

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

***THERMUS* sp. K6' DAN YENİ, KRİPTİK, KÜÇÜK, ÇOK KOPYALI BİR
PLAZMİTİN (pHIG22) İZOLASYONU VE KISMİ KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Halil İbrahim GÜLER

HAZİRAN 2011
TRABZON

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalında

Halil İbrahim GÜLER tarafından hazırlanan

***THERMUS* sp. K6 BAKTERİSİNDEN YENİ, KÜÇÜK, ÇOK KOPYALI, KRİPTİK
BİR PLAZMİTİN (pHIG22) İZOLASYONU VE KISMİ KARAKTERİZASYONU**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 24 / 05 / 2011 gün ve 1406 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09 / 06 / 2011 tarihinde yapılan sınavda

YÜKSEK LİSANS TEZİ

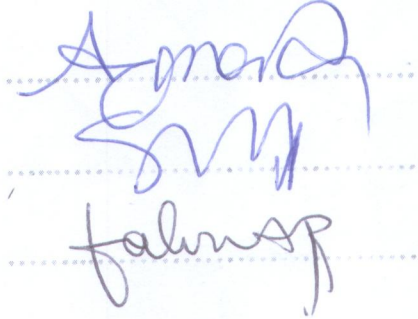
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Üye : Doç Dr. Sabriye ÇANAKÇI

Üye : Doç. Dr. Fahri UÇAR



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***THERMUS* sp. K6' DAN YENİ, KRİPTİK, KÜÇÜK, ÇOK KOPYALI BİR
PLAZMİTİN (pHIG22) İZOLASYONU VE KISMİ KARAKTERİZASYONU**

Biyolog Halil İbrahim GÜLER

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20.05.2011
Tezin Savunma Tarihi : 09.06.2011**

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ

Trabzon 2011

ÖNSÖZ

Thermus sp. K6' dan yeni, kriptik, küçük, çok kopyalı bir plazmitin (pHIG22) izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans tez konumun seçiminde ve çalışmaların planlanıp değerlendirilmesinde değerli eleştiri ve önerileri ile yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e, laboratuvar çalışmalarının ve tez yazımının her aşamasında engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Thermus sp. K6 ve *Thermus* sp. M5'nin temininde yardımlarını esirgemeyen Murat KAÇAĞAN'a, transformasyon çalışmalarında kullanılan *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8)' i bize göndererek büyük incelik gösteren Sayın Dr. Akira NAKAMURA'ya çok teşekkür ederim.

Tezimin yazılmasında emeği geçen Araş. Gör. Kadriye İNAN'a , Onur TOSUN'a ve Ersan BEKTAŞ'a teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Destek ve hoşgörülerini esirgemeyen Artvin Çoruh Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölüm Başkanı Yrd. Doç.Dr. Gökhan BAYRAMOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyuyorum.

Halil İbrahim GÜLER
Trabzon, 2011

TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Thermus* sp. K6’ dan Yeni, Kriptik, Küçük, Çok Kopyalı Bir Plazmitin (pHIG22) İzolasyonu ve Kısmi Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ ‘ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 20/05/2011

Halil İbrahim GÜLER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Termofilik Mikroorganizmalar	1
1.2.1. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı.....	2
1.2.2. <i>Thermus</i> Cinsinin Karakteristik Özellikleri.....	2
1.3. 16S rDNA ve 16S rRNA'nin Tür Tayininde Kullanılması.....	3
1.4. Plazmitler	4
1.4.1. Plazmitlerin Genel Özellikleri.....	4
1.4.2. Plazmitlerin Sınıflandırılması	5
1.4.2.1. Plazmitlerin Gösterdiği Fenotipe Göre Sınıflandırılması	5
1.4.2.2. Plazmitlerin Yapısal Olarak Sınıflandırılması	6
1.4.2.3. Plazmitlerin Temel Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....	6
1.4.3. Plazmit Replikasyonu	9
1.4.4. Plazmitlerin Konak Seçiciliği	10
1.4.5. Plazmitlerin Hücrelerde Paylaşımı	11
1.4.5.1. Plazmitlerin Kopya Sayısı.....	12
1.4.5.2. Plazmit Uyuşmazlığı.....	14
1.4.6. <i>Thermus</i> Cinsine Ait Plazmitler	14
1.4.7. Vektör Olarak Plazmitler	15
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	17
2.1. Materyal	17
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Enzimler	17
2.1.2. Mikroorganizmalar	18

2.1.2.1.	<i>Thermus</i> sp. K6 ve <i>Thermus</i> sp. M5	18
2.1.2.2.	<i>Escherichia coli</i> JM101	18
2.1.2.3.	<i>Escherichia coli</i> DH5α	18
2.1.2.4.	<i>Thermus thermophilus</i> HB27 TH104 (pTT8)	18
2.1.3.	Vektörler	19
2.1.3.1.	pGEM®-T Easy Klonlama Vektörü	19
2.1.3.2.	pUC18 Klonlama Vektörü	19
2.1.3.3.	pDG782 Vektörü	20
2.1.4.	Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotikler.....	20
2.1.4.1.	Luria Bertani (LB) Sıvı-Agar Besiyeri	20
2.1.4.2.	<i>Thermus</i> 162 Sıvı-Agar Besiyeri	21
2.1.4.3.	TM (<i>Thermus</i> Medium) Sıvı-Agar Besiyeri	22
2.1.5.	Antibiyotikler	23
2.1.6.	Kullanılan Analiz Programları	23
2.2.	METOTLAR	23
2.2.1.	Kaplıcalardan Örneklerin Alınması ve Termofilik Bakterilerin İzolasyonu	23
2.2.2.	İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu	23
2.2.3.	İzolatların rRNA Analizleri	24
2.2.3.1.	16S rRNA Geninin PCR ile Artırılması	24
2.2.3.2.	16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve GenBank'taki Sıralarla Karşılaştırılması	25
2.2.4.	İzolatların Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi	25
2.2.4.1.	Plazmit DNA İzolasyonu	25
2.2.5.	pHIG22' nin DNA Baz Dizisinin Belirlenmesi	26
2.2.5.1.	pHIG22' nin Restriksiyon Analizi.....	26
2.2.5.2.	pHIG22 Fragmentlerinin pUC18 Vektörüne Klonlanması.....	27
2.2.6.	<i>E. coli</i> JM101 'e Transformasyon	27
2.2.7.	Ters (invers) PCR ile pHIG22'nin Tüm Dizisinin Kalan Kısmının Belirlenmesi ve Klonlanması	28
2.2.7.1.	PCR Fragmentlerinin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması.....	30
2.2.7.2.	pHIG22'nin Tüm Sekansının Elde Edilmesi	31
2.2.8.	Biyoinformatik ve Diğer Analizler	31
2.2.9.	pHIG22 Plazmitinin Replikasyon Orijininin ve Fonksiyonel Genlerinin Belirlenmesi	31

2.2.9.1.	Spesifik Primerlerin Dizaynı.....	31
2.2.9.2.	Kanamisin Kasetinin pDG782 Vektöründen PCR ile Çoğaltılması.....	32
2.2.9.3.	<i>E.coli-Thermus</i> Shuttle Vektörlerinin Dizayn Edilmesi.....	33
2.2.9.3.1.	pUC-HIGK Shuttle Vektörünün Tasarlanması	34
2.2.9.3.2.	pET-HIG Shuttle Vektörlerinin Tasarlanması	34
2.2.9.4.	<i>E.coli-Thermus</i> Shuttle Vektörlerinin <i>Thermus thermophilus</i> HB27 TH104 (pTT8) Bakterisine Transformasyonu.....	35
2.2.10	pHIG22 Plazmitinin Protein Profilinin İncelenmesi	35
2.2.10.1.	Çözünebilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu.....	35
2.2.10.2.	Protein Konsantrasyonunun Tayini	36
2.2.10.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	36
2.2.10.4.	SDS-PAGE Jelinin Gümüş ile Boyanması	37
2.2.11.	pHIG22'nin Kopya Sayısının Hesaplanması	37
3.	BULGULAR.....	38
3.1.	<i>Thermus</i> sp. K6 ve <i>Thermus</i> sp. M5 Bakterilerinin Teşhis Edilmesi.....	38
3.1.1.	İzolatların rRNA Analizleri.....	38
3.2.	<i>Thermus</i> sp. K6 ve <i>Thermus</i> sp. M5 Bakterilerinin Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi.....	39
3.3.	pHIG22' nin Restriksiyon Analizi.....	39
3.4	pHIG22'nin DNA Baz Dizininin Belirlenmesi	40
3.5.	Biyoinformatik ve Diğer Analizler.....	44
3.5.1.	pHIG22'ye ait muhtemel ORF'lerin belirlenmesi.....	44
3.5.2.	pHIG22 Plazmitinin Promotor Analizi	45
3.6.	pHIG22 Plazmitinin Replikasyon Orijininin ve Fonksiyonel Genlerinin Belirlenmesi	47
3.6.1.	Kanamisin Kasetinin pDG782 Vektöründen PCR ile Çoğaltılması.....	47
3.6.2.	pUC-HIGK Shuttle Vektörünün Tasarlanması	47
3.6.3.	pHIG22 Plazmitinin Replikasyon Orijininin Belirlenmesi.....	49
3.7.	<i>E.coli-Thermus</i> Shuttle Vektörlerinin <i>Thermus thermophilus</i> HB27 TH104 (pTT8) Bakterisine Transformasyonu	51
3.8.	pHIG22 Plazmitinin Protein Profilinin İncelenmesi	51
3.9.	pHIG22'nin Kopya Sayısının Hesaplanması	53

4.	TARTIŞMA	55
5.	SONUÇLAR	59
6.	ÖNERİLER	61
7.	KAYNAKLAR.....	62

ÖZGEÇMİŞ

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

THERMUS sp. K6' DAN YENİ, KRİPTİK, KÜÇÜK, ÇOK KOPYALI BİR PLAZMİTİN (pHIG22) İZOLASYONU VE KISMİ KARAKTERİZASYONU

Halil İbrahim GÜLER

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2011, 65 Sayfa

Bu çalışmada, Alangüllü (Aydın) Kaplıcası'ndan alınan su ve çamurlu su örneklerinden izole edilen iki izolatin cins tayini yapılmıştır. *Thermus* cinsine ait olduğu belirlenen 2 bakteriden plazmit izolasyonu yapılmıştır.

Thermus sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 olarak adlandırılan iki izolattan yapılan plazmit izolasyonu sonucu *Thermus* sp. K6 bakterisinden izole edilen plazmitin tüm baz sırası elde edildi. İzole edilen plazmitin 2222 bp büyüklükte, %63 GC içeriğine sahip, çok kopyalı, cryptic bir plazmit olduğu belirlendi. İlk kez tanımlanan bu plazmit pHIG22 olarak adlandırıldı.

pHIG22 için yapılan BLAST araştırmaları sonucunda, GenBank'ta herhangi bir plazmit veya diziye benzerlik elde edilemedi. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda; genom üzerinde muhtemel 5 ORF bölgesi belirlendi. Belirlenen ORF'lerden; 426 bp olan ORF-1 ve 741 bp olan ORF-2 ana zincirde, 696 bp olan ORF-3, 387 bp olan ORF-4 ve 741 bp olan ORF-5'in de tamamlayıcı zincirde olduğu belirlendi. Yapılan promotor analizi sonucu pHIG22'nin tamamlayıcı zincirinde 2 promotor bölge tespit edildi.

pHIG22, pUC18 klonlama vektörü ve kanamisin kaseti birleştirilerek *E.coli-Thermus* shuttle vektörü oluşturuldu. pHIG22 genomundan belirli diziler PCR ile çoğaltılarak pET28a+ vektörüne klonlandı. Oluşturulan rekombinant plazmitler ile termofilik bakterilere transformasyon çalışmaları yapıldı.

Anahtar Kelimeler: Cryptic plazmit, Shuttle vektör, Kopya sayısı, *Thermus* sp. K6

Master Thesis

SUMMARY

ISOLATION OF A NOVEL, CRYPTIC LOW MOLECULAR-WEIGHT, MULTICOPY
PLASMID, pHIG22, FROM *THERMUS* sp. K6 AND ITS PARTIAL
CHARACTERIZATION

Halil İbrahim GÜLER

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Ali Osman BELDÜZ
2011, 65 Pages

In this study, thermophilic bacteria of both water and mud samples were isolated from Alangullu (Aydın) hot spring. Two isolates of those were determined belongs to *Thermus* genus and it was examined whether they harboured plasmid or not.

Plasmid content of two isolates, named *Thermus* sp. K6 and *Thermus* sp. M5, respectively, were examined. A small, novel and multicopy cryptic plasmid, named pHIG22, was isolated from *Thermus* sp. K6. The nucleotide sequence of pHIG22 revealed that plasmid was 2222 bp long, with a total G + C content of 63%.

According to results of BLAST searches, the sequence didn't show any similarities to any other plasmids; also the amino acid sequences of five putative open reading frames did not show similarities to those in the databases. ORF-1 426 bp long, ORF-2 741 bp long in leading strand; ORF-3 696 bp long, ORF-4 387 bp long and ORF-5 741 bp long in complementary strand were determined. Two promoter regions were predicted in complementary strand according to promotor analyses tools.

E.coli-Thermus shuttle vector were constructed by using pHIG22, pUC18 cloning vector and kanamycin cassette. Desired regions from genome of pHIG22 were amplified with PCR and cloned to pET28a+ vector. Constructed recombinant plasmids were tried to transform to thermophilic bacteria.

Key Words: Cryptic plasmid, Shuttle vector, copy number, *Thermus* sp. K6

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü	19
Şekil 2. pUC18 vektörünün şematik görünümü	20
Şekil 3. <i>Thermus</i> sp. K6 ve <i>Thermus</i> sp. M5 bakterilerinden plazmit izolasyonu	39
Şekil 4. pHIG22'nin RE'ler ile kesimi.....	40
Şekil 5. Ters (invers) PCR ile çoğaltılan fragment	42
Şekil 6. ORF Finder programıyla belirlenen muhtemel ORF bölgeleri.....	44
Şekil 7. pHIG22 üzerinde bulunan muhtemel ORF'lerin PlasMapper programıyla gösterilmesi.....	45
Şekil 8. PCR ile çoğaltılan kanamisin kaseti.....	47
Şekil 9. pUC-HIGK vektörünün şematik olarak tasarlanması	49
Şekil 10. Dizayn edilen spesifik primerler	50
Şekil 11. SDS-PAGE analizi	52
Şekil 12. Gümüş boyama sonucu elde edilen protein bantları	53
Şekil 13. pHIG22'nin kopya sayısının belirlenmesi	54

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Plazmit terminolojisinde kullanılan bazı terimlerin anlamı	8
Tablo 2. Plazmitlerin buldukları konaklara kazandırdıkları fenotipik özelliklerden bazıları	11
Tablo 3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler	23
Tablo 4. pUC18 vektörüne ligasyon için gereken şartlar	27
Tablo 5. Ters (invers) PCR için dizayn edilen primerler	29
Tablo 6. Ters (invers) PCR için reaksiyon şartları	29
Tablo 7. Ters (invers) PCR protokolü.....	30
Tablo 8. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar	30
Tablo 9. pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerinin çoğaltılması için dizayn edilen spesifik primerler.....	32
Tablo 10. PCR şartları.....	32
Tablo 11. pDG782 plazmiti için dizayn edilen primerler	33
Tablo 12. PCR şartları.....	33
Tablo 13. pHIG22 plazmitinin 920 bp'lik kısmı	41
Tablo 14. pHIG22 plazmitinin tüm baz dizilimi	43
Tablo 15. Promoter Predictor programı ile yapılan promotor analizi.....	46
Tablo 16. BPROM programı ile yapılan promotor analizi.....	46
Tablo 17. PCR ile çoğaltılan farklı bölgeler.....	50

SEMBOLLER DİZİNİ

a.a	: Amino asit
Amp	: Ampisilin
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CaCl	: Kalsiyum klorür
CoCl ₂	: Kobalt klorür
Da	: Dalton
dCTP	: Deoksisitidintrifosfat
ddH ₂ O	: Çift distile su
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
kan	: Kanamisin
kb	: Kilo baz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
KNO ₃	: Potasyum Nitrat
<i>lacZ</i>	: Beta- galaktosidaz
LB	: Lüria Bertani Broth
lt	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
mRNA	: Elçi RNA

Na ₂ CO ₃	: Sodyum bikarbonat
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NaNO ₃	: Sodyum Nitrat
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
nmol	: Nanomol
NTP	: Nükleotit trifosfat
OD	: Optical Density
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	: Pikomol
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
SDS	: Sodyum dedosilsülfat
sn	: Saniye
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TM	: <i>Thermus</i> Medium
U	: Unit
UV	: Ultra Violet
β	: Beta
α	: Alfa
°C	: Derece
μg	: Mikro gram
μl	: Mikro litre
μM	: Mikro molar
μmol	: Mikro mol

1. GENEL BİLGİLER

1.1.Giriş

Termofilik bakteriler son yılların en fazla ilgi duyulan araştırma odaklarından birisi olmuştur. Termofilik bakterilerin sahip oldukları enzimler endüstriyel açıdan büyük önem taşıdığı gibi sahip oldukları diğer özelliklerde birçok açıdan önem teşkil etmektedir (Williams, 1995).

Plazmitler tüm bakteri türleri arasında yaygın olarak bulunmasına rağmen, termofilik bakterilerden diğer bakteri türlerine oranla daha az sayıda plazmit izole edilmiştir. *Thermus* cinsine ait bakterilerden izole edilen plazmitler genelde, herhangi bir fenotipik özellik göstermeyen cryptic plazmitler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Kobayashi vd., 2005).

Thermus cinsine ait birçok doğal plazmit izole edilmesine rağmen, izole edilen plazmitlerin fonksiyonları tam olarak açıklanamamıştır (Takayama vd., 2004).

1.2. Termofilik Mikroorganizmalar

Termofilik bakteriler son yıllarda en fazla ilgi duyulan araştırma odaklarından birisi olmuştur. Çoğu canlı grubunun yaşayabilmesinin mümkün olmadığı sıcaklıklarda bile termofilik mikroorganizmaların enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Dünyamızda solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada sıcaklığın mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğu, yüksek sıcaklığın farklı mikroorganizmalar tarafından farklı düzeyde tolere edildiği tespit edilmiş; pek çok ökaryotik canlı kısa bir süreliğine 50°C'lik sıcaklığa bile dayanamazken, bazı mikroorganizmaların oldukça yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği bildirilmiştir (Williams vd., 1995).

Mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklıkları dikkate alındığında sakrofiller (20°C altında), mezofiller (20-55°C) ve termofiller (55°C üzerinde) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar (Gomes ve Steiner, 2004). Termofilik mikroorganizmaların biyokatalitik

potansiyelleri ve enzimleri üzerinde birçok araştırmalar yapılmıştır (Gomes ve Steiner, 2004). 60-110°C arasında yüksek sıcaklıklarda gelişebilen termofilik mikroorganizmalar, volkanik ve jeotermal kaynaklarda bulunurlar. 50-60°C arasındaki sıcaklıklarda optimum olarak çoğalabilen mikroorganizmalar ise, ılımlı termofillerdir. 60-80°C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilen ekstrem termofillerde; genellikle *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Thermotoga* ve *Aquifex* cinslerine aittirler (Stetter, 1998).

Termofil bakteriler, hem endüstriyel uygulama alanları için hem de temel bilimlerin gelişmesi için pek çok avantaj sağladığından dolayı son zamanlarda, bu bakteriler üzerine araştırmalar yoğun bir şekilde yürütölmektedir (Akhmaloka vd., 2006).

