

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



ASPERGİLLUS FLAVUS KARBONİK ANHİDRAZ GENİNİN
KLONLANMASI VE *E. COLI*'DE EKSPRESYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZARİF ECE CEYLAN

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



ASPERGİLLUS FLAVUS KARBONİK ANHİDRAZ GENİNİN
KLONLANMASI VE *E. COLI*'DE EKSPRESYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZARİF ECE CEYLAN

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Zarif Ece Ceylan tarafından hazırlanan “*ASPERGİLLUS FLAVUS* KARBONİK ANHİDRAZ GENİNİN KLONLANMASI VE *E. COLİ*’DE EKSPRESYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 19.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç. Dr. Tülin AŞKUN

Eş Danışman

Yrd. Doç. Dr. Hatice YILDIRIM

Üye

Prof. Dr. Feray KOÇKAR

Üye

Prof. Dr. Nuri NAKİBOĞLU

Üye

Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Üye

Yrd. Doç. Dr. Funda YÜKRÜK



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

**Bu tez alışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi
(BAP)tarafından 2011/19nolu proje ile desteklenmiştir.**

ÖZET

**ASPERGİLLUS FLAVUS KARBONİK ANHİDRAZ GENİNİN
KLONLANMASI VE E. COLİ'DE EKSPRESYONU ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZARIF ECE CEYLAN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. TÜLİN AŞKUN)
(EŞ DANIŞMAN: YRD. DOÇ. DR. HATİCE YILDIRIM)
BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013**

Araştırmamızda Balıkesir ili ve çevresinde satışa sunulan çeşitli çavdar örnekleri küf florası bakımından incelenmiştir. İl çevresindeki çeşitli köy ve ilçelerden temin edilen 10 çavdar örneğinde bulunan *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) fungal türünün izolasyonu ve tanılanması amaçlanmıştır. Toplam 601 küf izole edilmiş ve 22 adet mikotoksijenik etki yapan küf türleri arasında olan *A. flavus* türü tanımlanmıştır.

Ayrıca, *A. flavus* beta Karbonik Anhidraz (CA) ailesinden olan *A. flavus*'a ait karbonik anhidraz geninin klonlanması ve rekombinat proteinin *E. coli*'de üretilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda *A. flavus*'da RNA izolasyonunun ardından RT-PCR stratejisi ile *A. flavus* CA geni pGEM-T vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan genin dizi analizi sonucu, cDNA ile % 99 oranında homoloji göstermiş, genin 94. pozisyonunda 189 bazlık ve 234. pozisyonunda 87 bazlık olmak üzere 2 adet insersiyon gözlenmiş ve ayrıca delesyon, yer değişime mutasyonları taşıdığı belirlenmiştir. Putatif gen ürününün ifade olup olmadığı belirlenmesi için gen pET30a(+) ekspresyon vektörüne alt klonlanmıştır. Protein ekspresyonu, *E. coli*'de optimize edilen koşullarda BL21(DE3) kodon plus hücrelerinde IPTG ile indüklenerek yapılmıştır. SDS PAGE analizi ve takiben Western Blot analizi ile protein ürününün ifade olmadığı belirlenmiştir. Genin taşıdığı olduğu insersiyon, delesyon ve yer değiştirme mutasyonları baz alındığında, olası yalancı gen (pseudogen) olduğu düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER:Karbonik anhidraz, Fungus, *Aspergillus flavus*, RT-PCR, RNA izolasyonu, Sekonder metabolitler, Ekspresyon

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION OF *ASPERGILLUS FLAVUS* CARBONIC ANHYDRASE GENE

MSC THESIS

ZARIF ECE CEYLAN

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. TÜLİN AŞKUN)

(CO-SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. HATİCE YILDIRIM)

BALIKESİR, AUGUST 2013

In this study variety of rye which is offered for sale in province of Balıkesir and surrounding area was examined in terms of mold flora. Isolation and identification of fungal *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) species from ten different rye sample obtained from various villages and towns around the city was aimed. Totally 601 mold were isolated and 22 *A. flavus* species which have mycotoxigenic effect were identified.

Further cloning of *A. flavus* carbonic anhydrase which belongs to β -CA family and expression of recombinant protein in *E. coli* was also aimed. Therefore *A. flavus* CA gene was cloned into pGEM-T vector based on RT-PCR strategy after isolation of RNA from *A. flavus*. Sequence analysis revealed 99% homology with cDNA. Two insertion, deletion and substitution mutations at the 94bp and 234bp positions with the size of 189bp and 87bp was determined. To determine whether the putative gene product expression it was subcloned into pET30a(+) expression vector. Protein expression was optimised in *E. coli* BL21(DE3) Codon plus cells induced with IPTG. SDS-PAGE analysis followed with Western-blot was revealed that a protein product wasn't expressed. It is thought to be a possible pseudogene from insertion, deletion and substitution type of gene mutations.

KEYWORDS: Carbonic anhydrases, Fungi, *A. flavus*, RT-PCR, RNA extracting, Secondary metabolites, Expression

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Funguslar ve Mikotoksinler.....	2
1.1.1 Funguslar Hakkında Genel Bilgi	2
1.1.2 Mikotoksinler.....	4
1.1.3 Tarımsal Ürünler ve Gıdalarda Fungal Gelişimi Etkileyen Faktörler	7
1.2 Aspergillus.....	7
1.3 Karbonik Anhidraz (CA) Enzim Ailesi.....	10
1.3.1 Karbonik Anhidrazlar(CA) ve Sınıflandırılması	10
1.3.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları	11
1.3.3 Beta Karbonik Anhidraz Enzimi.....	12
1.4 Fungal Karbonik Anhidrazlar.....	13
1.4.1 Karbondioksitin Önemi.....	13
1.4.2 Funguslara Ait Alfa (α -) ve Beta (β -) Karbonik Anhidrazlar	14
1.5 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu	20
1.5.1 Kullanılacak Ekspresyon Vektörlerinin Genel Özellikleri	21
1.5.2 Prokaryotik Ekspresyon Sistemleri.....	22
1.5.3 pET Ekspresyon Vektör Sistemi.....	23
1.6 Çalışmanın Amacı	26
2. MATERYAL VE METOD.....	27
2.1 Materyal.....	27
2.1.1 Mikrobiyolojik Materyaller	27
2.1.1.1 Araştırma Materyali	27
2.1.1.2 Kullanılan Besiyerleri	28
2.1.1.3 Çözeltiler	31
2.1.2 Moleküler Biyoloji materyalleri	31
2.1.2.1 Kullanılan Besiyerleri	31
2.1.2.2 Kullanılan Kimyasallar	32
2.1.2.3 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri.....	32
2.1.2.4 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları.....	34
2.1.2.5 Bakteriyel Hücre Soyları.....	34
2.1.2.6 Plazmidler	34
2.1.2.7 Tamponlar ve Çözeltiler.....	36
2.1.2.8 E.coli için Bakteriyel Kültür Ortamları.....	37
2.1.2.9 Antibiyotiklerin Hazırlanması.....	37
2.1.2.10 Agaroz Jel Elektroforezi Tamponları.....	37
2.1.2.11 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Solüsyonu ...	38
2.1.2.12 Protein Ekspresyonunda Kullanılan Tamponlar	39
2.1.2.13 SDS – Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları.....	40

2.2	Metot	44
2.2.1	Mikrobiyolojik Yöntemler	44
2.2.1.1	Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması	44
2.2.1.2	Örneklerin Analize Hazırlanması.....	44
2.2.1.3	İzolatların tanınması	45
2.2.1.4	Seloteyp-Bant Metodu	46
2.2.1.5	Lam – Lamel Arası İnceleme Yöntemi	46
2.2.1.6	Kültürlerin Saklanması Kullanılan Yöntemler.....	46
2.2.2	Moleküler Biyoloji Yöntemleri	47
2.2.2.1	RNA İzolasyonun Yapılması	47
2.2.2.2	RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	50
2.2.2.3	Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	50
2.2.2.4	RT- PCR Reaksiyonu	51
2.2.2.5	Primerlerin Tasarlanması	52
2.2.2.6	Semi Kantitatif RT- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	53
2.2.2.7	Agaroz Jel elektroforezi	54
2.2.2.8	PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması	55
2.2.2.9	Spektrofotometrik Yöntemler	55
2.2.2.10	Plazmit DNA İzolasyonu	56
2.2.2.11	Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim	56
2.2.2.12	PCR Ürünlerinin pGEM-T Vektör Sistem I 'e Ligasyonu.....	56
2.2.2.13	Ligasyon.....	57
2.2.3	Bakteri Deneyleri	57
2.2.3.1	<i>DH5α</i> Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi	57
2.2.3.2	BL21(DE3)Kodon Plus Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi.....	58
2.2.3.3	Ampisilinli LB Agar Petrilerinin Hazırlanması	58
2.2.3.4	Kanamisinli LB Agar Petrilerinin Hazırlanması.....	59
2.2.3.5	Transformasyon.....	59
2.2.3.6	Gliserol Stoğun Hazırlanması	60
2.2.4	Rekombinant Proteinin Ekspresyonu, Analizi ve Saflaştırılması.....	60
2.2.4.1	Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi	60
2.2.4.2	Hücrelerin Yıkınması	60
2.2.4.3	Lizis İşlemi.....	61
2.2.5	SDS PAGE.....	61
2.2.6	WESTERN BLOT	62
3.	Bulgular.....	64
3.1	Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	64
3.1.1	Küf Sayımı Sonuçları.....	64
3.1.2	Çavdar Örneklerinden İzole Edilip Tanımlanan Fungal Tür	66
3.1.2.1	İzole Edilip Tanımlanan <i>A. flavus</i> Mikrofungusun Sistematığı	66
3.1.2.2	<i>Aspergillus flavus</i> Türünün Makroskobik özellikleri.....	66
3.1.2.3	<i>Aspergillus flavus</i> Türünün Makroskobik özellikleri.....	67
3.2	Moleküler Biyoloji Analiz Sonuçları	69
3.2.1	Farklı <i>Aspergillus</i> Türlerinde Karbonik Anhidraz Proteinlerinin Biyoinformatik Analizi.....	69
3.2.2	<i>Aspergillus Flavus</i> Karbonik Anhidraz Geninin Klonlanması	72
3.2.3	<i>A.flavus</i> Karbonik Anhidraz Geninin Biyoinformatik Analizi	76
3.2.4	<i>A. flavus</i> Karbonik Anhidraz Geninin pet30a(+) Vektörüne Alt Klonlanması.....	81

3.2.5	Rekombinant <i>A. flavus</i> Karbonik Anhidraz Geninin <i>E. coli</i> 'de Ekspresyonu.....	82
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	85
5.	KAYNAKLAR	89
6.	EKLER	100
6.1	Kullanılan Markerlar	100

