıdır. Bu durum, proteinin saflaştırılmasında ilk basamak olarak kullanılır. Ancak çalışılan proteinin primer dizininde glikozilasyon bölgeleri varsa (Asn-X-Ser/Thr) glikozillenme görülebilir.

1.1.4.2 aox1 Mutantlarının Fenotipi

AOX1 geninin kaybı hücrenin alkol oksidaz etkinliğinin çoğunun kaybıyla sonuçlanır. Bu mutant hücre hattı Mut^{s} (Methanol utilization slow) olarak isimlendirilir. Bu durumdaki hücrelerde metanolü metabolize etme yeteneğinde düşüş olur ve bu hücreler metanollü ortamda zayıf büyüme gösterir. Mut^{+} (Methanol utilization plus) ismi ise yabanıl tip hattı temsil eder. Bu 2 fenotip *Pichia* transformantlarında çalışılan genin integrasyonunun değerlendirilmesinde kullanılır. Bazı proteinler bu genetik arka planlardan birinde diğerine göre daha iyi ifade edilirler.

1.1.5 *Pichia pastoris*'te rekombinant *ß-glukozidaz* üretimi

Ökaryotik protein üretimi için, translasyon sonrası değişiklikleri gerçekleştirebilen sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. *E. coli'* de heterolog üretimi yapılabilen bitki ß-

glukozidazları bildirilmiş [73] olmasına rağmen zeytinden (*Ole europaea*) ve siyah kirazdan (*Prunus serotina*) *E. coli'* de *ß-glukozidaz* üretme denemeleri çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri oluşumuyla sonuçlanmıştır [74], [3]. Pirinç bitkisinin (*Oryza sativa*) *E. coli'* de üretilen *ß- glukozidazı* ise *Pichia pastoris*'te üretilene göre 3 kat düşük spesifik aktivite göstermiştir [6]. Bu nedenlerden ötürü *Pichia pastoris*, ß-*glukozidaz* üretiminde tercih edilen bir sistemdir. Ancak *P. pastoris*'in kendi ürettiği hücre içi *ß-glukozidaz*ın [75] rekombinant proteinden ayırımı güç olacağından hücre dışına salgılanabileceği vektörlerin seçimi yaygın bir yöntemdir.

Bugüne kadar *Dalbergia cochinchinensis* (siyam gülağacı), *Mucor circinelloides*, *Arabidopsis thaliana*, *Aspergillus fumigatus* gibi çeşitli canlılara ait *ß-glukozidaz*ların üretimi için *P. pastoris* kullanılmıştır [15], [76], [77], (80), (81), [78].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada zeytin *ß-glukozidaz* geninin ekspresyon sistemi *Pichia pastoris*'e klonlanarak ifade edilmesi hedeflenmektedir. İlerleyen çalışmalarda gen ürünü saflaştırılıp moleküler analizleri yapılacak ve zeytinden ekonomik değeri yüksek metabolitlerin üretiminde kullanım potansiyeli değerlendirilecektir.

1.3 Hipotez

Çeşitli çalışmalarda farklı kaynaklardan klonlanmış *ß-glukozidaz*lar *P. pastoris*'te aktif olarak üretilmiştir. Bu çalışmalar *P. pastoris*'in ökaryotik proteinlerin orijinal işlevlerini yerine getirebilmeleri için gerekli translasyon sonrası modifikasyonları yapabilme kapasitesine sahip bir mikroorganizma olduğunu göstermektedir. Zeytin *ß-glukozidaz*ı *P. pastoris* ekspresyon sisteminde (heterolog olarak) üretilirse bitkiden izole edilen enzimle yakın düzeyde aktiviteyi göstereceği beklenmektedir. Laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarımızda *ß-glukozidaz* geninin kısmi cDNA klonu elde edilmiştir. Bu genin tam uzunluktaki cDNA'sı Dr. Esra YÜCA tarafından klonlanmıştır. Bu cDNA uygun kesim dizinleri eklenmiş primerlerle çoğaltılarak *Pichia* vektörlerine eklenecek ve mayaya aktarılacaktır.

BÖLÜM 2

MATERYAL METOT

2.1 Tamponlar, Çözeltiler ve Agaroz Jel

10X TBE Stok Çözeltisi

108 g Tris base

55 g Borik asit

40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Saf suyla 1 litreye tamamlanıp karıştırıldı. 121 °C'de 20 dk. otoklavlandı.

%1 lik Agaroz jel

0.75 g Agaroz

75 ml TBE

Mikrodalga fırında 4 dk ısıtıldı, ~50 °C' ye soğutuldu, 3 µl 5 mg/ml EtBr eklenip elektroforez tepsisine döküldü.

0.5 M pH 8,0 EDTA Çözeltisi

36.5 g EDTA

Saf su ile 250 ml'ye tamamlandı. NaOH ile pH 8,0' a ayarlandı.

X-Gal Stok Çözeltisi

0.1 g X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-ß-D-galaktopiranosid) 2 ml DMF (dimetilformamid) ile çözüldü, alüminyum folyoya sarılıp -20 °C'de saklandı.

0.1 M IPTG Stok Çözeltisi

0.6 g IPTG (izopropil ß-D-1-tiyogalaktopiranosid) toplam 25 ml olacak şekilde dH_2O ile çözüldü, filtre ile sterilize edildi. 0.2 ml'lik tüplere bölünüp -20 °C'de saklandı.

10 X D (%20 Dekstroz)

40 g D-glukoz 200 ml suda çözüldü 15 dk otoklavlanarak veya filtre ile sterilize edildi.

10X M (%5 Metanol)

2.5 ml metanol 47,5 ml dH_2O ile karıştırılıp filtre ile sterilize edildi, +4 °C'de saklandı.

10X GY (%10 Gliserol)

10 ml gliserol 90 ml dH_2O ile karıştırılıp otoklavlandı.

500X B (% 0.02 Biyotin)

10 mg biyotin 50 ml suda çözülüp filtre ile sterilize edildi, +4 °C'de saklandı.

10X YNB (% 13.4 Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids)

33.5 g YNB 250 ml dH_2O içinde çözülüp filtre ile sterilize edildi, +4 °C'de saklandı.

5X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

47 g Glisin

7.5 g Tris Base

25 ml %10 SDS

Toplam hacim 500 ml olacak şekilde dH_2O da çözüldü.

SDS-PAGE Jel Boyama Çözeltisi

62.5 mg CBB

100 ml metanol içinde karıştırılarak çözüldü.

17.5 ml asetik asit eklendi, dH_2O ile hacim 500 ml'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Jel Boya Yıkama Çözeltisi

100 ml metanol

17.5 ml asetik asit

Toplam hacim 250 ml olacak şekilde dH_2O eklendi.

4X SDS-PAGE yükleme tamponu

1.25 ml Tris Base

400 mg SDS

1.5 ml Gliserol

1 mg Bromofenol

750 µl dH_2O

1.5 ml DTT (ditiyotreitol)

DTT örnekler hazırlanırken taze olarak katılır.

2.2 Besiyerleri

2.2.1 LS-LB (Low Salt Luria Broth)

10 g Tripton

5 g Yeast Ekstrakt

5 g NaCl

dH_2O ile 1 litreye tamamlandı 121 °C'de 20 dk otoklavlandı. Katı besiyeri için sterilizasyondan önce 15 g Agar ilave edildi.

2.2.2 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

%1 maya ekstrakt, %2 peptone (mikolojik), %2 dekstroz,

10 g maya ekstrakt

20 g pepton 900 ml dH_2O içinde çözüldü, katı besiyeri için 20 g Agar ilave edilip 121 °C'de 12 dk otoklavlandı. 100 ml 10x D ilave edildi. Katı besiyeri +4 °C'de, sıvı besiyeri oda ısısında saklandı.

2.2.3 YPDS + Zeosin Agar (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol)

%1 maya ekstrakt, %2 pepton (mikolojik), %2 dekstroz, 1 M sorbitol, %2 agar, 100 µg/ml zeosin.

5 g maya ekstrakt

91.1 g sorbitol

20 g pepton 450 ml dH_2O içinde çözüldü.

10 g agar ilave edildi.

121 °C'de 12 dk otoklavlandı, 50 ml 10X D ilave edildi. Çözelti ~60 °C' ye soğutulup 0.5 ml 100 mg/ml Zeosin ilave edildi.

2.2.4 BMGY (Buffered Rich Glycerol Medium)

%1 maya ekstrakt, %2 pepton, 100 mM Potasyum fosfat tamponu pH 6.0, %1.34 YNB, % $4x10^{-5}$ biyotin, %1 gliserol

10 g maya ekstrakt, 20 g pepton 700 ml dH_2O içinde çözülüp otoklavlandı, oda sıcaklığına soğutuldu,

100 ml 1 M potasyum fosfat tamponu pH 6.0

100 ml 10X YNB

100 ml 500X B

100 ml 10X GY ilave edilip +4 °C'de saklandı.

2.2.5 YPM

%1 maya ekstrakt, %2 pepton, %1 metanol

10 g maya ekstrakt ve 20 g pepton 800 ml dH_2O içinde çözülüp otoklavlandı. Oda sıcaklığına soğutulup 200 ml 10 X metanol eklendi.

2.3 Moleküler Markerlar

Çizelge 2. 1 Kullanılan moleküler markerlar

Biotechrabbit 100 bp DNA Ladder	3000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp bantları gözlenir.
Lambda DNA *EcoR* I + *Hind* III Marker	21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 bp bantları gözlenir.
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	260, 140, 100, 70, 50,40, 35,25,15,10 kDa bantlar gözlenir.

2.4 Kullanılan Enzimler ve Kitler

Çizelge 2. 2 Kullanılan kitler

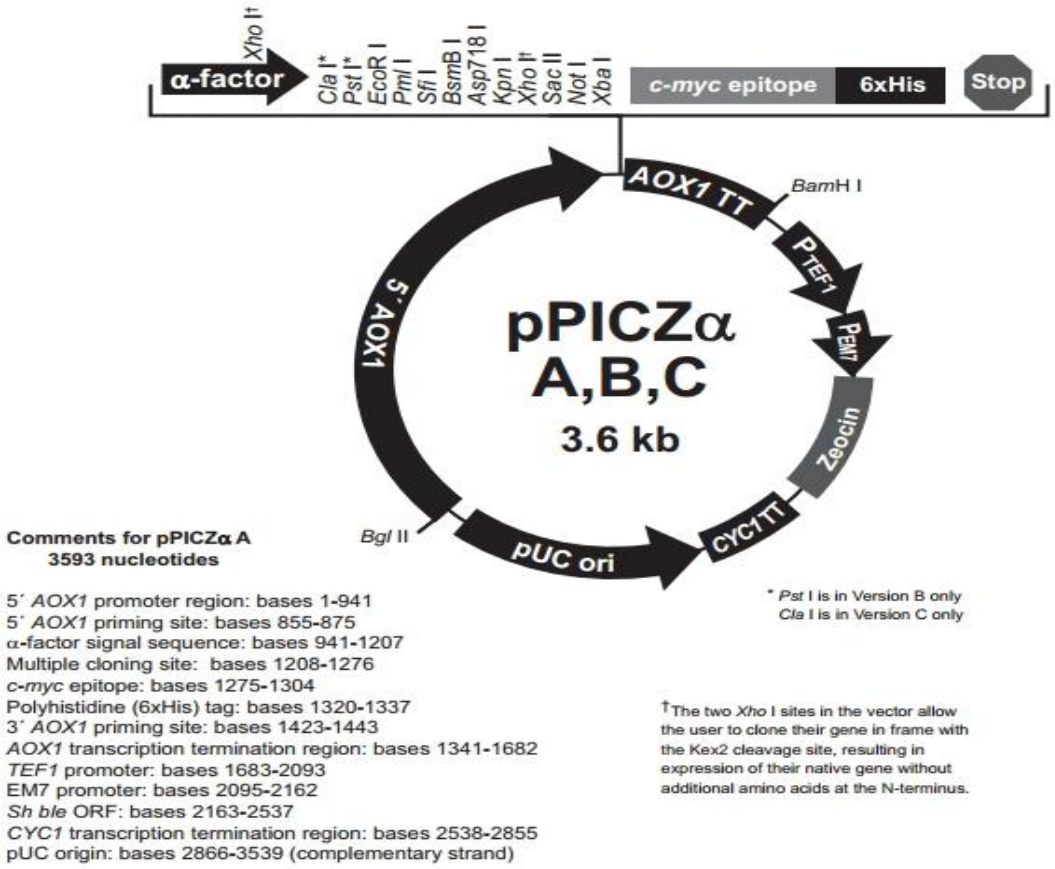
PCR Kiti	Roche Expand high Fidelity PCR System
Ligasyon kiti	Roche Rapid DNA Ligation Kit
Jel Ekstraksiyon Kiti	QIAquick Gel Ekstraksiyon Kit, BIO BASIC EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit
EasySelect *Pichia* Expression Kit	Invitrogen
Plazmit İzolasyon Kiti	Roche High Pure Plasmid Isolation Kit

Çizelge 2. 3 Kullanılan enzimler

Taq Polimeraz	QİAGEN
Ligaz	T4 DNA Ligaz (Roche)
Restriksiyon Enzimleri	*EcoR* I (Thermo Scientific), *Xba* I (Thermo Scientific), *Sac* I (Thermo Scientific)

2.5 Vektör

Hücre dışına salgılanan protein üretimi için kitin sunduğu seçeneklerden pPICZα B vektörü kullanılmıştır. Vektör *S. cerevisiae* doğal α faktör salgı sinyalini kullanarak üretilen heterolog proteinin salgılanmasına olanak tanımaktadır.



Şekil 2. 1 pPICZα B vektörünün haritası

pPICZα B (3328 bp) vektörü aşağıdaki, aktiviteleri test edilmiş özellikleri gösterir:

5’*AOX1*: 942 bp uzunluğundaki promotor sekansıdır. Metanolle uyarılabilen yüksek düzeyde ekspresyonu sağlar. Plazmidin *AOX1* lokusuna integrasyonunu hedefler.

10 adet tekli rekstriksiyon bölgesi içeren MCS: Hedef genin ekspresyon vektörüne eklenmesini sağlar.

C-terminal *myc* epitope tag: (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) Füzyon proteinin anti-*myc* antikoruyla veya anti-*myc*-HRP antikoruyla deteksiyonunu sağlar.

C-terminal polihistidin tag: Füzyon proteinin metal-şelat reçine ile saflaştırılmasını sağlar. Ayrıca Anti-His(C-term) antikor ve Anti-His (C-term)-HRP antikor için hedef epitoptur.

AOX1 Transkripsiyon Terminasyon (TT): *AOX1* geninin doğal transkripsiyon sonlanma sinyalidir (~260 bp). mRNA stabilitesinin artırılması için 3’ mRNA işlenmesini sağlar.

TEF1 promotoru: Zeosin direncini veren *Sh ble* geninin ekspresyonunu sağlar.

EM7 (Sentetik prokaryotik promotor): Zeosin direncini veren *Sh ble* geninin *E. coli* de ekspresyonunu sağlayan konstitütif promotordur.

Sh ble geni (*Streptoalloteichus hindustanus ble* geni): Seçim için zeosin direnç genidir.

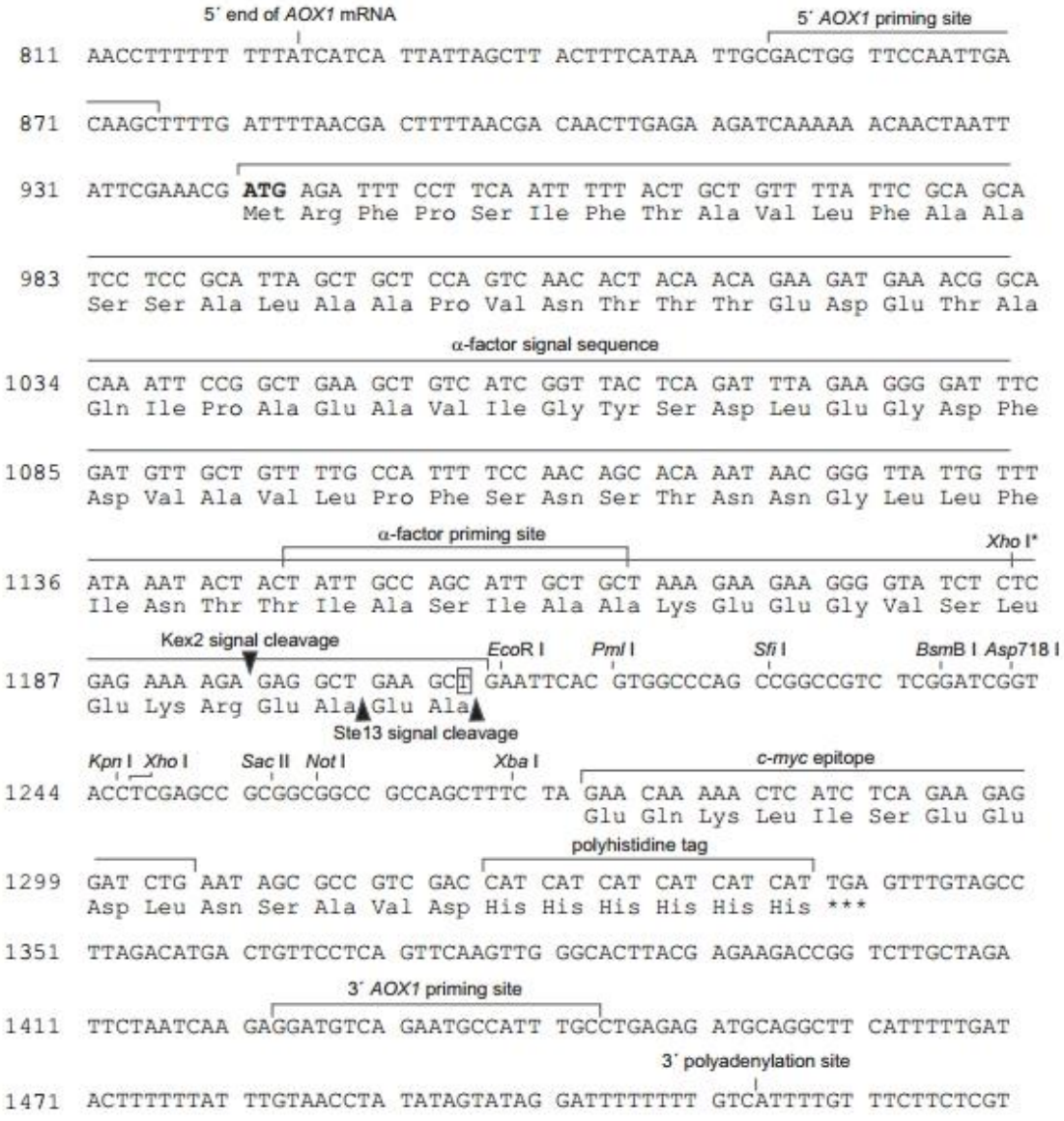
CYC1 transkripsiyon terminasyon bölgesi: *Sh ble* geni için etkin 3’ mRNA işlenmesini sağlar.

pUC orijini: Plazmitin *E. coli*’de idamesini ve replikasyonunu sağlar.