1.2.1. Termofilik Organizmaların Biyoteknolojide Kullanımı

Termofilik organizmalar, biyoteknoloji açasından bazı büyük faydalar sağlamaktadır (Brock, 1986). Termofillerin biyoteknolojide kullanıldığı bazı alanlar şunlardır: Termofilik organizmalar kullanılarak bazı yakıt ve kimyasalların üretiminin mümkün olması, fermentasyon yapabilen bu organizmalar kullanılarak genetik manipulasyonların yapılabilmesi, termofil enzimlerin potansiyel olarak endüstride kullanılmaları. Biyoteknoloji açasından termofilik organizmaların en önemli özellikleri, biyokimyasal reaksiyonları normal organizmalardakinden çok daha yüksek sıcaklıklarda katalizleyebilen enzimleri üretmeleridir. Buna ilave olarak, termofillerden elde edilen enzimler, normal sıcaklıklarda diğer enzimlere göre daha dayanıklıdırlar ve bu yüzden bunlardan elde edilen ürünler daha uzun ömürlüdürler (Brock, 1986).

1.2.2. *Thermus* Cinsinin Karakteristik Özellikleri

Thermus cinsi bakteriler pek çok doğal ve yapay kaynakta bulunabilirler. İlk izole edilen *Thermus aquaticus* Yellow Stone National Parkından nötr ve alkali sıcak sulardan izole edilmiş, daha sonra yapılan çalışmalarda ise, Yellow Stone Parkı ve diğer karasal suların yanı sıra deniz dibindeki termal çukurlardan da izole edildikleri bildirilmiştir (Williams ve Da Costa, 1994).

Williams ve Sharp'ın bildirdiğine göre ise, *Thermus* cinsine ait bakteriler gram negatif, heterotrofik, hareketsiz, çubuk şeklinde, çoğu zorunlu aerobik, pH6,0-10,5 aralığında, optimum nötr pH'da, ve 55-80 °C aralığında, optimum 70 °C'de gelişen, düşük konsantrasyonlu organik materyallerin bulunduğu ortamlarda büyüeyebilen bakterilerdir. % 0,1 tripton, % 2,5-3 yeast extract ve düşük mineral tuzlarının bulunduğu besi ortamları gelişmeleri için yeterlidir. Bu grup bakteriler için özel bir zenginleştirme ortamı yoktur, uygun mineral tuzlarını içeren minimal organik ortamlarda gelişebilirler. *Thermus* suşları seçici olarak besi ortamı 162'de ve *Thermus* besi ortamında, çalkalamalı ortamda gelişirler. İlk yapılan çalışmalarda Japon bilim adamları bu bakterileri *Flavobacterium thermophilum* grubuna dahil etmişler daha sonraki çalışmalar sonucunda ise *Thermus* ismi verilmiştir (Williams vd., 1995).

1.3. 16S rDNA ve 16S rRNA'nın Tür Tayininde Kullanılması

Bakteri genomundaki 16S rRNA geninde devamlı aynı olan yani değişmeyen ve değişken olan bölgeler bulunmaktadır. Bakteri türlerinin teşhisinde bu değişken bölgeler kullanılmaktadır. 16S rRNA geninde 8 adet değişmeyen ve 9 adet değişken bölgenin olduğu ortaya çıkarıldı (Gray vd., 1984) ve bu özellikler kullanılarak kültür edilmemiş bakterilerin bile 16S rDNA'larını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla belli primerler kullanılarak artırıldı (Relman vd., 1992). PCR veya diğer bazı izolasyon yöntemleri ile elde edilen 16S rDNA'nın baz dizin analizi, restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve hibridizasyon özellikleri kullanılarak türler arasında karşılaştırma yapılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, hibridizasyon (Stackebrand ve Goebel, 1994) çalışmalarında aynı cinse ait olan türlerin arasında 16S rRNA dizisi açısından %97'den daha az benzerlik gösteren suşların farklı türler olduğunu ortaya koymuşlardır (Sneath, 1986).

1.4. Plazmitler

1.4.1. Plazmitlerin Genel Özellikleri

Plazmitler bağımsız replike olabilen DNA molekülleridir ve nadiren RNA şeklinde olabilirler. Canlı hücrelerde bulunmalarına ve genetik bilgi taşımalarına rağmen kromozom değildirler. İki nedenden dolayı hücre genomu olarak kabul edilmezler. Bunlardan birincisi, tek bir plazmit farklı hücre türlerinde bulunabilir ve bir konak hücreden başkasına geçebilir. İkincisi, bir plazmit bir hücrede var iken bir süre sonra o konakta bulunmayabilir. Bu yüzden, plazmitler protein kodlayan genleri taşımalarına rağmen, normal şartlar altında hücre büyümesi ve bölünmesi için gerekli değildirler. Bu da kendi başına replike olabilen nükleik asit molekülleri anlamına gelen replikon terimini ortaya çıkarmıştır. Kromozomlar, plazmitler, virus genomları (hem DNA hem RNA) ve viroidlerin hepsi replikon olarak ifade edilirler. Başka bir deyişle replikon, DNA (ya da RNA) sentezinin başladığı replikasyon orijininin kontrolünü kendi elinde bulundurmasıyla tanımlanır. Bu yüzden bir replikon kendi replikasyonu için gerekli olan enzimleri kodlayan genleri taşımak zorunda olmadığı gibi nükleotit öncülleri ve enerji ihtiyacından da sorumlu değildir. Virusler ve plazmitler kendileri için gerekli olan çoğu enzimi, hammaddeyi ve enerjiyi sağlamak için konak hücreyi kullanan replikonlar olarak karşımıza çıkar (Clarck, 2010).

Plazmitler kendi başına yaşayan yaratıklar olarak kabul edilirler. Solucanların toprakta yuvalandığı, balıkların denizde yüzdüğü gibi plazmitlerde kendi konak hücrelerinde çoğalırlar. Bir plazmit için konağı onun yaşayabildiği ortamdır, bu yüzden bir hücre gibi ifade edilemezler sadece hücrenin bir parçası olabilirler. Bazı yönlerden, plazmitler ulaştıkları hücreden hücreye ölüm taşıma yeteneklerini kaybetmiş virüslere benzerler. Plazmitler, replikasyon enzimlerini, enerji ve hammadde ihtiyaçlarını karşılamak için konak hücreye gerek duyduklarından dolayı bazı viral özellikleri barındırırlar. Virüslerin aksine, plazmitler birçok proteini sentezleyemedikleri için, yaşadıkları hücreyi terk etmezler ve ona zarar vermekten kaçınırlar (Clarck, 2010).

Virüsler genellikle replike oldukları hücreyi yok ederler ve yeni kurbanlar aramak için virüs partikülleri şeklinde hücreden ayrılırlar. Plazmitler ise konak hücre ile aynı anda replike olurlar. Konak hücre bölündüğü zaman plazmitte bölünür ve yavru hücrelere plazmitin bir kopyası alınır (Primrose vd.1983).

Gerçekte plazmitler, konak hücreden bırakılmamayı garantilemek için konak ölümüne yol açan fonksiyonları kullanarak, konağı ona karşı korur ve konak içinde kalmayı garanti altına alırlar (Clarck, 2010).

Plazmitler, ekstrakromozomal bir halde sürekli kalıtsal olarak alınan replikondurlar. Plazmitlerin çoğu çift zincir halka DNA molekülleri olarak meydana gelirler. Eğer her iki DNA zinciri sağlam halka halinde ise, kovalent kapalı halka veya CCC DNA olarak tanımlanırlar. Sadece bir zincir sağlam ise, açık halka veya OC DNA olarak tanımlanırlar. Farklı yapısal konfigürasyonlarından dolayı, CCC ve OC DNA agaroz jel elektroforezinde ayrılır. Etidyum bromür gibi interkalasyon yapan ajanların ilavesi, süpersarmal plazmit DNA' sının açılmasına neden olur. Eğer aşırı miktarda EB ilave edilirse, plazmit ters yönde süpersarmal olacaktır. Bu gerçeğin kullanımı plazmit DNA'nın izolasyonunda kullanılır (Primrose vd., 2006).

1.4.2. Plazmitlerin Sınıflandırılması

Plazmitler daha önceleri F plazmitleri, kolisojenik plazmitler ve R plazmitleri olarak sınıflandırılmışlardır. Fakat günümüzde plazmit sınıflandırılmasında kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar, genelde replikasyon mekanizmasına, gösterdiği fenotipik ve yapısal özelliğe göre değişmektedir (Wang vd., 2009).

1.4.2.1. Plazmitlerin Gösterdiği Fenotipe Göre Sınıflandırılması

Plazmitler birçok şekilde sınıflandırılabilirler. En basit fakat en muhtemel ölçüt konak hücrede gösterdikleri fenotiptir. Bakteriyel plazmitlerin, replikasyonunda, transferinde ve hücrede muhafazasının sağlanmasında kullandığı genler, genellikle konak kromozomunda ve başka bir plazmite aktarılabilen mobil elemanlar üzerinde taşınırlar (Twyman, 1998).

Bakteriyel plazmit tarafından ortaya konan fenotip, plazmit molekülünün kendine has bir özelliğini yansıtmaz ve farklı birçok fenotip aynı plazmit tarafından gösterilebilir. Megaplazmitler çoğu antibiyotik için direnç geni taşırlar ve tıp alanında çalışanlar için büyük önem taşırlar. Dahası, taşınabilir elementlerin fazlalığı ve plazmitlerin rekombinasyon yapma eğiliminden dolayı, plazmit yapısı istikrarsızdır. Bu yüzden

plazmitlerin sadece fenotiplerine bakarak metodsalsal bir sınıflandırma yapmak zordur. Çoğu ökaryotik plazmit böylesi bir sınıflandırma sistemine dayalı bir fenotip göstermez; diğersal plazmitler için fenotip, DNA ile kodlanmış fonksiyonlardan ziyade plazmit davranışından kaynaklanır (Twyman, 1998).

1.4.2.2. Plazmitlerin Yapısal Olarak Sınıflandırılması

Çoğu plazmit çift zincirli kapalı halka yapısında bulunmasına rağmen, bir plazmiti tanımlamak için diğersal yapısal şekilleri göz ardı edemeyiz. Birçok sayıda tek zincirli halkasal DNA plazmitlerine *Streptomyces* ve *Clostridium* türlerinde rastlanılmıştır (Schrempf vd., 1975).

Ayrıca lineer çift zincirli DNA plazmitleri birçok bakteriyal ve ökaryotik kaynaktan izole edilmiştir, *Borrelia hermsii*'de bulunan çeşitli yüzey antijenlerini kodlayan lineer plazmitler bunlara örnek verilebilir (Ferdows vd., 1996).

Lineer plazmit barındıran ökaryotlarda, sürekli transkript olan genlerin kromozoma mı ait yoksa plazmitten mi kaynaklandığını belirlemek her zaman belirgin değildir. Normal büyüme şartları altında esansiyal olmayan bir plazmitin alışılmış tanımlama, 'normal' büyüme şartları kesin olarak belirlenmedikçe anlamsızdır. Örneğin, bir yapay maya kromozomu esansiyal değildir, aynı zamanda memeli Y-kromozomu da esansiyal değildir, fakat bunlardan ikisi de bir plazmit olarak tanımlanamamaktadır (Twyman, 1998).

Diğersal yandan RNA plazmitleri dediğimiz viroidler hiçbir gen taşımayan özelleşmiş tek zincirli halkasal RNA plazmitleridir. İki parçalı, lineer, çift zincirli RNA elementleri mayalarda bulunmuştur. Bunlar öldürücü faktörler olarak bilinirler çünkü konak üzerinde öldürücü fenotip gösterirler. Genomu kapsayan bir protein tabakası kodlayan bu RNA plazmitleri diğersal hücreleri enfekte etmezler ve intraselüler olarak aktarılırlar (Primrose ve Twyman, 2006).

1.4.2.3. Plazmitlerin Temel Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

İyi bir plazmit sınıflandırma sistemi transfer, replikasyon ve hücrede muhafaza olma gibi özgün özellikleri kullanır. Bakterilerde, plazmit aktarımı dört yol ile olur. Bunlar; hücre birleşmesi, transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyondur (Twyman, 1998).

İlk 3 yol plazmite bağı olarak gerçekleşmezken, konjugasyon plazmit bilgisi dahilindedir ve çoğu plazmitler bu metotla hücreler arasında kendi transferlerini gerçekleştirecek genleri taşırlar (Twyman, 1998).

Ökaryotlarda, plazmit transfer mekanizması sınıflandırmada daha az kullanılan bir kriterdir. Horizontal plazmit transferi genellikle hücreler birleştiği zaman meydana gelir ve çoğunlukla mekaniksel transfer şeklinde olur. Genellikle bakteriler plazmitlerini ökaryotlara aktarırlar, en yaygın olarak görülenler bakteriden mayaya konjugasyonla plazmit aktarımı ve *Agrobacterium tumefaciens* Ti plazmit aktarımında görülür (Twyman, 1998).

Plazmitler *tra* genleri denen transfer genlerini taşıyıp taşıyamalarına göre konjugatif ve non-konjugatif olarak iki büyük sınıfa ayrılabilirler. *tra* genleri; bakteriyal konjugasyonun oluşmasını sağlayan genlerdir. Genellikle konjugatif plazmitler, diğerlerine göre yüksek molekül ağırlıklıdır ve kromozom başına 1 ila 3 kopya içerir. Non konjugatif plazmitler ise düşük molekül ağırlıklıdır ve kromozom başına çok sayıda kopya olarak bulunurlar. R6K istisna bir konjugatif plazmittir, moleküler ağırlığı 25×10^6 daltondur ve bir relaxed plazmit olarak muhafaza edilir (Primrose ve Twyman, 2006).

Plazmitler ayrıca hücre başına kopya sayısının az olmasına veya çok sayıda olmasına göre de sınıflandırılabilirler.

Plazmit terminolojisinde kullanılan bazı terimler Tablo 1'de tanımlanmıştır (Twyman, 1998).

Tablo 1. Plazmit terminolojisinde kullanılan bazı terimlerin anlamı

Terim	Tanım
Basic replicon	Plazmitin replike olabilmesi için gerekli olan minimal bölgedir.
Copy number	Bir plazmitin bir hücrede bulunan sayısını ifade eder. Genellikle plazmit DNA'sının kantitatif ölçümü veya kodlanan gen ürünü ile hesaplanır.
Conjugative ve Non-conjugative plazmid	Plazmitlerin konjugasyonla kendi transferlerini yapabilme yeteneğine göre belirlenirler.
cop Mutantı	Bir plazmitin kopya sayısını düzenleyen geninde mutasyon taşımasıdır.
Cryptic Plazmit	Hiçbir fenotipik özellik göstermeyen plazmittir.
Curing	Doğal yolla ya da uyarılarak plazmit kaybıdır.
Dislodgment	Bir plazmitin ikinci bir plazmitle uyuşmayarak kaybı, genelde ikinci plazmit tarafından kodlanan restriksiyon endonükleazların aktivitesiyle belirlenir.
Episome	Hem ektrakromozomal hem de konak genomuna entegrasyon yapabilen plazmit ya da virüslerdir.
Homoplasmid, Heteroplasmid	Bir yada iki farklı tip plazmit içeren hücreleri tanımlar.
Incompatibility	Aynı replikasyon orijinine sahip olan plazmitlerin aynı hücrede muhafaza olamamasıdır
Invertron	Ökaryotlar da uzun kusursuz, tekrarlı dizilere sahip olan lineer bir plazmittir
Killer system	Curing yapılmış yavru hücrelerdeki plazmit muhafaza sistemini yok eden sistemdir
Maintenance system	Bölünen hücrelerde plazmitin muhafaza edilmesini sağlayan sistemdir.
Miniplazmit	F-plazmiti gibi büyük bir plazmitin temel replikonudur.
One-way incompatibility	Replikasyon orijinleri farklı olmasına rağmen, Tip-1 plazmitin bir hücre popülasyonuna girerek Tip-2 plazmitin uyumsuzluk sonucu hücreden kaybedilmesi fakat tip-2 plazmitin tip-1 plazmit için aynı özelliği göstermemesidir.
Partition, partition system	Hücre bölünmesi esnasında plazmitlerin yavru hücrelere paylaşılmasıdır. Paylaşım sistemi plazmitlerin iki yavru hücreye eşit paylaşılmasını sağlar.
Plazmit orijini	DNA replikasyonunun başladığı plazmit üzerindeki bölgedir.
Plazmit ayrımı	Farklı tipteki plazmitlerin hücre bölünmesi esnasında yavru hücrelere farklı olarak paylaşımıdır.
Promiscuous plazmit	Geniş konak spektrumuna sahip olan plazmitlerdir.
Prime plazmit	Bir plazmit episomunun rastgele konak kromozomundan ayrılması ve ayrılırken konak kromozomunun bir parçasını da yanında taşımasıdır.
Relaxed plazmit	Replikasyonu için protein sentezine ihtiyaç duymayan, protein sentezi baskılansa bile kopya sayısını artırabilen; bunu da negatif regülatör proteinin uzaklaştırılmasıyla sağlayan plazmittir.
Stringent plazmit	Replikasyonu için protein sentezinin devam etmesine ihtiyaç duyan, protein sentezi inhibe edilince kopya sayısı azalan plazmittir.

1.4.3. Plazmit Replikasyonu

Plazmit DNA'sı iki alternatif yolla replike olur. Halkasal çift zincir DNA'ya sahip tipik plazmitler DNA'larını replike etmek için iki alternatif mekanizma kullanılırlar. Çoğu plazmitler küçük bakteriyal kromozomlar gibi replike olurlar. Bu plazmitler DNA'nın açıldığı ve replikasyonun başladığı replikasyon orijinine sahiptirler (Clark, 2010).

İki replikasyon çatalı halkasal plazmit DNA etrafında farklı yönlerde birbirleriyle karşılaşıncaya kadar hareket eder. Çok az sayıda küçük plazmitte tek bir replikasyon çatalı vardır ve başladığı yere ulaşana kadar halka üzerinde hareket eder (Clark, 2010).

Diğer replikasyon mekanizması birkaç plazmit ve zararsız bazı virüsler tarafından kullanılan *yuvarlanan çember replikasyonu*'dur. Replikasyon orijininde çift zincirli DNA molekülünün tek zincirinde kırık oluşturulur. Diğer halkasal zincir kırık zincirden uzaklaşarak dönmeye başlar. Bunun sonucunda DNA'da iki tane tek zincirli bölge oluşur, bunlardan biri kırık zincir, diğeri de halkasal DNA'nın bir parçasıdır. Sonra DNA kırık zincirin ucundan başlayarak sentezlenir ve uzatılır. Halkasal DNA bir kalıp olarak kullanılır, ayrı olarak dönen iki orijinal zincirde bırakılan boşluk doldurulur. Bu işlem dönme ve doldurma ile devam eder, aslında orijinal kırık zincir tamamen açılır ve halkasal zincir yeni sentezlenmiş DNA zinciri ile tam olarak eşlenir. Bu sayede orijinal DNA halkasına eşit uzunlukta tek zincirli DNA elde edilmiş olur (del Solar vd., 1998).

Basit plazmit replikasyonu için, açılmayan eski zincir tamamlayıcı bir zincir yapmak için kalıp olarak kullanılır. Bu çift zincirli bölge ayrılır ve plazmitin ikinci bir kopyasını vermek için halkasal hale gelir. *E. coli*'nin F plazmiti gibi bazı plazmitler bir bakteriden diğerine kendilerini aktarırlar. Böylesi plazmitler iki farklı replikasyon orijinine sahiptirler. Konak hücre bölündüğü zaman iki yönlü replikasyonla bölünürler fakat konjugasyon esnasında bir hücreden diğerine taşınırlarken yuvarlanan çember mekanizmasını kullanamazlar. İki yönlü replikasyon vejetatif replikasyon merkezi olan oriV de başlar. Bu bölge plazmit üzerinde transfer esnasında kullanılan orijin olan oriT den farklı bir bölgedir. Bütün plazmitler yaşamalarını devam ettirmek için vejetatif bir orijine sahip olmalıdırlar (Clark, 2010).