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Mikotoksin üretiminde, geninin transkripsiyonunda görev alan düzenleyici bileşenlerin şematik gösterimi.	6
Şekil 1.2: Aspergillus morfolojik yapının şematik gösterimi	8
Şekil 1.3: Bir β -Ca olan Can2 ve çözünür Adenil siklaz'ın Can1 ile aracılığı ile <i>C. neoformans</i> 'da kapsül biyosentezinin regulasyonu	17
Şekil 1.4: Fungal bir Patojen olan <i>C. albicans</i> ve <i>C. neoformans</i> 'da karbondioksitin.....	18
Şekil 1.5: <i>Sordaria macrospora</i> 'da bikorbonat regulasyonunu ve karbondioksitin fungal hücrelerden difüzyon ve transport sistemlerle taşınımını gösteren model	20
Şekil 1.6: pET Ekspresyon Vektör Sistemi	24
Şekil 1.7: Rekombinant Proteinin Ekspresyon Mekanizması	25
Şekil 1.8: Tez çalışma diyagramı	26
Şekil 2.1: Örneklerinin toplandığı bölge haritası	28
Şekil 2.2: pGEM-T easy Vektör haritası	35
Şekil 2.3: pET30a(+) Vektör haritası	35
Şekil 2.4: Dilüsyon (seyreltme) tekniğinin şematik olarak gösterimi	45
Şekil 2.5: <i>Aspergillus flavus</i> karbonik anhidraz genin 475 baz çiftlik nükleotid dizisi	52
Şekil 3.1: <i>Aspergillus flavus</i> makroskobik ve mikroskobik özellikleri	68
Şekil 3.2: Fungal β -sınıf CA enziminin aktif katalitik bölgelerindeki çinko (Zn^{2+}) iyonu konumuna göre multiple sequence alignment çalışması	70
Şekil 3.3: Fungal β -CA enziminin aktif katalitik bölgelerindeki çinko (Zn^{+2}) konumuna göre filogenetik ağacı	71
Şekil 3.4: <i>A. flavus</i> ve <i>A. oryzae</i> 'nin beta karbonik anhidraz genlerinin ikili karşılaştırması.....	71
Şekil 3.5: <i>A. flavus</i> Mobio mikrobiyal RNA izolasyon Kit, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü	72
Şekil 3.6: <i>A. flavus</i> Qiagen Plant Mini Kit, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü.....	73
Şekil 3.7: <i>A. flavus</i> STE ve değiştirilmiş STE Metod RNA İzolasyonu, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü	73
Şekil 3.8: <i>A. flavus</i> Trizol RNA İzolasyonu, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü.....	74
Şekil 3.9 : <i>A. flavus</i> Ca geni PCR amplifikasyonu Agaroz Jel Elektrofrez Görüntüsü	75
Şekil 3.10: pGEM-T rekombinat kontrolü	75
Şekil 3.11: Dizi analizinden gelen forward ve reverse primerlerinin hizalanması.....	77
Şekil 3.12: Dizi analizinden elde edilen sonuçlar ile <i>A. flavus</i> β -CA geninin (XM_002378906) BLAST sonucu.....	78
Şekil 3.13: Analiz edilen <i>A. flavus</i> β -CA genin blast sonucu diyagramı.....	78
Şekil 3.14: Elde ettiğimiz <i>A. flavus</i> protein dizi	79
Şekil 3.15: Klon <i>A. flavus</i> , bizim klonladığımız gen ve databankasındaki <i>A. flavus</i> protein dizisinin karşılaştırması.....	80

Şekil 3.16 : pET30a(+) restriksiyon kesim sonucu	81
Şekil 3.17 : pET30a(+) ve <i>A. flavus</i> CA Geninin Agoroz Jel Elektroforez Görüntüsü.....	82
Şekil 3.18: SDS PAGE Görüntü.....	84
Şekil 3.19: Western blot jel görüntüsü.....	84

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Önemli mikotoksinler, Üretici küfler, Etkileri ve Buldukları ürünler	5
Tablo 1.2: Funguslarda β -CA'ların fonksiyonel olarak karakterizasyonu.....	15
Tablo 2.1: Toplanan örneklerin numarası, cinsi ve toplandığı yer.....	27
Tablo 2.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazları ve modelleri	33
Tablo 2.3: Liziz tamponu	36
Tablo 2.4: Formaldehit agaroz elektroforezi jel tamponu.....	36
Tablo 2.5: Formaldehit jel elektroforez tank tamponu.....	37
Tablo 2.6: (0,5)X-TBE (Tris-Borat) tamponu.....	38
Tablo 2.7: 6X DNA Yükleme tamponu	38
Tablo 2.8: Kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar	38
Tablo 2.9: Tritilasyon tamponu.....	39
Tablo 2.10: Bakteri yıkama tamponu.....	39
Tablo 2.11: Liziz tamponu	40
Tablo 2.12: %10 Ayırma Jeli	41
Tablo 2.13: Yığıma jeli	41
Tablo 2.14: Tank tamponu	41
Tablo 2.15: Yükleme boyası	42
Tablo 2.16: Boyama çözeltisi.....	42
Tablo 2.17: Transfer tamponu.....	42
Tablo 2.18: 10XTBS	43
Tablo 2.19: Bloklama tamponu.....	43
Tablo 2.20: Reverse transkripsiyon bileşenleri	51
Tablo 2.21: Reverse transkripsiyon bileşenleri	51
Tablo 2.22: <i>A. flavus</i> CA ve Beta Aktin genine spesifik olarak tasarlanan primerler	53
Tablo 2.23: PCR reaksiyonu	54
Tablo 2.24: PCR koşulları	54
Tablo 2.25: Restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu.....	56
Tablo 3.1: Çavdar örneklerinden izole edilen küflerin sayısı	64
Tablo 3.2: <i>Aspergillus flavus</i> olarak tanımlanan suşlar.....	65
Tablo 3.3 : İzole edilen mikrofungusların ve <i>A. flavus</i> fungal türünün örneklere göre dağılımı	65
Tablo 3.4: <i>Aspergillus</i> cinsi küflerin CA nükleotid dizilerinin databank numaraları.....	69
Tablo 3.5: <i>A. flavus</i> ve <i>A. oryzae</i> 'nin karşılaştırılması	71

SEMBOL LİSTESİ

CARP	Karbonik Anhidraz Bağlantılı Proteini
CA	Karbonik Anhidraz
RT-PCR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
IPTG	İzopropil β -D-Tiogalaktopiranozit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DEPC	Dietilpirokarbonat.
LB	Luria Broth
PMSF	Fenilmetilsülfonil Florür
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
FA	Formaldehit Agaroz
RPM	Dakikadaki Dönüş Sayısı
kob	Koloni oluşturan birim
pH	Asitlik Derecesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmanın deneysel aşamaları, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji laboratuvarlarında yapılmış olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Tülin AŞKUN ve Yrd.Doç.Hatice YILDIRIMdanışmanlığında sonuçlanmıştır.

Çalışmam sırasında benden bilgi ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Tülin AŞKUN'a ve eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hatice Yıldırma,

Başarı nedir?Sabah uyanınca yapacakların için çok büyük bir heyecan duymaktır. Kapıdan uçarak çıkacak kadar. Başarı sevdiğin insanlarla çalışmaktır. İnsanlara bişey hissettirmek , tek ortak noktaları bir hayal olan birsürü insanı birleştirmektir. Gece yatarken elimden gelenin en iyisini yaptım demektir.Başarı keyiftir, özgürlüktür, dostluktur.

Öncelikle tüm öğrencilerinin hayallerine öncülük eden ve Engin bilgilerinden yararlandığım, çalışmam süresince beni yönlendiren, benden ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Feray KOÇKAR'a,

Herkesin hayatında olması gereken iki insan, yoğun laboratuvar çalışmalarım süresince beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan hocalarım Araş.Gör.Meltem ALPER ve Görkem Sönmez'e

Ve tabiki dostlar, kalbiniz gönlünüze sağlık her zaman yanımda olduklarını hissettiğim sevgili dostlarım Esra TOKAY, Mesut ACAR, Derya OKUYAN ve Süleyman UZUNER'e

Özellikle manevi desteğini tezimin her aşamasında hissettiren Tuğşen AYDEMİR'e

Ve tabiki attığım her adımda yanımda olan kıymetlim canım anneme teşekkürü borç bilirim.

1. GİRİŞ

Doğal gıda kontaminantı olarak bilinen küfler ve bunların ürettiği mikotoksinler, gıda maddesine ürünün gelişimi, hasat, taşıma ve depolama aşamalarında kontamine olabilmektedir [1]. Sekonder metabolizma ürünleri olan mikotoksinler ile hayvan ve insan sağlığı açısından büyük tehlike oluşturmaktadır. Gıda endüstrisinde fungal floranın yapısı ve miktarı gerek kalite gerekse hijyen açısından önemli bir ölçüttür. İnsan beslenmesinde temel olan gıda ve yem maddelerinin üzerinde yüksek sayılarda bulduklarında bu gıdaların bozulmasına neden olarak ekonomik kayıplara yol açmaktadır [2].

İlk olarak Micheli (1729) tarafından keşfedilen 180 tür sayısı ile *Aspergillus* genusu dünya üzerinde en bol bulunan ve geniş ölçüde dağılım gösteren genuslar arasındadır. Genusa ait türler çok çeşitli yaşam alanlarına adapte olabilmekte ve sayısız metabolit üretebilme kabiliyetine sahiptir [3]. Taksonomik olarak Deutromycetes (fungi imperfecti) sınıfı içerisinde yer alan *A. flavus*, *Aspergillus* genusuna dahil olup ekonomik olarak etkili birkaç fungusun bir tanesidir. Çok sayıda ekinde depolama koşullarında, böceklerde, hayvanlarda, insanlarda ve bitkilerde patojen olan bu tür aflatoksin B1 gibi kuvvetli bir karsinojen olan mikotoksin üreticisidir. Ayrıca immün sistemini baskılanmış olan insanlarda bu fungal tür tarafından enfeksiyon gerçekleşebilmektedir [4,5].

Karbonik Anhidraz (Karbonat hidrolizaz, karbonat dehidrataz, karbonat anhidraz, karbonik asit anhidraz E.C.4.2.1.1) bakterilerden en geniş hayvanlara kadar dağılım gösteren ve yapısında Zn^{+} iyonu bulduran bir metaloenzimdir [6]. Evrimsel olarak karbonik anhidrazlar amino asit dizileri ve yapıları temel alınarak birbirinden bağımsız beş gen ailesi (α -, β -, γ -, δ -, ζ -) tarafından temsil edilmektedir. α -CA'lar hayvanlarda, memelilerde, prokaryotlarda, bitkilerde, alglerde ve funguslarda bulunurken, β -CA lar yaygın olarak alglerde, bitkilerde, funguslarda ve bakterilerde tanımlanmıştır. γ -CA izoformu genelde *Archaea*'da ve bazı bakterilerde, ζ - ve δ -CA ise şimdiye kadar marine diatomlarında saptanmıştır [7,8].

CA izoenzimlerinin temel görevi karbondioksitin bikarbonata geri dönüşümlü hidratasyonunu sağlamaktır. Ayrıca dokularda CO₂ 'nin taşınması, pH ve CO₂ homeostasisinin sağlanması, iyonların taşınması, kemik oluşumu ve çeşitli biyosentetik reaksiyonlar rol oynar[9].

Bilinen fungal CA'lar α - ve β - sınıfına dahilolan CA'lardır ve karbonik anhidraz enzim ailesinin diğer üyeleri fungal genomlarda tanımlanmamıştır. Fungal CA'yı kodlayan genler, memelilerdeki, alglerdeki ve bitkilerdeki CA multigene ailesi ile benzerlik gösterebilir fungal evrim boyunca farklılık kazanmıştır [10].

Çalışmamızda; *A. flavus* beta CA ailesinden olan karbonik anhidraz geninin klonlanması ve rekombinant proteinin prokaryot konakçıda üretilmesi amaçlanmıştır.

1.1 Funguslar ve Mikotoksinler

1.1.1 Funguslar Hakkında Genel Bilgi

Habitatları oldukça geniş olan funguslar, hemen her yerde yayılmış gösteren heterotrof, filamentli (uzantılı) ve çok hücreli canlılardır. Ökaryotik hücre yapısına sahip olan fungusların sporları çimlenerek, iplik şeklinde 'hif' adı verilen yapıları oluştururlar. Hifler de çeşitli dallanma ve budaklanma yaparak, karmaşık bir hif topluluğu oluşturacak şekilde bir araya gelirler. Bu hif topluluğuna **miselyum** adı verilmektedir [11,12].

Fungusların vejetatif ve üreme olmak üzere iki çeşit yapıları bulunmaktadır. Bu yapılar hiflerin substratın alt kısmına doğru uzanmış veya substrat üzerinde olmasına göre belirlenir [13]. Aynı koloni içinde bulunan hiflerden bazıları beslenmeyi sağlamak için üzerinde yaşadıkları substratların içine doğru uzanırlar. Dallanmış halde bulunan ve küfün substrata sıkıca tutunmasını sağlayan ve besin elementleriyle suyun emilerek alınmasını sağlayan bu yapıya **beslenme hifi (vejetatif hif)** adı verilmektedir. Substratın üzerinde gelişen küfün görünebilen kısmını oluşturan hif topluluklarına ise **havai miselyum** adı verilmektedir. Havai

miselyum küflerin üreme organelleri olan sporları taşıyan konidiofor ve sporangiofor olarak adlandırılan yapıları içerir [14].