Sac I, Pme I, BstX I: *Pichia* genomuna etkin integrasyon için vektörün *AOX1* lokusunda linearizasyonunu sağlayan tekli restriksiyon bölgeleridir.

S. cerevisiae doğal α faktör salgı sinyali: Pek çok proteinin *Pichia*’dan etkin salgılanışını sağlar.

pPICZα B vektörünün çoklu klonlama bölgesi aşağıdaki gibidir:



Şekil 2. 2 pPICZα B vektörünün çoklu klonlama bölgesi

2.6 Oligonükleotitler

Çizelge 2. 4 Oligonükleotitler

P1	5’- CCGGAATTCATGGATATCCAAAGCAACGT -3’
P7	5’- AACTCTAGAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGA -3’

P1, ileri primerdir ve GAATTC *EcoR* I kesim bölgesini içerir, genimizin vektörün α-faktör sinyaliyle aynı çerçevede olmasını sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. P7 ise geri

primerdir ve TCTAGA *Xba* I kesim bölgesini içerir. Geri primer, ekspresyon vektöründeki poli histidin kuyruğu sentezlenecek şekilde STOP kodonu içermez.

2.7 Kullanılan Programlar ve Cihazlar

2.7.1 Primer 3

PCR reaksiyonu için primer tasarlamak amacıyla kullanılmıştır.

2.7.2 BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool)

Dizinler arasında yerel benzerlik bölgelerini bulan, veri tabanındaki dizinlerle karşılaştırdığı dizinler arasındaki eşleşmelerin istatistiksel önemini hesaplayan araçtır. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi internet adresi üzerinden kullanılır.

2.7.3 FinchTV

DNA dizin analizi sonuçlarını görüntüleyen, analiz sonuçlarıyla BLAST araştırması yapılmasına uyumlu, internetten ücretsiz indirilebilen bir programdır.

2.7.4 Cihazlar

Çizelge 2. 5 Kullanılan cihazlar

PCR	Eppendorf Mastercycler
Etüv	WTB binder
Santrifüj	Hettich Universal 32R
Çalkalamalı İnkübatör	JSR
Isı Bloğu	INOVIA
Spektrofotometre	SHIMADZU UV-1800

2.8 PCR Raksiyonu

Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalarda *Olea europaea* L. Gemlik kültivarından elde edilen *ß-glukozidaz* cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak elde edilen DNA dizisi pGEM-T Easy plazmitine klonlanmıştır. Bu plazmit kalıp olarak kullanılarak aşağıdaki şartlarda bir pcr reaksiyonu kurulmuştur. Kalıp olarak kullanılan plazmitin dizin analizi ve BLAST analiz sonuçları sonucu ekler kısmında (EK A-1) verilmiştir.

Roche Expand High Fidelity PCR System kullanılarak kurulan reaksiyonun koşulları şöyledir:

Karışım 1	
dH_2O	21.5 µl
dNTP karışımı	1.5 µl
p1(ileri primer) 10 µM	0.5 µl
p7(geri primer) 10 µM	0.5 µl
Kalıp DNA	1 µl
TOPLAM	25 µl

Karışım2	
dH_2O	19.5 µl
Tampon 10X	5 µl
Enzim (3.5 U/µl)	0.5 µl
TOPLAM	25 µl

Yönerge doğrultusunda 2 karışım olarak hazırlanan reaksiyon, pcr başlatılmadan hemen önce birleştirildi.

Reaksiyon döngüsü şu şekilde oluşturuldu:

Başlangıç denaturasyonu	94°C 2dk	
Denaturasyon	94°C 15sn	30 döngü
Yapışma	55°C 30sn	
Uzama	72°C 1dk	
Son uzatma	72°C 7dk	

2.9 PCR Ürününün Agaroz Jelde Analizi ve Saflaştırılması

%1 lik agaroz jelde 70 V potansiyel farkı ile ve 75 dk yürütülen pcr reaksiyonundan bant boyutu analiz edildi. Oluşan DNA bandı jelden kesilip QiaQuick Gel Extraction Kit kullanılarak yönergeye göre saflaştırıldı.

2.10 PCR Ürünü ve Ekspresyon Vektörünün Kesimi

İnsertimiz ve ekspresyon vektöründe ortak olarak bulunan 5' ucundaki *EcoR* I ve 3' ucundaki *Xba* I kesim bölgelerinin ilgili enzimlerle kesimi sonucu yapışkan uçlar oluşturulması hedeflendi. Kesim reaksiyonunun koşulları aşağıdaki gibidir.

p1-p7	
dH_2O	25 µl
10X Tango Tampon	10 µl
p1-p7	13 µl
EcoR I (10 U/µl)	1 µl
Xba I (10 U/µl)	1 µl
Toplam	50 µl

pPICZα B

dH_2O	24 µl
10X Tango Tampon	10 µl
Plazmit	14 µl
EcoR I (10 U/µl)	1 µl
Xba I (10 U/µl)	1 µl
Toplam	50 µl

Reaksiyonlar 37 ˚C de 2 saat inkübe edildi.

2.11 Kesim Sonuçlarının Jelden Saflaştırılması ve Yoğunluklarının Ölçümü

Kesim sonuçları %1'lik agaroz jele yüklendi. 70 V potansiyel farkı ile ve 75 dk süren elektroforez sonucu DNAlar jelden QIAquick Gel Extraction Kit ile yönergeler doğrultusunda ekstrakte edildi. Elusyon sonuçlarının %1'lik jelde yoğunlukları tespit edildi.

2.12 PCR Ürününün Ekspresyon Vektörüne Ligasyonu

Ligasyon Roche Rapid Ligation Kit kullanılarak yapıldı. Reaksiyon insert/vektör molar oranı 8/1 olacak şekilde kuruldu. Molar oranın hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\frac{\text{Vektör kütlesi (ng)} \times \text{insert boyutu (kb)}}{\text{Vektör boyutu (kb)}} \times \text{insert:vektör molar oranı} = \text{insert kütlesi (ng)}$$

Reaksiyon şartları aşağıdaki gibidir:

Vektör (36 ng/µl)	1µl
İnsert (20 ng/µl)	7 µl
DNA seyreltme tamponu	2 µl

Karışım hafifçe karıştırıldı.

10 µl ligasyon tamponu eklendi ve karıştırıldı, 1 µl T4 DNA (5 U/µl) ligaz eklenip tipin ucuyla hafifçe karıştırıldı, 22 °C de 5 dk inkübe edildi. Reaksiyon buzun üstüne alınıp transformasyon işlemine geçildi.

2.13 Bakteriye Transformasyon

Ligasyon ürününün bakteriye transformasyonu için 100 µl *E. coli* DH5α suşu kompetan hücre, 2.1 µl ligasyon ürünü ile karıştırıldı. 30 dk buzda bekletme, 1 dk 42 ˚C de bekletme ve 2 dk tekrar buzda bekletme işlemlerinden sonra karışıma 400 µl SOC eklendi. Karışım 37 ˚C de ve 220 rpm hızda 1 saat çalkalandı. 4000 rpm'de 5 dk çöktürme sonrası üstsıvının 400 µl'si atılıp hücreler kalan hacimde çözüldü. Transformant hücreler 25 µg/ml Zeosin (vektörün işaret geni) antibiyotiği içeren seçici LS-LB besiyerlerine ekildi. 37 ˚C sıcaklıktaki etüvde O/N inkübe edildi. Bu besiyerinde oluşan koloniler transforme olmuş hücreleri temsil etmektedir. Kontrol için DNA verilmemiş bir transformasyon reaksiyonu da aynı şartlardaki besiyerine ekildi.

2.14 Pozitif Kolonilerin Analizi

Transformasyon sonucu zeosin içeren besiyerinde büyüyen kolonilerden 4 tanesi rastgele seçildi ve Roche High Pure Plasmid Isolation Kitiyle plazmit izolasyonu yapıldı. Plazmit boyutunun anlaşılabilmesi için *EcoR* I ile tekli ve insertin serbest kalabilmesi için de *EcoR* I ve *Xba* I ile çift kesimi yapıldı. Aşağıdaki reaksiyon koşulları uygulandı.

EcoR I Kesim :

H_2O	6 µl
10X Tampon	1 µl
Plazmit	2 µl
Enzim(10 U/ µl)	1 µl
Toplam	10 µl

Çift kesim:

H_2O 8µl

Tango Tampon 4µl

Plazmit 6µl

EcoR I (10 U/ µl) 1µl

Xba I (10 U/ µl) 1µl

Toplam 20µl

Kesim reaksiyonu sonuçları %1'lik agaroz jelde görüntülendi.

2.15 Dizin Analizi

1. koloninin O/N kültüründen izole edilen plazmit, 5'*AOX1* ve 3' *AOX1* dizileme primerleri kullanılarak dizilendi (Ek-B).

2.16 *Pichia Pastoris*'e Transformasyon

Çalışmada Invitrogen EasySelect *Pichia* Expression Kit içinde bulunan yabanıl tip X-33 suşu kullanılmıştır.

2.16.1 Rekombinant Ekspresyon Vektörünün Lineerizasyonu

Lineerize edilmiş DNA, *Pichia pastoris* genomunda homoloji gösterdiği dizilerle homolog rekombinasyon yaparak kararlı transformantlar oluşturabilir. Tekli kros-over olayları (insersiyon), çift kros-over (yer değiştirme, replacement) olaylarından daha sık görülür. İnsersiyon, vektörün *AOX1* promotor ya da *AOX1* TT (Transkripisiyon Terminasyon) bölgelerinden biriyle mayanın *AOX1* lokusu arasında görülür. Vektörün bir ya da daha çok kopyası *AOX1* geninin upstream ya da downstream bölgelerine girer. Rekombine vektörün 5' *AOX1* bölgesindeki bir restriksiyon bölgesinden lineerizasyonu ile rekombine mayalar uygun şekilde elde edilebilir. Lineer olmayan DNA ile insersiyon oluşma sıklığı daha düşüktür.

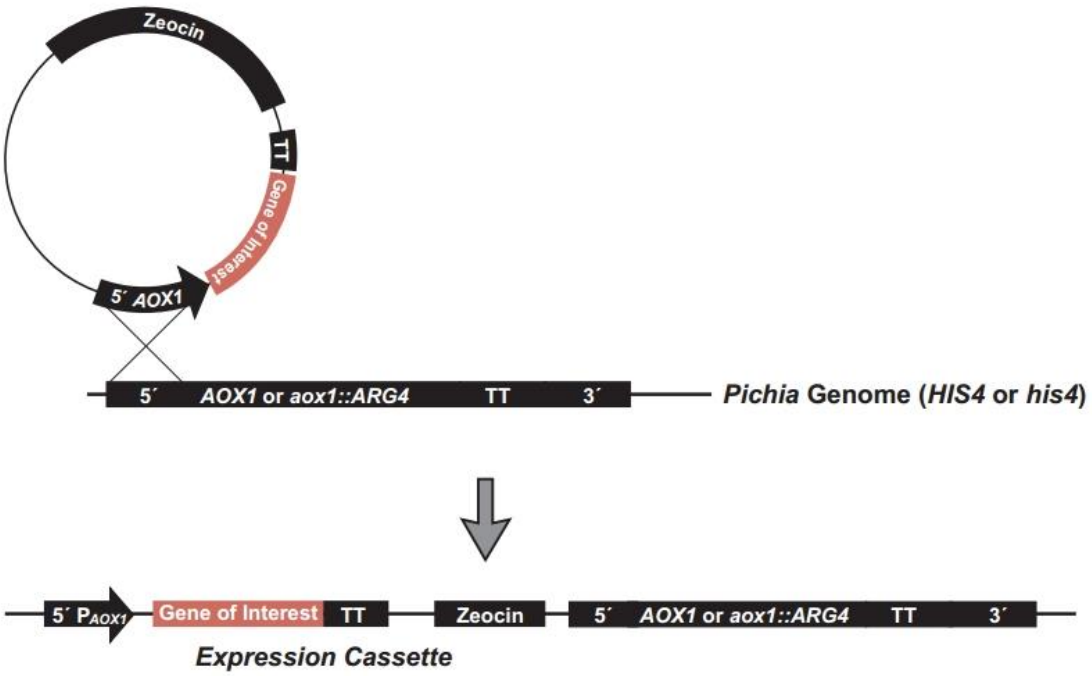
Bu amaca yönelik olarak genimizde kesim bölgesi bulunmayan *Sac* I enzimi lineerizasyon için seçildi. Enzim Thermoscientific'ten satın alındı. Kontrol için ana

vektörün de kesimi yapıldı. Kesim reaksiyonları %1'lik agaroz jelden BIO BASIC EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit ve Thermo Scientific GeneJet Gel Extraction Kit kullanılarak ekstrakte edildi. 260 nm ışık altında DNA miktarı ölçüldü.

KesimReaksiyonu:

Su	4 ul
10X *Sac* I tampon	5 ul
Plazmit DNA (1µg/µl)	40 ul
Sac I (10 U/µl)	1 ul
Toplam	50 ul

Reaksiyon 37 ˚C de ve 4 saat inkübe edildi.



Şekil 2. 3 Ekspresyon vektörünün maya genomuna insersiyonu

2.16.2 Kimyasal Kompetent Maya Hücrelerinin Hazırlanması

X-33 hücreleri tek koloni elde etmek için YPD platelerine çizildi. 28 ˚C etüvde 2 gün inkübe edildi. Tek koloniden 10 ml YPD sıvı besiyerine aşılama yapıldı. 28 ˚C ve 280 rpm hızda O/N inkübe edildi. O/N kültür 10 ml YPD ye OD_{600} değeri 0.1-0.2 olacak şekilde seyreltildi ve 28-30 ˚C çalkalamalı inkübatörde OD_{600} ~ 1 (0.940) olana kadar

büyütüldü. Hücreler 500 xg hızda 5 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Çökelti 10 ml Solusyon 1 ile süspansiye edildi ve aynı şartlarda tekrar çöktürüldü. 500 µl Solusyon 1 de süspansiye edilen hücreler kompetent hale geldi. Hücreler -80 ˚C de saklandı.

2.16.3 Kimyasal Transformasyon

50 µl kompetent hücre 5 µl lineer plazmitle karıştırıldı. Karışıma 1 ml Solusyon 2 elenerek vortekslendi. Reaksiyon 1 saat 30 ˚C de inkübe edildi, her 15 dk da bir vortekslendi. Hücrelere 42 ˚C de 10 dk ısı şoku verildi. Hücreler 2 mikrosantrifüj tüpüne bölünüp her tüpe 1 ml YPD besiyeri eklendi. Hücreler 1 saat 30 ˚C de inkübe edilip markör gen olan *Sh ble* ürünü olan zeosin direncinin oluşması sağlandı. 3000 xg de 5 dk santrifüjlenerek çöktürülen hücreler 500 µl Solusyon 3 te süspansiye edilip tek tüpte birleştirildi. Aynı şartlarda tekrar çöktürme yapılıp 100 µl Solusyon 3 te süspansiye edilen hücreler 100 µg/ml Zeosin içeren seçici YPDS besiyerine ekildi. 3-10 gün 30 ˚C de inkübasyonla transformant koloniler elde edildi.

2.16.4 Rekonbinant Maya Hücrelerinde *ß-glukozidaz* Aktivitesinin Analizi

Kimyasal transformasyon sonucu oluşan 34 adet X-33 kolonisinden en fazla *ß-glukozidaz* aktivitesi gösteren hücrelerin seçimi için tarama yapıldı. Klonlanan genin ekspresyonu için öncelikle 50 ml lik konik tüplerde 10 ml BMGY besiyerine aşılama yapılıp 28 °C de ve 280 rpm de O/N inkübe edildi. Büyüyen hücreler böylece log fazına ulaşmış oldular. O/N kültürden bir miktar alınarak OD_{600} değeri 1 ve toplam hacim 10 ml olacak şekilde YPM (%1 Maya ekstraktı, %2 pepton, %1 metanol) besiyeriyle konik tüpe seyreltildi. Metanol, geni kontrol eden promotoru uyaran madde olduğundan ekspresyona geçilmiş oldu. Metanol konsantrasyonunu %1 oranında tutacak şekilde her gün %100 metanol ilavesi yapıldı. 96 saatlik kültürleri içeren konik tüpteki örneğin tamamı ekspresyon analizi için kullanıldı. Alınan örnekler öncelikle 3 dk maksimum hızda santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Proteinimiz ekstraselüler bir protein olduğundan üst sıvı protein kaynağı olarak alındı, altta kalan hücreler gerektiğinde analiz edilene kadar saklanmak üzere -80 °C de dondurulduu. Kontrol için ana vektörü içeren kolonilere de aynı işlemler uygulandı.

Enzim aktivitesini göstermek üzere yapay bir substrat olan p-nitrofenil-ß-D-glukopiranosid (pNP-ß-Glu) kullanıldı. Substratın özgül olarak *ß-glukozidaz* ile hidroliziyle oluşan sarı renkli ürün 400 nm civarında maksimum absorbans göstermektedir. Oluşan ürün miktarıyla doğru orantılı olarak değişen absorbans değeri enzim aktivitesini gösteren bir ölçüdür.

250 µl 0.1 M Na-asetat pH 5.5 tamponuyla (0.1 M asetik asit ve 0.1 M sodyum asetat içerir) 125 µl 20 mM pNP-ß-Glu ile karıştırılıp 10 dk. 37 °C' de inkübe edildi. Karışıma 125 µl kültür üst sıvısı ilave edilerek 37 °C de 15 dk inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak ve sarı renk oluşmasını sağlamak için 500 µl 0.2 M soğuk Na_2CO_3 eklendi.