Fakat sadece oriT orijinine sahip olan plazmitler özel bir transfer orijini kullanarak kendilerini transfer edebilirler. Gerçek plazmitler ve virüsler arasındaki ilişki DNA replikasyon mekanizmasıyla tanımlanır. Yuvarlanan çember replikasyonu mekanizması sadece transfer olabilen plazmitler tarafından kullanılmaz aynı zamanda birçok virüs

tarafından da kullanılır. Genellikle, çift zincirli virüs DNA moleküllerinde bu mekanizma görülür. Bu virüsler yeni bir DNA zinciri sentezlemek için, açılan zinciri kalıp olarak kullanılırlar. Dönmeye ve senteze devam ederler ve uzun lineer bir çift zincirli DNA sentezlerler, çoğu zamanda orijinal DNA halkası uzunluğunda bir ürün oluşturarak sentezi sonlandırırlar. Bu tek bir genom içerisinde parça parça dağıtılır ve virüs partikülleri içerisine paketlenir. Bu virüslerin bazıları paketlemeden önce DNA'sını halkasal hale getirir. Diğerleri ise lineer DNA halinde paketleme yapar ve sadece konak bir hücreyi enfekte ettikten sonra tekrar replike olacağı zaman DNA'sını halkasal hale getirir (del Solar vd., 1998).

Diğer virüsler tek zincirli DNA içerirler. Bu virüsler tamamlayıcısı oluşturulmamış açık zinciri bırakırlar. Dönmeye devam ederler ve uzun tek bir zincir oluşturarak işlemi sonlandırırlar (Clark, 2010).

1.4.4. Plazmitlerin Konak Seçiciliği

Plazmitlerin konak seçiciliği, kodladıkları replikasyon proteinleri tarafından belirlenir. Plazmitler kendi replikasyonları için gerekli proteinlerin sadece birkaçını, çoğu durumda da bu proteinlerin sadece birini kodlarlar. Replikasyon için gerekli diğer bütün proteinler; DNA polimeraz, DNA ligaz, helikazlar vs. konak hücre tarafından sağlanır. Plazmit tarafından kodlanan bu replikasyon proteinleri replikasyonun gerçekleştiği *ori* (replikasyon orijini) bölgesine çok yakın yerleşmişlerdir. Bu nedenle *ori* bölgesinin etrafında çok küçük bir bölge replikasyon için gereklidir. Plazmitin diğer bölgeleri çıkarılabilir ve yabancı diziler plazmite eklenebilir, bu halde dahi replikasyon yine de olacaktır. Plazmitlerin bu özelliği çok yönlü klonlama vektörlerinin yapımını fazlasıyla kolaylaştırmıştır (Twyman, 1998).

Bir plazmitin konak seçiciliğine *ori* bölgesiyle karar verilir. Plazmit Col E1'den türevlenen plazmitlerin *ori* bölgeleri konak seçiciliğinde bir sınırlamaya sahiptir: Bunlar sadece *E.coli*, *Salmonella* vs. gibi enterik bakterilerde replike olabilirler. RF4 ve RSF1010'un da dahil olduğu diğer promiscuous plazmitler geniş bir konak seçiciliğine sahiptirler. Konjugasyonla kolaylıkla aktarılabilen RP4 tipi plazmitleri Gram negatif (-) bakterilerin çoğunda replike olurlar. Böylesi promiscuous plazmitler DNA molekülündeki genetik bilginin birçok konağa kolayca transfer edilmesine olanak sağlarlar. RSF1010 gibi plazmitler konjugatif değildirler. Fakat kalıcı olarak muhafaza edildikleri birçok Gram

negatif (-) ve Gram pozitif (+) bakteriye aktarılabilirler. Ayrıca *Staphylococcus aureus*'tan izole edilen plazmitlerin çoğu geniş bir konak spesifikliğine sahiptir (Stiffler vd., 1974).

Bunlar pek çok Gram pozitif (+) bakteride replike edilebilirler. Geniş konak seçiciliğine sahip olan plazmitlerin çoğu replikasyon için gerekli olan proteinlerin hepsini olmasa da çoğunu kodlarlar. Bu genleri ekspres edebilirler. Çeşitli bakteri aileleri tarafından tanınabilmeleri için promotorları ve bağlanma bölgeleri içermelidirler (Primrose ve Twyman, 2006).

Plazmitlerin buldukları konak hücrelere kazandırdıkları birçok fenotipik özellik bulunmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Plazmitlerin buldukları konaklara kazandırdıkları fenotipik özelliklerden bazıları

Plazmitlerin Gösterdiği Fenotipik özellikler
Antibiyotik dirençliliği
Antibiyotik üretimi
Aromatik bileşiklerin degradasyonu
Hemolizin üretimi
Şeker fermantasyonu
Enterotoksin üretimi
Ağır metal direnci
Bakteriyosin üretimi
Bitki tümörlerini indükleme
Hidrojen sülfid üretimi
Düzenlenmiş konağın restriksiyonu ve modifikasyonu

1.4.5. Plazmitlerin Hücrelerde Paylaşımı

Hücrede plazmitlerin kararlı bir şekilde muhafaza edilmesi özel bir paylaşım mekanizmasını gerektirir. Hücrelere eşit olarak dağılamamaya bağlı plazmit kaybı, bölünmeyle ilgili kararsızlık olarak adlandırılır. Doğal olarak mevcut olan plazmitler kararlılıklarını sürdürürler. Çünkü bu plazmitler, her hücre bölünmesinde hücrede

muhafaza olmalarını sağlayan bir *par* bölgesi içerirler. Düşük kopyalı plazmitlerin kararlılığı için bu *par* bölgesi zorunludur (Bingle ve Thomas, 2001).

Yüksek kopyalı plazmitlerden olan Col E1'de *par* bölgesi içerir, fakat bu *par* bölgesi birçok Col E1 türevli klonlama vektöründen çıkarılmıştır. pBR322 gibi vektörlerin kopya sayılarının genellikle yüksek olmasına rağmen, sınırlı besin ortamında ya da diğer stres şartları altında plazmit içermeyen hücrelerin sayısında artış meydana gelir. pSC101 gibi bir plazmitteki *par* bölgesi pBR322'ye klonlanabilir, böylece plazmitin hücrede muhafazası sağlanır (Primrose vd.1983). DNA'nın süpersarmallığı da paylaşım mekanizmasında etkilidir. *par* bölgesi içermeyen pSC101 türevleri yabancı tip pSC101 ile karşılaştırıldığında, süpersarmallık yoğunluğunda bir azalma gösterir (Miller ve Cohen, 1993).

pSC101'in bölünme yeteneği olmayan mutantları ve başka plazmitlerin benzer mutantları, negatif süpersarmallığı arttıran topA mutasyonları ile *E. coli*'de stabil kalabilirler. Aksine DNA giraz inhibitörleri ve DNA girazdaki mutasyonlar kusurlu pSC101 türevlerindeki *par* bölgesinin kaybedilmesine neden olurlar (Miller ve Cohen, 1993).

Plazmit kararsızlığı, plazmitin multimerik formlarından dolayı da artabilir. Bir plazmitin kopya sayısını kontrol eden mekanizma, her bakteri de eşit sayıda plazmit orijini olmasını sağar. Multimerik plazmit içeren hücreler aynı sayıda plazmit orijinine sahiptir fakat birkaç plazmit bölünme fonksiyonundaki eksikliğe bağlı olarak bölünmede bir kararsızlığa neden olabilir. Bu multimerik formlar Col E1'de görülmez. Çünkü Col E1, multimerlerin monomerlere dönüştüğü doğal bir yöntemle sahiptir. Col E1 oldukça yüksek bir rekombinejenik (*cer*) bölge içerir. Eğer *cer* sırası bir plazmitte birden fazla yerde bulunursa, yani bir multimer de bulunursa, konak hücrenin Xer proteini rekombinasyonu başlatır ve monomerleri yeniden oluşturur (Twyman, 1998).

1.4.5.1. Plazmitlerin Kopya Sayısı

Bir hücrede bir plazmitin kopya sayısı diğer plazmitden farklıdır ve bu farklılık replikasyonu kontrol eden düzenleme mekanizmaları tarafından belirlenir. Bir plazmitin kopya sayısı plazmit replikasyonunun başlangıcının düzenlenmesiyle belirlenir. Başlangıcı kontrol eden 2 ana mekanizma şöyle tanımlanır:

1. Antisens RNA düzenlemesi

2. Gerekli proteinlerin iteron denen tekrar dizilerine bağlanmasıyla yapılan düzenleme.

Halihazırda kullanılan klonlama vektörlerinin çoğu Col E1 plazmitinden türetilen bir ori bölgesi taşır ve kopya sayısı kontrolü antisens RNA aracılığıyla yapılır (del Solar vd., 1998). Bu tip plazmitte DNA replikasyonu için gerekli primer, RNA II diye bilinen 555 bazlık replikasyon orijininde bir RNA-DNA hibriti oluşturan bir ribonükleotittir (Tomizawa ve Itoh, 1981). RNA II, RNaz H ile serbest bir 3' OH grubu bırakacak şekilde kesilmişse ancak o zaman bir primer olarak hareket edebilir. RNA II bu şekilde işlem görmedikçe bir primer olarak fonksiyon görmeyecek ve replikasyon gerçekleşmeyecektir. Ayrıca replikasyon kontrolünde RNA I olarak bilinen 108 bazlık küçük RNA molekülü de aracılık eder. Bu RNA I, RNA II gibi DNA'nın aynı bölgesinden ama tamamlayıcı zinciri tarafından kodlanır. Yani, RNA I ve RNA II birbirlerinin tamamlayıcısıdır ve çift zincirli RNA oluşturmak için hibridize olabilirler. Bu dubleks yapı RNA II'nin RNase H ile parçalanmasını engeller ve böylece replikasyon gerçekleşmez. RNA I plazmit tarafından kodlandığı için plazmitin kopya sayısı fazla olduğunda RNA I de fazla sayıda sentezlenecektir. Böylece konak hücre büyürken ve bölünürken RNA I'in konsantrasyonu düşecek ve plazmit tekrar replike olmaya başlayacaktır (Tomizawa ve Itoh 1981).

Kopya sayısının korunmasına RNA I'e ek olarak Rop diye bilinen, plazmit tarafından kodlanan bir protein de yardım eder. Bir dimer formu olan bu Rop proteini RNA I ve RNA II'nin eşleşmesini artırır. Primer işlendiği için RNA II, RNA I'in nispeten düşük konsantrasyonlarında bile inhibe edilebilir (Rop proteini primerin uçlardan kesilmesine engel olur). *rop* geninin delesyonu ya da RNA I'deki mutasyonlar sonucunda kopya sayısında artış görülür (Twigg ve Sherratt, 1980).

pSC101 plazmitinde ve geniş konak spektrumu olan plazmitlerin çoğunda, ori bölgesi 17 ile 22 bp uzunluğunda, 3 ila 7 kopyaya sahip iteron sıraları içerirler. pSC101 plazmitinde ori bölgesine yakın, Rep A proteinini kodlayan *repA* geni bulunur. Sadece plazmitin kodladığı, replikasyon için gerekli olan bu protein iteronlara bağlanır ve DNA sentezini başlatır.

Kopya sayısı kontrolü iki ilave mekanizmayla gösterilir. İlkinde, Rep A kendi promotor bölgesine bağlanarak transkripsiyonunu engeller ve sentezini baskılar (Ingmer ve Cohen, 1993). Eğer kopya sayısı yüksekse Rep A'nın sentezi baskılanacaktır. Hücre bölünmesinden sonra, kopya sayısı ve Rep A'nın konsantrasyonu düşecek ve replikasyon yeniden başlatılacaktır. Rep A proteinindeki mutasyonlar kopya sayısının artmasına sebep

olabilir (Ingmer & Cohen 1993). İkinci olarak, Rep A iki plazmitin iteron bölgelerine bağlanarak bu iki plazmiti birbirine bağlayabilir. Böylece onları replikasyonun başlangıcında engellemiş olur. Handcuffing (kelepçeleme) olarak bilinen bu mekanizmaya göre iteron plazmitlerinin replikasyonu hem Rep A proteininin konsantrasyonuna hem de plazmitlerin kendi konsantrasyonlarına bağlı olacaktır.

1.4.5.2. Plazmit Uyuşmazlığı

Aynı replikasyon ve paylaşırma sistemlerine sahip plazmitler aynı hücrede muhafaza edilemezler. İki farklı plazmitin, seçimsel baskı olmadığı durumlarda aynı hücre içinde birlikte bulunmamasına plazmit uyumsuzluğu denir. Bu terim sadece, ikinci plazmit hücreye girdiğinde ve DNA restriksiyon sistemi bulunmadığı durumlarda kullanılabilir. Karşılıklı uyumsuz plazmit grupları, aynı uyumsuzluk gruplarına ait olarak düşünülürler. *E. coli*'de 30'un üzerinde, *S. aureus* plazmitleri içinde 13 tane uyumsuzluk gurubu tespit edilmiştir. Plazmitler aynı replikasyon kontrol mekanizmasına sahip iseler uyumsuzlar. Şaşırtıcı olarak, kopya sayısının antisens kontrole bağlı olduğu plazmitlerin RNAI/RNAII bölgelerindeki dizilerin değişimiyle, uyumsuzluk grupların değişimi mümkündür. Buna alternatif olarak aynı par bölgesini paylaşıyorlarsa plazmitler uyumsuz olacaklardır (Austin ve Nordstrom 1990).

1.4.6. *Thermus* Cinsine Ait Plazmitler

Thermus cinsi doğal olarak birçok plazmit barındırmaktadır (Eberhard vd., 1981). Fakat yapılan birçok çalışmada *Thermus* cinsine ait plazmitlerin fonksiyonları belirlenememiştir (Takayama vd., 2004).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Thermus thermophilus* HB27 ve HB8 bakterilerine ait 2 megaplazmit tanımlanmıştır. Bu megaplazmitlerin, termofilik arkealarda ve termofilik bakterilerdeki DNA tamir mekanizmasında görevli genlere benzer genler taşıdıkları belirlenmiştir (Bruggemann ve Chen, 2006).

Thermus cinsine ait bakterilerden izole edilen plazmitler genelde, herhangi bir fenotipik özellik göstermeyen cryptic plazmitler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (Kobayashi vd., 2005).

1.4.7. Vektör Olarak Plazmitler

1970'lerin başında ilk nesil klonlama vektörlerinin tasarlanmasından beri, dizayn edilen plazmitlerin sayısı aşırı derecede artmıştır. Plazmitler ticari olarak satın alınabilir ya da elden temin edilebilirler. Bu yüzden, günümüz araştırmacıları belirli bir çalışma için hangi plazmiti kullanacaklarını belirleme hususunda, birkaç küçük kritere dikkat etmek zorundadırlar. Bunlar: insert boyu, kopya sayısı, plazmit uyumsuzluğu, seçilebilir marker, klonlama bölgeleri ve özelleşmiş vektör fonksiyonlarıdır. Bu kriterler yapılan çalışmaya göre değişebilir (Primrose ve Twyman, 2006).

İdeal bir klonlama aracı aşağıda verilen üç özelliğe sahip olmalıdır.

1. Düşük moleküler ağırlıklı olmalı
2. Konak hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilir olmalı
3. Kolaylıkla değerlendirilebilen genlerde tek noktadan kesen restriksiyon endonükleazlara sahip olmalıdır (Clark, 2010).

Düşük moleküler ağırlığın avantajları birkaç tanedir. Bunlardan birincisi; plazmiti kullanmak çok kolaydır. Örneğin, kırılmalarla oluşacak zarara karşı oldukça dirençlidir ve kolaylıkla konak hücreden izole edilebilir. İkinci olarak, düşük moleküler ağırlıklı plazmitler genellikle konakta çoklu kopyalar halinde bulunurlar ve bu sadece onların izolasyon kolaylığı için değil bütün klonlanan genler için gen dozajına yol açmada etkilidir. Son olarak, düşük moleküler ağırlığa sahip olmanın verdiği avantaj, konak endonükleazlarından etkilenme ihtimalinin minimum seviyede olmasıdır (Primrose ve Twyman, 2006).

Küçük bir DNA fragmentinin vektör içine sokulmasından sonra, oluşan kimerik moleküller uygun bir alıcı içine transforme edilmelidir. Transformasyon verimliliği çok düşük olduğu için, kimerik moleküllerin kolaylıkla değerlendirilebilir fenotiplere sahip olması gereklidir. Genellikle bu fenotipler (antibiyotik direnci, kanamisin direnci vs.) vektör üzerinde bulunabildiği gibi, insert DNA üzerinde bulunan genler tarafından da üretilebilirler (Clark, 2010).

Klonlamanın ilk basamaklarından biri vektör DNA'sının kesilmesidir ve bu DNA'nın aynı endonükleaz ile kesilmiş aynı uçlara sahip bir DNA fragmenti ile birleştirilmesidir. Eğer vektörün endonükleaz için birden fazla kesim bölgesi varsa birden fazla fragment üretilenektir. Kesilen iki DNA örneği sonradan karıştırıldığında ve tekrar birleştirildiğinde, oluşan kimeralar muhtemelen vektörün bir parçasını taşımayacaklardır.

Eğer endonükleazın kestiği bölgeye bir DNA parçası sokulunca bir gen inaktif oluyorsa ve bu inaktif olan gen fenotipik olarak değerlendirilebilirse bu çok avantajlı olur. Böylece, kendi üzerine katlanan ya da insört DNA ile birleşen vektörler kolaylıkla ayırt edilebilir (Primrose ve Twyman,2006).

Bu çalışma kapsamında *Thermus* cinsine ait 2 izolattan plazmit izolasyonu yapıldı. *Thermus* sp. K6 olarak adlandırılan bakteriden izole edilen plazmit üzerinden çalışmalara devam edildi. İzole edilen plazmitin tüm baz dizini ortaya çıkarıldı ve biyoinformatik analizi yapıldı. İzole edilen plazmitin küçük bir genoma sahip olması ve bir benzerine rastlanılmaması bu plazmit üzerinde yoğunlaşılmasına neden oldu. Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri, ORF dizileri, GC içeriği, kopya sayısı ve promotorların yerleri tespit edildi. Buna dayanarak, plazmitin termofilik bakteriler için klonlama vektörü olarak kullanılabilmesi amaçlandı. Ayrıca plazmit genomu üzerinde yapılacak genetik modifikasyonlarla pHIG22'nin klonlama ve ekspresyon vektörü olarak kullanılması mümkündür.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Enzimler

BclI (NEB), *HindIII* (Promega), *EcoRI* (Promega), *NotI* (TaKaRa), *SmaI* (GmbH), *PstI* (Fermentas), *BamHI* (Fermentas), *KpnI* (Sigma), *NcoI* (Fermentas), *SacI* (Fermentas), *NdeI* (NEB), *BglII* (Promega), *Sau3A* (Takara), T4 DNA Ligaz (Promega), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega), Tripton (Merck), Yeast ekstrakt (Merck), Polipepton (Merck), NaCl (Merck), MgSO₄.7H₂O (Sigma), CaSO₄ (Merck), Fe III Citrate (Merck), H₂SO₄ (Merck), MnSO₄.H₂O (Merck), ZnSO₄.7H₂O (Sigma), KNO₃ (Sigma), NaNO₃ (Merck), H₃BO₃ (Merck), CuSO₄.5H₂O (Sigma), Na₂MoO₄.2H₂O (Merck), CoCl₂.6H₂O (Merck), Etil alkol (Applichem), IPTG (Applichem), Amfisilin (Applichem), Kanamisin (AppliChem), DNA Extraction Kiti (Fermentas), EDTA (Merck), dNTP seti (Promega), pET28a(+) Klonlama Vektörü (Invitrogen), CaCl₂ (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem), Commassie Brilliant Blue G-250 (Merck), Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck), BSA (NEB), Sodyum Asetat (Merck), K₂HPO₄(Merck), KH₂PO₄(Merck), Trizma Baz (Sigma), Nutrient Agar (Merck), SDS, Glisin (GERBU), Akrilamid (Sigma), Bis-akrilamid (Promega), Bromo Fenol Mavisi (Gerbu), Etidyum Bromür (Sigma), Agaroz (Sigma), TEMED (Janssen Chimica), β-merkaptolanol (Merck), Lizozim (Merck), Protein markır (Promega), Metanol (Sigma), Fenol (Sigma), NaOH (JTBaker), Asetik asit (Riedel-dan Haen), Gliserol (Merck).