Küfler gelişimleri için temel olarak su, oksijen ve makro elementlere (karbon, potasyum, forfor ve nitrojen) gereksinim duymaktadır. Sudaerimiş halde bulunan besinleri difüzyon yoluyla alırlar ve zengin enzim sistemleri sayesinde çok sayıda besin maddesinden yararlanabilirler. Küfler karbon ve enerji kaynaklarını karşılamak amacıyla genellikle glikozdan yararlanırlar. Bunun yanı sıra sakkaroz, nişasta ve maltoz gibi kompleks karbon bileşikleri de küfler tarafından kullanılabilir. Bazı küfler yağ asitlerini, organik asitleri, gliserolü, heksoz ve pentoz gibi şeker türevlerini de kullanabilmektedir [15].

Tarımsal ürünler ve işlenmiş gıdalar için önemli kontaminant olan fungusların bir kısmı genellikle tatlı sularda ve denizlerde sucül olarak yaşamlarını sürdürürken, büyük bir bölümü toprak ve ölü bitki materyallerinde gelişen karasal organizmalardır. Bazı fungal türler, bitkiler, hayvanlar ve insanları da kapsayan geniş bir çevrede parazit yaşam sürmektedir. Hatta tarımsal ürünlerdeki en büyük ekonomik kayıpların sebebini funguslar oluşturmaktadır [16].

Funguslar, oldukça geniş pH aralığı (pH 2-9), depolama sıcaklığı (10-35) ve su aktivitesinde (0,70-0,92) büyüme göstermekte olup, tarımsal ürünlerde, hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında, çeşitli ortam koşullarında tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak kontaminasyona neden olurlar [17]. Fungusların, üretimden hasata ve depolamadan tüketime kadar geçen her evrede tarımsal ürünler üzerinde meydana getirdikleri hasar ve bozulmalar önem teşkil etmektedir [18].

Küflerle kontaminasyon iki açıdan önem taşımaktadır: Yakın zamana kadar tarımsal ürünlerdeki küflerin varlığı yalnızca bozulmalara neden olduğu düşünülürken, daha sonraki çalışmalar küflerin ürünün besin değerinde kayıplara ve danelerin çimlenme kabiliyetindeki düşüşlere de neden olduğunu göstermiştir. Bu nedenle fungusların verdiği zararlar ekonomik açıdan önemli görülmektedir. Küflerin verdiği ekonomik zararlar, tarım ürünlerindeki kayıplar dikkate alındığında gerçekten azımsanamayacak düzeydedir. Yıllık üretimler temel alındığında; yağlı tohumlarda

% 12, pirinçte % 5, yer fıstıklarında % 4,2,mısırdada % 3, soya fasulyesinde % 3 ürün kayıplarına neden olmaktadır [17].

Aynı zamanda, Küflerin neden oldukları en önemli sorunlardan biri, gıda ve yemlerde gelişen küflerin gelişme sürelerini tamamladıktan sonra miselleri içerisinde oluşturdukları ve genelde üzerinde buldukları substrat üzerine saldıkları toksik metabolitlerdir [12]. Salgıladıkları bu toksik metabolitlere mikotoksin denilmekte olup, insanların ve hayvanların sağlığını tehdit ettiğinden, küflenme ekonomik boyutun ötesinde önem taşımaktadır [11].

Bir üründeki filamentöz fungus türleri; substrat, nem ve ürünün saklanma koşullarına göre 3'e ayrılmıştır [5,12]. Bunlar ;

- i) Tahıl ve ürünlere hasat öncesi bulaşan "Tarla Küfleri"; *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium sp.* Hasat sonrası tarla küflerinin zaman içerisinde gelişmesi durmakta ve bunun yerini daha düşük su aktivitesinde gelişen depo küfleri almaktadır.
- ii) Hasat sonrası ve depolama aşamalarında bulaşan "Depo Küfleri"; *Aspergillus ve Penicillium sp.* Depo küfleri genellikle taşıma ve depolama aşamalarında çevreden taşıma araçlarından ve ambardan bulaşır.
- iii) Diğer mikroorganizmaların ortaya çıkmasından ve hasar vermesinden sonra ortaya çıkan "İlerlemiş Çürütme Küfleri"; *Fusarium ve Chaetomium sp'ler.*

1.1.2 Mikotoksinler

Küfler, uygun koşullarda ham ve işlenmemiş materyalde çoğalarak bir yandan ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olmakta, diğer yandan da insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Toksik maddeleri oluşturmaktadırlar. Oluşan bu ürünler, mikotoksin olarak adlandırılan, son derece toksik, çoğu karsinojen, teratojen ve mutajen maddelerdir [19].

Mikotoksin üreten en önemli türler; Fungi imperfecti içinde yer alan *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* cinslerine giren türlerdir. En sık karşılaşılan mikotoksin çeşitleri; aflatoksin, okratoksin A (OTA), trikotesen, zearalenon, patulin, sterigmatosistin ve sitrinin olarak sıralanabilir[20].

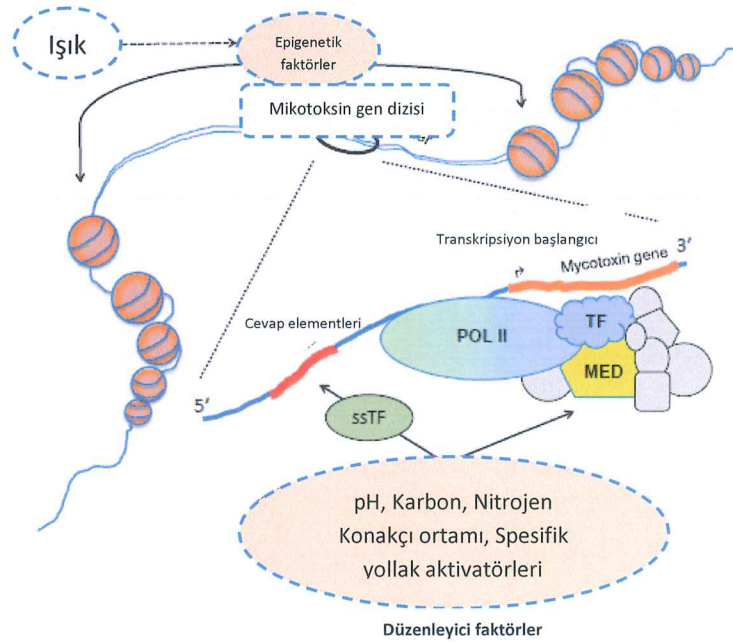
Tablo 1.1: Önemli mikotoksinler, Üretici küfler, Etkileri ve Buldukları ürünler[21]

Mikotoksin	Toksin Üreten Fungus Türleri	Memeli Hayvanlara Etkileri	Bulduğu Ürünler
Aflatoksin	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Hepatotoksik, Kanserojen, Teratojen (AFB1).	Yer fıstığı, Antep fıstığı, Fındık, Süt, Peynir, Kırmızı biber ve Çeşitli baharatlar
OTA	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> <i>P. verrucosum</i> <i>P. citrinum</i>	Nefrotoksik, Hepatotoksik, Teratojen, İmmunosupresif	Üzüm suyu, Kuru üzüm, Kuru incir, Şarap, Kahve, Mısır, Malt
Sitrinin	<i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Nefrotoksik, Nörotoksik	Pirinç, Arpa, Bugday ve unları, Meyve suları
Patulin	<i>Pen. Expansum</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	Nörotoksik	Meyveler ve Meyve suları
Sterigmatosistin	<i>A. versicolor</i> , <i>A. rugolosis</i>	Kanserojen	Buğday, yer fıstığı
Trikotesenler (T-2 Toksin)	<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i>	Düşük dozlarda kusma, Lökopeni, Derinekrozları.	Bugday, Pirinç, Tahıllar
Zearalenon	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i>	Östrojen benzeri etki.	Mısır, Buğday, Arpa, Pirinç, Yemler.

Mikotoksinlerin insan ve hayvanlara karşı toksik etkisi; toksinin türüne, etki mekanizmasına, alınan doza, toksine maruz kalma süresine, yaşa, metabolizmaya ve savunma mekanizmasına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (WHO ve IARC) tarafından, mikotoksinler insanlara karşı kanserojenik potansiyellerine göre sınıflandırılmıştır.

Bu sınıflandırmaya göre; aflatoksin B1(AFB1), “yeterli kanıt elde edilmiş insan kanserojenleri” (1A grubu) grubunda yer alırken, aflatoksin M1 ve OTA “muhtemel kanserojenik mikotoksin” (2B grubu) grubunda yer almıştır [22]. Diğer yandan trikotesen ve zearalenon için insanlara karşı kanserojenik etkisinin bulunmadığı (3B grubu) belirtilmiştir [23].

Fungusların ürettiği bu seconder metabolitlerin moleküler mekanizması ve herbir fungusta mikotoksin biyosentezini düzenleyen çevresel faktörlerde en az mikotoksinlerin fizyolojik fonksiyonları kadar önemlidir. Bahsedilen bu fungusların tüm genomlarına ait var olan veritabanları genomik, transkriptomik ve proteomik analizler için kaynak oluşturmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar; karmaşık transkripsiyonel ve çevresel etkenlerin bu gen dizilerine etki ettiği rapor edilmiştir. Özellikle; mikotoksin üretimini sağlayan genlerin karbon, nitrojen ve pH gibi çevresel faktörler ile ilişki içinde olduğu gösterilmiştir [24].



Şekil 1.1: Mikotoksin üretiminde, geninin transkripsiyonunda görev alan düzenleyici bileşenlerin şematik gösterimi. (Polimeraz II (POLII), transkripsiyon faktörleri (TF), aracı kompleksler (MED), sequence- spesifik transkripsiyon faktörleri (ssTF))[25].

Çeşitli regülatör faktörleri mikotoksin gen dizilerinde genin transkripsiyonu için Rna polimeraz II ile ilişki içindedir. Mikotoksin geninin ekspresyonunu tetikleyen ışık gibi epigenetik faktörler de kromozomun yapısal modifikasyonunda kritik bir rol oynamaktadır.

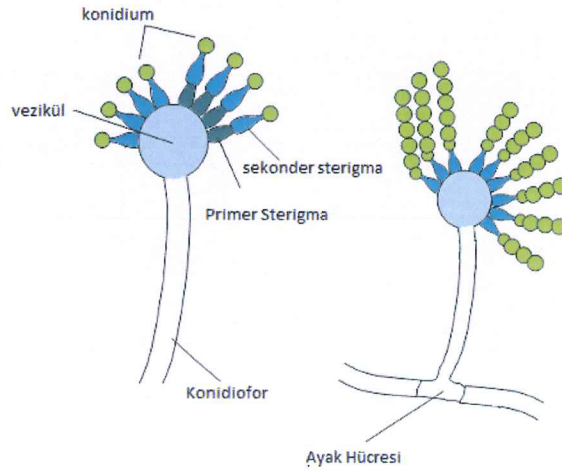
1.1.3 Tarımsal Ürünler ve Gıdalarda Fungal Gelişimi Etkileyen Faktörler

Birçok tarım ürünü ve gıdalarda fungal büyümeyi ve dolayısıyla toksin üretimini etkileyen birçok faktör bulunmakla beraber bunların başında çevresel faktörler gelmektedir. Tarım ürününün veya gıdanın çeşidi, kimyasal kompozisyonu, ürünün yetiştirildiği klima zonu, ürünün olgunluk durumu, geçikmiş yada erken hasat, uygun olmayan depolama koşulları etki eden çevresel faktörler arasında yer almaktadır. Kontamine küfler mikotoksin üreticisi olsalar bile toksinin sentezlenmesinde ürünün nem içeriği, sıcaklık, işleme ve depolamada havanın bağıl nemi etkindir. Ayrıca atmosferik oksijen, diğer modifiye atmosfer gazları, ışık, süre, pH gibi faktörlerin de etkisi vardır. Tüm bu faktörler içerisinde en önemlileri ürün kompozisyonu, su aktivitesi, sıcaklık, oksijen varlığı ve pH'dır [25].