2.16.5 Yüksek Hacimde Büyütme

Transformant kolonilerin taranması sonucu elde edilen veriler doğrultusunda seçilen bir koloni ve bir ana vektör içeren koloninin daha önceki belirtilen şartlarda ancak 100 ml hacimde kültürü yapıldı. Her gün (24-48-72-96 sa) alınan 2 ml örnekten santrifüjlemeyle elde edilen üst sıvı ve hücre çökeltisi -80 °C de saklandı. Bunun öncesinde kültürün günlük olarak OD_{600} değeri ölçülerek hücre yoğunluğu ve üst sıvıdan da 2.16.9'da belirtilen şartlarda pNPG substratı ile aktivite ölçümü yapıldı. Günlük büyüme hızı ve aktivite değişimi belirlendi.

2.16.6 Protein Yoğunlaştırılması

Proteinlerin yoğunlaştırılması için üstsıvıdan amonyumsülfat çöktürmesi yapıldı. 96 saat sürdürülen maya kültüründen elde edilen üst sıvıda amonyum sülfat yoğunluğu %70'e getirilip 4 ˚C'de O/N bekletildi. Maksimum hızda 45 dk santrifüjlenen örneklerin üstsıvısı alınıp kalan çökelti 6 ml 50 mM sodyum-fosfat pH 6.8 tamponunda çözüldü. Elde edilen örnekler 30 MWCO büyüklüğündeki ultrafiltrasyon tüpünde son hacim 2 ml olacak şekilde yoğunlaştırıldı. Elde edilen örnekler protein miktar tayini, his tag saflaştırması, enzim aktivite ölçümü ve SDS-PAGE analizi için kullanıldı.

2.16.7 Protein Miktar Tayini

Kullanılan örneklerin protein miktarları Bradford Ölçümü ile belirlendi. Bu ölçüm

Coomassie Brillant Blue G-250 boyasının proteine bağlanması esasına dayanan hassas bir yöntemdir. Proteine bağlanan boyanın maksimum absorbansı 465 nm'den 595 nm'ye değişir ve bu değişikliğin ölçümü yapılır [79]. Boyanın bağlandığı aminoasitler özellikle arjinin olmak üzere diğer bazik amino asitler ve aromatik aminoasitlerdir [80]

Quick Start™ Bradford Protein Assay - Bio-Rad kitinin Microplate Microassay Dilutions for 2 mg/ml BSA or Gamma-Globulin ölçümü kullanılarak deney yapıldı. Öncelikle 2 mg/ml stok BSA çözeltisinden dH_2O ile 1.25-2.5-5-10-15-20-25 µg/ml yoğunlukta protein çözeltileri hazırlandı. Standart çözeltilerden alınan 150 µl örneğe 150 µl Bradford çözeltisi eklenerek 5 dk inkübe edilerek renk değişimi sağlandı. Uygun şekilde sulandırılarak 150 µl'si alınan örneklere de aynı miktar BRADFORD çözeltisi eklenerek 5 dk inkübasyon sonrası 595 nm deki absorbanslar ölçüldü. 2'şer ölçüm alınıp ortalamalar hesaplandı. Besiyeri ve örneklerin içinde bulunduğu tampon için de aynı işlemler uygulandı. Üstsıvı örneklerinin absorbansından besiyerinin, ultrafiltrasyon absorbansından da tamponun absorbansı çıkarıldı. Standart çözeltilerin protein konsantrasyonu referans alınarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Tüm örneklerden suyun Bradford ayıracıyla verdiği absorbans da çıkarıldı.

2.16.8 Ni-IDA (Nikel İminodiasetik Asit) Saflaştırması

Yapılandırılmış genimizin kodladığı N-terminal 6Xhistidin kuyruğuna sahip enzimin saflaştırılmasında ilginlik kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Kullandığımız yöntemde rekombinant proteinin bağlanması, polihistidin kuyruğun immobilize Ni^{+2} iyonlarına yüksek ilginliği ile gerçekleşir. IDA ise Ni^{+2} iyonlarını silika boncuğa bağlayan şelat (kıskaç) görevi görür. Uygun pH koşullarında rezine bağlanan proteinin elusyonu histidinle rekabet eden imidazolün uygun konsantrasyonda histidinle yer değiştirmesi sonucu gerçekleşir.

Saflaştırmada 0.5 ml Clontech His60 Ni Superflow Resin kullanıldı. Rezin toplamda 4 hacim kalibrasyon tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu, 300 mM sodyum klorür, 20 mM imidazol; pH 7.4) ile kalibre edildi. Örnek kolona yüklenip 30 dk kadar hafifçe çevirerek bağlanma sağlandı, sonra tüp dikey konumda bırakılıp rezinin çökmesi sağlandı. Üst kısım alınıp jele yüklenmek üzere saklandı. 2 hacim kalibrasyon tamponu koyulan tüp 4-5 kez hafifçe çevrildi, rezin çöktükten sonra üst kısım alındı. 2 hacim

yıkama tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu, 300 mM sodyum klorür, 40 mM imidazol; pH 7.4) koyulup hafifçe birkaç kez çevirilip rezin çöktürüldükten sonra üst sıvı alınıp 1. yıkama olarak kodlandı. Aynı şekilde 2. yıkama ve 3.yıkama fraksiyonları da elde edildi. 1 hacim elusyon tamponu (50 mM sodyum fosfat tamponu, 300 mM sodyum klorür, 300 mM imidazol; pH 7.4) ile aynı işlem yapılıp 1. elusyon elde edildi. 2. ve 3. elusyon da aynı yöntemle elde edildi.3 hacim kalibrasyon tamponu ve su ile yıkanan rezin % 20 etanolde +4 °C'de saklandı. Elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edildi.

2.16.9 pNPG ile Aktivite Ölçümü

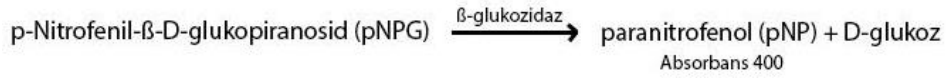
Ultrafiltrasyon sonucu elde edilen protein içeren çözelti kullanılarak 2.16.5'te belirtilen şartlarda yapay substran pNPG ile aktivite ölçümü yapıldı. Bu kez farklı olarak kontrol için örneklerden birer tane de enzimin reaksiyon sonlandıktan sonra eklendiği reaksiyon (kör) kuruldu. Bu reaksiyonun aynı dalga boyundaki absorbansı enzimli reaksiyondan çıkarılarak sonuç alındı.

Çizelge 2. 1 pNPG ile aktivite ölçümü koşulları

REAKSİYON	KÖR
250 µl 0.1 M Na-asetat tamponu pH 5.5	250 µl 0.1 M Na-asetat tamponu pH 5.5
125 µl 20 mM pNP-ß-Glu	125 µl 20 mM pNP-ß-Glu
10 dk. 37 °C'de inkübasyon	
125 µl kültür üstsıvısı	-
15 dk. 37 °C'de inkübasyon	
500 µl soğuk 0.2 M Na_2CO_3	500 µl soğuk 0.2 M Na_2CO_3
-	125 µl kültür üstsıvısı

Her ölçüm 2'şer kez yapılıp 3'er kez absorbans ölçümü alınmıştır. Elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanıp kullanılmıştır. Aşağıda verilen formül (http://www.toyobo-global.com/) kullanılarak aktivite hesaplanmıştır. Enzim yoğunluğunun hesaplanmasında Bradford ölçümü sonuçları kullanılmıştır.

1 ünite enzim; dakikada 1 mikromol paranitrofenol oluşumunu sağlayan enzim iktarı olarak tanımlanmıştır.



(2.1)

Aktivite (U/ml) = $\frac{\Delta OD(OD_{enzimli}-OD_{kör})xVtxdf}{18.1x1.0xtxVö}$

Spesifik aktivite (U/mg) = (U/ml)x1/C

Vt: Toplam hacim(1 ml)

Vö: Örnek hacmi (125µl)

18.1: p-nitrofenol için verilen şartlarda milimolar ekstinksiyon katsayısıdır

1.0: Işık yolu uzunluğu (cm)

t: Reaksiyon süresi (15 dk)

df: Seyreltme katsayısı

C: Enzim yoğunluğu (mg/ml)

2.16.10 SDS-PAGE Analizi

Elde edilen örnekler SDS-PAGE jeline yüklenmek üzere 4X yükleme tamponu ile karıştırılıp 4 dk kaynatılarak [81] proteinlerin denatüre edilmesi sağlandı. %12 lik ayırıcı jel ve % 5 lik yükleme jeli şeklinde hazırlanan jele örnekler yüklendi. Elektroforez işlemi örnekler kuyulardan çıkana kadar 80 V, sonrasında da boya jelden çıkana kadar 150 V potansiyel farkı uygulanarak yapıldı. Jel boyama solüsyonunda 30 dk çalkalanarak boyanan jel, boya yıkama solüsyonuna alınarak 1 sa bekletildi, sonrasında boya açılana kadar dH_2O içine alındı.

%12 lik ayırıcı jelin ve %5lik yükleme jelinin hazırlanması ve örneklerin yüklenmesi:

Ayırıcı jel için aşağıda belirtilen miktar ve sırada karıştırılan maddeler kullanıldı.

dH_2O	2.4 ml
1.5M Tris (pH 8.8)	1.95 ml
%30 Akrilamid	3 ml
%10 SDS(w/v)	75 µl
%10 APS(w/v)	75 µl
TEMED	3µl
TOPLAM	7.5 ml

1.0 mm lik plakalar arasına bekletmeden dökülen jelin polimerleşmesi için bir süre beklendi. Ardından hazırlanan yükleme jeli de plakalar arasına dökülüp polimerleştirildi. Yükleme jeli aşağıdaki şekilde hazırlandı.

dH_2O	2.04 ml
1M Tris (pH 6.8)	390 µl
%30 Akrilamid	510 µl
%10 SDS(w/v)	30 µl
%10 APS (w/v)	30 µl
TEMED	3 µl
TOPLAM	4ml

1.5 mm kalınlığında jel dökmek için de aynı miktarlar uyarlandı.

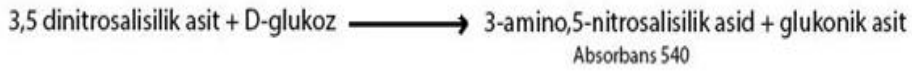
2.16.11 Oleuropein Kullanılarak Enzim Aktivite Ölçümü

Enzimin aktivitesi özgül substrat oleuropein kullanılarak da ölçüldü.

$$\text{Oleuropein} \xrightarrow{\beta\text{-glukozidaz}} \text{Oleuropein Aglikon} + \text{D-glukoz} \qquad (2.2)$$

Reaksiyon sonucu oluşan glukozun miktarı aktivite ölçüsü olarak kullanıldı. Glukoz miktarı kolorimetrik bir yöntem olan “dinitrosalisitik asit metodu” ile belirlendi. Bu metotta bazik ortamda glukozun serbest karbonil grubu (C=O) okside olurken ayıraçta

bulunan 3,5 dinitrosalisilik asit 3-amino,5-nitrosalisilik aside indirgenir ve 540 nm ışığı emer.



(2.3)

Kullanılan Dinitrosalisilik asit ayıracı; dinitrosalisilik asit, Rochelle tuzu (sodyum potasyum tartarat), fenol ve sodyum hidroksitten oluşur. Rochelle tuzu ayıracın oksijen çözmesini ve oluşan glukozun oksidasyonunu engeller, fenol reaksiyon sonucu oluşan renk yoğunluğunu artırır, alkali ise glukozun dinitrosalisilik asit üzerine indirgen etkisi için gereklidir .

DNS ayıracı hazırlamak için 2.5 g 3,5 dinitrosalisilik asit, 2.5 g NaOH, 0.5 g fenol ve 2.5 g Sodyum potasyum tartarat toplam 250 ml hacim olacak şekilde suda çözüldü. Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi, reaksiyonda 10 mM oleuropein stok çözeltisi (son konsantrasyon 2.5 mM) ve enzim kaynağı olarak 96 saatlik ekspresyon kültürlerinin üst sıvısı kullanıldı.

Çizelge 2. 2 Oleuropein ile aktivite ölçümü koşulları

	KÖR	Kontrol	Örnek
Tampon (0.1 M Sodyum asetat, pH 5.5)	70 µl	52.5 µl	17.5 µl
Substrat (oleuropein)	-	17.5 µl	17.5 µl
Enzim	-	-	35 µl
30 dk 37 °C de inkübasyon ve sonrasında 5 dakika buza alarak reaksiyonun durdurulması			
DNS	105 µl	105 µl	105 µl
5 dk kaynar su banyosunda bekletme			
dH_2O	525 µl	525 µl	525 µl

Sonuçların yorumlanabilmesi için 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mg/ml konsantrasyonlarında glukoz çözelti standartları hazırlandı. Bu standart çözeltilerin 70 µl'sine 105 µl DNS eklenerek deneyin sonraki aşamaları uygulandı. Reaksiyon sonunda tüm çözeltilerin 540 nm deki absorbansları mikrolevhada ölçüldü. Her reaksiyon 2'şer kez tekrarlanıp ölçümler 3'er kez yapıldı ve ortalamaları alındı. Standart reksiyonlarının absorbansına göre çizilen grafiğin denklemi kullanılarak her reaksiyonda oluşan glukoz miktarı hesaplandı. 1 ünite enzim; 1 dakikada 1 µmol glukoz oluşumunu sağlayan enzim miktarı olarak tanımlandı. Bradford ölçümüne göre protein miktarı (µg) hesaplanmış olan örneklerin 1 ml hacmindeki spesifik aktivitesi de hesaplandı.

Örneklerin aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

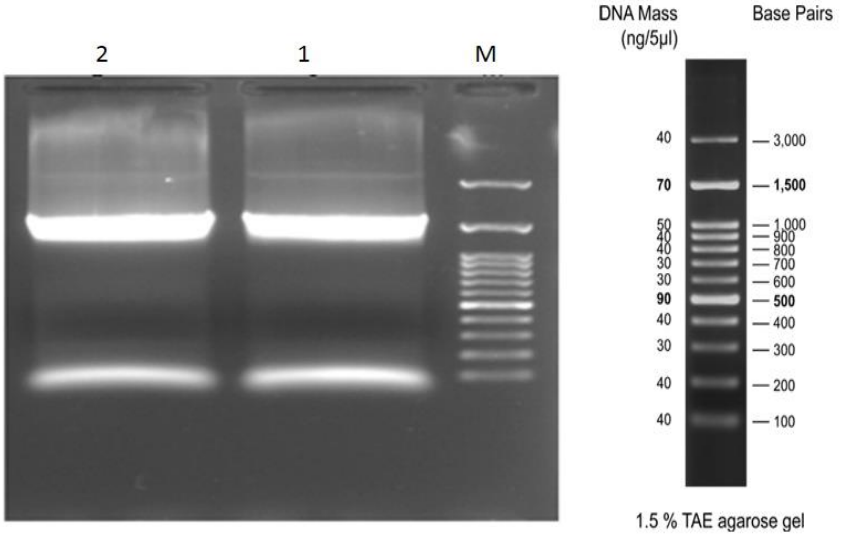
$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{\text{µmol/ml glukoz x deney hacmi}}{\text{zaman (dk) x örnek hacmi}}$$

BÖLÜM 3

SONUÇLAR

3.1 PCR Sonuçlarının Analizi ve Jelden Ekstraksiyonu

2. 8 de anlatıldığı gibi yapılan pcr reaksiyonu sonucunda ~1700 bp boyutunda bir bant gözlenmiştir.



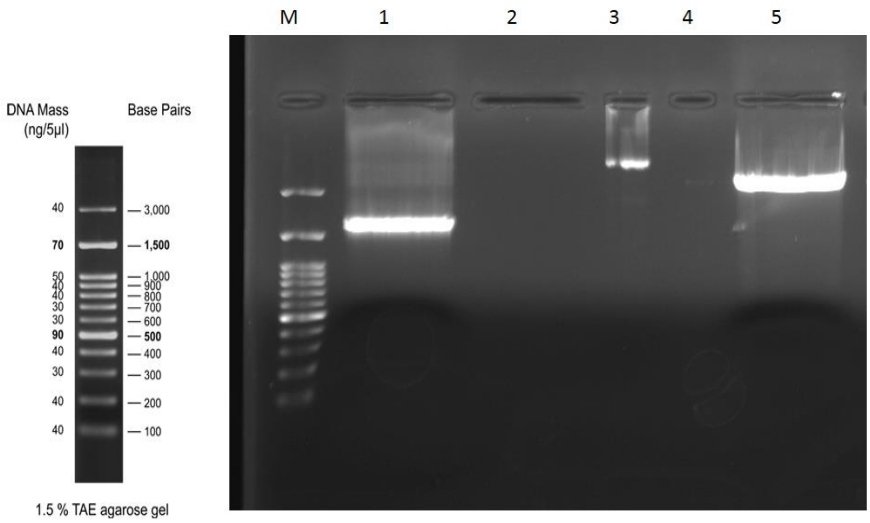
Şekil 3. 1 Başlangıç pcr jelinin fotoğrafı.

1-2: p1-p7 pcr M: Biotechrabbit 100 bp DNA Ladder.

PCR ürünü 2.9'da anlatıldığı gibi jelden ekstrakte edildi.

3.2 Vektör ve ß-glukozidaz cDNA'sının Kesimi

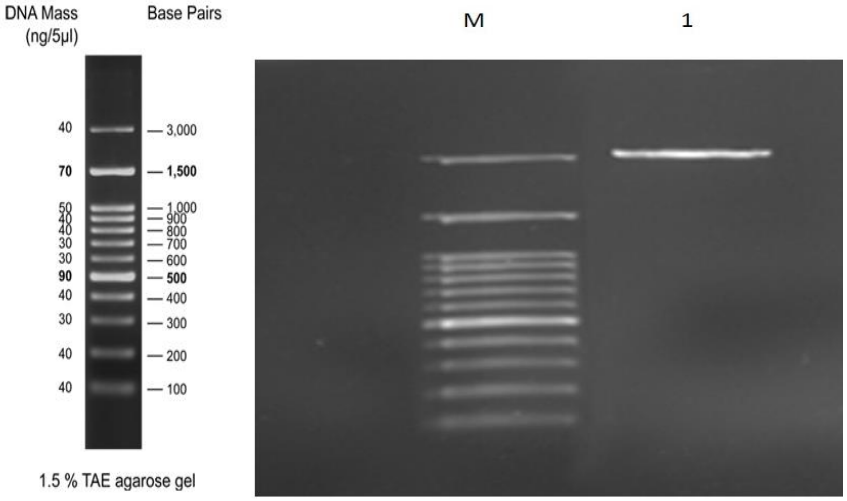
2.10'da anlatıldığı gibi yapılan kesimin sonucu jelde analiz edildi.