Kullanılan reagentler %99 ya da daha saftırlar.

2.1.2. Mikroorganizmalar

2.1.2.1. *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5

Thermus sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 bakterileri Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarında izole edildi. K6 ve M5, plazmitlerinin izole edildikleri ve transformasyon denemelerinin yapıldığı hücrelerdir.

2.1.2.2. *Escherichia coli* JM101

E. coli JM101 suşu hibrit vektör aşamasında kullanıldı. JM101 F' *traD36 proA⁺B⁺ lacI^qΔ(lacZ)M15/ Δ(lac-proAB) glnV thi⁺* genotipik özelliklerine sahiptir. JM101 Δ(*LacZ*)M15 genini içerir ve böylece rekombinat plazmitlerin mavi veya beyaz koloni ayırımına göre ayrılmalarına müsaade eder.

2.1.2.3. *Escherichia coli* DH5α

E. coli DH5α suşu pD782 vektörünün izolasyonu için kullanıldı. DH5α *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* genotipik özelliklere sahiptir.

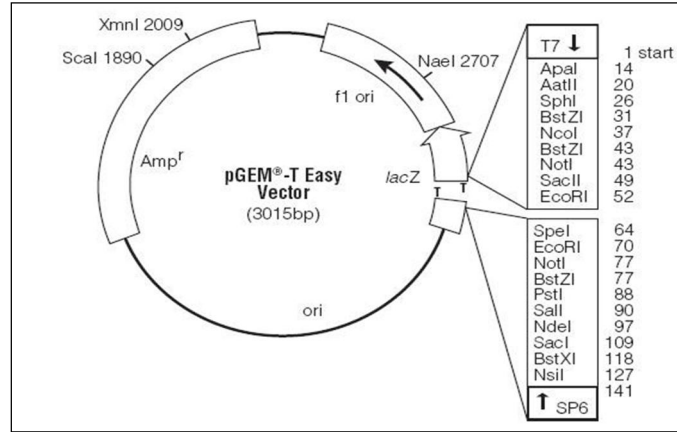
2.1.2.4. *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8)

Thermus thermophilus HB27 TH104 (pTT8) bakterisi Dr. Akira NAKAMURA'dan temin edilmiştir. pHIG22 ve rekombinant plazmitlerin transformasyonu ve replikasyonu denemelerinde kullanıldı.

2.1.3. Vektörler

2.1.3.1. pGEM[®]-T Easy Klonlama Vektörü

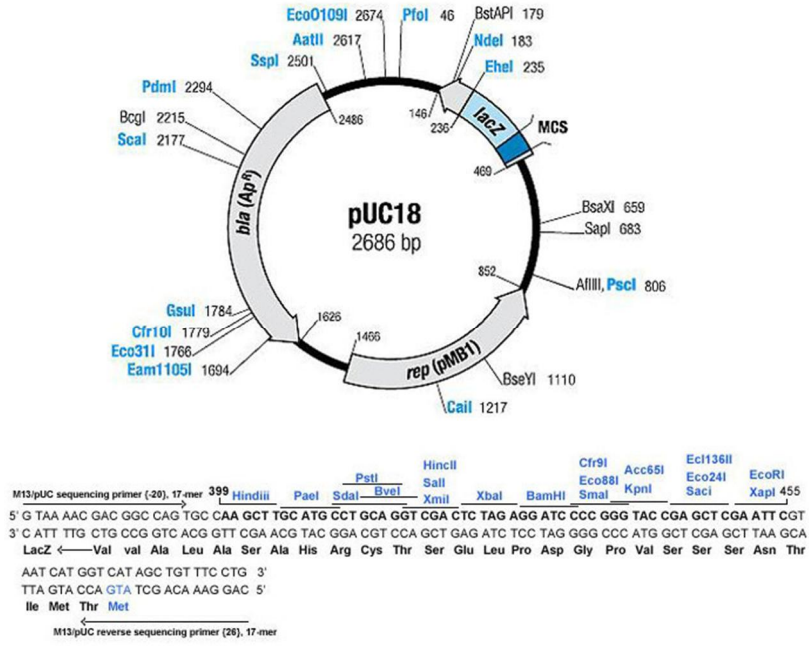
pGEM[®]-T Easy (Promega) vektörü PCR ürünlerinin klonlanmasında ve shuttle vektör tasarlanmasında kullanıldı. pGEM[®]-T Easy PCR ürünlerinin klonlanması için uygun bir sistemdir (Şekil 1).



Şekil 1. pGEM-T Easy vektörünün şematik görünümü

2.1.3.2. pUC18 Klonlama Vektörü

pUC18 klonlama vektörü PCR ürünlerinin klonlanmasında ve shuttle vektör tasarlanmasında kullanıldı. pUC18 klonlama vektörü restriksiyon endonükleazlarla kesim yapılan DNA parçalarının klonlanması için uygun bir sistemdir. Bu çalışmada restriksiyon endonükleazlarla kesilen pHIG22 fragmentleri aynı restriksiyon endonükleazlarla kesilen pUC18 klonlama vektörüne klonlandı (Sambrook vd., 1989).



Şekil 2. pUC18 vektörünün şematik görünümü

2.1.3.3. pDG782 Vektörü

Klonlama aşamalarında kullanılan kanamisin kaseti, PCR ile pDG782 vektöründen çoğaltıldı. pDG782 vektörü kanamisin direnç geni içeren bir sistemdir. pDG782, Rize Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Cemal SANDALLI'dan temin edilmiştir.

2.1.4. Kullanılan Besiyerleri ve Antibiyotikler

2.1.4.1. Luria Bertani (LB) Sıvı-Agar Besiyeri

Tripton	1 gr
Yeast ekstrakt	0,5 gr
NaCl	0,5 gr
ddH ₂ O	100 ml

E. coli JM101 Luria Bertani Broth (pH 7) besiyerinde üretildi. Besiyerine istendiğinde % 1,2 agar ilavesi ile LB agar yapıldı (Luria S., 1984) .

2.1.4.2. *Thermus* 162 Sıvı-Agar Besiyeri

Yeast ekstrakt	1,0 gr
Tripton	1,0 gr
Nitritotriasetik asit	0,1 gr
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,04 gr
MgSO ₄ .6H ₂ O	0,2 gr
Fe (III) Sitrat (0.01 M)	0,5 ml
Trace Element	0,5 ml
Fosfat Tamponu	100 ml
ddH ₂ O	900 ml

Fosfat Tamponu:

Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	43 gr
KH ₂ PO ₄	5,44 gr
ddH ₂ O	1000 ml

Trace Element:

H ₂ SO ₄	0,50 ml
MnSO ₄ .H ₂ O	0,28 gr
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,50 gr
H ₃ BO ₃	0,50 gr
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025gr
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025gr
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,045 gr
ddH ₂ O	1000 ml

Thermus sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 izolatları *Thermus* 162 (pH 7,5) besiyerinde üretildi. Besiyerine istendiğinde % 2 agar ilavesi ile *Thermus* 162 agar yapıldı.

2.1.4.3. TM (*Thermus Medium*) Sıvı-Agar Besiyeri

Polipepton	4 gr
Yeast Ekstrakt	2 gr
NaCl	1 gr
*Castenholz sol.	100 ml
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır (pH 7,5).

*Castenholz sol.

Nitrilotriasetik asit	1 gr
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,6 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 gr
NaCl	0,08 gr
KNO ₃	1,03 gr
NaNO ₃	6,89 gr
Na ₂ HPO ₄	1,11 gr
FeCl ₃ (0.01 M)	1 ml
**Nitch sol.	10 ml
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır (pH 8,2).

**Nitch sol.

H ₂ SO ₄	0,5 ml
MnSO ₄ .7H ₂ O	2,2 gr
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,5 gr
CuSO ₄	0,016gr
H ₃ BO ₄	0,5 gr
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025gr
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,046 gr
ddH ₂ O	1 L'ye tamamlanır.

Thermus thermophilus HB27 TH104 (pTT8) bakterisi TM (pH 7.5) besiyerinde büyütüldü. Besiyerine istendiğinde % 2 agar ilavesi ile TM agar yapıldı.

2.1.5. Antibiyotikler

Çalışmada kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları aşağıdaki Tablo 3' de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan antibiyotikler

Antibiyotikler	Stok	Son µg/ml	Son µg/ml
	mg/ml	<i>Thermus</i>	<i>E.coli</i>
Ampisilin (ddH ₂ O)	100	-	100
Kanamisin (ddH ₂ O)	15	10-25	10-50

2.1.6. Kullanılan Analiz Programları

Plasmapper (Donf vd., 2004), OriFinder (Gao ve Zhang , 2008), Gentle V 1.9. 4, BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, 1999), FastPCR 6.1.53. beta 3 (Kalendar vd, 2009), BPROM (Softberry) ve Promotor Predictor (URL-4, 2011) programları kullanıldı.

2.2. METOTLAR

2.2.1. Kaplıcalardan Örneklerin Alınması ve Termofilik Bakterilerin İzolasyonu

Kaplıcadan su ve çamurlu su örnekleri, ağız kapaklı steril şişelere alındı. Alınan örnekler olabildiğince kısa sürede ve soğuk şartlar altında laboratuvara getirildi. Daha sonra içerdikleri termofilik bakteriler, uygun besiyerler kullanılarak zenginleştirme kültürleri yapılmak suretiyle çoğaltıldı. Çoğaltılan bu kültürler, uygun besiyerleri içeren agar petrilere tek koloni elde etmek amacıyla ekildi ve sonuçta petri üzerinde oluşan koloniler incelenerek birbirinden farklı olabilecek koloniler seçilip bunların saf kültürleri yapıldı (Benson, 1985; Dulger, 1997).

2.2.2. İzolatların Genomik DNA'larının İzolasyonu

Seçilen iki bakteri suşu için genomik DNA izolasyonu Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre yapıldı. Termofilik izolatlar, 65 °C'de Degryse besiyerinde 150 rpm' de bir gece inkübe edildi. Elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm'de 3-4 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 500 µl TE tamponu (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edildi ve vortekslenerek çözüldü. Üzerine 10 µg lizozim ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 50 µl %10'luk SDS eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65°C'de 30 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir, tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi, alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst kısımdaki sıvı pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve pellet kısımları atıldı. Bu tüplere 500 µl kloroform ilave edildi ve alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu kloroform aşaması 2 kez tekrarlandıktan sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan sıvının üzerine 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96'lık soğuk etil alkol ilave edildi ve -20°C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µl %70'lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37°C'de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 100 µl TE'de çözümlenerek - 20°C'de muhafaza edildi.

2.2.3. İzolatların rRNA Analizleri

2.2.3.1. 16S rRNA Geninin PCR ile Artırılması

16S rRNA genleri, iki termofilik izolattan Sambrook ve arkadaşlarının prosedürüne göre izole edilen genomik DNA'dan UNI16S-L (5'-ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') ileri ve UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA) geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. PCR şartları Beffa ve arkadaşlarına (1996) göre oluşturuldu. 12 ng kalıp

DNA, 5 µl 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP karışımı steril ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µl'lik tüplerde, "Thermal Cycler'da gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise: İlk denatürasyon basamağı 95°C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94°C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56°C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72°C'de 2 dakika (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5 µl'si %1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5 µg/ml) ile boyandıktan sonra "BioDocAnalyze" sistemiyle görüntüledi.

2.2.3.2. 16S rRNA Geninin Klonlanması, Baz Dizisinin Ortaya Çıkarılması ve GenBank'taki Sıralarla Karşılaştırılması

Yukarıda açıklanan PCR ile çoğaltılan 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü şartlarda klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini analizi, baz dizini otomatik dizi analizatörleri aracılığıyla ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

2.2.4. İzolatların Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi

Thermus cinsine ait olduğu belirlenen *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 suşlarının plazmit içerikleri incelendi.

2.2.4.1. Plazmit DNA İzolasyonu

İzolatların plazmit içerikleri, Voskuil ve Chambliss'ın (32) geliştirdiği metoda göre ortaya çıkarıldı. Herbir bakteriden 5-10 ml gece kültürü (12-16 saat) 10.000 rpm'de 5

dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve çökelek 200 µl SET tamponunda (%25 sakkaroz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)) vortekslenerek çözüldü. Kullanılan SET tamponunun 1ml'sine 5 mg lizozim ilave edildi. Daha sonra, karışım mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bunun üzerine 350 µl yeni hazırlanmış sodyum hidroksit-sodyum dodesil sülfat solüsyonu (0,2 N NaOH, %1 SDS) ilave edildi. Süspansiyon şeffaf bir durum almaya kadar ters düz çevrildi ve bu şeffaf süspansiyona 350 µl soğuk 3 M K⁺ - 5 M asetat solüsyonundan ilave edildi. Süspansiyon, 13.000 rpm'de, 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı yeni bir mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve üzerine 650 µl soğuk fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) karışımından ilave edildi. Bir dakika vortekslenerek karıştırıldı. Karışım daha sonra 5 dakika mikrosantrifujde santrifuj edildi. Üst faz alındı ve buna 620 µl soğuk kloroform:izoamilalkol karışımından ilave edildi. Otuz saniye vortekslenerek karıştırıldıktan sonra karışım mikrosantrifujde 3 dakika santrifuj edildi. 550 µl'lik üst faz pipetörle alınıp yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra, buna eşit miktarda soğuk (-20°C) izopropanol ilave edildi. Karışım ters düz çevrilerek tamamen karıştırıldıktan sonra, 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant kısmı döküldü ve izopropanol açık havada uçurulduktan sonra çökelek kısmı %70'lik etanol ilave edilerek 2 dakika santrifüjlendi, kalan etanol açık havada uçurulduktan sonra 50 µl ddH₂O'da çözüldü.

Yapılan plazmit DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, plazmit DNA'larının izole edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması için, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %0,7'lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl 10X yürütme boyası ve 4 µl ddH₂O veya TE tamponu ilavesi ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan her bir kuyucuğa yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment büyüklüğü belli olan bir şahit DNA ile yürütüldüler. Yürütme neticesinde, plazmit DNA'larının var olup olmadıkları ve moleküler ağırlıkları tespit edildi.

2.2.5. pHIG22' nin DNA Baz Dizininin Belirlenmesi

2.2.5.1. pHIG22' nin Restriksiyon Analizi

Plazmit DNA'sının restriksiyon analizinin yapılması için bir seri restriksiyon endonükleaz ile kesim reaksiyonları yapıldı. *BclI* (NEB), *HindIII* (Promega), *EcoRI* (Promega), *NotI* (TaKaRa), *SmaI* (GmbH), *PstI*(Fermentas), *BamHI* (Fermentas),

KpnI(Sigma), *NcoI* (Fermentas), *SacI* (Fermentas), *NdeI* (NEB), *BglIII* (Promega), *Sau3A*(Fermentas) restriksiyon endonükleazları ile firmaların öngördüğü şartlar altında kesim reaksiyonları gerçekleştirildi.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda, plazmit DNA'larının herhangi bir restriksiyon endonükleaz ile kesilip kesilmediğinin belirlenmesi için, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %0,7'lik agaroz jel hazırlandı. 6 µl DNA solüsyonu, 1 µl 10X yürütme boyası ve 4 µl ddH₂O veya TE tamponu ilavesi ile hazırlanan karışım agaroz jel üzerinde oluşturulan herbir kuyucuğa yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment büyüklüğü belli olan bir şahit DNA ile yürütüldüler. Yürütme neticesinde, kesim sonuçları ve oluşan fragmentlerin moleküler ağırlıkları tespit edildi ve sonra BioDocAnalyze sistemiyle görüntüledi.

2.2.5.2. pHIG22 Fragmentlerinin pUC18 Vektörüne Klonlanması

Yukarıda açıklandığı gibi elde edilen fragmentler T4 ligaz (Promega) enzimi kullanılarak pUC18 klonlama vektörüne, uygun görülen konsantrasyonlar ve şartlarda gerçekleştirilerek klonlandı (Tablo 4). 16 °C'de bir gece boyunca bekletildi.

Tablo 4. pUC18 vektörüne ligasyon için gereken şartlar

pUC18 vektörüne ligasyon için tepkime bileşenleri	
19X T ₄ DNA ligaz tampon	1 µL
Kalıp DNA	3 µL
pUC18 vektörü	1 µL
T ₄ DNA ligaz (1 U)	1 µL
ddH ₂ O	4 µL

2.2.6. *E. coli* JM101 'e Transformasyon

Kompotent hücre hazırlamak için *E. coli* JM101 hücreleri Luria Bertani (LB) Broth besiyerine ekildi ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bir gecelik kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C'de yoğunlukları 600 nm dalga

boyunda OD₆₀₀ 0,4–0,5 olacak şekilde büyütüldü. Hücreler ardından 4 °C’de 4.000×rpm hızda 5 dk. santrifüj edildi ve pelletin üzerine 10 ml 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek elle çözümleri sağlandı. Hücreler 30 dk. buz üzerinde bekletildi ve tekrar 4°C’de 4.000×rpm hızında 5 dk. santrifüj edildi. Pellet üzerine 2 ml 100 mM soğuk CaCl₂ ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Elde edilen kompetent hücreler +4°C’de 2 gün içinde kullanılmak üzere muhafaza edilebilir.

Transformasyon, Sambrok vd., (1990) tanımladığı şartlarda gerçekleştirildi. Kompetent *E. coli* hücreleri mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu hücrelerin üzerlerine 3–5 µl ligasyon karışımından ilave edildi. Karışım 30 dk. buz üzerinde bekletildi ve daha sonra 90 sn. 42 °C’de bekletildi. Ardından ependorf tüplerinin içerisine 200 µl LB Broth besiyeri ilave edilerek 37 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler ve petri kaplarında bulunan 50 mg/ml LB-Agar besiyeri üzerine cam bagetle yayıldı. Petriyerler 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edilerek sekanslama işlemi için Macrogen Inc., Seoul, Korea firmasına gönderildi.

2.2.7. Ters (Invers) PCR ile pHIG22’nin Tüm Dizininin Kalan Kısımlarının Belirlenmesi ve Klonlanması

pHIG22’nin tüm baz diziliminin belirlenmesi için tersPCR (inverse PCR) çalışması gerçekleştirildi. Bu nedenle, elde edilen bu fragment parçalarına ait baz dizilimleri kullanılarak uç kısımlara yakın bölgelerden dış taraflara doğru olacak şekilde, 6 adet primer dizayn edildi (Tablo 5).

Daha sonra dizayn edilen primerler kullanılarak yapılan PCR çalışması 200 µL’lik PCR tüpleri içerisinde, 50 µL’lik son hacimde gerçekleştirildi (Tablo 6). PCR için BioRAD marka Mj Mini model Personal Thermal Cycler cihazı kullanıldı (Tablo 7).