1.2 Aspergillus

İlk olarak Micheli (1729) tarafından keşfedilen *Aspergillus* genusu üyeleri yaygın olarak her yerde yayılış gösterebilen fungal türlerdir. Bu genus ait yaklaşık 180 farklı tür tanımlanmış olup bu türlerin yirmisinin insanlarda hastalık etmeni olduğu belgelenmiştir. *Aspergillus* sporları solunum yoluyla vücuda alınıp, konakçının bağışıklık sistemine bağlı olarak; yayılabilen enfeksiyonlara, allerjik belirtilere neden olabilmektedir [26]. Genusa ait türler çok çeşitli yaşam alanlarına adapte olup ayrıca sayısız metabolit üretebilme kabiliyetine sahiptir. Bu metabolitlerin pek çoğu da insan ve hayvanlar üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır [27].

Aspergillus cinsi küfler Deutromycetes (fungi imperfecti) sınıfı içerisinde yer almaktadır. Bu cins küflerde eşeyli üreme olmayıp, sadece konidia olarak bilinen eşeysiz üreme yapılarıyla ürerler [5]. Bu genusu ait türler kolaylıkla ayırt edilebilen konidiyafolarıyla karakterize edilir. Konidiyafolar vejetatif hifler ile bağlantılı olup genellikle “T” veya “L”şeklinde bir Ayak Hücresi” olarak isimlendirilir [3]. Konidialar ayak hücresi adı verilen bu özel hücreler üzerinde uzanan konidioforlar üzerinde bulunurlar. Dik olarak gelişen konidioforların uçları küre ve oval şeklinde şişkindir. Bu yapıya vezikül adı verilir. Vezikülden uzayan ve şişe şeklinde olan konidioforların ürettiği yapıya ise sterigma denilmektedir. Bazıları bir sıralı bazıları iki sıralı olan sterigmaların ucunda bulunan konidiler birbiri ardına gevşekçe bağlanarak zincir oluştururlar. Konidilerin rengi *Aspergillus* cinsi küflerin tür ve grubuna göre değişiklik göstermektedir. Konidiler pamuksu, ipliksi, renkli veya renksiz koloniler oluşturmaktadır [28]. *Aspergillus*'un genel morfolojik görüntüsü şematik olarak Şekil 1.2’de gösterildiği gibidir.



Şekil 1.2: *Aspergillus* morfolojik yapının şematik gösterimi

Aspergillus'a ait pek çok tür medikal bileşenler için kaynak oluşturmaktadır. Ticari olarak yaygın bir kullanım alanına sahip olan kolesterol düşürücü bir ilaç olan Lovastatin, *A. terreus* tarafından üretilmekte olup Pek çok antibiyotik, antitümör ve anti-fungal ajanlar bu genusun metabolitleri tarafından elde edilmektedir [29]. Aynı zaman da genusun pek çok üyesi tarafından üretilen çeşitli asit ve enzimler ekonomik

açından önemli positif etkilere sahiptir. Amilaz ve sitrik asit gibi çok önemli iki endüstriyel ürün bu genusun üyeleri tarafından üretilmektedir. Asya ülkelerinde hem yiyecek hemde içecek sanayisinde yaygın olarak kullanılan sake ve soya sosu'nun üretimde *A. oryzae*, *A. sojae* ve *A. awamori* türleri kullanılmaktadır. Bu küf grubu nişanta ve nişanta türevlerini yıkan ve ürünlerde tat ve renk değişikliğine neden olan amilazı üretmektedir [30]. *A. oryzae* tarafından üretilen Alfa amilaz ilk olarak 1894'de Amerika Billeşik Devletlerin Jokichi Takamine tarafından keşfedilmiş olup, mikrabiyal amilaz bugün hala mısır gibi tahıl ürünlerindeki nişastanın parçalanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca sitrik asit üreticisi olan *A. niger* ilk olarak 1916 yılında keşfedilmiş olup, yiyecek ve içecek sanayisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır [31].

Aspergillus genusuna ait türlerin positif ekonomik etkilerinin yanında sahip oldukları metabolitler nedeniyle negatif yönleri çok daha fazladır. Özellikle bu genusa ait türler tarım ürünlerinde hasat edilmeden önce ve sonrasında önemli derecede hasarlara neden olmaktadır. Bazı türleri de insanlarda ve hayvanlarda patojen olup pek çok türü allerjeniktir. Aynı zamanda sekonder metabolitlerinden olan mikotoksinler insan ve hayvanlarda zehirli hatta ölümcül etkilere neden olmaktadır. Genusun üyeleri geniş bir sıcaklık aralığına toleranslıdır ve diğer fungal türlere göre daha düşük su konsantrasyonlarında büyüme gösterebilmektedir. Bu yüzden yaygın olarak gıda ve yemlerde bozulmalara neden olmaktadır. Ayrıca *Aspergillus* türleri, enfeksiyon yoluyla bulaşan ve immün sistemi baskılayarak insanlarda ölümcül bir etkiyle sonuçlanan "Aspergillosis" hastalığına neden olmaktadır. *Aspergillus fumigatus* % 90 oranında insanda Aspergillosis'e neden olurken bunu *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* ve *A. ochraceus* izlemektedir [28,32,33].

A. flavus ekonomik açıdan etkili birkaç fungustan biridir. Bu tür yaygın olarak toprakta bulunmakta olup, aynı zamanda havada, suda ve toz taneciklerinde görülmektedir. Bu fungal tür, üretmiş olduğu karsinojenik sekonder metabolitler ile hem tarımda hemde insan ve hayvan sağlığında tehlike yaratmaktadır. Özellikle mısır, fıstık, pamuk çekirdeği ve çeviz gibi yağlı tohumlarda yaygın olarak görülmektedir. Olumsuz depolama koşullarında *A. flavus* büyüme gösterebilmekte ve ürün tohumlarında aflotoksin üreterek ekonomik kayıplara neden olmaktadır [34].

A. flavus, yüksek sıcaklık ve kuru hava koşulları gibi zorlu çevresel şartlarda hayatta kalabilme özelliğine sahiptir. Asya ve Güneydoğu Asya'yı da içiren bölgelerde sinüzit, kornea iltihabı ve deri enfeksiyonları vakalarının yaklaşık % 50-80'inin de bu fungal türler rol oynamaktadır. Ayrıca bitkiler, hayvanlar ve insanlar dahil olmak üzere geniş bir konak aralığına sahip olan bu tür aflatoksin üretiminde görev alan güçlü bir patojendir [27,35].

1.3 Karbonik Anhidraz (CA) Enzim Ailesi

1.3.1 Karbonik Anhidrazlar(CA) ve Sınıflandırılması

Karbonik Anhidraz (CAs, E.C 4.2.1.1 Karbonat Hidroliyz) bakterilerden en gelişmiş hayvanlara kadar dağılım gösteren bir enzimdir. Bu enzim aktif bölgelerinde çinko (Zn^{+2}) iyonu bulduran metaloproteinler olup, monomer yapıdadır. İlk defa sığır eritrositlerinde keşfedilen karbonik anhidrazlar (CA), canlılarda kabondioksitin(CO_2) hidratasyonu ve bikarbonatın (HCO_3^-) dehidratasyonu reaksiyonlarını geri dönüşümlü olarak katalizleyen önemli bir enzimdir [10,36].



$HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O$ (CO_2 derişiminin düşük olduğu durumlarda) [37,38].

Karbondioksitin ve bikarbonat moleküllerinin birbirine dönüşümü denge içinde ve kendiliğinden gerçekleşmektedir. Reaksiyon sırasında oluşan bikarbonat molekülü (HCO_3^-) pek çok biyolojik süreçte önemli bir substrat olarak kullanılırken, CO_2 tüm canlılarda solunumun bir atık ürünüdür. Bu iki molekülün birbirine geri dönüşümü spontan bir şekilde gerçekleşirken, bu reaksiyon karbonik anhidraz(CAs) enzimi sayesinde 10.000 kat daha hızlı bir şekilde gerçekleşebilmektedir [39,40].

Evrimsel olarak karbonik anhidrazlaramino asit dizileri ve yapıları temel alınarak birbirinden bağımsız beş gen ailesi (α -, β -, γ -, δ -, ζ -) tarafından temsil edilmektedir [7].

α -CA'lar hayvanlarda, memelilerde, prokaryotlarda, bitkilerde, alglerde ve funguslarda bulunmaktadır [8,41,42]. Hayvanlarda yalnızca α -CA'lar bulunurken memelilerde 16 farklı doku ve organda α -CA izoformları ve CA bağlantılı proteinler (CARP) tanımlanmıştır [7]. CA izoenzimleri doku dağılımları, hücre içi yerleşimleri ve kinetik özellikleri bakımından farklılık gösterirler. Bu CA izoenzimlerinden beş tanesi sitoplazmada (CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAXIII), beşi mebrana bağlı olarak (CAIV, CAIX, CAXII, CAXIV ve CAXV), ikisi mitokondriyel (CAVA ve CAVB) ve biri salgısal (CAVI) olarak bulunmaktadır. Nükleusta bulunan NonO/p54^{nrb} formu ise henüz sınıflandırılmamıştır [43,44].

β -CA'lar alglerde, bitkilerde, funguslarda ve bakterilerde yaygın olarak bulunmakta olupbu β - sınıf CA'lar plant-type ve cab-type (CAB) olarak da alt gruplarına ayrılabilir. β -CA'nın Üçüncü bir alt grubu olan ϵ -CA'nın kemolitotrofik bir bakteri olan *Halothiobacillus neapolitanus*'da mevcut olduğu bulunmuştur [45]. Dikkat çekici bir biçimde farklı dizi yapıları ile γ -CA izoformu genelde *Archaea*'da ve bazı bakterilerde bulunmakla birlikte bitkilerin mitokondrilerinde de tanımlanmıştır [7,8] ζ - ve δ -CA ise şimdiye kadar marine diatomlarında saptanmıştır [46,47].

1.3.2 Karbonik Anhidraz Enziminin Fizyolojik Fonksiyonları

Karbondioksit tüm yaşayan organizmaların hücrelerinde anahtar bir molekül olarak düşünülmekte ve bikarbonat ile denge halinde bulunmaktadır. Bikarbonat lipit membranlarında çözünmez halde bulunmakta olup hücre membranından taşınması gerekmektedir. Karbonioksit ise membranda çözülmüş halde bulunur ve bu nedenle hücre dışına kolayca diffüze olabilir. Prostatik gubunda Zn^{2+} iyonu bulunduran karbonik anhidraz enzimi; hücre içi, hücreler arası ve hücre dışı gibi biyolojik mebranlardan CO_2 'in ve protonların taşınmasında önemli bir rol oynayan spesifik bir enzimdir [48].

Bu enzim tüm canlı alemlerinde bulunmakta olup; prokaryotlarda 2 temel fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlardan ilki organizmanın farklı dokuları arasında CO_2/HCO_3^- 'in taşınımını sağlamak, ikincisi ise enzimatik reaksiyonlarda CO_2/HCO_3^- dengesinin kurulmasını sağlamaktır [49].

Akuatik fotosentetik organizmlarda bu görevlere ek olarak korbondioksinin sınırlı olduğu çevresel koşullarda yardımcı bir mekanizma olarak korbondioksit konsatrasyonunu ayarlamakta görev alır [50,51].