Şekil 3. 2 Vektör ve insertte yapışkan uç oluşturma kesimi

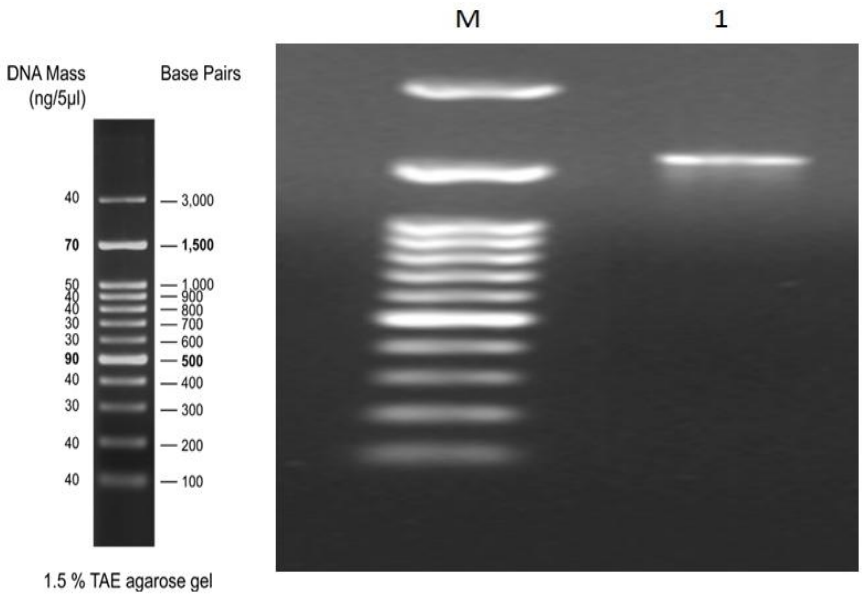
M: Biotechrabbit 100 bp DNA Ladder 1: p1-p7 EcoR I-Xba I kesim 2: Boş 3: pPICZαB kesilmemiş 4: Boş 5: pPICZαB EcoR I-Xba I kesim

Ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA'ların yoğunluk tayini için örnekler %1'lik agaroz yürütüldü (şekil 3.3) . Jel görüntülerinden insertin yoğunluğu 20 ng /µl olarak, vektörün yoğunluğu 36 ng/ µl olarak hesaplandı.



Şekil 3. 3 Kesilmiş vektörün agaroz jel görüntüsü

M: Biotechrabbit 100 bp DNA ladder(3 µl) 1: pPICZαB EcoR I-Xba I kesim (1.5 µl).



Şekil 3. 4 Kesilmiş insertin agaroz jel görüntüsü

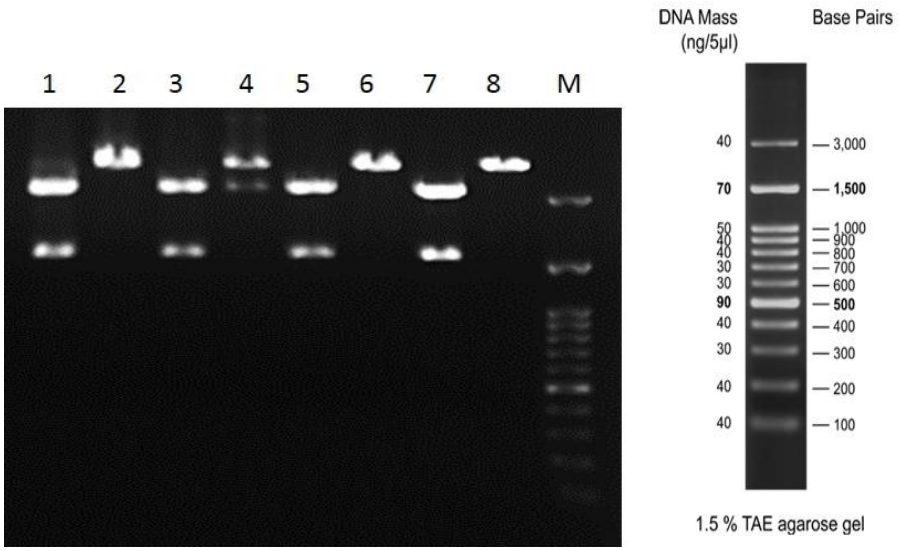
M: Biotechrabbit 100 bp DNA ladder (2.5 µl) 1: p1-p7 EcoR I-Xba I kesim (1 µl)

3.3 PCR Ürününün Ligasyon ve Transformasyonu

2.13'de anlatıldığı şekilde yapılan transformasyon sonucunda çok sayıda koloni elde edildi.

3.4 Pozitif Kolonilerin Analizi

2.14 de anlatıldığı şekilde kolonilerden elde edilen plazmitlere uygulanan kesim sonucunda taranan 4 kolonide de insertin varlığı görüldü.



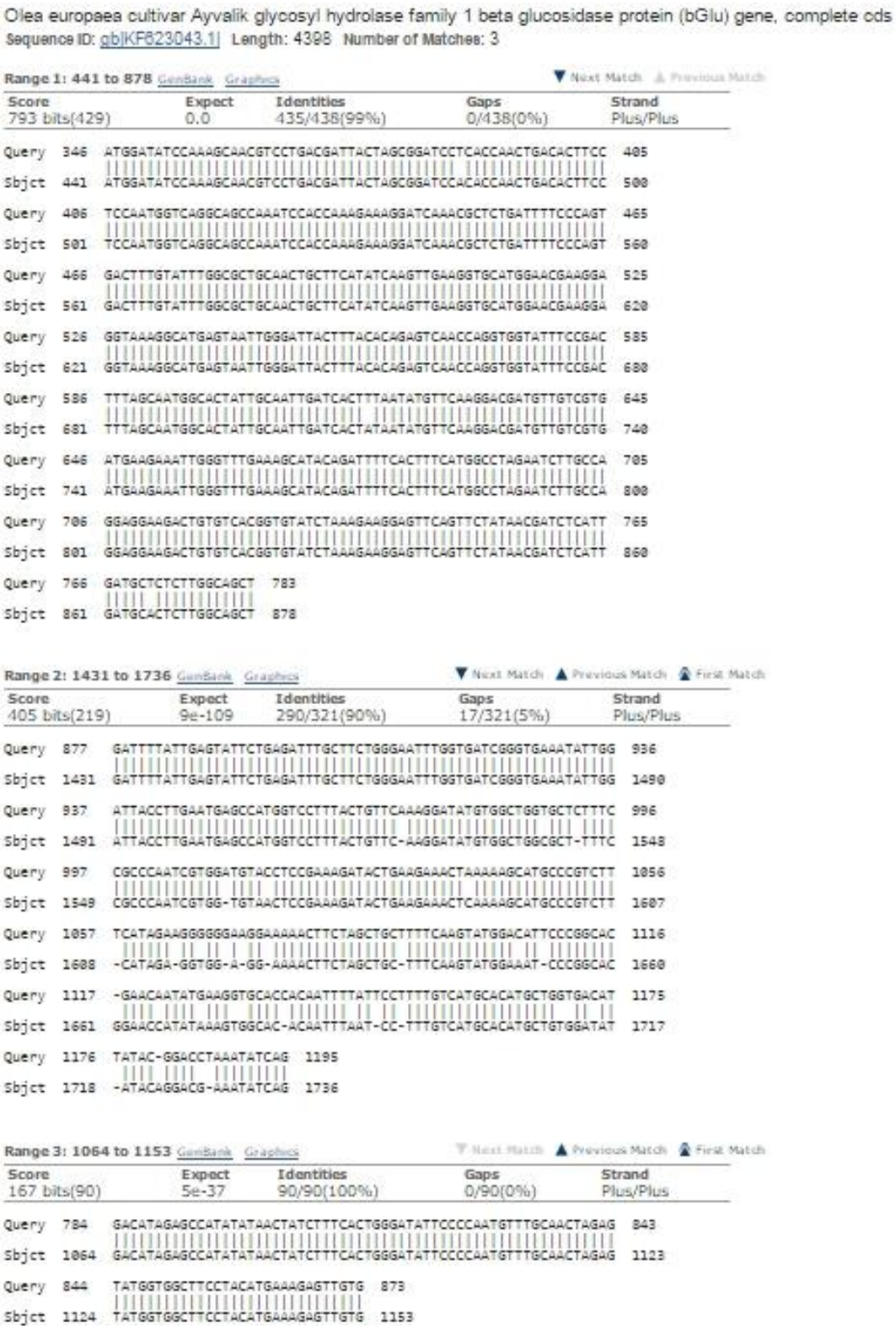
Şekil 3. 5 Transformant kolonilerde insert arama kesimi

1: 4. Koloni EcoR I-Xba I çift kesim 2: 4. Koloni EcoR I kesim 3: 3. Koloni EcoR I-Xba I çift kesim 4: 3. Koloni EcoR I kesim 5: 2. Koloni EcoR I-Xba I çift kesim 6: 2. Koloni EcoR I kesim 7: 1. Koloni EcoR I-Xba I çift kesim 8: 1. Koloni EcoR I kesim 9: Biotechrabbit 100 bp DNA ladder

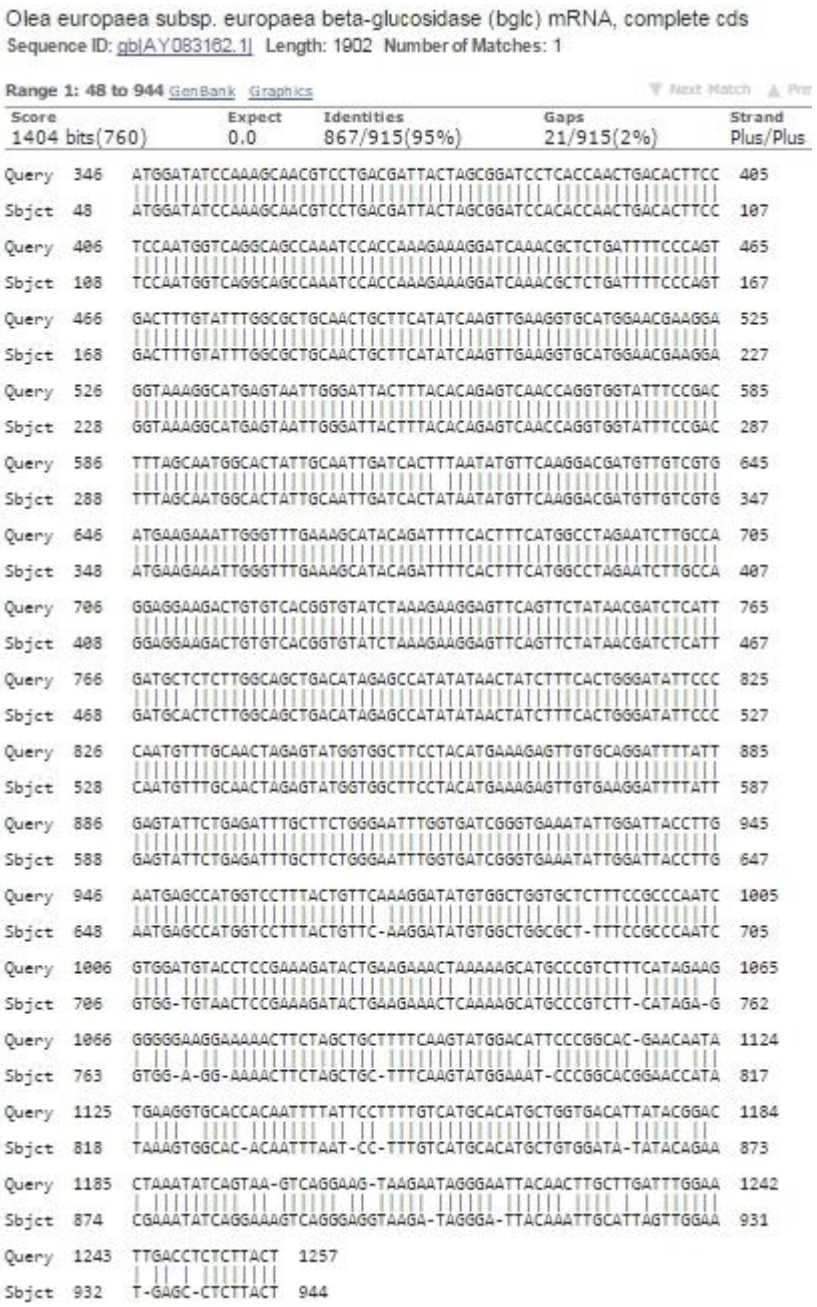
Sonuç olarak 1. koloni sonraki aşamalar için seçildi.

3.5 Dizin Analizi ve BLAST Sonuçları

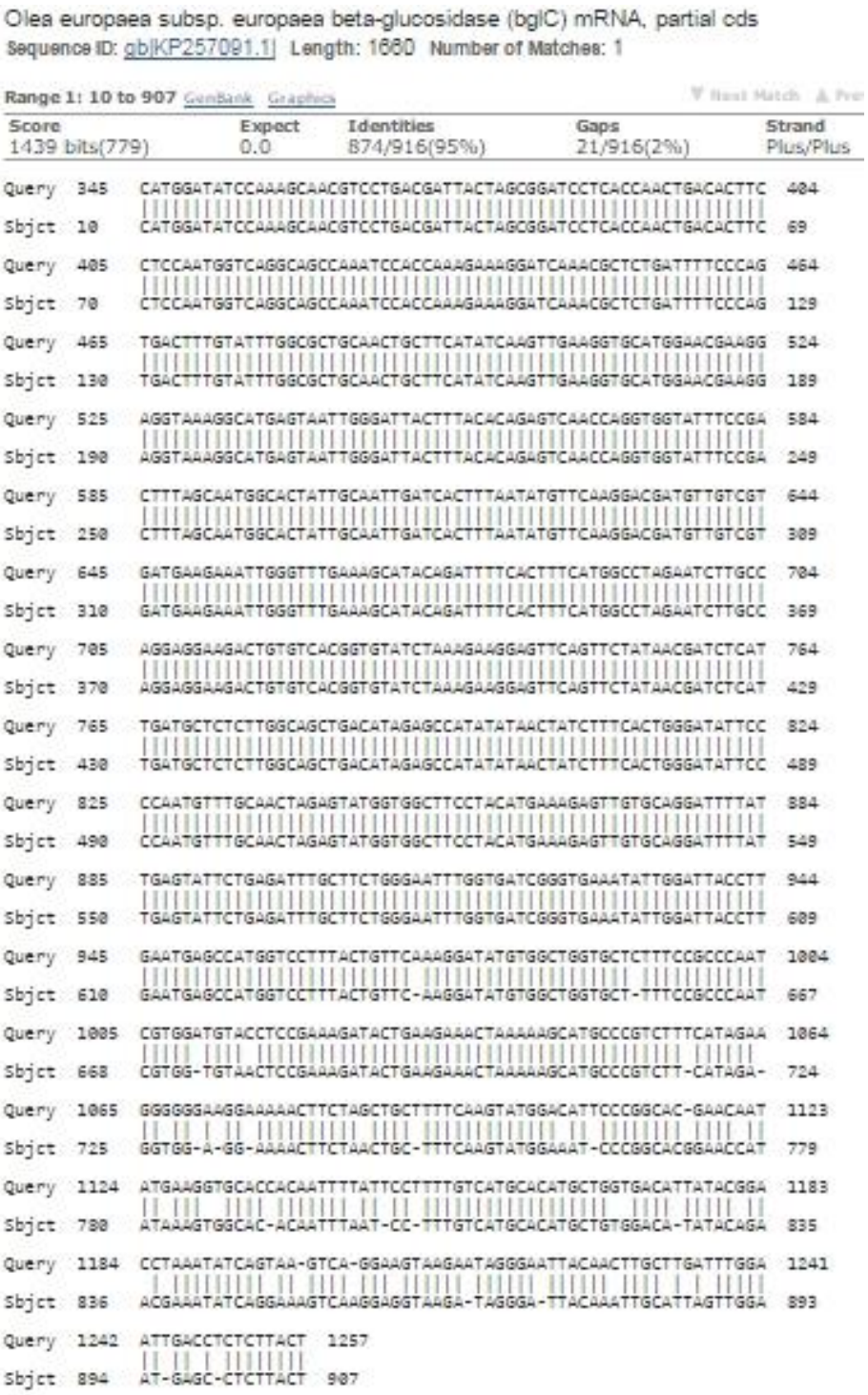
EasySelect Pichia Expression Kit'in 5'*AOX1* ve 3'*AOX1* primerleriyle yapılan dizileme sonuçları ekte verilmiştir. Elde edilen dizinin blast analizi yapıldığında veri tabanındaki 3 adet *O. europaea L. ß-glukozidaz* dizisi ile yüksek homoloji gösterdiği görülmüştür.