Tablo 5. Ters (invers) PCR için dizayn edilen primerler

Primerlerin ismi	Primerlerin dizisi
TherS_6P-1FW	5'- CTA _g CAT _g AgAA _g CC _g ACACC- 3'
TherS_6P-1RW	5'- ggATACACCAggAggTgAgTg- 3'
TherS_6P-2FW	5'- gACCTgTCgATgCTgTgATgC- 3'
TherS_6P-2RW	5'- CAATCAgCAggCTCggTTAgg- 3'
TherS_6P-3FW	5'- CgCgACA _g TTTC _g ACATCTAg - 3'
TherS_6P-3RW	5'- gATACCTCAggCgCAgATAgg - 3'

Tablo 6. Ters (invers) PCR için reaksiyon şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşeni (50 µL)	
10X PCR tampon	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
dNTP (1 mM)	16 µL
Forward primer (10 µM)	1 µL
Rewers primer (10 µM)	1 µL
dH ₂ O	21,75 µL
<i>Taq</i> polimeraz	0,25 µL
Kalıp DNA	1 µL

Tablo 7. Ters (invers) PCR protokolü

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	1	1
94 °C	0.5	36
55 °C	1	36
72 °C	2	36
72 °C	4	1
4 °C	15	1

Sonuçlar % 0,7'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

2.2.7.1. PCR Fragmentlerinin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

Yukarıda açıklandığı gibi elde edilen DNA fragmentleri, baz dizilimi belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne firmanın öngördüğü şartlar altında yapıştırıldı (Tablo 8) ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

Tablo 8. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar

pGEM-T Easy vektörüne ligasyon için tepkime bileşenleri	
10X T ₄ DNA ligaz tampon	1 µL
Kalıp DNA	3 µL
pGEM-T T Easy klonlama vektörü	1 µL (1:1)*
T ₄ DNA ligaz (1 U)	1 µL
ddH ₂ O	4 µL

* 1:1 sulandırılmış vektör

2.2.7.2. pHIG22'nin Tüm Sekansının Elde Edilmesi

Daha önce belirlenen 920 bp uzunluğundaki fragment ile pGEM-T vektörüne klonlanan fragmentlerin dizileri karşılaştırıldı, baz sıraları birleştirildi. Böylece pHIG22 plazmitinin tüm baz dizisi ortaya çıkarıldı.

2.2.8. Biyoinformatik ve Diğer Analizler

pHIG22 plazmitinin tüm baz dizisinin belirlenmesi için; elde edilen fragmentlerin birleştirilmesinde, çakışan bölgelerin belirlenmesinde ve sekans sonuçlarının temizlenip tüm baz dizisinin elde edilmesinde, Gentle V 1.9. 4 ve BioEdit V 7.0.9.0 (Hall, 1999), programları kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin dizayn edilmesinde FastPCR 6.1.53. beta 3 (Kalendar vd, 2009) programı kullanıldı. pHIG22 plazmiti için ORF analizi OriFinder (Gao veZhang , 2008) programı ile gerçekleştirildi (URL-2, 2011). Ayrıca olası promotor bölgelerinin belirlenmesinde BPROM (Softberry) (URL-3, 2011) ve Promotor Predictor (URL-4, 2011) programları kullanıldı.

2.2.9. pHIG22 Plazmitinin Replikasyon Orijininin ve Fonksiyonel Genlerinin Belirlenmesi

2.2.9.1. Spesifik Primerlerin Dizaynı

pHIG22 plazmitinin replikasyon orijininin ve fonksiyonel genlerinin belirlenebilmesi için 12 adet primer dizayn edildi (Tablo 9). Primerler pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerden farklı boyutlarda amplifikasyonunu sağlayacak şekilde, uç kısımlarında *Bam*HI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi içerecek şekilde dizayn edildi. PCR şartları optimize edildi (Tablo 10).

Tablo 9. pHIG22 plazmitinin farklı bölgelerinin çoğaltılması için dizayn edilen spesifik primerler

Primerlerin İsmi	Primerler dizisi
pHg-1Fw	5'- CAggATCCTCCCAGTCTATgggCTC -3'
pHg-1Rw	5'- CggATCCgCTgggTTAggTgTTgTg -3'
pHg-2Fw	5'- CggATCCgCAAACggggTAAgCTAC -3'
pHg-2Rw	5'- CggATCCgCTCTgACTTCgCCTTg -3'
pHg-3Fw	5'- CggATCCgACTTCCCTAggAACCTC -3'
pHg-3Rw	5'- CggATCCgCATCACgCACgTTTTTC -3'
pHg-4Fw	5'- CggATCCgATgCTCCAggCTCATC -3'
pHg-4Rw	5'- CggATCCAgTgCggCATAATgTg -3'
pHg-5Fw	5'- CggATCCgACTTgACgggCATACg -3'
pHg-5Rw	5'- CggATCCgCTggAggAgCTTgATg -3'
pHg-6Fw	5'- CggATCCgCATCAAgCTCCTCCA -3'
pHg-6Rw	5'- gAgCCCATAgACTgggAggATCCTg -3'

Tablo 10. PCR şartları

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	3	1
94 °C	1	36
57 °C	1.5	36
72 °C	1.5	36
72 °C	10	1
4 °C	15	1

2.2.9.2. Kanamisin Kasetinin pDG782 Vektöründen PCR ile Çoğaltılması

Klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere; pDG782 vektörü, *E. coli* DH5 α bakterisinden Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler. İzole edilen pDG782 vektöründen, dizayn edilen primerler (Tablo 11) kullanılarak PCR ile kanamisin kaseti çoğaltıldı (Tablo 12). Kullanılan primerlerden pKAN-Fw ileri primerinin 5' ucuna *Bam*HI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi eklendi. Kanamisin kasetinin aşağı bölgesinde *Bam*HI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulunduğundan bu bölgeye herhangi bir linker eklenmedi.

Tablo 11. pDG782 plazmiti için dizayn edilen primerler

Primerlerin ismi	Primerlerin dizisi
pKAN-Fw	5'-CggATCCgACCATTTgAggTgATAgg-3'
KanR	5'-CgATACAAATTCCTCgTAggCgCTCgg-3'

Tablo 12. PCR şartları

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	2	1
94 °C	1	36
53.5 °C	1	36
72 °C	2	36
72 °C	10	1
4 °C	15	1

2.2.9.3. *E.coli-Thermus* Shuttle Vektörlerinin Dizayn Edilmesi

E.coli-Thermus shuttle vektörlerinin dizayn edilmesi için pUC18 vektörü, pHIG22 plazmiti, pGEM-T Easy vektörü, pET28a+ ekspresyon vektörü, kanamisin kaseti ve dizayn edilen primerler ile yapılan PCR sonucu çoğaltılan fragmentler kullanıldı.

2.2.9.3.1. pUC-HIGK Shuttle Vektörünün Tasarlanması

Uygun primerler kullanılarak pHIG22 plazmitinden PCR ile çoğaltılan fragmentler, pUC18 vektörü ve kanamisin kaseti; firmaların öngördüğü şartlar altında belirlenen restriksiyon endonükleazlarla kesildi. Kesim reaksiyonları sonucu oluşan fragmentler BioDocAnalyze sistemi ile görüntülendi.

Uygun restriksiyon endonükleazlarla kesim yapılan fragmentler, T4 DNA ligaz enzimi ile firmanın öngördüğü şartlarda 16 °C’de bir gece bekletildi. Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

Yapılan klonlama çalışmasında ilk aşamada pUC18 klonlama vektörüne pHIG22 plazmiti eklendi. Bu rekombinant plazmite sonraki aşamada *EcoRI* kesim noktasından kanamisin kaseti eklendi.

Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler.

Klon olduğu düşünülen rekombinant plazmitler *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine Koyama ve arkadaşlarının (1986) geliştirdiği transformasyon metoduna göre aktarılmaya çalışıldı.

2.2.9.3.2. pET-HIG Shuttle Vektörlerinin Tasarlanması

Dizayn edilen primerler kullanılarak, pHIG22 plazmitinden PCR ile farklı ORF’leri içerecek şekilde fragmentler çoğaltıldı. Çoğaltılan fragmentler ve pGEM-T Easy vektörü, T4 ligaz enzimi ile firmanın öngördüğü şartlar altında 16 °C’de bir gece bekletildi. Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

pGEM-T Easy vektörüne klonlanan PCR fragmentleri, uygun restriksiyon endonükleazlarla çıkarıldı ve pET28a+ vektörüne uygun restriksiyon endonükleaz kesim bölgesinden klonlandı.

Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler.

Klonlama sonucunda elde edilen rekombinant plazmitler *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine Koyama ve arkadaşlarının (1986) geliştirdiği transformasyon metoduna göre aktarılmaya çalışıldı.

2.2.9.4. *E.coli-Thermus* Shuttle Vektörlerinin *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) Bakterisine Transformasyonu

Transformasyon metodu Koyama ve arkadaşlarının (1986) geliştirdiği yönteme göre yapıldı. Doğal kompetant olan *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisi TM besiyerinde 65 °C'de 150 rpm'de 15 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda büyüyen *Thermus* kültüründen 0,2 ml alınarak, 10 ml taze hazırlanmış TM besiyerine inokule edildi. 2,5 saat 70 °C'de 150 rpm'de büyütüldü. Büyütülen kültürden 0,5 ml steril bir tüpe alınarak üzerine 10 µl plazmit DNA'sı (50 ng/µl) ilave edildi. 1 saat 70 °C'de 170 rpm'de inokule edilerek kompetant hücrelerin plazmit DNA'sını hücre içine alması sağlandı. Bu süre sonunda uygun antibiyotikli besiyerlerine yayılarak 60 °C'de 1 ile 3 gün arasında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonucunda petriyerler incelendi.

2.2.10. pHIG22 Plazmitinin Protein Profilinin İncelenmesi

E.coli JM101 bakterisi, pUC18 vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterisi, pUC-HIGK shuttle vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterisi ve pHIG22 plazmitini içeren *Thermus* sp. K6 bakterisinin protein profilleri karşılaştırılarak; pHIG22 plazmit DNA'sı üzerinde bulunan ORF'lerin herhangi bir protein kodlayıp kodlamadığı araştırıldı.

2.2.10.1. Çözünabilir Hücre Proteinlerinin İzolasyonu

E.coli JM101 bakterisi, pUC18 vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterisi, pHIG22 plazmitini içeren *E.coli* JM101 bakterisi ve *Thermus* sp. K6 bakterisinin proteinlerinin profilini çıkarmak için, öncelikle her bir bakteriden 10 ml gece kültürleri yapıldı. Hücrelerin, 14.000 rpm'de 15 dakika santrifuj edilmesiyle oluşturulan çökelek, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) ve %10 sakkarozdan oluşan TS tamponunda çözüldü ve sıvı azot (-194°C) tankında bir dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığına alındı ve bu işlem iki kez tekrarlandı (Belduz vd., 1993). Oda sıcaklığında çözüldükten sonra, hacminin 1/20'si kadar 10 mg/ml'lik lizozim ilave edilerek hücre süspansiyonu 35 dakika buz üzerinde bekletildi, daha sonra 16.000 x g'de santrifuj edildi ve protein özütünü içeren sıvı kısım, steril bir tüpe alınarak -20°C'de saklandı.

2.2.10.2. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonunun tayini Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. 100 ml boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 ml %95'lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit ilave edildi ve 100 ml'ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan zelti filtre kağı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak BSA kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren zeltiler 0,15 M'lık NaCl ile 100 µl'ye tamamlandı. Ardından zerine 5 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vortekslenerek 10 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µl her bir bakteriden izole edilen protein özütü kullanılarak aynı işlem gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.2.10.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Her bir bakteriden izole edilen protein özütlerinin konsantrasyonu hesaplandıktan sonra, bu protein özütlerinden uygun miktarlarda (40 µg) alınarak bu özütlere eşit miktarda 2 x muamele tamponu (0,15 M TRIS-HCl pH 6,8, %4 SDS, %20 gliserol, %6 β-Merkaptoetanol) ilave edildi ve sonrasında 95 °C'de 3 dakika bekletildi. Daha sonra Laemli (1970) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil slfatpoliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklenerek ve 0,75 mm kalınlığındaki her bir jel için 15 mA akım uygulanarak ayırma işlemi gerçekleştirildi.

Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel Coomassie Brilliant Blue (%0,125 Coomassie Brilliant Blue R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.2.10.4. SDS-PAGE Jelinin Gümüş ile Boyanması

Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra, jel % 50'lik metanolde 1 ila 3 saat düşük hızda sallandı. Sonra 100 ml gümüş nitrat solüsyonu (0,8 gr gümüş nitrat, 21 ml % 36'luk NaOH, 1,4 ml Amonyak ve 77 ml ddH₂O) içerisine aktarıldı ve 15 dk. bekletildi. 5 dk. ddH₂O ile yıkandıktan sonra Solüsyon I'e (2,5 ml %1'lik sitrik asit, 0,25 ml %37'lik formaldehit ve 497 ml ddH₂O) aktarıldı ve 10 dk. bekletildi. Daha sonra Solüsyon II'ye (200 ml %50'lik metanol, 48 ml %12'lik asitik asit ve 400 ml ddH₂O) alınan jel bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

2.2.11. pHIG22'nin Kopya Sayısının Hesaplanması

Thermus sp. K6 bakterisinden izole edilen pHIG22 plazmitinin kopya sayısının belirlenmesi için, kopya sayısı bilinen pUC18 vektörü standart olarak kullanıldı.

pUC18 vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterisi ve pHIG22 plazmitini taşıyan *Thermus* sp. K6 bakterisinden gecelik kültürler atıldı. OD₆₀₀ = 1.0 olana kadar hücreler büyütüldü. *E.coli* JM101 ve *Thermus* sp. K6 kültürlerinin ml'sindeki bakteri sayısı hemositometre kullanılarak mikroskop altında sayıldı ve hesaplandı.

Hesaplanan veriler doğrultusunda aynı sayıda hücre alınarak plazmit DNA izolasyonu yapıldı.

Yapılan plazmit DNA'sı izolasyonu sonucunda, plazmit DNA'larının yoğunluklarının hesaplanması için, 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren %0,7'lik agaroz jel hazırlandı. 5 µl DNA solüsyonu, 1 µl 10X yürütme boyası ve 4 µl ddH₂O veya TE tamponu ilavesi ile hazırlanan karışım agaroz jele yüklenerek 100 voltluk elektrik alanda, fragment büyüklüğü belli olan bir şahit DNA ile yürütüldüler. Yürütme neticesinde, pHIG22 plazmitinin kopya sayısı pUC18 vektörünün kopya sayısı ile karşılaştırılarak hesaplandı. Görüntülenen bantların yoğunlukları BioDocAnalyze 1.0 sistemi ile hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 Bakterilerinin Teşhis Edilmesi

Aydın Alangüllü kaplıcasından alınan su ve çamurlu su örnekleri, ağzı kapaklı steril şişelere alındı. Alınan örnekler olabildiğince kısa sürede ve soğuk şartlar altında laboratuvara getirildi. Daha sonra içerdikleri termofilik bakteriler, uygun besiyerler kullanılarak zenginleştirme kültürleri yapılmak suretiyle çoğaltıldı. Çoğaltılan bu kültürler, uygun besiyerleri içeren agar petrilere tek koloni elde etmek amacıyla ekildi ve sonuçta petri üzerinde oluşan koloniler incelenerek birbirinden farklı olabilecek koloniler seçilip bunların saf kültürleri yapıldı (Benson, 1985; Dulger, 1997).

Saf kültürleri yapılan, K6 ve M5 olarak adlandırılan iki bakteri 16S rRNA analizi için seçildi ve daha sonraki çalışmalar bu iki izolat üzerinden devam ettirildi. Bu iki izolat için genomik DNA izolasyonu yapıldı (Sambrook vd, 1989).

3.1.1. İzolatların rRNA Analizleri

K6 ve M5 izolatlarından 16S rRNA genleri, universal primerler, UNI16S-L ve UNI16S-R, kullanılarak uygun konsantrasyonlar ve şartlar altında PCR ile çoğaltıldı. BioDocAnalyze sistemi ile görüntülenen DNA fragmentlerinin yaklaşık 1400 bp olduğu belirlendi.

PCR ile çoğaltılan K6 ve M5 izolatlarına ait 16S rRNA genleri, pGEM-T Easy vektörüne firmanın öngördüğü şartlarda klonlandı. Klonlanma sonucunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, Maniatis ve arkadaşlarının (1982) geliştirdiği plazmit izolasyon yöntemine göre izole edildiler. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin hangilerinin istenilen parçayı taşıdığı belirlendi ve doğruluğu teyit edilen klonların baz dizinleri belirlendi. Elde edilen yaklaşık 1400 bp uzunluğundaki 16S rRNA dizileri Gen Bankasında var olan diğer bakteriyal dizilerle karşılaştırılarak aralarındaki benzerlik oranları ortaya çıkarıldı.

Gen Bankasında yapılan BLAST analizi sonucu K6 ve M5 izolatlarının *Thermus* cinsine ait oldukları belirlendi. K6 ve M5 izolatları sırasıyla, *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 olarak adlandırıldı.

3.2. *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 Bakterilerinin Plazmit İçeriklerinin Belirlenmesi

Thermus cinsine ait olduğu belirlenen *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 bakterilerinin plazmit içerikleri incelendi.

İzolatların plazmit içerikleri, Voskuil ve Chambliss'ın geliştirdiği metoda göre ortaya çıkarıldı. Yapılan plazmit DNA'sı izolasyonu çalışması sonucunda, *Thermus* sp. M5 bakterisinin herhangi bir plazmit içermediği, *Thermus* sp. K6 bakterisinin 2 farklı plazmit içerdiği belirlendi (Şekil 3). Bu iki plazmitin boyutları yaklaşık olarak 2200 bp ve 1500 bp olarak belirlendi. Daha sonraki çalışmalar *Thermus* sp. K6 bakterisinden izole edilen yaklaşık 2200 bp büyüklükte olan plazmit üzerinden devam ettirildi.

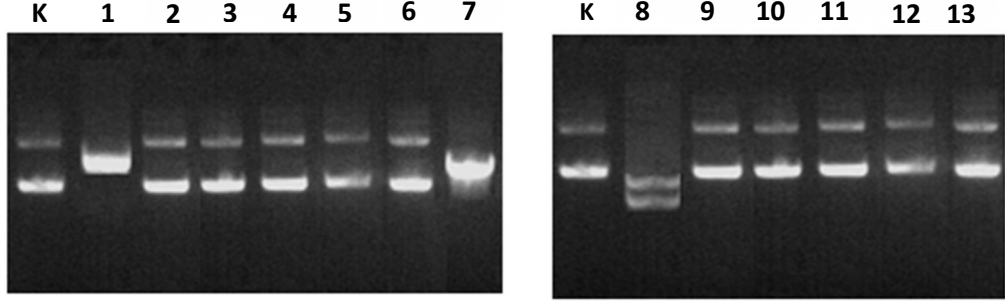


Şekil 3. *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 bakterilerinden plazmit izolasyonu. 1) Marker, 2) *Thermus* sp. K6'dan plazmit izolasyonu, 3) *Thermus* sp. M5'den plazmit izolasyonu

3.3. pHIG22' nin Restriksiyon Analizi

Restriksiyon analizinin yapılması için pHIG22 plazmiti Jel Ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden çıkarma yöntemi ile elde edildi. pHIG22 plazmiti için 13 farklı restriksiyon endonükleaz ile kesim reaksiyonları yapıldı. 2 kez tekrarlanan kesim sonuçları,

fragment büyüklüğü belli olan bir şahit DNA ile %0,7'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü, sonra BioDocAnalyze sistemiyle görüntüledi (Şekil 4).



Şekil 4. pHIG22'nin RE'ler ile kesimi. K) Kontrol olarak pHIG22, 1) pHIG22'nin *Bam*HI kesim sonucu, 2) pHIG22'nin *Bcl*I kesim sonucu, 3) pHIG22'nin *Hind*III kesim sonucu, 4) pHIG22'nin *Eco*RI kesim sonucu, 5) pHIG22'nin *Not*I kesim sonucu, 6) pHIG22'nin *Sma*I kesim sonucu, 7) pHIG22'nin *Nco*I kesim sonucu, 8) pHIG22'nin *Sau*3A kesim sonucu, 9) pHIG22'nin *Kpn*I kesim sonucu, 10) pHIG22'nin *Pst*I kesim sonucu, 11) pHIG22'nin *Sac*I kesim sonucu, 12) pHIG22'nin *Nde*I kesim sonucu, 13) pHIG22'nin *Bgl*II kesim sonucu

pHIG22 plazmitini *Bam*HI ve *Nco*I restriksiyon endonükleazlarının tek yerden, *Sau*3A endonükleazın ise 2 yerden kestiği, diğer restriksiyon endonükleazların herhangi bir bölgeden kesmediği belirlendi.