Omurgalılarıda içeren yüksek omurgasızlarda; CA izoenzimleri birçok fizyolojik ve fizyopatolojik fonksiyonlarda görev almaktadır. Başta asit-baz dengesi olmak üzere pek çok metabolik olayda görev alan bu enzim, doku/organlar ile akciğer arasında CO_2/HCO_3^- respirasyonu ve taşınımı, pH ve korbondioksit hemostazı, elektrolit sekresyonu, hayvanlarda glukoneogenez, lipogenez ve üre sentezi, kemik resorpsiyonu, kalsifikasyonu, tümör oluşu ve diğer pekçok fizyolojik ve patolojik olayda görev almaktadır [52].

1.3.3 Beta Karbonik Anhidraz Enzimi

Beta karbonik anhidraz (β -CAs)'lar Arkea, mavi-yeşil algler, bitki kloroplastları ve eubakterileri ve fungusları da içeren canlı gruplarında bulunan ve yapısal olarak aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduran karbonik anhidraz enzim ailesinin dahil bir metaloenzimidir. Karbonik anhidraz enziminin evrimsel olarak ayrılanbeş farklı grubundan sadece beta CA'lar allosterik yapı göstermektedir [53].

İlk beta karbonik anhidraz enzimi, 1939 yılında bitki yaprak kloroplastında Neish tarafından keşfedilmiştir [54]. 1990'da, *Spinacea oleracea*'da kloroplast CA'nın cDNA dizileri belirlenmiş ve hayvanlardaki α -CA ile homoloji göstermediği anlaşılmıştır [55]. Daha sonra *Pisium sativum* ve *Arabidopsis thaliana*'nın cDNA'ları üzerine yapılan araştırmalarda bu dizilerin *Spinacea oleracea* ile yüksek düzeyde homolog olduğu rapor edilmiştir. Beta CA'lardan olan üç tip bitki beta CA'sı kloroplast stromasında, tillokoid boşluklarda ve sitoplazmada genomik olarak tanımlanmıştır [56].

İlk bakteriyel CA, *E. coli*'nin CynT genindeki β -CA dır [57]. Daha sonrasında *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Salmonella typhimurium* gibi patojen eubakterilerde, Arkea'lardan *Methanobacterium thermoautotrophicum*'da, mayalarda *Saccharomyces cerevisiae*'de, yeşil

(*Chlamydomonas reinhardtii*) ve mavi (*Porphyridium purpureum*) alglerde β -CA'lar tanımlanmıştır [58,59,60].

β -CA'nın fizyolojik rolü tam olarak aydınlatılmamış olup, CO_2 ve HCO_3^- kullanılmasında, kloroplastlarda Rubisco, *E.coli*'de siyanaz [61], *H. Pylori*'de üreaz [62] ve *Corynebacterium glutamicum*'da [63] bikarbonatı bağlayan karboksilaz gibi enzimleri ile benzer özellik göstermektedir. β -CA, siyanobakterilerde karbondioksitin fiksasyonunda görev alan karboksizom enziminin önemli bir bileşeni olup aynı zamanda aerobik ortam koşullarında *E. Coli*, *C. glutamicum* ve *S. cerevisiae*'nin büyümesinde etkili olan atmosferik karbondioksit konsantrasyonun ayarlanmasında görev aldığı belirlenmiştir. Yüksek bitkilerde, β -CA'nın önemi ve fonksiyonu tam olarak aydınlatılmamış olup *P. Sativum*'da Rubisco ve β -CA'nın tranzkripsiyonel olarak birbirleriyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bitki yüksek karbondioksit içeren ortamdan düşük CO_2 içeren ortama alındığında Rubisko ve β -CA'nın ekspresyon seviyesinde artış görülmektedir [62].

1.4 Fungal Karbonik Anhidrazlar

1.4.1 Karbondioksitin Önemi

Karbondioksit ekosistem içinde bulunan anahtar bir gaz molekülüdür. Bitkiler gibi ototrofik organizmalar tarafından karbondioksit, fotosentez sırasında kullanılan önemli bir molekül olup karbon fiksasyonu ile glukozaya çevrilir. Memelilerde ve mikroorganizmalarda hücre solunumunun son ürünü olarak tekrar ekosisteme geri dönüşümü sağlanır. Buyüzden biyosfer içerisinde karbondioksitin dengesi tüm oranizmaları önemli ölçüde etkilemektedir. En basit örneği, atmosferdeki karbondioksit oranının yükselmesi sonucunda atmosferin sıcaklığı artarmakta ve ekosistemin dengesini olumsuz yönde etkilemektedir [64].

Karbondioksit aynı zamanda önemli bir sinyal molekülüdür. Örneğin, dişi sivrisinekler avlarının yerlerini bulmak amacıyla karbondioksitten faydalabilmektedirler. Bir meyve sineği olan *Drosophila* G protein coupled receptors (GPCRs) aracılığı ile karbondioksiti bir koku molekülü olarak algılayabilir [65]. Ayrıca karbondioksit potojen bir bakteri olan *Bacillus*

Anthrax tarafından enfeksiyon sırasında anti-fagositik polisakkarit kapsüllerin üretimini indükler [66].

Funguslar sıcaklık ve besin gibi farklı uyarıcılara tepki oluşturmakta olup, CO₂ gazı da önemli bir sinyal molekül olarak funguslarda da görev almaktadır. Bu durumu en iyi örneği farklı CO₂ seviyelerine cevap oluşturan *Candida albicans*'de belirlenmiş ve bu sürecin fungal adenil siklaz ve bir β -CA tarafından kontrol edildiği aydınlatılmıştır [67,68].

1.4.2 Funguslara Ait Alfa (α -) ve Beta (β -) Karbonik Anhidrazlar

Bilinen tüm funguslar α ve β -CA'lerden birisine sahip olmakla birlikte, bugüne kadar karbonik anhidrazların diğer grupları fungal genomlarda tanımlanmamıştır. Fungal CA'yı kodlayan genler memelilerdeki, alglerdeki ve bitkilerdeki multigene CA familyası ile benzerlik gösterir, fungal evrim boyunca farklılık kazanmıştır. Filamentli *Ascomycetes*'lerin pek çoğunun genomu beta CA'nın üç izoformunu içermektedir, *Hemiascomycetous* mayalarında sadece tek bir β - sınıf CA tanımlanabilmiştir. Basidiomycetesler içinde *Cryptococcus neoformans* yalnızca iki β -CA'yı kodlarken, *Coprinopsis cinerea*, *Laccaria bicolor*, *Malassezia globosa* ve *Ustilago maydis* genomları sadece tek bir β -CA geni içermektedir. İlginç bir şekilde α -CA'yı kodlayan sekiz gen *L.bicolor*'ın genomunda tanımlanabilmiştir [10].

Sadece birkaç fungal türde, beta CA'lar fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir (Tablo 1.3). *Candida albicans*, *Candida glabrata* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi hemiascomycetous mayalarında bulunan Nce103 gen plant-type β -CA'yı kodlarken, bir basidiomycetes olan *Cryptococcus neoformans* ise sahip olduğu Can1 ve Can2 genleri ile karbonik anhidraz enzimini kodlamaktadır [69,70,71]. Ayrıca cab-like type β -CA patojen bir maya olan *C. albicans*da ve *Pichia stipitis*'de tanımlanmıştır [10,68]. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda β -CA'nın multigene ailesinin, filamentous ascomycetlerden olan *Sordaria macrospora*'nın seksüel gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Salgılanan CA izoformlarındaki aktivite ise çeşitli *Penicillium* isolatlarında ayrıca tespit edilmiş olup bu aktivitenin kalkerli arazilerde kiraç taşının çözülmesinde etkili olduğu düşünülmektedir [72].

Tablo 1.2:Funguslarda β -CA'ların fonksiyonel olarak karakterizasyonu

Türler	Proteinler	Referanslar
<i>Candida albicans</i>	Nce103	[68]
<i>Candida glabrata</i>	Nce103	[71]
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Can 1 Can2	[69]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nce103	[70,73]
<i>Sordaria macrospora</i>	CAS 1 CAS 2 CAS 3	[10]

İlk fungal karbonik anhidrazlar 1996 yılında bir maya olan *S. cerevisiae*'de keşfedilmiştir. Başlangıçta bu gen herhangi bir sınıfa dahil olmayan protein taşıyıcı yolların bir bileşeni olarak tanımlanmış ve Nce103 geni olarak ifade edilmiştir [73]. Sonrasında tahmin edilen bu aminoasidin dizilerinin β -CA sınıfına dahil bir gen olduğu belirlenmiştir [70].

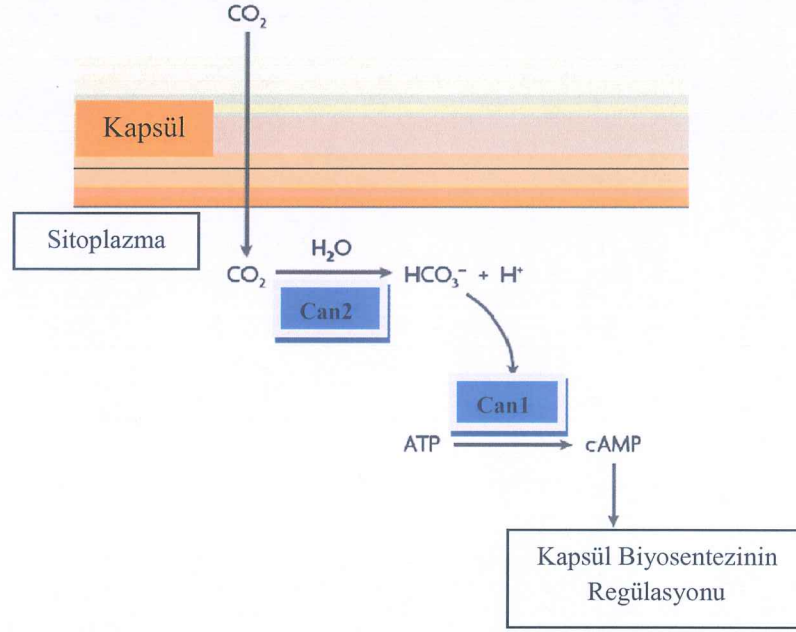
Bu canlıda Nce103 geni mRNA'larında belirlenebilir şekilde çalışılmış ve bu genin %0.033 CO₂ (düşük CO₂) içeren bir ortamda transkripsiyonel olarak upregule olduğu ve buna bağlı olarak CA aktifesinde bir artış görüldüğü belirtilmiştir [74]. Ayrıca CO₂'in yüksek seviyelerinde NCE103 geninin transkripsiyonu downregule olmakta ve sonuçta CA geni aktivite gösterememektedir. Delesyon ile mutant hala getirilmiş Nce103 genlerinde isedüşük CO₂içeren ortamlarda büyüme gösteremezken, Nce103D mutantları CO₂konsantrasyonu% 5'e çıkardığımızda (yüksek CO₂) aktif hale geçebilmektedir. Bu fenotip durumu HCR (high-CO₂-requiring) olarak tanımlanmıştır [75].

S.cerevisiae'nin Nce103 mutantlarının göstermiş olduğu fenotip, CO₂/HCO₃'in hücre içi hemostaziyi sağladığını ve karbonik anhidrazın hücreler arası pH düzenlenmesinde görev aldığını desteklemektedir. Ayrıca bikarbonata bağlı pek çok karboksilasyon reaksiyonlarının Nce103 mutant strainlerinde engellendiği aydınlatılmıştır. Bu sonuçta bize şunu göstermektedirki, düşük karbondioksit

koşullarında ekspre olabilen *S.cerevisiae* karbonik anhidraz, rol aldığı pek çok fizyolojik prosesde bikarbonat üretimini desteklemekte ve asetil-CoA karboksilaz ve karbomoil fosfat sentez gibi pek çok metabolik karboksilasyon reaksiyonlarında bikarbonat önemli bir substrat olarak görev almaktadır [76].