Şekil 3. 6 Vektöre ligasyonu yapılan insertten okunan dizinin BLAST analizi



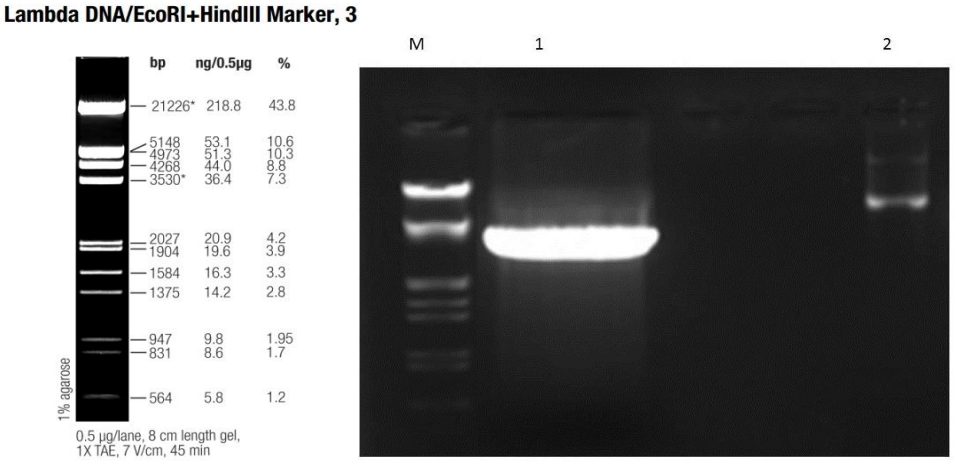
Şekil 3. 7 Vektöre ligasyonu yapılan insertten okunan dizinin BLAST analizi (devamı)



Şekil 3. 8 Vektöre ligasyonu yapılan insertten okunan dizinin BLAST analizi (devamı)

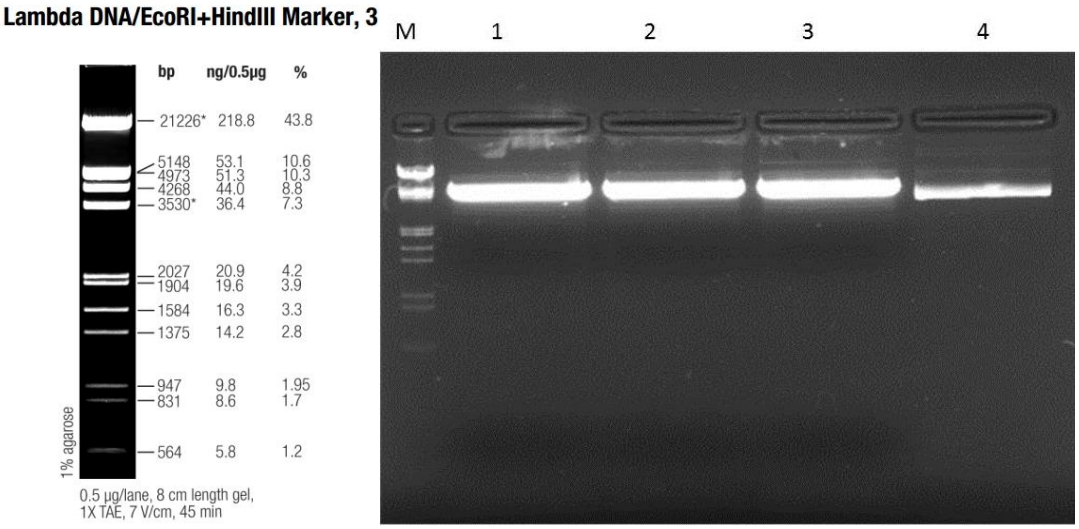
3.6 Ekspresyon Sistemi *Pichia pastoris*'e Transformasyon

Transformasyonun etkin olabilmesi için insertli ekspresyon vektörümüze ve kontrol amaçlı olarak da boş vektöre 2.16.1 de anlatıldığı şartlarda lineerizasyon kesimi yapıldı. Kesilen vektörler agaroz jelden saflaştırıldı.



Şekil 3. 9 Boş vektör lineerizasyon kesimi sonuçları.

M: Lambda DNA/EcoR I+Hind III Marker, 1: pPICZα B Sac I kesimi, 2: kesilmemiş boş vektör



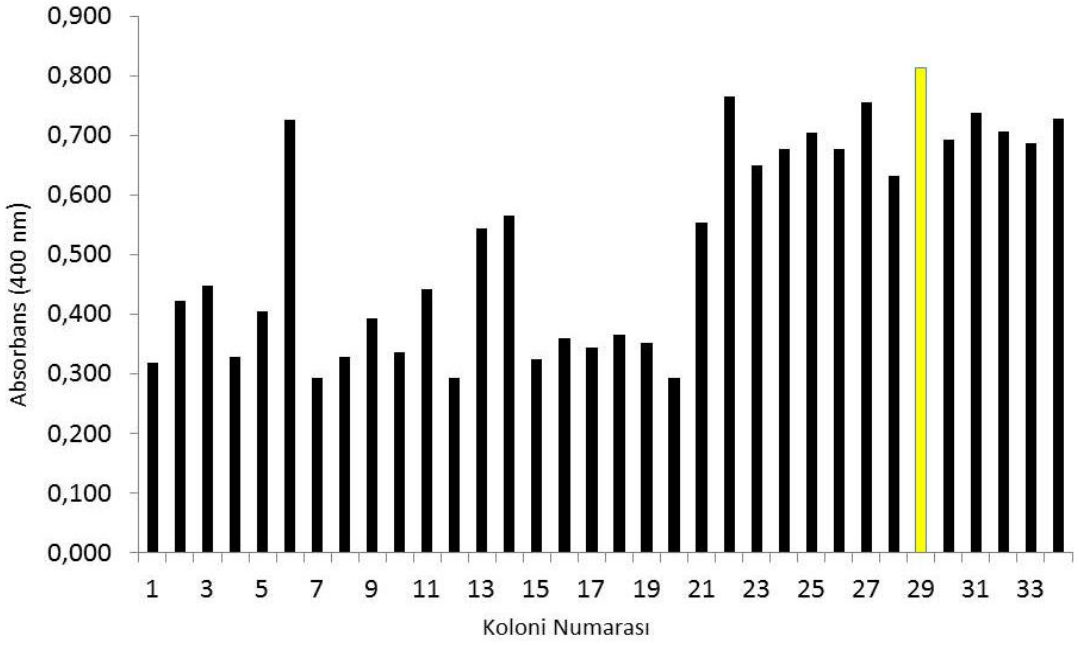
Şekil 3. 10 İnsertli vektör lineerizasyon kesimi sonucu

M: Lambda DNA/EcoR I+Hind III Marker, 1- 2-3-4: İnsertli vektör Sac I kesimi.

P. pastoris genomuna entegrasyon için lineer şekle getirilen vektörler 2.16.3'te anlatıldığı gibi kimyasal kompetent maya hücrelerine transforme edildi.

3.7 Transformant Maya Kolonilerinde Ekspresyon Analizi

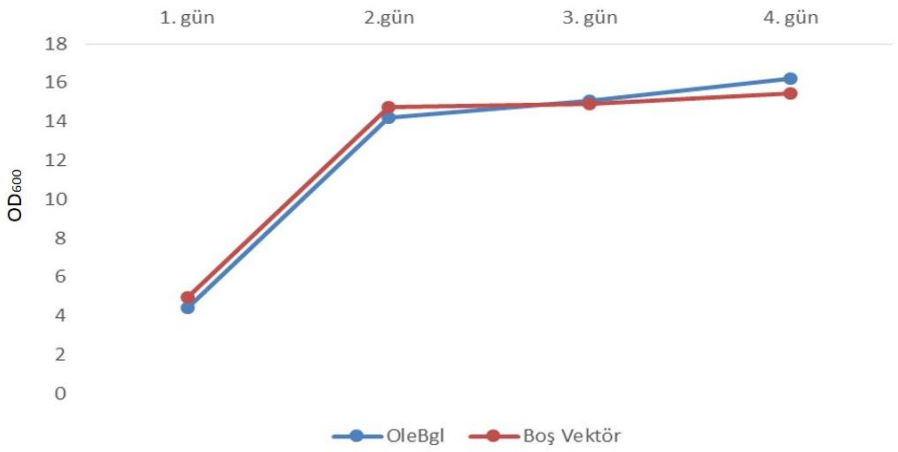
Transformasyon sonucu seçici antibiyotik içeren ortamda oluşan koloniler önce 2.16.4'te anlatıldığı şekilde BMGY besiyerinde büyütülerek biyokütle elde edildi. Bu hücreler ekspresyon uyarımı yapmak için BMMY içeren besiyerine alındı. Kültürlerden elde edilen üstsıvılara 2.16.5'te anlatılan şartlarda aktivite ölçümü uygulandı. Sonuçta en yüksek absorbans veren 29. koloni sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçildi, şekil 3.11 . Bu koloni OleBgl olarak isimlendirildi.



Şekil 3. 11 Koloni taraması aktivite ölçümü sonuç grafiği

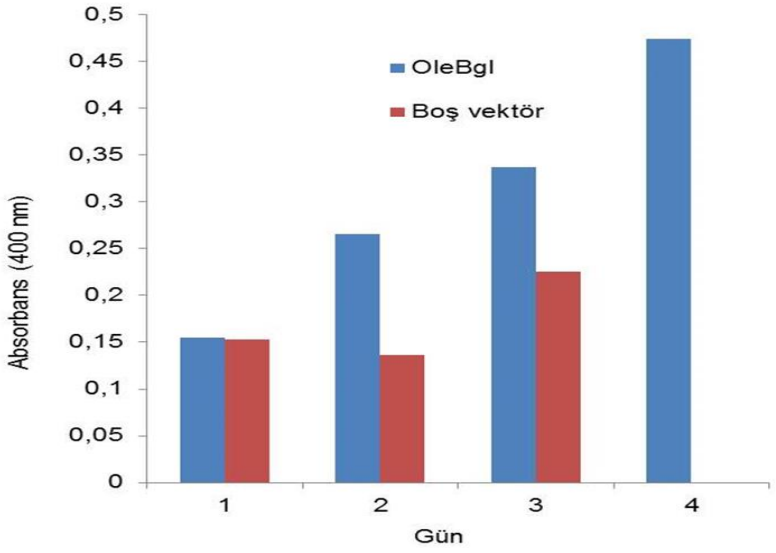
3.8 Büyük Hacim Kültürlerde Büyüme Hızı ve Aktivite Değişimi

Büyük hacimde büyütülen OleBgl ve Boş vektör kültürlerinde 24-48-72-96 saat zaman noktalarında 600 nm'deki absorbanslarla büyüme hızındaki değişim şekil 3. 12'deki gibi gözlenmiştir.



Şekil 3. 12 Büyük hacimde büyütülen kolonilerde büyüme hızı grafiği

Aynı zaman dilimlerinde alınan örneklerle 2.16.5'te belirtilen şartlarda yapılan pNPG aktivite ölçümünün sonuçları da Şekil 3. 13'deki gibi elde edilmiştir.

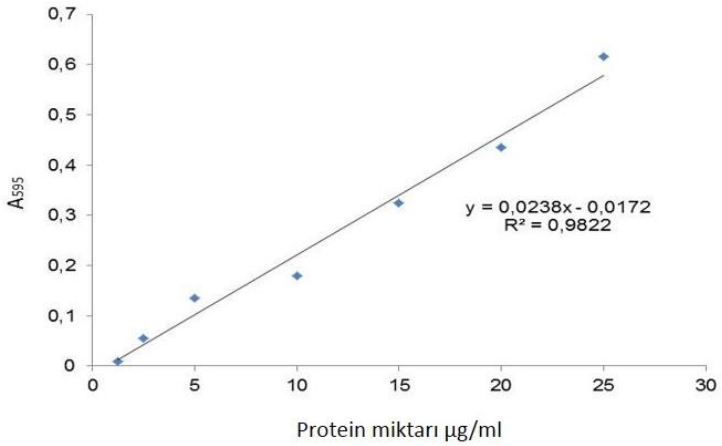


Şekil 3. 13 Büyük hacim kolonilerinde günlük aktivite ölçümü sonuçları

Bu sonuçlara göre ekspresyon kültürlerinin 2. günden itibaren durgun faza girdiği ve bu günden itibaren kontrol kültürüne göre aktivitede bariz bir fark olduğu görülmüştür.

3.9 Bradford Ölçümü Sonuçları

2.16.7'de anlatılan şekilde yapılan ölçüm sonucunda protein standartlarının absorbanslarına göre aşağıdaki grafik elde edildi.



Şekil 3. 14 Bradford ölçümü protein standardı grafiği

Standart çözeltilerin protein miktarları referans alınarak reaksiyonlar sonucu elde dilen absorbanslardan örneklerin protein miktarları tayin edildi. Bunun için hesaplanan son absorbans değerine grafiğin denklemi uygulandı, (Çizelge 3.1).

Örnekler	Boş vektör Ultrafiltrasyon	OleBgl Ultrafiltrasyon	Na-fosfat tamponu	YPM (Besiyeri)	Boş vektör üstsıvı	OleBgl üstsıvı
Absorbans (595 nm)	0,430	0,310	0,048	0,560	0,870	0,658
Standart Eğriye göre protein miktarı (µg/ml)	18,790	13,748	2,718	24,252	37,277	28,349
Dilusyon Faktörü	100	100	1	2	2	2
Dilusyon faktörü ile çarpımı (µg/ml protein)	1.878,992	1.374,790	2,718	48,504	74,555	56,697
Net Protein Miktarı (µg/ml)	1.876,273	1.372,071			26,050	8,193

Çizelge 3. 1 Bradford Ölçümü sonuçları

3.10 pNPG ile Aktivite Ölçümü

2.16.8'de belirtildiği şekilde yapılan ölçümün sonuçları çizelge 3.2'de verilmiştir. Sonuçta genin transforme edildiği transformant kolonide enzim aktivitesi boş vektörün transforme edildiği hücreden daha yüksek olarak ölçülmüştür. Sonuçlar Ek C-1 'de verilmiştir. Örneklerin absorbansından su ve kör absorbansları çıkarıldıktan sonra elde edilen net absorbans (ΔOD) denklemde yerine koyularak aktivite (U/ml) ve spesifik aktivite (U/mg) hesaplanmıştır. Spesifik aktivite saf enzim kullanılmadan yapıldığından mg protein başına aktivite olarak ölçülmüştür.

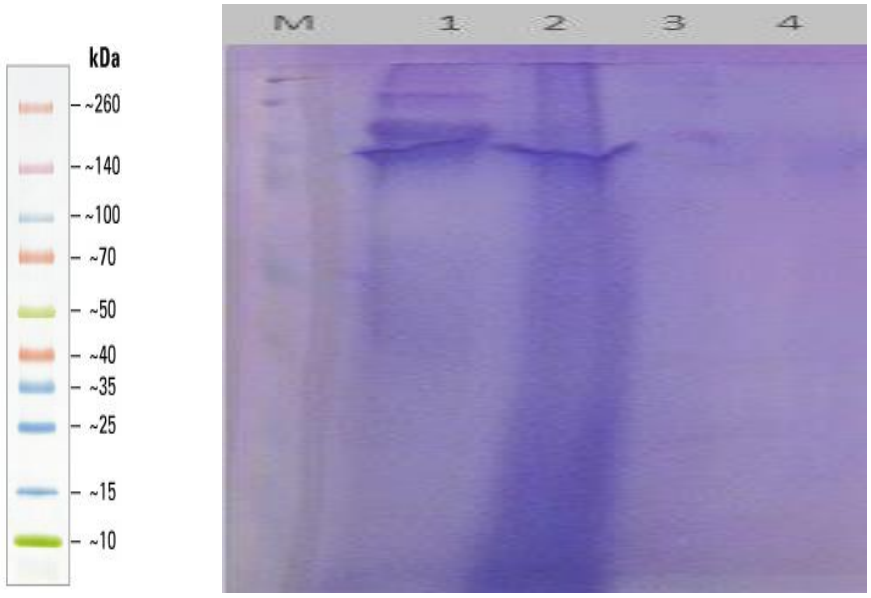
Çizelge 3. 2 pNPG ile aktivite ölçümüne göre sonuçlar

Örnek	A_{400}	Reaksiyon-Kör	Aktivite (U/ml)	mg/ml protein	Spesifik Aktivite (U/mg)
OleBgl üstsıvı	0,471	0,288	0,0085	0,0082	1,037
OleBlg Kör	0,182				
Boş Vektör Üstsıvı	0,193	-0,199	-	0,026	-
Boş Vektör Üstsıvı Kör	0,392				

3.11 Rekombinant Proteinin SDS PAGE ile Analizi

Rekombinant protein üretimi 2.16.4'te anlatıldığı şekilde indüklendikten sonra maya kültürleri santrifüjlenerek üstsıvısı alınmış ve %70 amonyumsülfat eklenerek proteinler çöktürülüp 50 mM Na-fosfat pH 6.8 tamponunda çözülmüştür. Daha sonra ultrafiltrasyonla tuz uzaklaştırılmış ve örnek daha da konsantre edilmiştir. Bu şekilde elde edilen örnekler ve daha önceden ayırılan ham üstsıvı örneği PAGE ile analiz edilmiştir (şekil 3.15). Bu elektroforez işleminde, sonraki iki jelden farklı olarak denaturasyon %9 2-Merkaptoetanol içeren 6X örnek tamponu ile ve 10 dk kaynatılarak yapılmıştır. Boyama çözeltisi de %0.1 CBB içermektedir. Birinci sırada rekombinant vektör taşıyan maya kültürünün (OleBgl) amonyumsülfat çöktürmesi, ikinci sırada ise

yalnızca boş vektör içeren maya kültürünün amonyumsülfat çöktürmesi görülmektedir. Marker bantları net olarak ayırt edilemese de rekombinant örnekte kontrolden farklı kalın bir bant gözlenmiştir. Üçüncü sırada rekombinant kültürün üstsıvısı, dördüncü sırada ise rekombinant olmayan kültürün üstsıvısı görülmektedir. Bu örneklerde protein konsantrasyonu çok düşük olduğundan pozitif örnekte kontrolden farklı olarak çok silik bir bant gözlenmiştir.

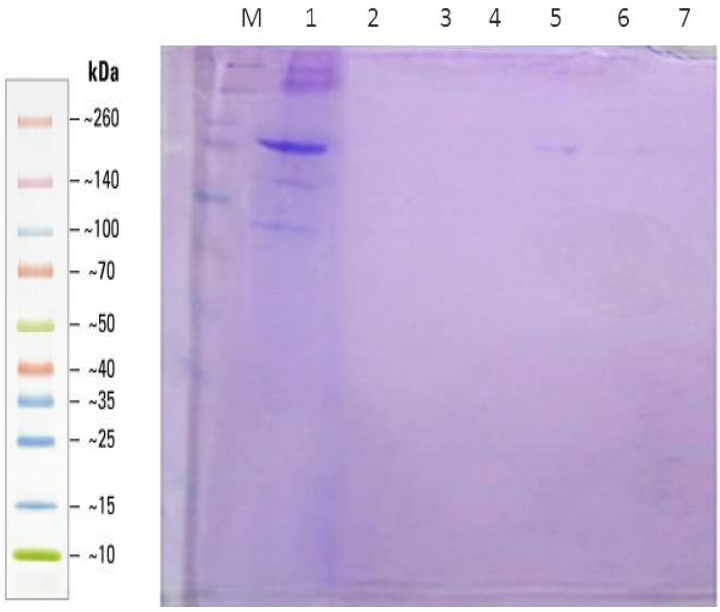


Şekil 3. 15 Amonyumsülfatla konsantre edilen örneklerin PAGE jeli

M:Marker 1: OleBgl ultrafiltrasyon 2: Boş vektör ultrafiltrasyon 3: OleBgl üstsıvı 4: Boş vektör üstsıvı

Rekombinant proteinin saflaştırılması için 2.16.8'de anlatılan şartlarda IMAC (İmmobilize Metal Afinite Kromatografi) yöntemi kullanılmıştır. Örnekler 1.5 mm kalınlığındaki %12lik PAGE jelinde analiz edilmiştir (şekil 3.16). Rezine yüklenip bağlama işlemi uygulandıktan sonra alınan ilk fraksiyonda rekombinant proteine karşılık gelen kalın bir bant görülmüştür (şekil 3.16/1). Saflaştırmadan sonra elde edilen elusyonlarda bant görülmemiştir (şekil 3.16/2,3,4). Bağlanma sonrası fraksiyonda kalın bir bant şeklinde görülen rekombinant protein, rezine bağlanmanın başarılı olmadığını göstermektedir. Yıkama fraksiyonlarında ise çok zayıf bantlar görülmüştür (şekil 3. 16/5,6,7). Jelde yıkama fraksiyonlarında bant görülmesi ilk bağlanma aşamasının gerçekleşmiş olabileceği ancak yeterince güçlü olmayan bağlanma sonucu yıkama ile bu proteinlerin rezinden ayrıldığı ihtimalini düşündürmektedir. Histidin kuyruğunun

bağlandığı bölge katlanmış proteinin iç kısımlarında kalmışsa rezine bağlanma gerçekleşmez.