*Sau*3A restriksiyon endonükleazı ile yapılan kesim reaksiyonu sonucu oluşan 2 farklı büyüklükteki DNA fragmenti DNA Jel Ekstraksiyon kiti kullanılarak jelden çıkarıldı.

3.4. pHIG22'nin DNA Baz Dizininin Belirlenmesi

*Sau*3A ile yapılan kesim sonucu oluşan sırasıyla, yaklaşık 1000 bp ve 1200 bp boyutlarındaki fragmentler, T4 DNA ligaz (Promega) enzimi kullanılarak pUC18 vektörünün *Bam*HI bölgesine klonlandı.

Ertesi gün alınan ligasyon ürünleri önceden hazırlanan kompetant *E.coli* JM101 hücresine transforme edildi. Transformasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edildi. M13 Forward ve M13 Revers universal primerleri kullanılarak, Macrogen Inc., Seoul, Korea firması tarafından baz dizileri belirlendi. Baz dizileri belirlenen fragmentlerdeki en iyi okuma sonucu, 1000 bp uzunlukta olduğu tahmin edilen

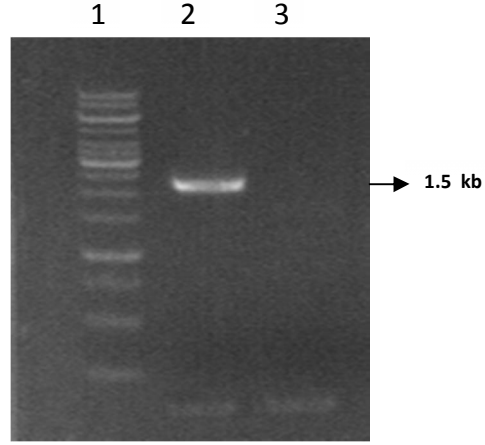
fragmentten elde edildi. Böylece pHIG22 plazmitinin 920 bp'lik kısmı elde edilmiş oldu (Tablo 13).

Tablo 13. pHIG22 plazmitinin 920 bp'lik kısmı

```
GCTCCAGCTCCACCGACGGAATGGGGCTAGAGCGAGCCTCTTCCCAGGCCCGCCTATCCCC
CTCCCGTAACGCCTCCCAAAGGACACGCTCAAGCTCGCCACTCTCCAAAAACACTCACCTC
CTGGTGTATCCGCCAGGAGGTGGGAGCGTCCTCGGGTTAGGGCCAGCTTCTCTTCGTCTCT
GCTTCCCCGCCCCCACGGCTAGGGGCCTCTTCTCACTCTCTTGCGCCGTGTGCCCAAACG
GGTAAGCTACTCACGTCAGGAAAGCCCCGCCTGGAGCGCCAACTCCCGGCGGCTTTTTTC
TTTGGGGGAATGGGACCCCCGTTAGGGGCCATGCTACTATGGTCAGCCGCTAGCTTGCAAC
CACAACACCTAACCAGACGGCCAGAAGAGCCAGCGGAAAGCCAGGCAGGAGCCTCATAACA
TGGCGACCACGAAGAAGTTAGGCAGGCGGGAGGCCCTCCCCATAGTCAAAGACCAGCCAGAA
CACCAAGGCCGCGCCTATTAGCGAAGCGGATGCGGAGAGCCCGCACCCGAAGCCGCAAGGCG
AAGTCAGAGCCCTCCCAACCCACCAACTCCCCAACCTCATGAAGGACTTCCCTAGGAACCT
CCCAGGAAGGAGCAGGCTCAACCTCAGCCCCCAGGATAGTGCCGAGACGGCGAGCGTACCG
AGCCCAGAAAAAGAGGCCCTGAGGCACCTCCCCCACGCCCTCTTCAACCGCCTCAGAGATG
CGCCCGATAACCCTGAAGCGCCAGACCCTTAGCCTCTTCCGCAAAGTCCATGCCTATCACCT
CTCTTCTCTCTTCTCCCTCTTCTCCACGCCAAGCCCTAGCATGAGAAGCCGACACCTGATG
ACGGGATGGAGCCCGGAGCCCGGAGCCATCCCGCCCAAGAGTGTAGGCCTGGGCGGGGTCC
CCGCC
```

pHIG22' nin tüm baz diziliminin kalan kısımlarının bulunması için ters PCR (inverse PCR) çalışması gerçekleştirildi. Bu nedenle, elde edilen bu fragment parçalarına ait baz dizimleri kullanılarak uç kısımlara yakın bölgelerden dış taraflara doğru olacak şekilde, 6 adet primer dizayn edildi.

PCR sonuçları % 0,7'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Bu primerler kullanılarak yapılan PCR'lar sonucunda; TherS_6P-1FW ve TherS_6P-1RW primerleri ile yapılan reaksiyondan yaklaşık 1500 bp büyüklükte fragment elde edildi (Şekil 5).



Şekil 5.Ters (invers) PCR ile çoğaltılan fragment
1) Marker, 2) PCR Ürünü 3) Kontrol

Elde edilen fragmentin baz dizilimi belirlenmek üzere, pGEM-T Easy vektörüne yapıştırıldı ve *E. coli* JM101 hücrelerine aktarıldı.

Transformasyon sonucunda oluşan kolonilerden seçilen klonlar izole edildi. Klonların baz sıraları SP6 ve T7 universal promoter primerleri ile okutuldu ve belirlendi.

Elde edilen baz sıraları ile daha önce belirlenen 920 bp uzunluğundaki fragmentin baz dizinleri Gentle ve BioEdit programları kullanılarak analiz edildi. Her iki fragmentin aşağı ve yukarı bölgelerinde çakışan baz dizileri bulundu, çakışan bölgelerdeki bazlar temizlendi, baz dizileri birleştirildi. Böylece pHIG22 plazmitinin tüm baz dizisi 2222 bp olarak bulundu (Tablo 14).

Tablo 14. pHIG22 plazmitinin tüm baz dizilimi

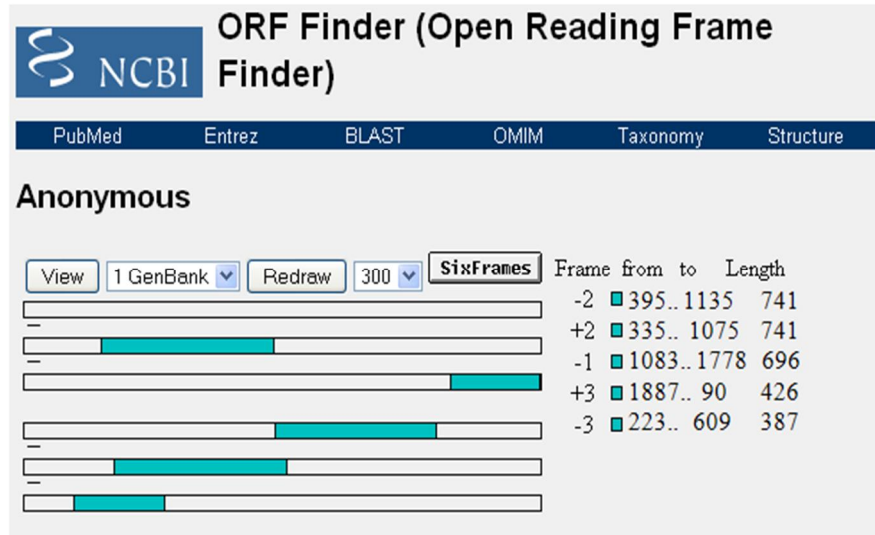
AGGATCCTCCCAGTCTATGGGCTCCAGCTCCACCGACGGAATGGGGCTAGAGCGAGCCTCT
 TCCCAGGCCCGCCTATCCCCCTCCCGTAACGCCTCCCAAAGGACACGCTCAAGCTCGCCAC
 TCTCCAAAAACACTCACCTCCTGGTGTATCCGCCAGGAGGTGGGAGCGTCCTCGGGTTAGG
 GCCAGCTTCTCTTCGTCTCTGCTTCCCCGCCCCCACGGCTAGGGGCCTCTTCTCACTCTC
 TTGCGCCGTGTGCCCAAACGGGGTAAGCTACTCACGTCAGGAAAGCCCCGCCTGGAGCGCC
 CAACTCCCGGCGGCTTTTTCTTTGGGGGAATGGGACCCCCGTTAGGGGCCATGCTACTATG
 GTCAGCCGCTAGCTTGCAACCACAACACCTAACCCAGACGGCCAGAAGAGCCAGCGGAAAG
 CCAGGCAGGAGCCTCATACATGGCGACCACGAAGAAGTTAGGCAGGCGGGAGGCCTCCCCA
 TAGTCAAAGACCAGCCAGAACACCAAGGCCGGCCTATTAGCGAAGCGGATGCGGAGAGCCC
 GCACCCGAAGCCGCAAGGCGAAGTCAGAGCCCTCCCAACCCACCAACTCCCCAACCTCATG
 AAGGACTTCCCTAGGAACCTCCAGGAAGGAGCAGGCTCAACCTCAGCCCCCAGGATAGTG
 CCGAGACGGCGAGCGTACCGAGCCCAGAAAAGAGGCCCTGAGGCACCTCCCCCACGCCT
 CTTCAACCGCCTCAGAGATGCGCCCCGATAACCCTGAAGCGCCAGACCCTTAGCCTCTTCCGC
 AAAGTCCATGCCTATCACCTCTCTTCTCTCTTCTCCCTCTTCTCCACGCCAAGCCCTAGCA
 TGAGAAGCCGACACCTGATGACGGGATGGAGCCCGGAGCCCGGAGCCATCCCGCCCAAGAG
 TGTAGGCCTGGGCGGGGTCCCCGCGTCAAGGGTGCAGAGCACCCCTCCGGGGCGGGCCTC
 TCGCATGTACAAACCCCGTCCTCGTGGCCTCCGGAAAACGTGCGTGATGGGATGGCCCGCC
 CTTCCGGGGCTAACGCCCTTGACGGCACCCCGCCCTAGCCAAGGCCTAGGCTTGGGGATGG
 CTCCGGGAAAATGCTCCAGGCTCATCAACCACCCCATGCCCGCTTCTGCTAACCCAGTCCA
 GTATTCCCAAGACTACCGGGTGAACCTTAGGTAGCCAGTAGAAGCGCCCCACGAGAACGCC
 ACGCTTCAGCCAGTCCCACACCCTCACCGCCTCCCATGGAAGGCGGGCCACCCGATCAGGC
 CCAACCACAAGCGGCACGGCCTCCTCCACCGCCCCAGGTCCTCCAGACTCTCCACCTCCC
 GGTAATCGCCAGGTACATATTGCCCCGAGCGAAGGCCATTTTGGCGTAGAGGAGGAGAAG
 CGAAGGGGTATCCAGGAGGAACCCACATTATGCCGCACTTGACGGGCATACGCCCGCCAG
 ACACCCGCCACGCCATAAGCACGCCCCAGTTTCCCGAAAAGGGCAAGTGCTTTTGCTCAG
 GCTTAGAGGCGTAGACCCTGGAATAGCGGAAGTCTCTCTCCCGCAGCGCCTCAATGCGGGT
 CCTGGACCGAATGCCCCCTAACGCCCGTTGCCACGCTTCTTCTATCCAGTCAGCCCAATCA
 CGCCAGGCCTCAGCATCAAGGTCCCCAATCCTAGCCAGGATATGCAAATGCGGAGCGGCAG
 GAGAACGATTCTGTTGAAACTCTAAGAAGAAGAGATAGGCCCAGTCTTCCCCCAGCGACT
 CAGACGCATGCGAAACGCATGCAGGAACCTATCCAGCGCACCCCGCCAGCGAGATAAGCGA
 GCCTCATCATCCGGAAGCTCCTCCCAAGCCTCAGGCGCAAGCGTCAGCGTGATGAGATGCG
 TAGGAGGAGGGGCATCAAGCTCCTCCAGGGTCAGCGTCAGCCTAACCAACCGCCTAATAGA
 CCCCCGCGAGCTACACCTCTCCCTAGACCCAGGCACCGGAGGAGGAGACTGAGGCTTCCCA
 AGGGGACTCAGGTGAGTCCCCAAGGGTAAACCCTTACACGCCACCTGGGTTTGTGCGACT
 TATGCACCGAAAGAGACAAGGACCGCCCCGCGGGGGGGCGGGCCTTCAGGCCCGGCCCC
 CCCCCGTCCAGTCCCGAGCCTTCCCTTGCAGATACCTCAGGCGCAGATAGGCCCGAGAG
 GCCTCCTCAGCAAACCGCCGACGAGC

pHIG22 plazmitinin 1 numaralı nükleotiti olarak, plazmitin *Bam*HI kesim bölgesinin 3 nükleotit yukarı bölgesindeki Adenin nükleotiti kabul edildi.

3.5. Biyoinformatik ve Diğer Analizler

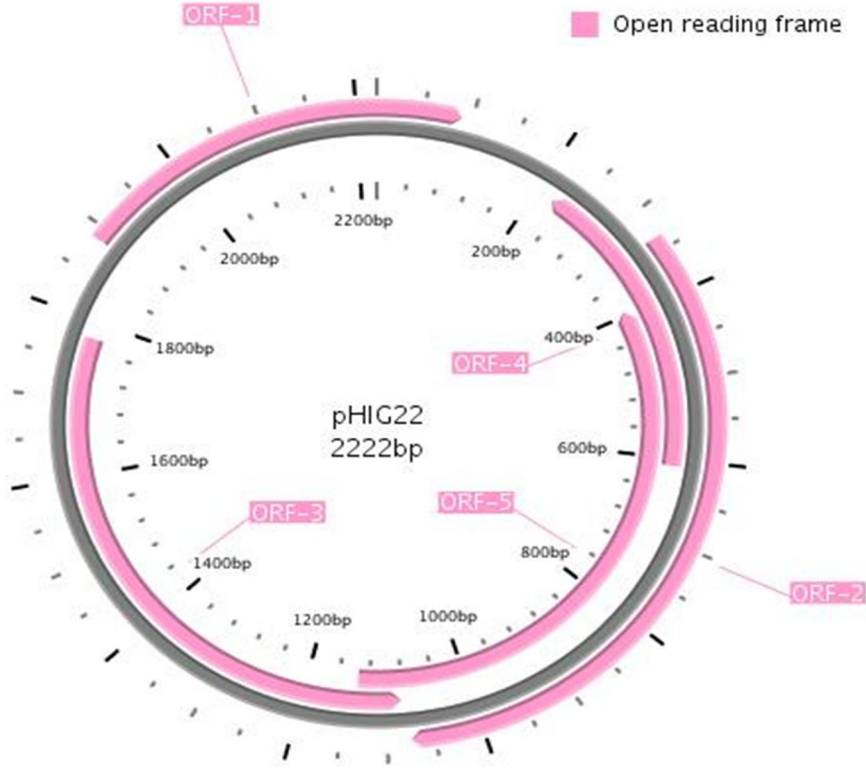
3.5.1. pHIG22'ye Ait Muhtemel ORF'lerin Belirlenmesi

pHIG22 plazmit genomu üzerindeki ORF'lerin belirlenmesi için GenBank'taki OriFinder (URL-1) programı kullanıldı. Program, ATG kodonu ile başlayıp TAG, TGA ya da TAA kodonlarından biriyle biten en az 300 bp uzunluğundaki fragmentleri ORF (Açık Okuma Çerçevesi) kabul edecek şekilde ayarlandı. Analiz hem ana zincirde hem de tamamlayıcı zincirde 6 farklı okuma çerçevesini kapsayacak şekilde yapıldı. Yapılan analiz sonucunda pHIG22 plazmitinde 5 ORF bölgesi belirlendi ve plazmitin GC oranı %63 olarak hesaplandı (Şekil 6).



Şekil 6. ORF Finder programıyla belirlenen muhtemel ORF bölgeleri

OriFinder programı ile tahmin edilen açık okuma çerçevelerinden; 426 bp olan ORF-1 ve 741 bp olan ORF-2'nin ana zincirde, 696 bp olan ORF-3, 387 bp olan ORF-4 ve 741 bp olan ORF-5'in de tamamlayıcı zincirde olduğu belirlendi. Tespit edilen 5 ORF bölgesinin şematik görüntüsünün elde edilmesi için PlasMapper (URL-2) programı kullanıldı (Şekil 7).



Şekil 7. pHIG22 üzerinde bulunan muhtemel ORF'lerin PlasMapper programıyla gösterilmesi

3.5.2. pHIG22 Plazmitinin Promotor Analizi

pHIG22 plazmitinin promotor analizinin yapılabilmesi için Promoter Predictor programı kullanıldı. Her iki zincirdeki tahmini promotor bölgeleri tespit edildi (URL-3). Yapılan analiz “1” üzerinden değerlendirilen bir skora göre yapıldı, “1” değerine en yakın bulunan skor en iyi değer olarak kabul edildi. Bu değerlere göre ilk zincirde herhangi bir promotor bölge bulunamadı. Karşı zincirde 2 promotor bölge tespit edildi. 0,80 ve 0,97 skor değerine sahip bu iki bölge için transkripsiyon başlama bölgesi olarak tahmin edilen nükleotit büyük harfle gösterildi (Tablo 15).

Tablo 15. Promoter Predictor programı ile yapılan promotör analizi

Promoter predictions for seq0 :

Start	End	Score	Promoter Sequence
-------	-----	-------	-------------------

Predictions for the reverse strand of seq0 :

Start	End	Score	Promoter Sequence
948	903	0.80	CTGCACCCTTGACGGCGGGGACCCCGCCCAGGCCTACACTCTTGGGCGGG
390	345	0.97	GGTGTGTGGTTGCAAGCTAGCGGCTGACCATAGTAGCATGGCCCCTAAC

Ayrıca ikinci bir program kullanılarak yapılan analizler karşılaştırıldı. Bunun için BPPROM programı kullanıldı. pHIG22 plazmiti için her iki zincirdeki tahmini promotör bölgelerinin (Tablo 16) bulunması amaçlandı (URL-3, 2011). Bu program bakterilerdeki operon ve genleri esas alarak ORF bölgelerinin yukarı bölgelerini tarama ve bu bölgelerdeki olası -10 ve -35 kutularını tahmin etme esasına dayanmaktadır. Yapılan analiz sonucunda, ilk zincirde herhangi bir promotör bölgeye rastlanılmadı fakat karşı zincirde 2 promotör bölge tespit edildi.