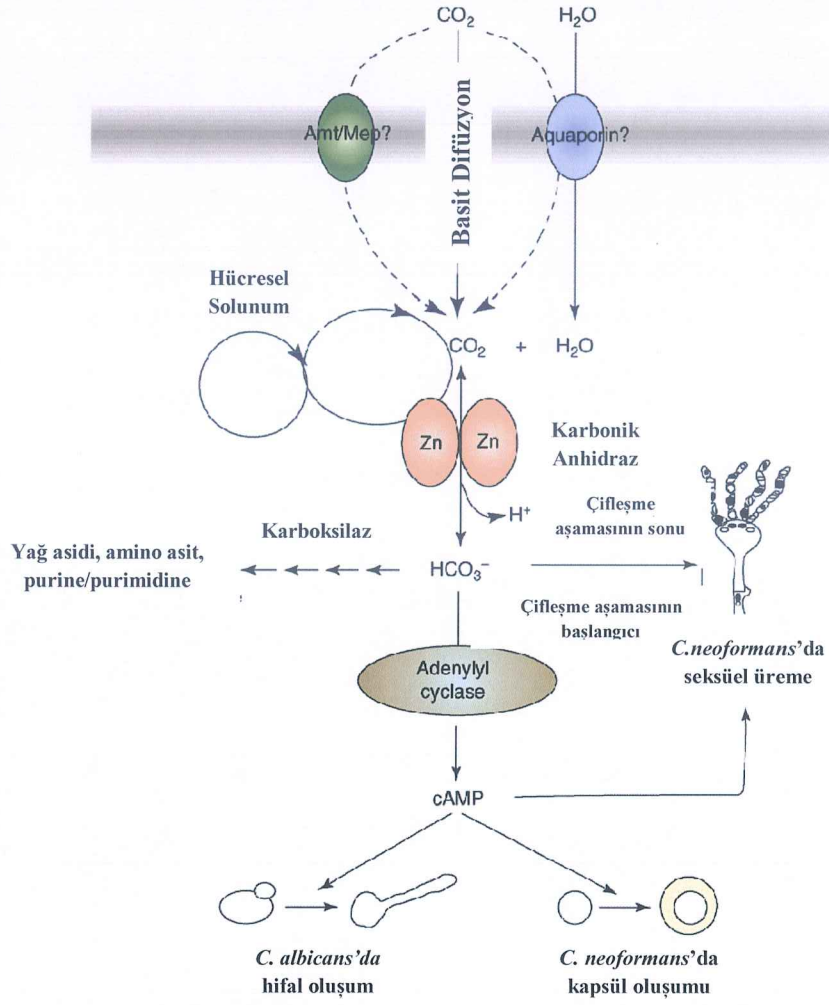
Candida albicans'daki Nce103 ve *Cryptococcus neoformans*'a ait Can1 ve Can2 genleri tarafından kodlanan proteinler, β -CA katalitik aktivitesi üzerinde etkilidir. Bu β -CA'lar karbondioksit duyarlılığı, kapsül biyosentezinin düzenlemesi, filamentasyon ve farklı pH ve CO₂ koşullarına organizmanın adaptasyonu gibi çeşitli roller ile patojen fungusların hayat döngülerinde katalitik olarak görev alır [69,76].

Cryptococcus neoformans Can1 ve Can2 olmak üzere iki tip β -CA'ya sahip olup, bu CA'lar *S.cerevisiae*'deki Nce103 geni ile homoloji göstermektedir. Can2 geninin Can1 genine göre daha yüksek seviyelerde ekspre olduğu RT-PCR ile belirlenmiştir. Can1 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu elde edilen mutanların fenotiplerinde değişiklikler meydana geldiği gözlemlenirken, Can2 geninin ise karbondioksit seviyesinin sınırlandırıldığı çevresel koşullarda büyüme için önemli rol oynadığı rapor edilmiştir [77]. *Candida neoformans*'ın virulans etkisi, onun kapsül sentezine ve dolayısıyla konukçunun immün sisteminde kendisini korumasına bağlı olarak belirlenir. Kapsül biyosentezi yüksek CO₂ seviyelerinde upregüle olmaktadır ve Can2'nin adenil siklaz (sAC) ile birlikte kapsül biyosentezinde gerekli olduğu gösterilmiştir. Can2 hücre içi cAMP konsantrasyonunu artırmak için bikarbonat üretiminde görev alır ve bu sayede direkt olarak spor oluşumu için gerekli olan adenil siklaz ile ilişki içindedir. Karbonik anhidraz enziminin yapısal çalışmalarının yanında temel olarak patogenesis ile ilişkisi de enzimin aktivitesi üzerinde de önemli araştırmalara yol açmıştır [68,71].



Şekil 1.3: Bir β -Ca olan Can2 ve çözünür Adenil siklaz'ın Can1 ile aracılığı ile *C. neoformans*'da kapsül biyosentezinin regülasyonu [78]

Karbondioksit, insanlarda patojen olan *C. albicans*'da hifal büyüme üzerinde önemli bir promotördür. Kan dolaşımı içerisinde *C. albicans*'ın neden olduğu enfeksiyon kan doşalımı ile yayılabilmekte ve dolaşımında yüksek konsantrasyonda CO₂'e maruz kalmaktadır. Bu güne kadar karbondioksiti algılama yolunun karakterizasyonunda iki proteinin önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. İlki sekonder bir iletici olan adenil siklaz cAMP yolunu aktive ederek *C. albicansta*'da hifal oluşuma yardımcı olurken söz konusu sAC direkt olarak CO₂/HCO₃⁻ tarafından aktive edilmektedir. İkincisi ise Nce103 geni tarafından kodlanan beta karbonik anhidraz enzimidir. *C. albicansta*'da Nce103 geni çarpıcı bir şekilde *S. cerevisie*'de Nce103 geni ile genel bir transkripsiyonel yaklaşımda benzerlik göstermektedir [79].



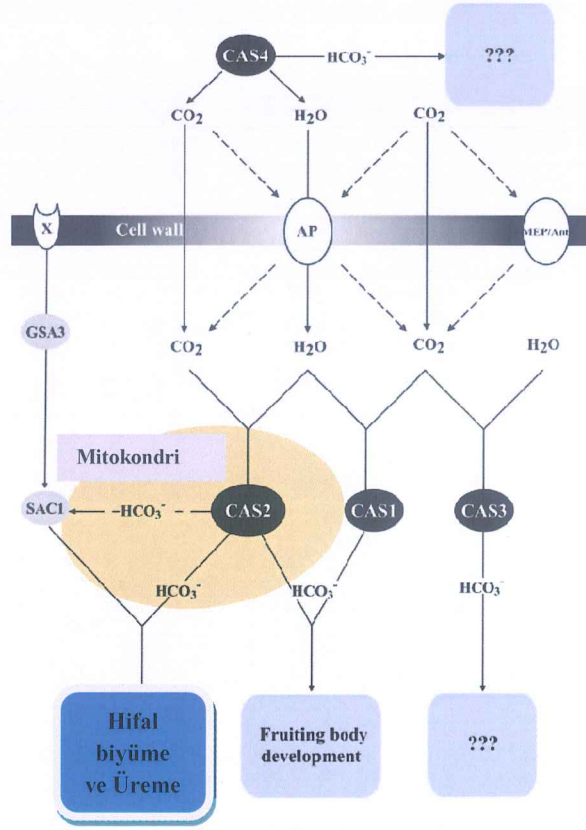
Şekil 1.4: Fungal bir Patojen olan *C. albicans* ve *C. neoformans*'da karbondioksitin metabolik yolunu gösteren şema [43].

C. albicans ve *C. neoformans* çevredeki karbondioksiti basit diffüzyon, aquaporin gibi membran transportörleri veya Amt/Mep proteinleri ile hücre içerisine taşıyabilmektedir. Ayrıca karbondioksit hücre içi solunumlarda üretilebilmektedir. Dimerik yapıdaki CA'lar hücre içi karbondioksiti, temel hücre moleküllerinin sentezini katalizleyen pek çok karboksilik enzimler için önemli bir substrat olarak kullanılan bikarbonata çevirirler. Yüksek karbondioksit düzeylerinde artan bikarbonat AC'nin cAMP'ye dönüşümünü aktive ederek *C. albicans*'da morfolojik değişimlere, *C. neoformans*'da kapsül üretiminde etkili olur [43].

Ekmek küfü olan *Neurospora crassa* ile benzerlik gösteren filamentli ascomyceteslerden olan *Sordaria macrospora* funguslarda seksüel gelişimin sürecini incelemek için model olarak kullanılmaktadır [79]. Bikarbonatın seksüel üremedeki

rolü üç β -CA geninin aktivitesi ile incelenmiştir. *S.macrospora* genomunda karbonik anhidrazı kodlayan Cas1, Cas2, Cas3 ve Cas4 genleri tanımlanmıştır. Bu genlerden birbirleriyle yakın ilişkili olan Cas1 ve Cas2 genleri β -CA'nın alt grubu olan plant type β -CA'yı kodlarken, Cas3 geni bir cap-type β -CA tarafından kodlanmaktadır. Cas4 ise α -sınıf bir CA'dır. Plant type beta CA yaygın bir şekilde funguslarda dağılım gösterirken, cap-type beta CA genleri ascomycetesde sınırlı sayıda görülmektedir [10].

Sordaria macrospora'da karbondioksit, fungal hücre duvarında diffüzyon veya taşıyıcı sistemler aracılığıyla taşınmaktadır. Bir α -CA olan Cas4'un bir salgı proteini olduğu ve fungal hücre duvarlarından salgılandığı tahmin edilmekte olup, Cas1 ve Cas3'ün sitoplazmik bir protein olarak görev aldığı belirlenmiştir. Cas2 ise mitokondride lokalize olmaktadır. Bir plant type CA olan Cas1 ve Cas3 askokarp gelişiminde görev alırken, Cas2 aynı zamanda hifal büyümede ve üremede görev almaktadır. Bir β -CA olan Cas3'un ve bir α -CA olan Cas4'un fonksiyonları ise tam olarak bilinmemektedir [81].



Şekil 1.5: *Sordaria macrospora*'da bikarbonat regülasyonunu ve karbondioksitin fungal hücrelerden difüzyon ve transport sistemler ile taşınımını gösteren model [80].

Aspergillus genusu, multigene karbonik anhidraz enzimleri içerisinde çoğunlukla β -sınıf CA'lara sahiptir. Fakat *Aspergillus oryzae*'nin bir α - sınıf CA'ya sahip olduğu rapor gösterilmiştir. Ayrıca akciğerlerde patojen olan *Aspergillus fumigatus*'un ise beta sınıf CA içerdiği gösterilmiştir [43].

1.5 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu

Rekombinat protein ekspresyonunda klonlanacak DNA molekülü ve vektör belirli noktalardan kesilerek, kontrollü bir şekilde birbirine bağlanmalıdır. Gen klonlamanın temlini oluşturan kesme ve birbirine bağlama işlemleri, **restriksiyon endonükleazlar** (kesmek için) ve **ligazlar** (birbirine bağlamak için) tarafından gerçekleştirilir. Gen klonlama deneyinde sonraki basamak, bu molekülleri canlı hücrelere, genellikle daha sonra klonlar meydana getirmek için bölünüp büyüyecek olan bir bakteriye aktarmaktır [81].

Klonlama iki amaca hizmet etmektedir;

- i) Sınırlı miktarda olan başlangıç materyalinden çok miktarda rekombinat DNA molekülünün üretmek
- ii) Saflaştırma: Rekombinat bir DNA molekülü elde etme sürecinde, ligasyon işleminde rekombinat proteine ek olarak; bağlanmamış vektör molekülleri, bağlanmamış DNA fragmanları, yeni bir DNA sokulmaksızın kendi kendine bağlanan vektör molekülleri ve yeni DNA fragmanlarını taşıyan rekombinat DNA molekülleri bulunmaktadır. Bu yüzden problem doğru rekombinat plazmitleri içeren kolonileri saptanmasıdır.