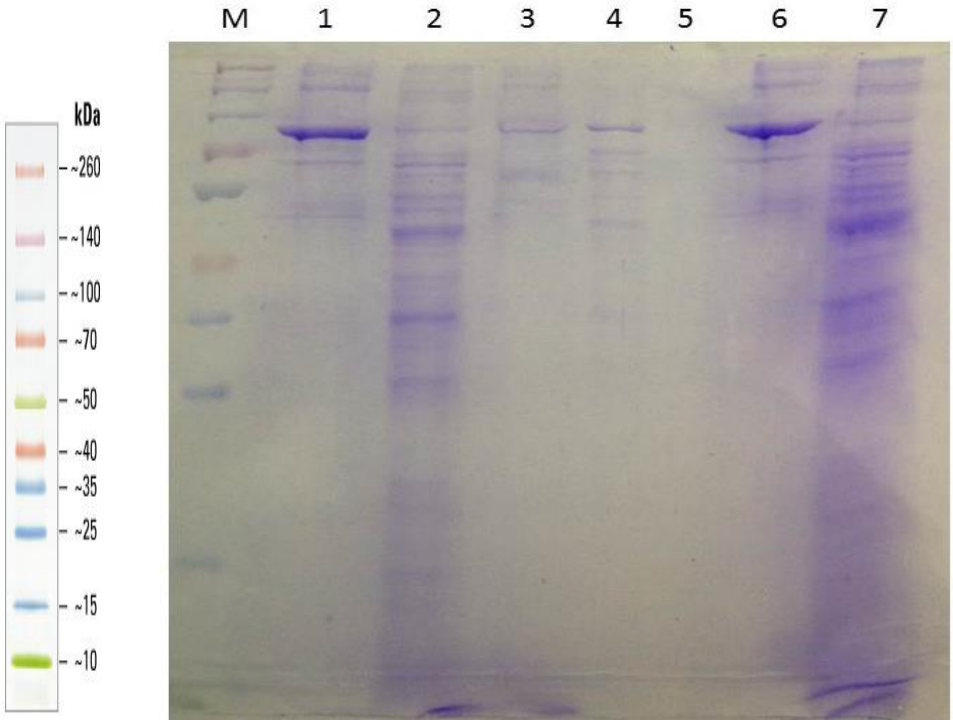


Şekil Şekil 3. 16 His tag saflaştırma jeli

M: Marker 1: Bağlama sonrası fraksiyon 2-3-4: Elusyon 5-6-7: Yıkama

Rekombinant proteinin saflaştırılması işleminin çalışmaması ve elimizde amonyumsülfatla çöktürülmüş örneklerin kalmaması sonucu rekombinant mayada ß-glukozidazı fazla miktarda üretiminin doğrulanması için 2.16.11'de anlatıldığı şekilde yeni bir PAGE yapılmıştır. PAGE için 1 mm kalınlıkta jel kullanılmıştır. Bu jelin görüntüsü aşağıdaki gibidir (şekil 3.17). Bu kez önceki saflaştırma işleminde bağlama aşamasından elde edilen üst sıvı (3.36 sıra 1'de görülen örnek) kullanılmıştır. Ayrıca karşılaştırma için rekombinant olmayan vektörü taşıyan ve metanol katılmış maya kültürü üstsıvısı da amonyumsülfatla yoğunlaştırılıp (3.15 2. sıradaki örnek) rezinden geçirilmiş ve jele yüklenmiştir. Jele yüklenecek miktarlar hesaplanırken Bradford ölçümü sonuçlarına göre protein miktarlarının eşitlendiği (3.17/1,2) ve hacimlerin eşit tutulduğu (3.17/6,7) iki ayrı yükleme yapıldı. Ayrıca kültürlerin üstsıvısından da jele yüklenerek (3.17/3,4) protein profilleri karşılaştırıldı. Rekombinant maya örneklerinin bulunduğu 1. ve 6. sıralarda 85-90 kDa luk yoğun bir protein bandı görülmüştür. Rekombinant olmayan maya örneklerinin bulunduğu 2. ve 7. sıralarda bu bant gözlenmemiştir.

Rekombinant proteinin boyutunun beklenenden daha büyük görünmesi glikozilasyon gibi modifikasyonların olabileceğini göstermektedir(şekil 3.17/1ve 6). Bu tür modifikasyonlar da histidin kuyruğunu saklayabileceğinden etkin saflaştırmayı engelleyebilir. Bu durumda da saflaştırma mümkün olmayacaktır. İleriki saflaştırma denemelerinde üre kullanılarak rekombinant proteinin denatürasyonu gerçekleştirilecektir ve saflaştırma bundan sonra yapılacaktır. Ayrıca olası bir glikozillenme durumunun analizi için de deneyler planlanmaktadır.

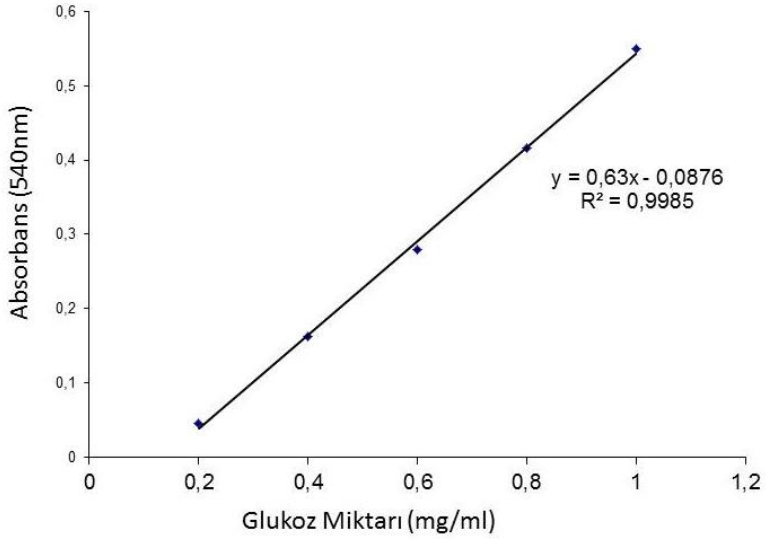


Şekil 3. 17 Ekspresyon kültürü örneklerinin SDS-PAGE jel görüntüsü.

M: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (5 µl) 1: OleBgl ultrafiltrasyon (22,5 µl) 2: Boş vektör ultrafiltrasyon (8.90 µl) 3: OleBgl üstsıvı (22.5 µl) 4: Boş vektör üstsıvı (7.06 µl) 5: Boş 6: OleBgl ultrafiltrasyon (30 µl) 7: Boş vektör ultrafiltrasyon (30 µl)

3.12 Oleuropein ile Aktivite Ölçümü

2.16.11'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilen ölçüm sonucu aşağıdaki glukoz standart eğrisi elde edildi.



Şekil 3. 18 DNS ölçümü glukoz standardı grafiği

DNS ölçümü sonucu 540 nm'de elde edilen absorbanslar Ek C-2'de verilmiştir.

Farklı yoğunluktaki glukoz çözeltilerinin yoğunlukları referans alınarak ölçüm sonucu açığa çıkan glukoz miktarları ve buna bağlı olarak aktivite hesapları aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Çizelge 3. 3 Oleuropein aktivite ölçümü sonuçları

Örneğin Adı	Glukoz miktarı (mg/ml)	Aktivite (U/ml)	Toplam Protein Miktarı (mg/ml)	Spesifik Aktivite (U/mg)
OleBgl üstsıvı	0,219	0,811	0,008	99,024
Boş vektör üstsıvı	0,165	0,611	0,026	23,467

Özgül substrat oleuropeine karşı aktivitenin ölçüldüğü bu deneyde rekombinant olmayan kontrol kolonisinde de aktivite gözlenmiştir. Boş vektör kolonisinden elde edilen üstsıvı daha yoğun protein içerdiğinden, U/mg cinsinden olan spesifik aktivite rekombinant kolonide daha yüksek olarak hesaplanmıştır.

P. pastoris'in bildirilen hücre dışı enzimlerinin de *ß-glukozidaz* aktivitesi göstermesinin yanı sıra [83], ökaryotik sistemlerde salgısal yolakta yaygın olarak görülen protein glikozillenmesi [84] rekombinant *ß-glukozidaz*larda aktivite düşüşüne neden olabilmektedir [85]. Sentetik ve özgül substratlar karşılaştırıldığında ise rekombinant enzimin spesifik substrata karşı spesifik aktivitesi kontrole göre 95.5 kat fazla olarak ölçülmüştür.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm canlı gruplarında yaygın bir enzim sınıfı olan *ß-glukozidaz*lar çok çeşitli işlevler görmektedir. Bitkilerde savunma bileşiklerinin oluşturulması, tat ve koku bileşiklerinin üretilmesi, stres durumunda alternatif yollardan besin sağlanması veya stres hormonlarının üretilmesi, hücre duvarı yapımı gibi farklı görevler yapan *ß-glukozidaz*lar bildirilmiştir. Laboratuvarımızda daha önce yürütülen çalışmalarda ülkemizin önde gelen kültür bitkilerinden biri olan zeytinin yaprağından elde edilen mRNA nın kodladığı *ß-glukozidaz* geni klonlanmıştır. Zeytin yaprağında yüksek miktarlarda bulunan bir savunma bileşiği olan oleuropein, bitkinin *ß-glukozidaz* enzimiyle özgül olarak hidrolizlenmektedir. Sonuçta oluşan bileşikler arasında sağlığa yararları dolayısıyla önemi ve ekonomik değeri yüksek olan hidroksitirozol ve oleuropein aglikonu dikkat çekmektedir. Çalışmada bu gen güçlü bir ökaryotik ekspresyon sistemi olarak öne çıkan *Pichia pastoris*'e klonlanmış ve hücre dışı ekspresyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak rekombinant proteinin saflaştırılması ile ilgili problemler ortaya çıkmıştır. Yapılan deneyler gelecek çalışmalarımıza yön verecek bir takım bulgular ortaya koymuştur. Bunlar:

1- Özgül olmayan substratla, rekombinant vektör taşıyan ve taşımayan kültürlerin üstsıvıları kullanılarak karşılaştırmalı yapılan aktivite testlerinde önemli farklar görülmüştür. Bu farklara dayanarak pozitif maya kolonilerinden en yüksek aktivite gösteren seçilmiştir. Rekombinant *ß-glukozidaz*ın aktivitesi özgül substratla da belirlenmiştir.

2- Protein hücre dışı üretildiğinde boyutunda yaklaşık 10 kDa'luk bir artış görülmüştür. Bunun nedeninin hücre dışına salgılanma öncesi glikozilasyon gibi bir translasyon sonrası modifikasyon olduğu düşünülmüştür. Kitin kılavuzunda belirtilen, (Asn-X-Ser/Thr) glikozillenme dizisinin, klonlanan genin dizin analizi sonucu elde edilen sekansın aminoasit dizisine çevirimiyle elde edilen dizide bulunması, bu ihtimali güçlendirmektedir.

3- Karboksi ucunda histidin kuyruklu üretilen rekombinant protein histidin afinite kromatografisinde saflaştırılamamıştır. Histidin kuyruğun bağlandığı bölgenin katlanmış proteinin iç kısımlarında kalması halinde bağlanma mümkün olmamaktadır. Histidin kuyruğu eklenmiş bir protein doğal proteinden farklı bir mutant olduğundan bu durum saflaştırma için engel oluşturabilir. Bu sorun denatüre koşullarda yapılan saflaştırma ile aşılabilir. Ayrıca hücre dışına salgılanmadan önce glikozilasyon gibi bir translasyon sonrası modifikasyon oluyorsa bu da saflaştırmayı engelleyebilir.

Laboratuvarımızda bu sorunları aşarak saf enzimi elde etmeye yönelik çalışmalar devam etmektedir. Rekombinant enzim saf olarak elde edildiğinde enzimin biyokimyasal ve katalitik özellikleri belirlenerek biyoteknolojik önemi değerlendirilecektir.

KAYNAKLAR

[1] Ketudat Cairns, J. ve Esen, A., (2010). "B-Glucosidases", Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 3389-3405.

[2] Lombard, V. Golaconda Ramulu, H. Drula, E. Coutinho, P.M. ve Henrissat, B., (2014). "The Carbohydrate-Active Enzymes Database (Cazy) in 2013", Nucleic Acids Research, 42: D490-D495.

[3] Koudounas, K. Banilas, G. Michaelidis, C. Demoliou, C. Rigas, S. ve Hatzopoulos, P., (2015). "A Defence-Related Olea Europaea B-Glucosidase Hydrolyses and Activates Oleuropein into a Potent Protein Cross-Linking Agent", Journal of Experimental Botany, 66: 2093-2106.

[4] Nagano, N. Orengo, C.A. Ve Thornton, J.M., (2002). "One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on Their Sequences, Structures and Functions", Journal of Molecular Biology, 321: 741-765.

[5] Sansenya, S. Opassiri, R. Kuaprasert, B. Chen, C.-J. ve Cairns, J.R.K., (2011). "The Crystal Structure of Rice (Oryza Sativa L.) Os4bglu12, an Oligosaccharide and Tuberonic Acid Glucoside-Hydrolyzing Beta-Glucosidase with Significant Thioglucohydrolase Activity", Archives of Biochemistry and Biophysics, 510: 62-72.

[6] Himeno, N. Saburi, W. Wakuta, S. Takeda, R. Matsuura, H. Nabeta, K. Sansenya, S. Cairns, J.R.K. Mori, H. Imai, R. ve Matsui, H., (2013). "Identification of Rice Beta-Glucosidase with High Hydrolytic Activity Towards Salicylic Acid Beta-D-Glucoside", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 77: 934-939.

[7] Morant, A.V. Jorgensen, K. Jorgensen, C. Paquette, S.M. Sanchez-Perez, R. Moller, B.L. ve Bak, S., (2008). "Beta-Glucosidases as Detonators of Plant Chemical Defense", Phytochemistry, 69: 1795-1813.

[8] Konno, K. Hirayama, C. Yasui, H. ve Nakamura, M., (1999). "Enzymatic Activation of Oleuropein: A Protein Crosslinker Used as a Chemical Defense in the Privet Tree", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96: 9159-9164.

[9] Spadafora, A. Mazzuca, S. Chiappetta, F.F. Parise, A. Perri, E. ve Innocenti, A.M., (2008). "Oleuropein-Specific-B-Glucosidase Activity Marks the Early

Response of Olive Fruits (Olea Europaea) to Mimed Insect Attack", Agricultural Sciences in China, 7: 703-712.

[10] Gerardi, C. Blando, F. Santino, A. ve Zacheo, G., (2001). "Purification and Characterisation of a Beta-Glucosidase Abundantly Expressed in Ripe Sweet Cherry (Prunus Avium L.) Fruit", Plant Science, 160: 795-805.

[11] Rawat, R. Gulati, A. ve Joshi, R., (2011). "Partial Purification and Characterızation of Beta-Glucosıdase from Tea Shoot", Journal of Food Biochemistry, 35: 953-975.

[12] Williams, P.J. Strauss, C.R. Wilson, B. ve Massywestropp, R.A., (1982). "Studies on the Hydrolysis of Vitis-Vinifera Monoterpene Precursor Compounds and Model Monoterpene Beta-D-Glucosides Rationalizing the Monoterpene Composition of Grapes", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30: 1219-1223.

[13] Gueguen, Y. Chemardin, P. Janbon, G. Arnaud, A. ve Galzy, P., (1996). "A Very Efficient Beta-Glucosidase Catalyst for the Hydrolysis of Flavor Precursors of Wines and Fruit Juices", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44: 2336-2340.

[14] Dharmawardhana, D.P. Ellis, B.E. Ve Carlson, J.E., (1995). "A Beta-Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin", Plant Physiology, 107: 331-339.

[15] Escamilla-Trevino, L.L. Chen, W. Card, M.L. Shih, M.-C. Cheng, C.-L. ve Poulton, J.E., (2006). "Arabidopsis Thaliana Beta-Glucosidases Bglu45 and Bglu46 Hydrolyse Monolignol Glucosides", Phytochemistry, 67: 1651-1660.

[16] Lee, K.H. Piao, H.L. Kim, H.-Y. Choi, S.M. Jiang, F. Hartung, W. Hwang, I. Kwak, J.M. Lee, I.-J. ve Hwang, I., (2006). "Activation of Glucosidase Via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid", Cell, 126: 1109-1120.

[17] Thorlby, G. Fourrier, N. ve Warren, G., (2004). "The Sensitive To Freezing2 Gene, Required for Freezing Tolerance in Arabidopsis Thaliana, Encodes a Beta-Glucosidase", Plant Cell, 16: 2192-2203.

[18] Patro, L. Mohapatra, P.K. Biswal, U.C. ve Biswal, B., (2014). "Dehydration Induced Loss of Photosynthesis in Arabidopsis Leaves During Senescence is Accompanied by the Reversible Enhancement in the Activity of Cell Wall Beta-Glucosidase", Journal Of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 137: 49-54.

[19] Fujiki, Y. Yoshikawa, Y. Sato, T. Inada, N. Ito, M. Nishida, I. ve Watanabe, A., (2001). "Dark-İnducible Genes from Arabidopsis Thaliana are Associated with Leaf Senescence and Repressed by Sugars", Physiologia Plantarum, 111: 345-352.

[20] Dogaris, I. Mamma, D. ve Kekos, D., (2013). "Biotechnological Production of Ethanol from Renewable Resources by Neurospora crassa: An Alternative to

Conventional Yeast Fermentations?", Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 1457-1473.