Tablo 16. BPPROM programı ile yapılan promotör analizi

```

Length of sequence-      2222
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      2
Promoter Pos:      280 LDF- 1.54
-10 box at pos.      265 GGGTAAGCT Score      58
-35 box at pos.      245 TTGCGC      Score      16
Promoter Pos:      1096 LDF- 0.98
-10 box at pos.      1081 GCCTAGGCT Score      28
-35 box at pos.      1056 TTGACG      Score      60

Oligonucleotides from known TF binding sites:

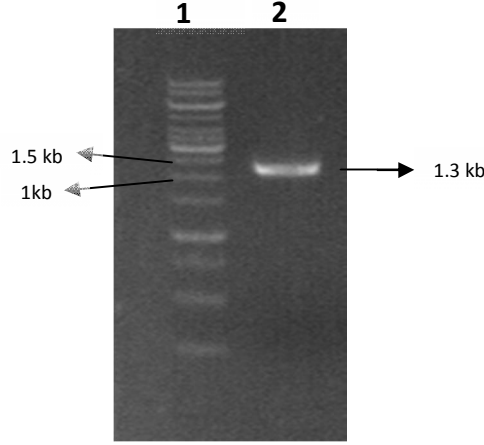
No such sites for promoter at      280
No such sites for promoter at      1096

```

3.6. pHIG22 Plazmitinin Replikasyon Orijininin ve Fonksiyonel Genlerinin Belirlenmesi

3.6.1. Kanamisin Kasetinin pDG782 Vektöründen PCR ile Çoğaltılması

Yaklaşık 1300 bp büyüklüğündeki kanamisin kaseti, *E. coli* DH5 α bakterisinden izole edilen pDG782 vektöründen, pKAN-Fw ileri ve KanR geri primerleri kullanılarak uygun PCR konsantrasyonları ve şartları sağlanarak çoğaltıldı. PCR sonuçları kontrol edilmek amacıyla BioDocAnalyze sistemi ile görüntüledi (Şekil 8). Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 C de muhafaza edildi.



Şekil 8. PCR ile çoğaltılan kanamisin kaseti 1) Marker, 2) Kanamisin Kaseti

3.6.2. pUC-HIGK Shuttle Vektörünün Tasarlanması

pUC18 vektörü ve pHIG22 plazmiti, firmanın öngördüğü şartlar sağlanarak *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tek noktadan kesildi. Kesim reaksiyonu sonucu her iki plazmit 5' ve 3' uçlarda yapışkan uçlar oluşacak şekilde lineer hale getirildi. Oluşan yapışkan uçların birleştirilmesi için T4 ligaz enzimi firmanın öngördüğü şartlar altında 16 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

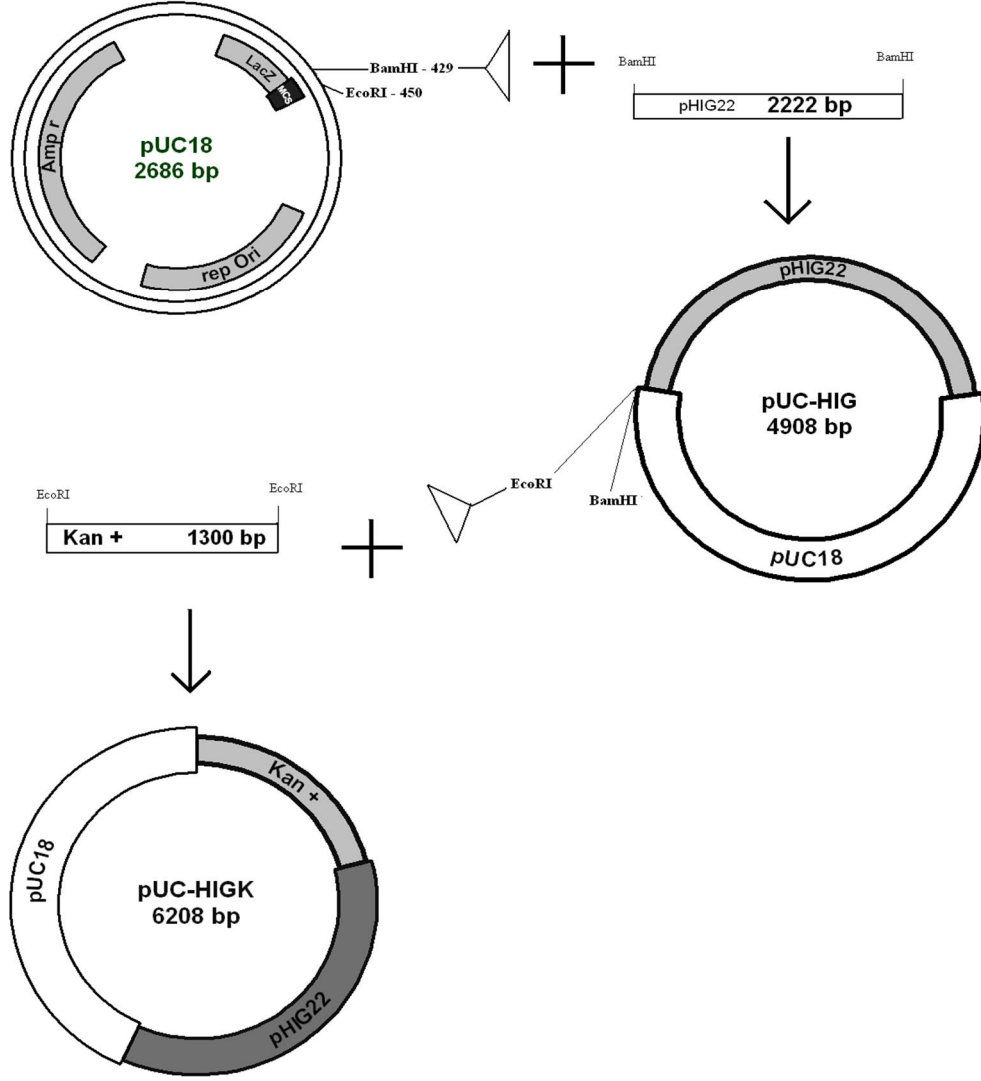
Rekombinant plazmitler seçildi ve klon olduğu belirlenen plazmitler üzerinden çalışma devam ettirildi.

pHIG22 plazmiti ile birleştirilen pUC18 vektörünün, firmanın öngördüğü şartlar sağlanarak *Eco*RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tek noktadan kesilerek her iki

ucunda yapışkan uç bırakması sağlandı. Kanamisin kasetinin aynı yapışkan uçlara sahip olabilmesi için, pKAN-Fw ve KanR primerleri ile çoğaltılarak pGEM-T easy Klonlama vektörüne klonlandı. pGEM-T Easy Klonlama vektöründen *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek çıkarıldı.

EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi ile tek noktadan kesilerek her iki ucunda yapışkan uç oluşturulan rekombinant pUC18 vektörü ve *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek pGEM-T vektöründen çıkarılan kanamisin kaseti, T4 ligaz enzimi ile firmanın öngördüğü şartlar altında 16 °C’de bir gece boyunca bekletildi.

Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı. Rekombinant plazmitler seçildi ve klon olan plazmitler elde edildi. pUC18, pHIG22 ve kanamisin kasetinin birleştirildiği pUC-HIGK vektörü elde edilmiş oldu (Şekil 9).



Şekil 9. pUC-HIGK vektörünün şematik olarak tasarlanması

pUC-HIGK vektörü *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine transforme edilmek üzere sonraki çalışmalar için -20 °C’de saklandı.

3.6.3. pHIG22 Plazmitinin Replikasyon Orijinin Belirlenmesi

Dizayn edilen ileri ve geri primerleri ile pHIG22 plazmitinin 5 farklı bölgesi (Tablo 17) PCR ile çoğaltıldı. pHIG22 plazmitinden PCR ile çoğaltılan 5 farklı bölge pGEM-T Easy vektörüne klonlandı ve her bir fragment *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek çıkarıldı. pET28a+ vektörü de *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek aynı yapışkan uçlara sahip hale getirildi.

pGEM-T klonlama vektöründen çıkarılan 5 farklı fragment, pET28a+ vektörüne ayrı ayrı klonlandı. Oluşan rekombinant plazmitler *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine transforme edilmek üzere -20 °C de muhafaza edildi.



Şekil 10. Dizayn edilen spesifik primerler

PCR ile çoğaltılan her fragmentin plazmit üzerindeki farklı muhtemel ORF bölgelerini içermesi sağlandı.

Tablo 17. PCR ile çoğaltılan farklı bölgeler

Kullanılan İleri Primerler	Kullanılan Geri Primerler	PCR Ürünü
pHG-3Fw	pHG-2Rw	2185 bp
pHG-4Fw	pHG-3Rw	2138 bp
pHG-5Fw	pHG-4Rw	2224 bp
pHG-6Fw	pHG-1Rw	721 bp
pHG-5Fw	pHG-6Rw	781 bp

3.7. *E.coli-Thermus* Shuttle Vektörlerinin *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) Bakterisine Transformasyonu

Doğal kompetant olan *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisi TM besiyerinde çoğaltıldı. Daha önce oluşturulan rekombinant plazmitler Koyama ve arkadaşlarının (1986) geliştirdiği yöntemle göre transforme edilmeye çalışıldı.

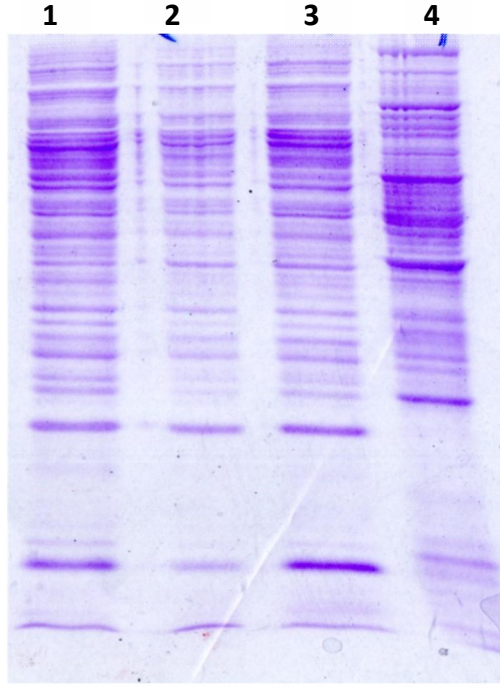
Yapılan transformasyon denemeleri sonucunda petriler üzerinde herhangi bir koloniye rastlanılmadı. Transformasyon protokolü 5 kez tekrarlandı ve aynı sonuçlar elde edildi.

Transformasyon prosedürü modifiye edildi ve protokol tekrarlandı. Yapılan çalışmalar sonucunda herhangi bir koloniye rastlanılmadı.

3.8. pHIG22 Plazmitinin Protein Profilinin İncelenmesi

E.coli JM101 bakterisi, pUC18 vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterisi, pUC-HIGK shuttle vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterisi ve pHIG22 plazmitini içeren *Thermus* sp. K6 bakterisinin protein profillerinin karşılaştırılması için, hücre içi proteinleri izole edildi.

İzole edilen hücre içi proteinler ile SDS-PAGE analizi yapıldı. Analiz sonucu elde edilen jel görüntüsü tarayıcı ile tarandı ve bilgisayar ortamına aktarıldı (Şekil 11). Protein bantlarının incelemesi sonucunda pUC-HIGK shuttle vektörünü taşıyan *E.coli* JM101 bakterisinin hücre içi protein profilinde herhangi bir farklı banta rastlanılmadı.



Şekil 11. SDS-PAGE analizi. 1) *E. coli* JM101, 2) pUC18 vektörünü içeren *E. coli* JM101, 3) pUC-HIGK vektörünü içeren *E. coli* JM101, 4) pHIG22 plazmitini içeren *Thermus* sp. K6

pHIG22 tarafından kodlanan herhangi bir proteinin ekspresyon seviyesinin düşük olması ve moleküler ağırlığının küçük olma ihtimaline karşılık Comassie Brilliant Blue ile boyanan protein bantlarının jel üzerinde görülememe ihtimali düşünüldü. Bu ihtimale karşılık protein bantlarının daha net bir biçimde görünmesini sağlayan gümüş boyama tekniği uygulandı. Yapılan analiz sonucu elde edilen jel görüntüsü tarayıcı ile tarandı ve bilgisayar ortamına aktarıldı (Şekil 12). Yapılan gümüş boyama sonucu herhangi farklı bir banta rastlanılmadı.

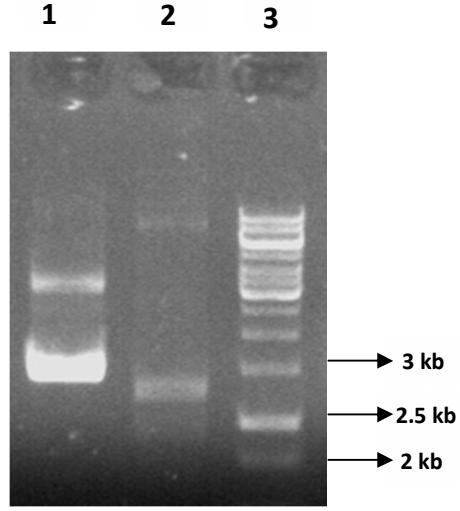


Şekil 12. Gümüş boyama sonucu elde edilen protein bantları. *E.coli* JM101, 2) pUC18 vektörünü içeren *E.coli* JM101, 3) pUC-HIGK shuttle vektörünü içeren *E.coli* JM101, 4) pHIG22 plazmitini içeren *Thermus* sp. K6

3.9. pHIG22'nin Kopya Sayısının Hesaplanması

pHIG22 plazmitini içeren *Thermus* sp. K6 ve pUC18 vektörünü içeren *E.coli* JM101 bakterilerinin ml'deki hücre sayısı hesaplandı. Alınan sıvı kültürlerin ml'sinde $3,27 \times 10^7$ *Thermus* sp. K6 hücresi, $5,27 \times 10^7$ *E.coli* JM101 hücresi olduğu belirlendi. Her kültürden eşit miktarda ($3,27 \times 10^7$) hücre alınarak plazmit izolasyonu yapıldı.

Hücre başına 690 plazmit (pUC18) içerdiği bilinen *E. coli* hücresi standart olarak alındı (Sambrook vd., 1989). *E.coli* JM101 ve *Thermus* sp. K6'dan izole edilen plazmitler agaroz jel elektroforezi ile görüntüledi ve bant yoğunlukları karşılaştırıldı. BioDocAnalyze 1.0 programı ile görüntülenen bantların yoğunlukları hesaplandı (Şekil 13).



Şekil 13. pHIG22'nin kopya sayısının belirlenmesi
1) pUC18, 2) pHIG22, 3) Marker

BioDocAnalyze 1.0 programı ile yapılan hesaplamaya göre pUC18 vektörünün bant yoğunluğunun pHIG22 plazmitinden 6.02 kat daha fazla olduğu belirlendi. Bu hesaplamaya göre pHIG22'nin hücre başına düşen kopya sayısı 114 ± 10 / hücre olarak belirlendi.

Bu analiz sonucuna göre pHIG22'nin yüksek kopyalı bir plazmit olduğu sonucuna varıldı.

4. TARTIŞMA

Bu çalışma, *Thermus* cinsine ait bir bakteriden daha önce tanımlanmamış bir plazmitin izolasyonunun ve karakterizasyonunun yapılmasını kapsamaktadır.

Termofilik bakterilerin özellikle büyüme sıcaklık aralığı, diğer ortam bakterileri ile kıyaslandığında yüksek olması nedeniyle endüstriyel açıdan oldukça önem arz etmektedir. İlgilenilen bakterinin termofilik bir karaktere ve yeni bir plazmite sahip olması, üzerine eğilinmesi gereken bir durumdur.

Thermus cinsine ait bakterilerden çok sayıda plazmit tanımlanmıştır (Eberhard vd., 1981). Fakat bu plazmitlerin çok azı karakterize edilmiştir ve fonksiyonları tam olarak belirlenememiştir (Takayama vd., 2004).

Kaplıcadan alınan su örneklerinden *Thermus* cinsine ait olduğu belirlenen iki bakteri izole edildi. Bu bakteriler *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 olarak adlandırıldı. Plazmit içerikleri incelenen bakterilerden *Thermus* sp. K6 bakterisinin 2 plazmite sahip olduğu belirlendi.

Thermus sp. K6 bakterisinden izole edilen 2 plazmitten biri üzerinden çalışmalara devam edildi ve bu plazmit pHIG22 olarak adlandırıldı. Plazmitin genom büyüklüğü 2222 bp olarak bulundu ve cryptic özellikte olduğu belirlenen plazmitin GC oranı % 63 olarak hesaplandı. Önceki çalışmalarda izole edilen *Thermus* cinsine ait plazmitlerin GC oranları pHIG22 plazmiti ile benzerlikler göstermektedir. *Thermus* sp. TK10 bakterisinden izole edilen pNHK101 plazmitinin GC oranı % 66,8 (Kobayashi vd., 2005), *Thermus* sp. 4C bakterisinden izole edilen pS4C ve pL4C plazmitlerinin GC oranları ise, sırasıyla % 58,25 ve 68,60 olarak belirlenmiştir (Ruan ve Xu, 2007). pHIG22 plazmitinin % 63 GC oranına sahip olması bu plazmitler ile benzer yapıda olduğunu göstermiştir.

pHIG22'nin restriksiyon analizi yapıldı. *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleaz tek kesim bölgesi, *Sau3A* enzimi 2 kesim bölgesi içerdiği belirlendi. *Sau3A* restriksiyon endonükleaz ile yapılan kesim sonucu elde edilen fragmentler pUC18 vektörüne klonlandı. pHIG22'nin başlangıçta, Macrogen (Kore) firmasına yaptırılan DNA sıra analizi sonucunda 920 bp'lik kısmı elde edildi. Daha sonra pHIG22'nin tüm baz diziliminin elde edilmesi için ters PCR çalışması yapıldı ve dizayn edilen primerler ile tüm baz dizilimi elde edildi.

Termofilik bakterilerden izole edilen plazmitler genelde büyük genomlara sahiptir ve tüm genomun aydınlatılması zahmetlidir (Makarova vd., 2002). Büyük genomun dezavantajları düşünüldüğünde, pHIG22 plazmitinin 2222 bp'lik küçük bir genoma sahip olması ve kopya sayısının yüksek olması (114 ± 10) yapılacak çalışmalar açısından büyük avantaj olarak görülmüştür. Ayrıca düşük moleküler ağırlığa sahip olmanın verdiği avantaj, konak endonükleazlarından etkilenme ihtimalinin de minimum seviyede olmasını sağlayacaktır (Primrose ve Twyman, 2006).

Küçük bir genoma sahip olan pHIG22'nin diğer termofilik bakterilerden izole edilen plazmitlere göre genom büyüklüğü ve kopya sayısı açısından daha avantajlı olması yapılan çalışmaların önemini artırmıştır.

Thermus cinsine ait cryptic plazmitlerde yapılan BLAST analizi sonuçlarında plazmitlerin baz dizilimlerinin diğer plazmitlere benzerliği çok az olarak belirlenmiştir (Hideo vd., 2005). Bu da bu cinse ait bakterilerde yeterli çalışma yapılmadığının göstergesidir. *Thermus* sp. TK10 bakterisinden izole edilen pNKH101 ve pKMH052 plazmitlerinin BLAST analizleri sonucu herhangi bir plazmite benzer sıralara sahip olmadığı görülmüştür (Hideo vd., 2005). Yapılan BLAST analizi sonucunda pHIG22'nin GenBank'ta herhangi bir sıraya benzerliği bulunamamıştır. *Thermus* cinsine ait plazmitlerin herhangi bir genoma ya da diğer plazmitlere benzer sıralar içermemesi nedeniyle fonksiyonel genlerinin belirlenmesi zorlaşmıştır. Bu dezavantaj, yeni termostabil proteinlerin bulunabilmesi ve karakterize edilmesi yönünden düşünüldüğünde avantaj olarak görülmektedir.

pHIG22 plazmitinin genomu üzerinde yapılan bilgisayar analizleri sonucunda 5 muhtemel ORF bölgesi belirlenmiştir. pHIG22'nin genom büyüklüğü ve cryptic özellikte olmasından dolayı, bu ORF'lerden en az birinin replikasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Thermus cinsine ait çoğu plazmit, replikasyonları için en az bir replikasyon proteini kodlamaktadırlar. repA adı verilen bu proteinin diğer plazmitlere ait replikasyon proteinlerine benzer sıralara sahip olduğu görülmüştür (Ruan ve Xu, 2007). *Thermus* cinsine ait plazmitlerin replikasyon proteinlerinin ayrıntılı olarak aydınlatılmamış olmasından dolayı bu benzerlik diğer türlere ait plazmitlere oranla daha azdır. Yapılan bir çok çalışmada aynı cinse ait birçok plazmit tanımlanmış ve bu plazmitlerin replikasyon proteinleri belirlenmiştir. Belirlenen gen sıralarından yola çıkarak birçok analiz programı tasarlanmıştır. Analiz programları ile plazmitlerin replikasyon orijinleri ya da

replikasyondan sorumlu genlerin baz sıraları tahmin edilmektedir. Bu da aynı cinse ait yeni bir plazmitin fonksiyonel genlerinin araştırılmasını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. *Thermus* cinsine ait çok az sayıda plazmitin fonksiyonel genleri belirlenmiştir. Bu da replikasyondan sorumlu genlerin analiz programları ile bulunma ihtimalini ortadan kaldırmıştır. Yapılan BLAST araştırmaları sonucunda, *Thermus* cinsi bakterilerden izole edilen plazmitlerin fazla homoloji göstermediği belirlenmiştir. Bu yüzden *Thermus* cinsine ait yeni plazmitlerin literatüre kazandırılarak sonraki çalışmalar için kolaylık sağlaması amaçlanmalıdır. pHIG22 plazmit genomu üzerinde bulunan muhtemel ORF bölgelerinin diğer *Thermus* cinsine ait plazmitlerin replikasyon proteinleri ile homoloji araştırması sonucu herhangi bir benzer sıraya rastlanılmamıştır.