1.5.1 Kullanılacak Ekspresyon Vektörlerinin Genel Özellikleri

Rekombinat protein üretiminde önemli hedeflerden biri, rekombinat DNA moleküllerinden istenilen proteinlerin, istenilen oranda üretilmesidir. Böylece, ilgi duyulan gen veya gen gruplarının ürüne dönüştürülebilmesi için genler, transfer vektörü olarak adlandırılan taşıyıcı moleküller aracılığıyla, proteine dönüştürülebilmelerini sağlayacak olan ekspresyon vektörlerine aktarılırlar.

Transfer vektörleri özel olarak düzenlenir. Bunlar klonlama, transfer ve rekombinant DNA'nın çoğaltılması için çeşitli özelliklere sahiptirler. Bir transfer vektörünün görevini yerine getirebilmesi için içermesi sahip olması gereken özellikler;

- i) Vektör DNA'sında, özgün bir baz dizisinden meydana gelen, DNA replikasyonunun başlamasında rol alan tüm enzimlerin tanıyıp bağlanabildiği ve vektörün konak içerisinde çoğalmasını sağlayan, yaklaşık 500 bp uzunluğunda bir "**promotör**" bölgesi bulundurulmalıdır.
- ii) Vektörler, vektörün veya rekombinat DNA'nın tanınmasını sağlayan bazı işaret (marker gen)'lere sahip olmalıdırlar. Bunlar, çeşitli antibiyotiklere direnç sağlayan bir gen olabileceği gibi, bazı amino asit ve şekerleri metabolize edebilen oksotrofik bir özellik de olabilir.

- iii) Vektörlerde, yabancı DNA'ların klonlanmasında kolaylık sağlayan, çok sayıda ve özel restriksiyon endonükleaz kesme noktaları olmalıdır.
- iv) Vektör DNA'sı, klonlanmış DNA'nın gen ifadesi için uygun kontrol elementlerini, promotörleri ve ribozom bağlanma bölgelerini içermelidir.
- v) Vektörün baz sırasının bilinmesi de işaret geninin, restriksiyon endonükleazların ve diğer ilgi duyulan elementlerin yerlerinin tam olarak tespit edilmesi ve uygun bir bilgisayar programıyla analiz edilebilmesi için önemlidir.

Bunlara ilave olarak, ekspresyon vektörünün oluşturulabilmesi için, transfer vektörüyle yabani tip virüs arasında özgün rekombinasyonu sağlayacak homolog bölgelerin olması gerekir. Böyle bir rekombinasyon sonucunda oluşacak rekombinant, ekspresyon vektörü olarak kullanılır. Oluşturulan ekspresyon vektörünün biyolojik aktiviteye sahip protein üretebilmesi için de uygun konak içerisinde bulunması gerekir [82].

1.5.2 Prokaryotik Ekspresyon Sistemleri

Prokaryot ekspresyon sistemleri ekspresyonun daha ucuz ve ekonomik olmasından dolayı ilk tercih edilen sistemlerdir. Ekspre edilen proteinin kompleks post translasyonel modifikasyonları gerekli değilse prokaryot ekspresyon sistemleri kullanılır [83]. Prokaryotik ekspresyon sistemi en yaygın olarak *E.coli* ve *B.subtilis* tercih edilmektedir [9].

İlk olarak Itakura ve arkadaşları tarafından bir memeli peptid hormonu olan somatostatinin *E.coli*'de ekspre edilmesiyle yabancı bir genin prokaryotik hücrelerde *in-vitro* olarak üretilebileceği anlaşılmıştır. Günümüzde gram (-) bir bakteri olan *E.coli* rekombinant proteinlerin üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. *E.coli* toksik rekombinant proteinlerin ekspresyonu için de oldukça caziptir [84].

E.coli'nin BL-21(DE3) Kodon Plus soyu rekombinant protein ekspresyonu için uygundur. Zararlı proteazları içermez, genomunda T7 RNA polimeraz geni bulundurur ve IPTG ile indüklenebilen bir sistemdir [85].

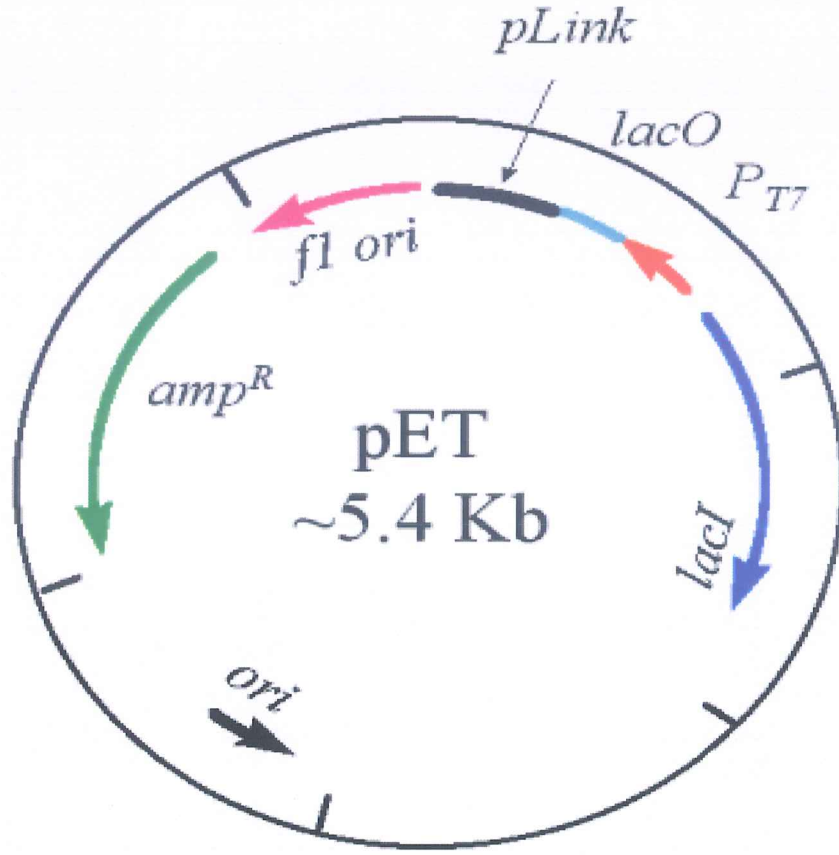
Toprakta bulunan ve bir bakteri olan *B.subtilis*, *E.coli*'ye alternatif olarak kullanılan bir ekspresyon sistemi olup çok sayıda avantaja sahiptir. Bunlar:

- *B.subtilis*, *E.coli*'nin yaygın bir yan ürünü olan, insan ve hayvanlarda bazı dejeneratif düzensizliklere neden olan lipopolisakkaritleri üretmez.
- Genetik yapısından dolayı plazmit ve bakteriyofajlarla kolay transforme olabilmektedir.
- İşlenmiş proteinleri medyuma verebilmekte ve bu da daha sonraki basamaklarda saflaştırmayı kolaylaştırmaktadır.
- *B.subtilis* ucuz ve kolay bir şekilde yoğun olarak üretilebilmektedir ve ayrıca bu bakterinin büyüme ve fizyolojik karakterleri detaylı bir şekilde çalışılmıştır.

B.subtilis dışında *E.coli*'ye alternatif olarak *Ralstonia eutrophada* kullanılmaktadır. Bu bakteri *E.coli*'ye bağlı proteinlerin ekspresyonunda meydana gelen bazı olumsuzlukların üstesinden gelebilmektedir Ayrıca son dönemde *Pseudomona*'a dayalı ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir [85].

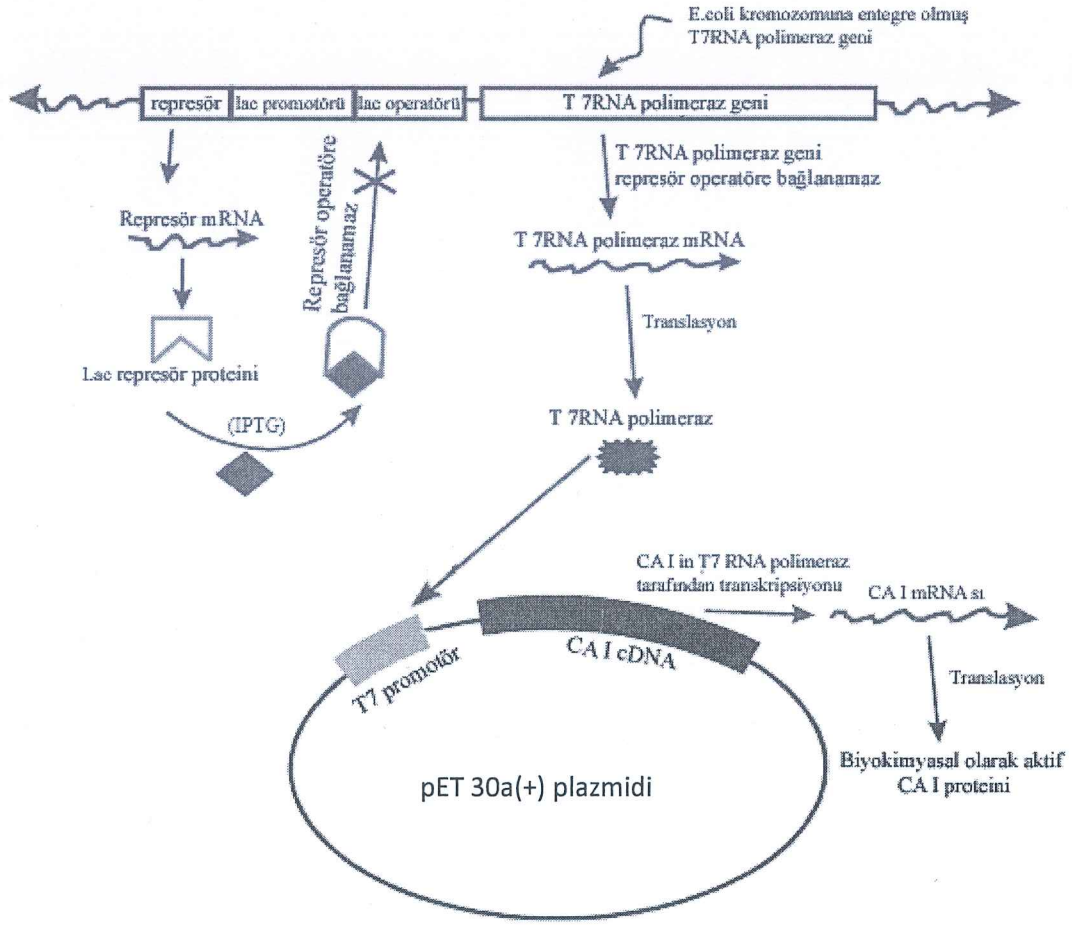
1.5.3 pET Ekspresyon Vektör Sistemi

pET vektör sistemi, *E.coli*'de rekombinat proteinlerin ekspresyonu ve klonlama için geliştirilen çok kuvvetli bir sistemdir. İstenilen proteinin büyük miktarda ve çabuk olarak üretilebilmesini sağlayacak şekilde tasarlanmıştır. Translasyon sinyalleri ve güçlü bakteriyofaj T7 transkripsiyonlarının kontrolü altında hedef genler pET plazmidlerine klonlanır ve ekspresyon konak hücredeki T7 RNA polimeraz ile indüklenir. Bu sistemin bir diğer önemli yararı indüklenmemiş bölgelerdeki hedef genlerin transkripsiyonel olarak suskunluğunu koruma yeteneğidir [86].



Şekil 1.6: pET Ekspresyon Vektör Sistemi [87]

Bir pET vektörü, aktive edildiğinde arzu edilen proteinin yüksek kalitede üretimini hızlı bir şekilde gerçekleşmesine izin verecek şekilde dizayn edilmiş bir bakteri plazmitidir. Bu plazmid Şekil 1.7’de gösterildiği gibi bir çok önemli element içermektedir. Bunlardan ilki *lac* repesör proteinini kodlayan *lacI* geni, T7 RNA polimeraza özgü olan T7 promotörü, transkripsiyonu durduran *lac* operatörü, bir polilinkir, replikasyonun *f1* orjini ve ampisiline direnç genini içerir [87].