[21] Singhania, R.R. Patel, A.K. Sukumaran, R.K. Larroche, C. ve Pandey, A., (2013). "Role and Significance of Beta-Glucosidases in the Hydrolysis of Cellulose for Bioethanol Production", Bioresource Technology, 127: 500-507.

[22] Kumar, R. Singh, S. ve Singh, O.V., (2008). "Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives", Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 35: 377-391.

[23] Niculescu-Duvaz, I. ve Springer, C.J., (1997). "Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (Adept): A Review", Advanced Drug Delivery Reviews, 26: 151-172.

[24] Syrigos, K.N. Rowlinson-Busza, G. ve Epenetos, A.A., (1998). "In Vitro Cytotoxicity Following Specific Activation of Amygdalin by Beta-Glucosidase Conjugated to a Bladder Cancer-Associated Monoclonal Antibody", International Journal of Cancer, 78: 712-719.

[25] Spadafranca, A. Erba, D. Foti, P. ve Testolin, G., (2008). "The Consumption of Soy Products Positively Affects DNA Resistance to Oxidative Stress in Healthy Subjects", Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 18: E45-E46.

[26] Ma, D.-F. Qin, L.-Q. Wang, P.-Y. ve Katoh, R., (2008). "Soy Isoflavone Intake Increases Bone Mineral Density in the Spine of Menopausal Women: Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials", Clinical Nutrition, 27: 57-64.

[27] Ouyang, G. Yao, L. Ruan, K. Song, G. Mao, Y. ve Bao, S., (2009). "Genistein Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells via Activation of DNA Damage Checkpoint Pathways", Cell Biology International, 33: 1237-1244.

[28] Mccue, P. ve Shetty, K., (2004). "Health Benefits of Soy Isoflavonoids and Strategies for Enhancement: A Review", Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44: 361-367.

[29] Bakis, Y. Babac, M.T. ve Uslu, E., (2011). "Updates and Improvements of Turkish Plants Data Service (TüBİVes)".

[30] Weiss, E., (2015). "“Beginnings of Fruit Growing in the Old World” – Two Generations Later", Israel Journal of Plant Sciences, 62: 75-85.

[31] Therios, I.N., (2009). "Olives", Available At: Http://Site.Ebrary.Com/İd/10320511. Accessed.

[32] Luchetti, F., (2002). "Importance and Future of Olive Oil in The World Market - an İntroduction to Olive Oil", European Journal of Lipid Science and Technology, 104: 559-563.

[33] Toguri, T. Umemoto, N. Kobayashi, O. ve Ohtani, T., (1993). "Activation of Anthocyanın Synthesıs Genes by White-Light in Eggplant Hypocotyl Tıssues, and Identıfıcatıon of an Inducıble P-450 Cdna", Plant Molecular Biology, 23: 933-946.

[34] Soleas, G.J. Diamandis, E.P. ve Goldberg, D.M., (1997). "Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention", Journal of Clinical Laboratory Analysis, 11: 287-313.

[35] Soler-Rivas, C. Espín, J.C. ve Wichers, H.J., (2000). "Oleuropein and Related Compounds", Journal of The Science of Food and Agriculture, 80: 1013-1023.

[36] Romero-Segura, C. Sanz, C. ve Perez, A.G., (2009). "Purification and Characterization of an Olive Fruit Beta-Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 7983-7988.

[37] Vissers, M.N. Zock, P.L. Roodenburg, A.J.C. Leenen, R. ve Katan, M.B., (2002). "Olive Oil Phenols are Absorbed in Humans", The Journal of Nutrition, 132: 409-417.

[38] Kiai, H. ve Hafidi, A., (2014). "Chemical Composition Changes in Four Green Olive Cultivars During Spontaneous Fermentation", Lwt-Food Science and Technology, 57: 663-670.

[39] Tuna, S. ve Akpinar-Bayizit, A., (2009). "The Use of Beta-Glucosidase Enzyme in Black Table Olives Fermentation", Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37: 182-189.

[40] Visioli, F. Ve Galli, C., (1998). "Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 4292-4296.

[41] Hamza, M. Khoufi, S. ve Sayadi, S., (2012). "Fungal Enzymes as a Powerful Tool to Release Antioxidants from Olive Mill Wastewater", Food Chemistry, 131: 1430-1436.

[42] Fleming, H.P. Walter, W.M. Ve Etchells, J.L., (1973). "Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives", Applied Microbiology, 26: 777-782.

[43] Micol, V. Caturla, N. Pérez-Fons, L. Más, V. Pérez, L. Ve Estepa, A., (2005). "The Olive Leaf Extract Exhibits Antiviral Activity against Viral Haemorrhagic Septicaemia Rhabdovirus (Vhsv)", Antiviral Research, 66: 129-136.

[44] Furneri, P.M. Marino, A. Saija, A. Uccella, N. Ve Bisignano, G., (2002). "In Vitro Antimycoplasmal Activity of Oleuropein", International Journal of Antimicrobial Agents, 20: 293-296.

[45] Visioli, F. Bellomo, G. Ve Galli, C., (1998). "Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols", Biochemical and Biophysical Research Communications, 247: 60-64.

[46] (1997). "Oleuropein İnhibits Ldl Oxidation and Increases No Production from Macrophages: Visioli F. ve Galli C. Inst. Pharmacol. Sci., Univ. Milan, Milan, Italy", Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 57: 212.

[47] Elamin, M.H. Daghestani, M.H. Omer, S.A. Elobeid, M.A. Virk, P. Al-Olayan, E.M. Hassan, Z.K. Mohammed, O.B. ve Aboussekhra, A., (2013). "Olive Oil

Oleuropein Has Anti-Breast Cancer Properties with Higher Efficiency on Er-Negative Cells", Food and Chemical Toxicology, 53: 310-316.

[48] Abe, R. Beckett, J. Abe, R. Nixon, A. Rochier, A. Yamashita, N. ve Sumpio, B., (2011). "Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation", European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 41: 814-820.

[49] Cárdeno, A. Sánchez-Hidalgo, M. Rosillo, M.A. ve De La Lastra, C.A., (2013). "Oleuropein, a Secoiridoid Derived from Olive Tree, Inhibits the Proliferation of Human Colorectal Cancer Cell Through Downregulation of Hif-1α", Nutrition and Cancer, 65: 147-156.

[50] Carrasco-Pancorbo, A. Cerretani, L. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Gallina-Toschi, T. ve Fernández-Gutiérrez, A., (2005). "Analytical Determination of Polyphenols in Olive Oils", Journal of Separation Science, 28: 837-858.

[51] Keys, A., (1995). "Mediterranean Diet and Public Health: Personal Reflections", The American Journal of Clinical Nutrition, 61: 1321s-1323s.

[52] Lipworth, L. Martínez, M.A.E. Angell, J. Hsieh, C.-C. ve Trichopoulos, D., (1997). "Olive Oil and Human Cancer: An Assessment of the Evidence", Preventive Medicine, 26: 181-190.

[53] Grossi, C. Rigacci, S. Ambrosini, S. Ed Dami, T. Luccarini, I. Traini, C. Failli, P. Berti, A. Casamenti, F. ve Stefani, M., (2013). "The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects Tgcrnd8 Mice Against Aß Plaque Pathology", Plos One, 8: E71702.

[54] Rigacci, S. Guidotti, V. Bucciantini, M. Parri, M. Nediani, C. Cerbai, E. Stefani, M. ve Berti, A., (2010). "Oleuropein Aglycon Prevents Cytotoxic Amyloid Aggregation of Human Amylin", The Journal of Nutritional Biochemistry, 21: 726-735.

[55] Impellizzeri, D. Esposito, E. Mazzon, E. Paterniti, I. Di Paola, R. Morittu, V.M. Procopio, A. Britti, D. ve Cuzzocrea, S., (2011). "Oleuropein Aglycone, an Olive Oil Compound, Ameliorates Development of Arthritis Caused By Injection of Collagen Type II in Mice", Journal Of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 339: 859-869.

[56] Impellizzeri, D. Esposito, E. Mazzon, E. Paterniti, I. Di Paola, R. Bramanti, P. Morittu, V.M. Procopio, A. Perri, E. Britti, D. ve Cuzzocrea, S., (2012). "The Effects of a Polyphenol Present in Olive Oil, Oleuropein Aglycone, in an Experimental Model of Spinal Cord İnjury in Mice", Biochemical Pharmacology, 83: 1413-1426.

[57] De Leonardis, A. Aretini, A. Alfano, G. Macciola, V. ve Ranalli, G., (2008). "Isolation of a Hydroxytyrosol-Rich Extract from Olive Leaves (Olea Europaea L.) and Evaluation of İts Antioxidant Properties and Bioactivity", European Food Research and Technology, 226: 653-659.

[58] Rietjens, S.J. Bast, A. ve Haenen, G.R.M.M., (2007). "New Insights into Controversies on the Antioxidant Potential of the Olive Oil Antioxidant Hydroxytyrosol", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 7609-7614.

[59] Persia, F.A. Mariani, M.L. Fogal, T.H. Ve Penissi, A.B., (2014). "Hydroxytyrosol and Oleuropein of Olive Oil İnhibit Mast Cell Degranulation Induced by Immune and Non-İmmune Pathways", Phytomedicine, 21: 1400-1405.

[60] Sun, L. Luo, C. Ve Liu, J., (2014). "Hydroxytyrosol Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells through Ros Generation", Food & Function, 5: 1909-1914.

[61] Sarsour, E. Goswami, M. Kalen, A. Lafin, J. ve Goswami, P., (2014). "Hydroxytyrosol Inhibits Chemokine C-C Motif Ligand 5 Mediated Aged Quiescent Fibroblast-Induced Stimulation of Breast Cancer Cell Proliferation", Age, 36: 1213-1224.

[62] Cao, K. Xu, J. Zou, X. Li, Y. Chen, C. Zheng, A. Li, H. Li, H. Szeto, I.M.-Y. Shi, Y. Long, J. Liu, J. Ve Feng, Z., (2014). "Hydroxytyrosol Prevents Diet-Induced Metabolic Syndrome and Attenuates Mitochondrial Abnormalities in Obese Mice", Free Radical Biology and Medicine, 67: 396-407.

[63] Rietjens, S.J. Bast, A. De Vente, J. ve Haenen, G.R.M.M., (2007). The Olive Oil Antioxidant Hydroxytyrosol Efficiently Protects against the Oxidative Stress-Induced Impairment of the No• Response of Isolated Rat Aorta.

[64] Achmon, Y. ve Fishman, A., (2015). "The Antioxidant Hydroxytyrosol: Biotechnological Production Challenges and Opportunities", Applied Microbiology and Biotechnology, 99: 1119-1130.

[65] Santos, M.M. Piccirillo, C. Castro, P.M. Kalogerakis, N. Ve Pintado, M.E., (2012). "Bioconversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol by Lactic Acid Bacteria", World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 2435-2440.

[66] Briante, R. Patumi, M. Terenziani, S. Bismuto, E. Febbraio, F. ve Nucci, R., (2002). "Olea Europaea L. Leaf Extract and Derivatives: Antioxidant Properties", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 4934-4940.

[67] Cregg, J.M. Madden, K.R. Barringer, K.J. Thill, G.P. ve Stillman, C.A., (1989). "Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast Pichia Pastoris", Molecular and Cellular Biology, 9: 1316-1323.

[68] Koutz, P. Davis, G.R. Stillman, C. Barringer, K. Cregg, J. ve Thill, G., (1989). "Structural Comparison of the Pichia Pastoris Alcohol Oxidase Genes", Yeast, 5: 167-177.

[69] Ellis, S.B. Brust, P.F. Koutz, P.J. Waters, A.F. Harpold, M.M. ve Gingeras, T.R., (1985). "Isolation of Alcohol Oxidase and Two Other Methanol Regulatable Genes From the Yeast Pichia Pastoris", Molecular and Cellular Biology, 5: 1111-1121.

[70] Tschopp, J.F. Brust, P.F. Cregg, J.M. Stillman, C.A. ve Gingeras, T.R., (1987). "Expression of the LacZ Gene From Two Methanol-Regulated Promoters in Pichia Pastoris", Nucleic Acids Research, 15: 3859-3876.

[71] Cregg, J.M. Vedvick, T.S. ve Raschke, W.C., (1993). "Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in Pichia Pastoris", Nat Biotech, 11: 905-910.

[72] Scorer, C.A. Buckholz, R.G. Clare, J.J. ve Romanes, M.A., (1993). "The Intracellular Production and Secretion of Hıv-1 Envelope Protein in the Methylotrophic Yeast Pichia Pastoris", Gene, 136: 111-119.

[73] Warzecha, H. Gerasimenko, I. Kutchan, T.M. ve Stöckigt, J., (2000). "Molecular Cloning and Functional Bacterial Expression of a Plant Glucosidase Specifically Involved in Alkaloid Biosynthesis", Phytochemistry, 54: 657-666.

[74] Zhou, J. Hartmann, S. Shepherd, B.K. ve Poulton, J.E., (2002). "Investigation of the Microheterogeneity and Aglycone Specificity-Conferring Residues of Black Cherry Prunasin Hydrolases", Plant Physiology, 129: 1252-1264.

[75] Turan, Y. ve Zheng, M., (2005). "Purification and Characterization of an Intracellular B-Glucosidase from the Methylotrophic Yeast Pichia Pastoris", Biochemistry (Moscow), 70: 1363-1368.

[76] Cairns, J.R.K. Champattanachai, V. Srisomsap, C. Wittman-Liebold, B. Thiede, B. ve Svasti, J., (2000). "Sequence and Expression of Thai Rosewood B-Glucosidase/B-Fucosidase, a Family 1 Glycosyl Hydrolase Glycoprotein", Journal of Biochemistry, 128: 999-1008.

[77] Huang, Y. Busk, P.K. Grell, M.N. Zhao, H. ve Lange, L., (2014). "Identification of a B-Glucosidase from the Mucor Circinelloides Genome by Peptide Pattern Recognition", Enzyme and Microbial Technology, 67: 47-52.

[78] Liu, D. Zhang, R. Yang, X. Zhang, Z. Song, S. Miao, Y. ve Shen, Q., (2012). "Characterization of a Thermostable B-Glucosidase from Aspergillus Fumigatus Z5, and Its Functional Expression in Pichia Pastoris X33", Microbial Cell Factories, 11: 25-25.

[79] Bradford, M.M., (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

[80] Compton, S.J. ve Jones, C.G., (1985). "Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay", Analytical Biochemistry, 151: 369-374.

[81] Grabski, A.C. ve Novagen, R.R.B., (2001). "Preparation of Protein Samples for SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Procedures and Tips".

[82] Miller, G.L., (1959). "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Anal. Chem., 31: 426-428.

[83] Xu, Z. Shih, M.-C. ve Poulton, J.E., (2006). "An Extracellular Exo-B-(1, 3)-Glucanase from Pichia Pastoris: Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Functional Expression", Protein Expression and Purification, 47: 118-127.

[84] Helenius, A. ve Aebi, M., (2004). "Roles of N-Linked Glycans in the Endoplasmic Reticulum", Annual Review of Biochemistry, 73: 1019-1049.

[85] Wei, W. Chen, L. Zou, G. Wang, Q. Yan, X. Zhang, J. Wang, C. ve Zhou, Z., (2013). "N-Glycosylation Affects the Proper Folding, Enzymatic Characteristics and Production of a Fungal B-Glucosidase", Biotechnology and Bioengineering, 110: 3075-3084.

S3 PLAZMİTİ DİZİLEME VE BLAST SONUÇLARI

A-1 Dizin Analizi Sonucu

T7 ileri primer kullanılarak yapılan dizileme sonucu:

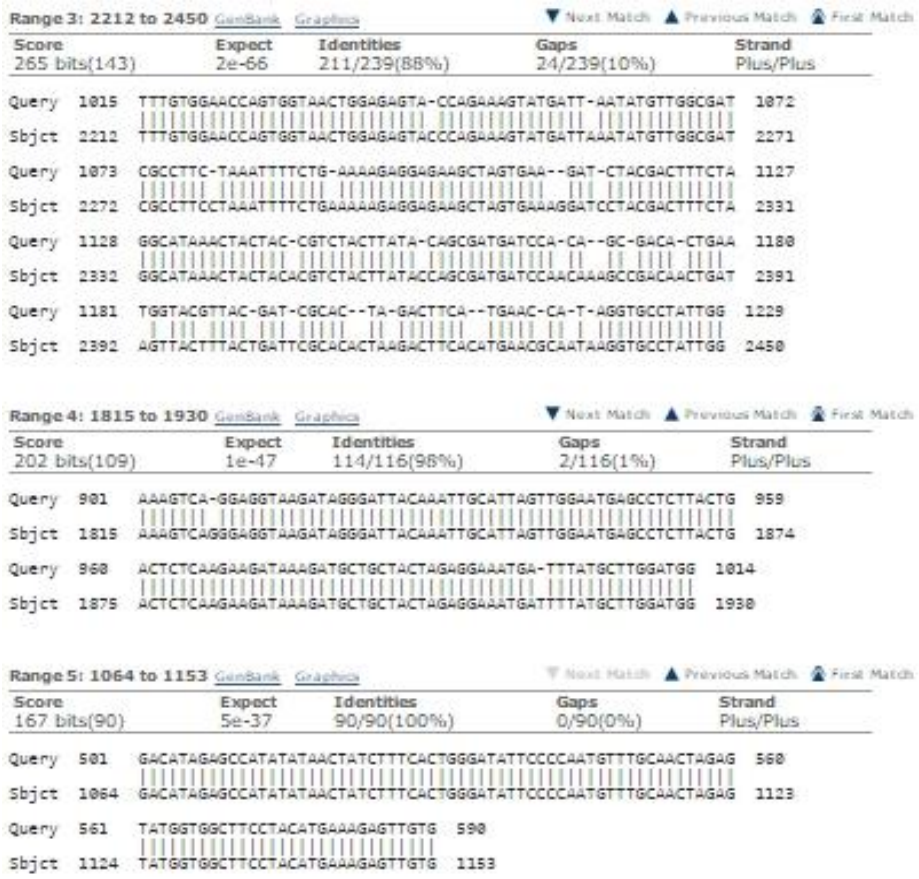
GGGCCAATTTCTCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTCCGGAATTCAGCA
TGGATATCCAAAGCAACGTCCTGACGATTACTAGCGGATCCTCACCAACTGACACTTCCTCCAA
TGGTCAGGCAGCCAAATCCACCAAAGAAAGGATCAAACGCTCTGATTTTCCCAGTGACTTTGT
ATTTGGCGCTGCAACTGCTTCATATCAAGTTGAAGGTGCATGGAACGAAGGAGGTAAAGGCA
TGAGTAATTGGGATTACTTTACACAGAGTCAACCAGGTGGTATTTCCGACTTTAGCAATGGCA
CTATTGCAATTGATCACTTTAATATGTTCAAGGACGATGTTGTCGTGATGAAGAAATTGGGTTT
GAAAGCATACAGATTTTCACTTTCATGGCCTAGAATCTTGCCAGGAGGAAGACTGTGTCACGG
TGTATCTAAAGAAGGAGTTCAGTTCTATAACGATCTCATTGATGCTCTCTTGGCAGCTGACATA
GAGCCATATATAACTATCTTTCACTGGGATATTCCCCAATGTTTGCAACTAGAGTATGGTGGCT
TCCTACATGAAAGAGTTGTGCAGGATTTTATTGAGTATTCTGAGATTTGCTTCTGGGAATTTGG
TGATCGGGTGAAATATTGGATTACCTTGAATGAGCCATGGTCCTTTACTGTTCAAGGATATGT
GGCTGGTGCTTTTCCGCCCAATCGTGGTGTAACTCCGAAAGATACTGAAGAAACTAAAAAGCA
TGCCCGTCTTCATAGAGGTGGAGGAAAACTTCTAGCTGCTTTCAAGTATGGAAATCCCGGCAC
GGAACCATATAAAGTGGCACACAATTTAATCCTTTGTCATGCACATGCTGTGGACATATACAG
AACGAAATATCAGGAAAGTCAGGAGGTAAGATAGGGATTACAAATTGCATTAGTTGGAATGA
GCCTCTTACTGACTCTCAAGAAGATAAAGATGCTGCTACTAGAGGAAATGATTTATGCTTGGA
TGGTTTGTGGAACCAGTGGTAACTGGAGAGTACCAGAAAGTATGATTAATATGTTGGCGATC
GCCTTCTAAATTTTCTGAAAAGAGGAGAAGCTAGTGAAGATCTACGACTTTCTAGGCATAAAC
TACTACCGTCTACTTATACAGCGATGATCCACAGCGACACTGAATGGTACGTTACGATCGCACT
AGACTTCATGAACCATAGGTGCCTATTGGGTCACAAGGGCGGTGTTTCGAAT