Cryptic plazmitlerde, replikasyon orijini ve promotor bölgeler genellikle tek bir zincirde bulunmaktadır (Wang vd., 2009). Yapılan 2 farklı programla yapılan promotor analizleri sonucunda pHIG22 plazmitinin bir zincirinde 2 promotor bölge tespit edilmiştir. 2 analiz sonucunda bulunan diziler karşılaştırıldığında birbirine yakın diziler bulunmuştur. Bu diziler diğer termofilik plazmitlerle karşılaştırıldığında herhangi benzer bir sıra bulunamamıştır.

pHIG22 plazmiti *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek pUC18 vektörüne klonlandı. Termofilik bakterilerin yüksek sıcaklıklarda inkübe edilmesinden dolayı, marker olarak yüksek sıcaklıklarda degrades olmayan kanamisin antibiyotigi kullanıldı (Kobayashi vd., 2005). Bunun sağlanması için kanamisin direnç geni pDG782 plazmitinden PCR ile çoğaltıldı, pGEM-T klonlama vektörüne klonlandı ve *Eco*RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile çıkarıldı. Çıkarılan kanamisin kaseti aynı enzimle kesilen pUC18-pHIG22 plazmitine eklendi ve böylece *E.coli* ve *Thermus* cinsinde replike olabilecek pUC-HIGK shuttle vektörü elde edilmiş oldu (Şekil 9). Yapılan bir çalışmada *E.coli-Thermus* shuttle vektörleri dizayn edilmiştir. Dizayn edilen shuttle vektörler ile *Clostridium thermocellum cea* geni *Thermus thermophilus*'da ekspres edilmiştir (Lasa vd., 1992). Yapılan diğer bir çalışmada *Thermus thermophilus* için ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir (Masheda ve Hoshino, 1998).

pUC-HIGK shuttle vektörü *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine transforme edilmeye çalışıldı ama yapılan transformasyon çalışmalarından herhangi bir sonuç elde edilemedi. *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisinin restriksiyon-modifikasyon sisteminin pUC-HIGK shuttle vektörünün hücre içinde

muhafazasını engelleyebileceği düşünüldü. Bakteri içerisine plazmit DNA alınsa bile, bu DNA'nın hücre içinde degrede edildiği düşünüldü.

Bunların dışında, *Thermus thermophilus* HB27 TH104 bakterisi 10 kb'den daha büyük pTT8 plazmitini barındırmaktadır. Önceki yapılan çalışmalarda pTT8 plazmitini içeren suşların transformasyon veriminin daha fazla olduğu belirlenmiştir. pTT8 plazmitinin, transforme edilen diğer plazmitlerin hücredeki stabilitesini artırdığı görülmüştür (Kobayashi vd., 2005). Fakat transformasyon çalışmalarından herhangi bir sonuç elde edilememiştir. Bunun nedeninin plazmit uyumsuzluğu olabileceği düşünüldü, ayrıca *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisi ile yapılan transformasyon denemelerinde pTT8 plazmitinin bakterideki stabilitesinin fazla olduğu belirlenmiştir (Kobayashi vd., 2005). pUC-HIGK shuttle vektörünün *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine transforme edilememesinin nedeninin pTT8 plazmitinin pHIG22 plazmiti ile aynı ya da benzer replikasyon sistemini paylaşıyor olmasından kaynaklandığı ve pUC-HIGK shuttle vektörünün *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisinde replike olamadığı da düşünülmektedir.

pHIG22 plazmiti üzerinde belirlenen muhtemel ORF'lerin herhangi bir protein kodlayıp kodlamadığının belirlenebilmesi için SDS-PAGE analizi yapıldı. Elde edilen jel Comassie Brilliant Blue ve gümüş ile boyandı (Şekil 11 ve 12). pUC18 vektörü ve pUC-HIGK shuttle vektörlerinin ekspres ettiği protein bantları incelendiğinde herhangi farklı bir protein bantına rastlanılmadı. Bunun birkaç nedeni olabilir. İlki, pHIG22 plazmiti tarafından kodlanan proteinlerin *E.coli* proteazlarınca hücre içinde degrede edilmiş olma ihtimali; ikinci olarak, ekspresyon seviyelerinin çok düşük olması sebebiyle bu bantların belirlenmemesi veya *Thermus* promotorlarının *E.coli* RNA polimerazlarınca tanınamamış olması. Bu soru işaretlerinin giderilmesi için, *Thermus* sp. K6'da plazmit curing yöntemi yapılarak; plazmit içeren ve plazmit içermeyen hücrelerin proteinlerinin belirlenmesi düşünülmektedir. Belirlenen bu proteinlerin büyüklük ve MALDI-TOF analizleri yapılarak plazmitten kodlanan genlerin belirlenmesi düşünülmektedir.

Bütün bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, pHIG22 plazmitinin *Thermus* cinsine ait cryptic bir plazmit olduğu ve diğer plazmitlerle kıyaslandığında küçük bir genoma sahip olduğu olduğu belirlenmiştir. 2222 bp'lik bir genoma sahip olması ve hücrede çok kopyalı olarak bulunması yapılacak çalışmalar açısından plazmiti cazip hale getirmektedir. pHIG22 üzerinde yapılacak genetik modifikasyonlarla klonlama ve ekspresyon vektörü olarak kullanılabilmesi muhtemeldir.

5. SONUÇLAR

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan *Thermus* sp. K6' dan yeni, kriptomik, küçük, çok kopyalı bir plazmitin (pHIG22) izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu başlıklı bu çalışmadan şu sonuçlar elde edilmiştir.

Aydın Alangüllü kaplıcasından alınan su örneklerinden izole edilen 2 izolatın 16S rRNA analizi ile cinsleri belirlendi. *Thermus* cinsine ait olduğu belirlenen 2 bakteriye sırasıyla *Thermus* sp. K6 ve *Thermus* sp. M5 adları verildi.

Bu 2 bakteriye ait plazmit içerikleri araştırıldı. *Thermus* sp. M5 bakterisinin herhangi bir plazmit içermediği, *Thermus* sp. K6 bakterisinin 2 plazmit içerdiği belirlendi.

Thermus sp. K6 bakterisinden izole edilen 2 plazmitten biri üzerinden çalışmalara devam edildi ve bu plazmite pHIG22 adı verildi. Bu plazmitin herhangi bir fenotipik özellik göstermeyen %63 GC oranına sahip cryptic bir plazmit olduğu belirlendi. pHIG22'nin hücre başına düşen kopya sayısı 114 ± 10 olarak belirlendi.

pHIG22 plazmitinin restriksiyon analizi yapıldı. Yapılan kesim reaksiyonları sonucu *NcoI* ve *BamHI* restriksiyon endonükleazların tek noktadan, *Sau3A* restriksiyon endonükleazın 2 farklı noktadan kestiği belirlendi.

Sau3A restriksiyon endonükleazı ile yapılan kesim reaksiyonu sonucu oluşan fragmentler pUC18 klonlama vektörüne klonlandı, ters PCR ile tüm baz dizilimi ortaya çıkarıldı ve pHIG22'nin 2222 bp'lik bir genoma sahip olduğu belirlendi (Tablo 14).

DNA analiz programları kullanılarak, pHIG22 plazmitinin 5 açık okuma çerçevesi içerdiği tespit edildi. ORF-1 426 bp ve ORF-2 741 bp ana zincirde, ORF-3 696 bp, ORF-4 387 bp ve ORF-5 741 bp tamamlayıcı zincirde belirlendi.

pHIG22 plazmiti için promotor analizi yapıldı. 2 farklı programla yapılan analiz sonucunda tamamlayıcı zincirde 2 promotor bölge tespit edildi. 2 analiz sonucunun benzerlik göstermesi ile, bu bölgelerin promotor bölge olma ihtimalinin yüksek olduğuna karar verildi.

Tespit edilen ORF'lerin ve promotorlerin fonksiyonel olup olmadığının belirlenebilmesi için *E.coli-Thermus* shuttle vektörleri dizayn edildi ve *Thermus thermophilus* HB27 TH104 (pTT8) bakterisine aktarılmaya çalışıldı. Transformasyon denemeleri sonucunda herhangi bir sonuç elde edilemedi.

pUC18, shuttle vektörler, pHIG22 ve *Thermus* sp. K6'nın protein profilleri çıkarılarak karşılaştırıldı (Şekil 11 ve Şekil 12). Protein profillerinin incelenmesi sonucunda pHIG22 tarafından *E.coli'de* kodlanan herhangi bir protein belirlenemedi.

Yapılan bu çalışma sonucunda termofilik bakterilerde klonlama ve ekspresyon çalışmaları için kullanılabilir çok kopyalı, yeni bir plazmit literatüre kazandırıldı.

6. ÖNERİLER

Thermus cinsine ait olduğu belirlenen pHIG22 plazmitinin termofilik bakterilere gen aktarımında kullanılabilir şekilde modifiye edilmesi önerilmektedir.

Klonlama vektörü olarak kullanılabilmesi için plazmit üzerine antibiyotik direnç geni ve çoklu klonlama bölgesi eklenmesi gerekmektedir. Ekspresyon vektörü olarak kullanılabilmesi için plazmit üzerine ekspresyonu sağlayacak sekansların eklenmesi düşünülmektedir.

Plazmit üzerindeki ORF bölgelerinin fonksiyonlarının belirlenip, literatüre kazandırılarak diğer çalışmalara kaynak teşkil etmesi önerilmektedir.

pHIG22 plazmitinin *E.coli* ve *Bacillus* cinsi bakterilerde kullanılan klonlama ve ekspresyon vektörleri ile shuttle vektörler oluşturulması önerilmektedir. Böylece ekonomik yönden değerli enzimleri kodlayan genlerin klonlanmasının ve ekspresyonunun daha verimli halde yapılabileceği düşünülmektedir.

pHIG22 plazmitinin replikasyondan sorumlu baz dizisinin, diğer fonksiyonel genlerinin ve ürünlerinin karakterizasyonun yapılması için, mRNA izolasyonu, cDNA eldesi ve spesifik primerler ile RT-PCR yapılması düşünülmektedir.

Thermus sp. K6'da acridine orange ile plazmit curing yöntemi yapılarak; plazmit içeren ve plazmit içermeyen hücrelerin proteinlerinin karşılaştırılıp, farklı proteinlerin büyüklük ve MALDI-TOF analizleri yapılarak plazmitten kodlanan genlerin belirlenmesi düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Akhmaloka, A., Suharto, S., Nurbaiti, I.,N., Tika, F. ve Warganegara, M., 2006. Ribotyping Identification of Thermophilic Bacterium from Papandayan Crater. PROC.ITB. Eng. Science, 38, 1-10.
- Austin, S.J. ve Nordstrom, K., 1990. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. Cell, 60, 351-354.
- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.,F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L. ve Aragno, M., 1996. Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80°C). Appl. Env. Microbiol., 62, 1723-1727.
- Belduz, A.,O., Lee, E.,J. ve Harman, J.,G., 1993. Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*: targeting positions 72 and 82 of the cyclic nucleotide binding pocket. Nuc. Acids. Res., 21, 1827-1835.
- Benson, H.,J., Microbiological Applications, a Laboratory Manual in General Microbiology, Fourth Edition, Wm C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1985.
- Bingle, L.,E. ve Thomas, C.,M., 2001. Regulatory circuits for plasmid survival. Curr Opin Microbiol., 4, 194–200
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Brock, T.,D., Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology, Brock, T.D., JohnWiley and Sons, New York, 1986.
- Bruggemann,H. ve Chen,C., 2006. Comparative genomics of *Thermus thermophilus*: Plasticity of the megaplasmid and its contribution to a thermophilic lifestyle. J. Biotechnol., 124, 654–661.
- Clarck, D.,P., 2010. Molecular Biology, Update Edition, Apcell Press, California.
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.,J., Espinosa, M. ve Diaz-Orejas,R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 434–464.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I.,J. ve David, S.,W., 2004. PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. Nucleic Acids Res., 32, 660-664.
- Dulger, S., 1997. Ayder Kaplıcasından Termofilik Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Eberhard, M.,D., Vasquez, C., Valenzuela, P., Vicuna, R. ve Yudelevich, A., 1981. Physical characterization of a plasmid (pTT1) isolated from *Thermus thermophilus*. Plasmid, 6, 1–6.
- Ferdows, M.,S., Serwer, P., Griess, G.,A., Norris, S.,J. ve Barbour, A.,G., 1996. Conversion of a linear to a circular plasmid in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. J. Bacteriol., 178, 793–800.
- Gao, F. ve Zhang, C.,T., 2008. Ori-Finder: a web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes. BMC Bioinformatics,1, 9-79.
- Gomes, J. ve Steiner, W., 2004. Extremophiles and extremozymes, Food Technol. Biotechnol., 42, 4, 223-235.
- Gray, M.,W., Sankoff, D. ve Cedergren, R.,J., 1984. On the Evolutionary Descent of Organisms and Organelles: A Global Phylogeny Based on a Highly Conserved Structural Core in Small Subunit Ribosomal RNA. Nucleic Acids Res., 12, 5837-5852.
- Hall, T.,A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp., November 1999, Oxford, 41, 95-98.
- Ingmer, H. ve Cohen, S.,N., 1993. Excess intracellular concentration of the pSC101 RepA protein interferes with both plasmid DNA replication and partitioning. J. Bacteriol., 175, 7834-7841.
- Kalendar, R., Lee, D. ve Schulman, A.,H., 2009. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. Genes, Genomes and Genomics, 3, 1, 1-14.
- Kobayashi, H., Kuwae, A., Maseda, H., Nakamura, A. ve Hoshino, T., 2005. Isolation of a low-molecular-weight, multicopy plasmid, pNHK101, from *Thermus* sp. TK10 and its use as an expression vector for *T. thermophilus* HB27. Plasmid, 54, 70-79.
- Koyama, Y., Hoshino, T., Tomizuka, N. ve Furukawa, K., 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. J. Bacteriol., 166, 338–340.
- Laemli, U.,K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lasa, I., Grado, M., Pedro, M.,A. ve Berenguer, J., 1992. Development of *Thermus-Escherichia* Shuttle vectors and their use for expression of the *Clostridium thermocellum celA* Gene in *Thermus thermophilus*. Journal of bacteriology, 174, 6424-6431.
- Luria S., 1984. “A slot Machine, A Broken Test Tube”, Harper ve Row.

- Makarova, G., Aravind, L., Grishin, N.,V., Rogozin, I.,B. ve Koonin, E.,V., 2002. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and Bacteria predicted by genomic context analysis. Nucleic Acids res, 30, 482-496
- Maseda, H. ve Hoshino, T., 1998. Development of expression vectors for *Thermus thermophilus*. J. Ferment. Bioeng, 86, 121–124.
- Miller, C.,A. ve Cohen, S.,N., 1993. The partition (par) locus of pSC101 is an enhancer of plasmid incompatibility. Mol. Microbiol., 9, 695–702.
- Primrose, S.,B., Derbyshire, P., Jones, I.,M., Robinson, A. ve Ellwood, D.,C., 1984. The application of continuous culture to the study of plasmid stability. In *Continuous Culture* 8, Edited by Dean, A. C. R., Ellwood D. C. & Evans C.G.T., 213- 238, Chichester: Ellis Horwood.
- Primrose, S.,B. ve Twyman, R.,M., 2006. Principles of Gene Manipulations and Genomics, Seventh Edition, Blackwell Publishing, Australia.
- Reese M.,G., 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome, Comput. Chem., 26, 1, 51-6.
- Relman, D.,A., Schmidt, T.,M., MacDermott, R.,P. ve Falkow, S., 1992. Identification of The Uncultured *Bacillus* of Whipple's Disease. N. Engl. J. Med., 327, 293-301.
- Sambrook, J., Fritsch, E.,F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Volume 2, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schrenpf, H., Bujard, H., Hopwood, D.,A. ve Goebel, W., 1975. Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor* A3(2). J. Bacteriol., 121, 416–421.
- Sneath, A.,P., 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Sneath, A.P., Mair, N.S., Sharpe, M.S. ve Holt, J.G., Volume 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Stackebrant, E. ve Goebel, B.,M., 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol., 44, 846-849.
- Stetter, K.,O., 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification and properties. In *Extremophiles -Microbial Life in Extreme Environments*. Edited by Horikoshi, K., Grant, W.D., 1-24, Wiley-Liss, New York.
- Stiffler, P.,W., Sweeney, H.,M., Schneider, M. ve Cohen, S., 1974. Isolation and characterization of a kanamycin resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 6, 5-16.
- Takayama, G., Kosuge, T., Maseda, H., Nakamura, H. ve Hoshino, O., 2004. Nucleotide sequence of the cryptic olasmid pTT8 from *Thermus thermophilus* HB8 and

isolation and characterization of its high-copy-number mutant. Plasmid., 51, 227-237.

Tomizawa, J. ve Itoh, J., 1981. Plasmid ColE1 incompatibility determined by interaction of RNA1 with primer transcript. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 6096-6100.

Twigg, A.,J. ve Sherratt, D., 1980. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. Nature., 233, 216-218.

Twyman, R.,M., 1998. Advanced Molecular Biology, BIOS Scientific Publishers Limited, First Edition, UK.

URL-1. <http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper/>. 17 Mayıs 2011

URL-2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>. 16 Mayıs 2011

URL-3. <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>. 10 Mayıs 2011

URL-4. http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html. 15 Mayıs 2011

Voskuil, M.,I. ve Chambbiss, G.,H., 1993. Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 59, 1138-1142

Wang, Z., Jin, L., Yuan, Z., Wegrzyn, G. ve Wegrzyn, A., 2009. Classification of plazmit vectors using replication origin, selection marker and promoter as a criteria. Plasmid, 61, 47-51.

Williams, R.,A.,D., Simith, K.,E., Welch, S.,G., Micallef, J. ve Sharp, R.,J., 1995. DNA relatednes of *Thermus* suşs, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 495-499.

Williams, R.,A.,D. ve Da Costa, M.,S., 1994. The Genus *Thermus* and Related Microorganisms, Prokaryotes, Ed:Ballows A., Türüper H.G., Dworkin M., Harder W., Shleifer K.-H., 3745-3750, Springer.Verlag, New York.

ÖZGEÇMİŞ

24.05.1982 tarihinde Sivas'ta doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'ta tamamladı. 2008 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı ile mezun oldu. Şubat 2009 K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı. Ocak 2009'dan itibaren Artvin Çoruh Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. İyi derecede İngilizce bilmektedir.