SP6 geri primer kullanılarak yapılan dizileme sonucu:

AAGAATTTAGTCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAG
TGATTAACCTCGAGCTAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGACGATCTTCAGATTTTTCAGGTT
CATTCTTCAATGGAACTGCTGTAGGCTTGGTGAGGAAGTTCCTCCACCATACAGCTGAACGTTT
TGGCAACCTTGTGTAACGACCATTAGCGTAGTCTACATACATAACGCCAAATCTAACACTGAAT
CCAGCAGCCCATTCAAAATTGTCGAACAACGACCATATGAAGTAACCCTTCAAATTTACACCTT
GGTCCATCGCTAGCTTAAGGTAGTAGAGATGTTCTTGGTGATAGTGAATCCTTATATCATCCTT
GAGAGCTTCGGTACTAGTCTTGGACTTATCATTTACTTCATCCACTCCATTCTCTGTAATGTAAA
TAACCGGATCATTATATCTTTTCTTCATATCAACCATAACTCTGTAAATTCCCCATGGAACTATG
TATAACCAATCCGAACCAGCCTGTGCACCAATAGGCACCTTATTGCGTTCATGTGAAGTCTTAG
TGTGCGAATCAGTAAAGTAACTATCAGTTGTCGGCTTTGTTGGATCATCGCTGGTATAAGTAG
ACGTGTAGTAGTTTATGCCTAGAAAGTCGTAGGATCCTTTCACTAGCTTCTCCTCTTTTTCAGAA
AATTTAGGAAGGCGATCGCCAACATATTTAATCATACTTTCTGGGTACTCTCCAGTTACCACTG
GTTCCACAAACCATCCAAGCATAAAATCATTTCCTCTAGTAGCAGCATCTTTATCTTCTTGAGA
GTCAGTAAGAGGCTCATTCCAACTAATGCAATTTGTAATCCCTATCTTACCTCCCTGACTTTCCT
GATATTTCGTTCTGTATATGTCCACAGCATGTGCATGACAAGGATTAAATTGTGTGCCACTTTA
TATGGTTCCGTGCCGGGATTTCCATACTTGAAGCAGCTAGAGTTTTCTTCACTCTATGAGACGC
ATGCTTTTAGTTCTTCAGTATCTTTCGGAGTACACCACGATGGCGAAAGCACAGCCACATATCT
GACAGTTACGACATGCTCAATCAAGTATCATATTCACGATCACCGATTCGAAGCCATCTCGAAT
ACTCATATCTGCACCTTCAGTAGAGCTCCAATCCTAGTGCAACATTGGGAT

A-2 BLAST Sonucu

Elde edilen dizinin blast analizi yapıldığında veri tabanındaki 2 adet *O. europaea L. ß-glukozidaz* dizisi ile yüksek homoloji gösterdiği görülmüştür.



Şekil A-2 .1 S3 Plazmiti BLAST Analizi Sonucu

Olea europaea subsp. europaea beta-glucosidase (bglc) mRNA, complete cds

Sequence ID: gb|AY083162.1| **Length:** 1902 **Number of Matches:** 1

Range 1: 48 to 1240 GenBank Graphics Next Match Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1975 bits(1069)	0.0	1156/1193(97%)	26/1193(2%)	Plus/Plus

```
Query  63    ATGGATATCCAAAGCAACGTCCTGACGATTACTAGCGGATCCTCACCAACTGACACTTCC  122
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  48    ATGGATATCCAAAGCAACGTCCTGACGATTACTAGCGGATCCACACCAACTGACACTTCC  107

Query  123   TCCAATGGTCAGGCAGCCAAATCCACCAAAGAAAGGATCAAACGCTCTGATTTTCCCAGT  182
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  108   TCCAATGGTCAGGCAGCCAAATCCACCAAAGAAAGGATCAAACGCTCTGATTTTCCCAGT  167

Query  183   GACTTTGTATTTGGCGCTGCAACTGCTTCATATCAAGTTGAAGGTGCATGGAACGAAGGA  242
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  168   GACTTTGTATTTGGCGCTGCAACTGCTTCATATCAAGTTGAAGGTGCATGGAACGAAGGA  227

Query  243   GGTAAAGGCATGAGTAATTGGGATTACTTTACACAGAGTCAACCAGGTGGTATTTCCGAC  302
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  228   GGTAAAGGCATGAGTAATTGGGATTACTTTACACAGAGTCAACCAGGTGGTATTTCCGAC  287

Query  303   TTTAGCAATGGCACTATTGCAATTGATCACTTTAATATGTTCAAGGACGATGTTGTCGTG  362
             ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  288   TTTAGCAATGGCACTATTGCAATTGATCACTATAATATGTTCAAGGACGATGTTGTCGTG  347

Query  363   ATGAAGAAATTGGGTTTGAAAGCATACAGATTTTCACTTTCATGGCCTAGAATCTTGCCA  422
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  348   ATGAAGAAATTGGGTTTGAAAGCATACAGATTTTCACTTTCATGGCCTAGAATCTTGCCA  407

Query  423   GGAGGAAGACTGTGTCACGGTGTATCTAAAGAAGGAGTTCAGTTCTATAACGATCTCATT  482
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  408   GGAGGAAGACTGTGTCACGGTGTATCTAAAGAAGGAGTTCAGTTCTATAACGATCTCATT  467

Query  483   GATGCTCTCTTGGCAGCTGACATAGAGCCATATATAACTATCTTTCACTGGGATATTCCC  542
             ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  468   GATGCACTCTTGGCAGCTGACATAGAGCCATATATAACTATCTTTCACTGGGATATTCCC  527

Query  543   CAATGTTTGCAACTAGAGTATGGTGGCTTCCTACATGAAAGAGTTGTGCAGGATTTTATT  602
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||
Sbjct  528   CAATGTTTGCAACTAGAGTATGGTGGCTTCCTACATGAAAGAGTTGTGAAGGATTTTATT  587

Query  603   GAGTATTCTGAGATTTGCTTCTGGGAATTTGGTGATCGGGTGAAATATTGGATTACCTTG  662
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  588   GAGTATTCTGAGATTTGCTTCTGGGAATTTGGTGATCGGGTGAAATATTGGATTACCTTG  647

Query  663   AATGAGCCATGGTCCTTTACTGTTCAAGGATATGTGGCTGGTGCTTTTCCGCCCAATCGT  722
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  648   AATGAGCCATGGTCCTTTACTGTTCAAGGATATGTGGCTGGCGCTTTTCCGCCCAATCGT  707

Query  723   GGTGTAACTCCGAAAGATACTGAAGAAACTAAAAAGCATGCCCGTCTTCATAGAGGTGGA  782
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  708   GGTGTAACTCCGAAAGATACTGAAGAAACTCAAAAGCATGCCCGTCTTCATAGAGGTGGA  767

Query  783   GGAAAACTTCTAGCTGCTTTCAAGTATGGAAATCCCGGCACGGAACCATATAAAGTGGCA  842
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  768   GGAAAACTTCTAGCTGCTTTCAAGTATGGAAATCCCGGCACGGAACCATATAAAGTGGCA  827

Query  843   CACAATTTAATCCTTTGTCATGCACATGCTGTGGACATATACAGAACGAAATATCAGGAA  902
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  828   CACAATTTAATCCTTTGTCATGCACATGCTGTGGATATATACAGAACGAAATATCAGGAA  887

Query  903   AGTCA-GGAGGTAAGATAGGGATTACAAATTGCATTAGTTGGAATGAGCCTCTTACTGAC  961
             ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  888   AGTCAGGGAGGTAAGATAGGGATTACAAATTGCATTAGTTGGAATGAGCCTCTTACTGAC  947

Query  962   TCTCAAGAAGATAAAGATGCTGCTACTAGAGGAAATGA-TTTATGCTTGGATGGTTTGTG  1020
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  948   TCTCAAGAAGATAAAGATGCTGCTACTAGAGGAAATGATTTTATGCTTGGATGGTTTGTG  1007

Query  1021  GAACCAGTGGTAACTGGAGAGTA-CCAGAAAGTATGATT-AATATGTTGGCGATCGCCTT  1078
             |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  1008  GAACCAGTGGTAACTGGAGAGTACCCAGAAAGTATGATTAAATATGTTGGCGATCGCCTT  1067

Query  1079  -CTAAATTTTCTG-AAAAGAGGAGAAGCTAGTGAA-G-AT-CTACGACTTTCTAGGCATA  1133
              |||||||||||| |||||||||||||||||||||| | || ||||||||||||||||||||
Sbjct  1068  CCTAAATTTTCTGAAAAAGAGGAGAAGCTAGTGAAAGGATCCTACGACTTTCTAGGCATA  1127

Query  1134  AACTACTAC-CGTCTACTTATA-CAGCGATGATCCA-CA--GC-GACA-CTGAATGGTAC  1186
             ||||||||| |||||||||||| |||||||||||||| ||  || |||| ||||  | |||
Sbjct  1128  AACTACTACACGTCTACTTATACCAGCGATGATCCAACAAAGCCGACAACTGATAGTTAC  1187

Query  1187  GTTAC-GAT-CGCAC--TA-GACTTCA--TGAAC-CA-T-AGGTGCCTATTGG  1229
              |||| ||| |||||  || ||||||||  ||||| || | ||||||||||||||
Sbjct  1188  TTTACTGATTCGCACACTAAGACTTCACATGAACGCAATAAGGTGCCTATTGG  1240
```

Şekil A-2.2 S3 Plazmiti BLAST Analizi Sonucu (devam)

EK-B

İnsertli Ekpresyon Vektörünün Dizin Analizi

B-1 5' *AOX1* primeriyle Dizileme Sonucu

GGATTTTTTATATTTTACGATGCTTACGACACTTGAGAAGATCAAAAAACAACTAATTATTCGA
AACGATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTC
CAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACT
CAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTT
ATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAA
AAGAGAGGCTGAAGCTGCAGGAATTCATGGATATCCAAAGCAACGTCCTGACGATTACTAGC
GGATCCTCACCAACTGACACTTCCTCCAATGGTCAGGCAGCCAAATCCACCAAAGAAAGGATC
AAACGCTCTGATTTTCCCAGTGACTTTGTATTTGGCGCTGCAACTGCTTCATATCAAGTTGAAG
GTGCATGGAACGAAGGAGGTAAAGGCATGAGTAATTGGGATTACTTTACACAGAGTCAACCA
GGTGGTATTTCCGACTTTAGCAATGGCACTATTGCAATTGATCACTTTAATATGTTCAAGGACG
ATGTTGTCGTGATGAAGAAATTGGGTTTGAAAGCATACAGATTTTCACTTTCATGGCCTAGAA
TCTTGCCAGGAGGAAGACTGTGTCACGGTGTATCTAAAGAAGGAGTTCAGTTCTATAACGATC
TCATTGATGCTCTCTTGGCAGCTGACATAGAGCCATATATAACTATCTTTCACTGGGATATTCC
CCAATGTTTGCAACTAGAGTATGGTGGCTTCCTACATGAAAGAGTTGTGCAGGATTTTATTGA
GTATTCTGAGATTTGCTTCTGGGAATTTGGTGATCGGGTGAAATATTGGATTACCTTGAATGA
GCCATGGTCCTTTACTGTTCAAAGGATATGTGGCTGGTGCTCTTTCCGCCCAATCGTGGATGTA
CCTCCGAAAGATACTGAAGAAACTAAAAAGCATGCCCGTCTTTCATAGAAGGGGGGAAGGAA
AAACTTCTAGCTGCTTTTCAAGTATGGACATTCCCGGCACGAACAATATGAAGGTGCACCACA
ATTTTATTCCTTTTGTCATGCACATGCTGGTGACATTATACGGACCTAAATATCAGTAAGTCAG
GAAGTAAGAATAGGGAATTACAACTTGCTTGATTTGGAATTGACCTCTCTTACTCGAA

B-2 3'*AOX1* Primeriyle Dizileme Sonucu

GGATAATTTGCAAGACCGGTCTTCTCGTAGTGCCCAACTTGAACTGAGGAACAGTCATGTCTA
AGGCTACAAACTCAATGATGATGATGATGATGGTCGACGGCGCTATTCAGATCCTCTTCTGAG
ATGAGTTTTTGTTCTAGAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGACGATCTTCAGATTTTTCAGGTT
CATTCTTCAATGGAACTGCTGTAGGCTTGGTGAGGAAGTTCCTCCACCATACAGCTGAACGTTT
TGGCAACCTTGTGTAACGACCATTAGCGTAGTCTACATACATAACGCCAAATCTAACACTGAAT
CCAGCAGCCCATTCAAAATTGTCGAACAACGACCATATGAAGTAACCCTTCAAATTTACACCTT
GGTCCATCGCTAGCTTAAGGTAGTAGAGATGTTCTTGGTGATAGTGAATCCTTATATCATCCTT
GAGAGCTTCGGTACTAGTCTTGGACTTATCATTTACTTCATCCACTCCATTCTCTGTAATGTAAA
TAACCGGATCATTATATCTTTTCTTCATATCAACCATAACTCTGTAAATTCCCCATGGAACTATG
TATAACCAATCCGAACCAGCCTGTGCACCAATAGGCACCTTATTGCGTTCATGTGAAGTCTTAG
TGTGCGAATCAGTAAAGTAACTATCAGTTGTCGGCTTTGTTGGATCATCGCTGGTATAAGTAG
ACGTGTAGTAGTTTATGCCTAGAAAGTCGTAGGATCCTTTCACTAGCTTCTCCTCTTTTTCAGAA
AATTTAGGAAGGCGATCGCCAACATATTTAATCATACTTTCTGGGTACTCTCCAGTTACCACTG
GTTCCACAAACCATCCAAGCATAAAATCATTTCCTCTAGTAGCAGCATCTTTATCTTCTTGAGA
GTCAGTAAGAGGCTCATTCCAACTAATGCAATTTGTAATCCCTATCTTACCTCCCTGACTTTCCT
GATATTTCGTTCTGTATATGTCCACAGCATGTGCATGACAAAGGATTAAATTGTGTGCCACTTT
ATATGGGTTCCGTGCCGGGATTTCCATACTTGAAAGCAGCTAGAAGTTTTCCTCCACCTCTATG
AAGACGGGCATGCTTTTTAGTTTCTTCAGTATTCTTTCGGAGTTACCACCACGATGGGCGGAA
AGCACAGCCACATTTCCTTGACAGTAAGACATGCTCAGTCAGTATTCAATATTTCACCCGAATC
ACCAATTCCAAAAAGCCAAGCTCTCCA

EK-C

C-1 pNPG Aktivite Ölçümü Sonucu 400 nm'deki Absorbanslar

Örneğin Adı	Absorbans (400 nm) 1. Reaksiyon			Absorbans (400 nm) 2. Reaksiyon			Ortalama	Std Sapma
Su	0.053	0,059	0,051	0,047	0,051	0,048	0,051	0.004
OleBgl Amonyumsülfat	0,221	0,221	0,225	0,25	0,252	0,249	0,236	0.015
OleBgl Amonyumsülfat Kör	0,095	0,097	0,092	0,097	0,101	0,104	0,098	0.004
Boş Vektör Üstsıvı	0,251	0,246	0,244	0,241	0,248	0,245	0,246	0.003
Boş Vektör Üstsıvı Kör	0,43	0,476	0,434	0,447	0,447	0,434	0,445	0.017

C-2 DNS Ölçümü Sonucu 540 nm'deki Absorbanslar

Örneğin Adı	Absorbans (540 nm) 1.Reaksiyon			Absorbans (540 nm) 2.Reaksiyon			Ort	Std Sapma
Kontrol	0,134	0,135	0,127	0,127	0,13	0,128	0,1302	0,0035
OleBgl-8 Üstsıvı	0,269	0,26	0,259	0,27	0,276	0,276	0,2683	0,0074
Ana vektörlü koloni Üstsıvı	0,245	0,254	0,238	0,226	0,204	0,239	0,2343	0,0175

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Serpil DEMİR

Doğum Tarihi ve Yeri : 13.03.1978

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : serpildemir@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji Eğitimi	Gazi Üniversitesi	1999
Lise		Yozgat Anadolu Lisesi	1995

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2003-	M.E.B.	Biyoloji Öğretmeni