Şekil 1.7: Rekombinant Proteinin Ekspresyon Mekanizması [88]

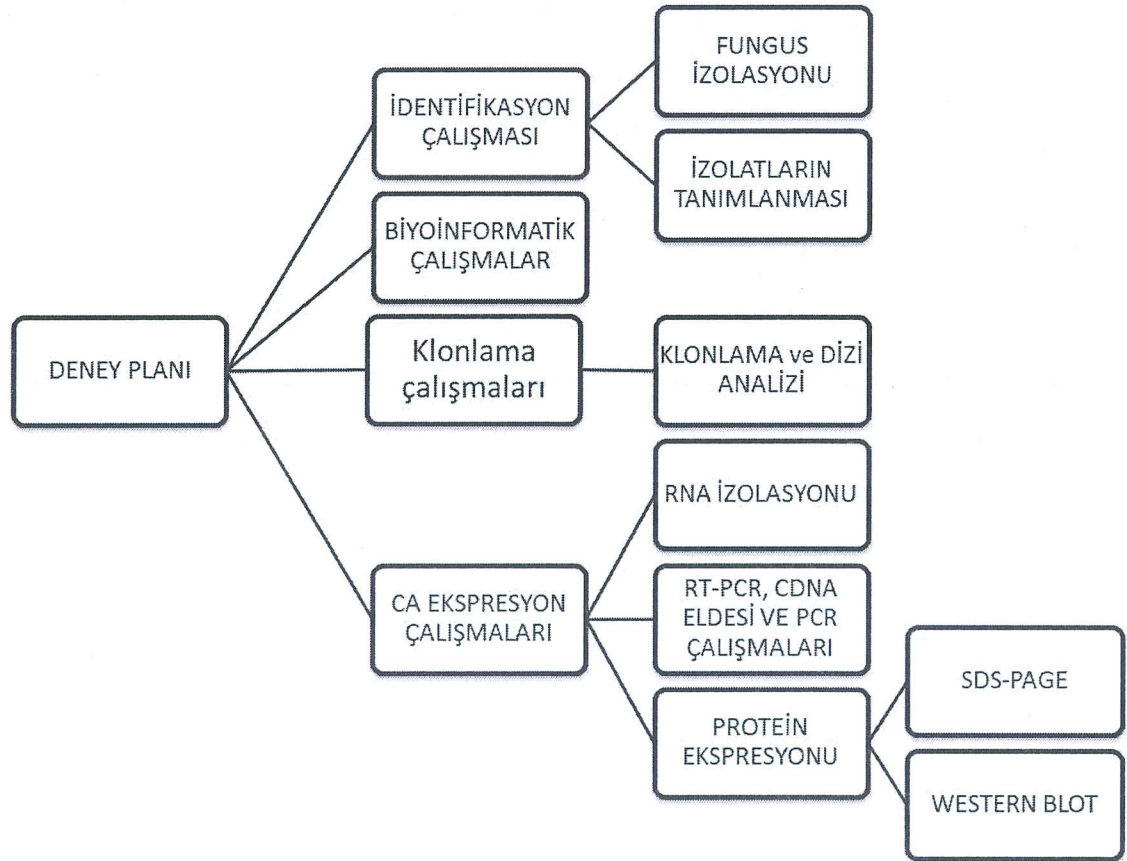
Rekombinat proteininin ekspresyon sisteminin mekanizmasının genel hatları (Şekil 1.8) aşağıdaki gibi özetlenebilir [88].

1. Lac I geni baskılayıcı molekül olarak yapısal genlerin transkripsiyonunu düzenlemektedir. İzopropil thiogalaktosid (IPTG), ortama eklendiğinde bakteriyel kromozomun lac operatörüne bağlanarak lac represör proteinini inaktif hale getirir.
2. Lac operatöründen, lac represörünün ayrılması ile lac promotörü boş kalır ve buraya bakteriyel RNA polimeraz bağlanır. Bu sayede T7 RNA polimeraz genin transkripsiyonu başlatır. Böylece RNA polimeraz yapısal genlerin transkripsiyonunu gerçekleştirir ve laktoz metabolizması için gerekli olan enzimler sentezlenir.

1.6 Çalışmanın Amacı

Bu tez, şekil 1.8’de gösterildiği gibi çeşitli alt çalışmaları içeren iki ana basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta Balıkesir bölgesinin 10 farklı lokalitesinden çavdar örnekleri toplandı. Mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak mikotoksin zengin bir tür olan *Aspergillus flavus*’un kalitatif ve kantitatif analizi yapıldı.

İkinci basamakta moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak, *Aspergillus flavus* mikro-fungusundan RNA izolasyonu, β -CA ailesine dahil olan karbonik anhidraz geninin klonlanması, RT-PCR stratejisi ile cDNA eldesi ve rekombinat proteinin prokaryot konakçıda üretilmesi gerçekleştirildi.



Şekil 1.8: Tez çalışma diyagramı

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Mikrobiyolojik Materyaller

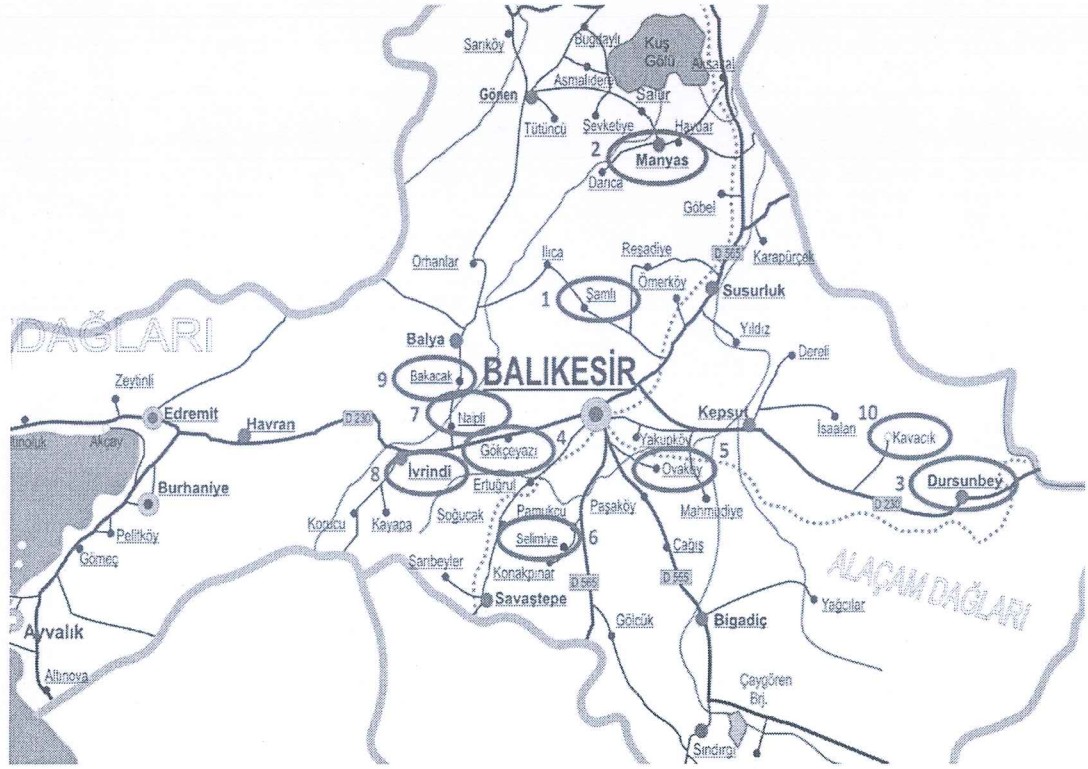
2.1.1.1 Araştırma Materyali

Bu çalışmada Balıkesir ili ve çevresinde satışa sunulan çeşitli çavdar örnekleri Balıkesir ili çevresindeki köylerden temin edilmiş olup; her bir örnekten en az 500'er gram olmak üzere satın alındı.500'er gramlık çavdar örnekleri ağzı kapalı poşetlere konularak laboratuvara getirildi ve küf izolasyonları yapıldı.

İncelenen çavdar örneklerinin alındığı yerlere ait bölge haritası Şekil 2.1'de ve alınan örnek sayısı ve alındığı bölgeye göre dağılımı Tablo 2.1'de görülmektedir.

Tablo 2.1: Toplanan örneklerin numarası, cinsi ve toplandığı yer

Örnek No	Örneğin Cinsi	Toplandığı Yer	Örneklerin Kodları
1	Çavdar	Edremit-Şamlı Köyü	1ÇŞM
2	Çavdar	Manyas-Merkez	2ÇMY
3	Çavdar	Dursunbey köyü	3ÇDR
4	Çavdar	Gökçeyazı -Merkez	4ÇGK
5	Çavdar	Ovaköy	5ÇOV
6	Çavdar	Selimiye Köyü	6ÇSL
7	Çavdar	Naıpli Köyü	7ÇNA
8	Çavdar	İvrindi- Merkez	8ÇİV
9	Çavdar	Bakacak Köyü	9ÇBK
10	Çavdar	Kavacık Köyü	10ÇKV



Şekil 2.1: Örneklerinin toplandığı bölge haritası

2.1.1.2 Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.2.1 Malt Ekstrakt Agar (MEA)

Malt Ekstrakt	20,0 g
Pepton	1,0 g
D-Glukoz	20,0 g
Agar	20,0 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satın alınan(Merck1.05398) Malt Ekstrakt Agar kullanıldı. 20 gram Malt Ekstrakt Agar 1000 ml distile su içersine ilave edilerek çözüldü. Stok kültürler için kullanılacak olan besiyerinin bir kısmı cam tüplere her tüpe 5 ml gelecek şekilde paylaştırıldı. 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilen besiyeri

steril petrilere dökülerek tanılamada veya yatık halde stokların saklanması için kullanıldı. Bubesiyeri özellikle küf ve mayaların tanılanması için kullanılmaktadır [88].

2.1.1.2.2 Malt Extrakt Broth

Malt Extrakt	17,0 g
Pepton	3,0 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satın alınan (Merck 70146) Malt Extrakt Broth besiyeri kullanıldı. 17 gram Malt Extrakt Broth 1000 ml distile su içerisine ilave edilerek çözüldü. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Bu besiyeri küf tanılamasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.1.1.2.3 Czapeks Dox Agar (CZ)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek Konsantresi	10,0 g
Sükroz	30,0 g
Agar	15,0 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satın alınan (Merck105460) Czapeks Dox Agar kullanıldı. 48 gram Czapeks Dox Agar besiyeri 1000 ml distile su içerisine ilave edilerek çözüldü. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Bu besi yeri *Aspergillus* türlerinin morfolojik özelliklerinin tanılamasında yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

2.1.1.2.4 Czapek Yeast Ekstrakt Agar (CYA)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek Konsantresi	10,0 g
Sükroz	30,0 g
Agar	15,0 g
Yeast Extract	5,0 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri bileşenleri uygun oranlarda tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü. Ortam kaynayana kadar ısıtılıp karıştırdıktan sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra yaklaşık 50°C'ye kadar soğutularak steril petrilere döküldü. Bu besiyeri *Aspergillus* ve *Penicilium* türlerinin tayininde kullanılmaktadır.

2.1.1.2.5 Dichloran Rose Bengal Chloramphenical (DRBC)

Pepton	5,0 g
KH ₂ PO ₄	10,0 g
D-Glukoz	30,0 g
Dichloran	0,002 g
MgSO ₄	5,0 g
Rose Bengal	0,025 g
Kloramfenikol	0,1 g
Agar	15,0 g
Distile su	1000 ml

Ticari olarak satın alınan (Merck1.00466.0500) besiyerinden 32,0 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve kaynatılıp tamamen çözülmeye kadar ısıtıldı. Ortam 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra yaklaşık 50°C'ye kadar soğutuldu ve steril petrilere paylaştırıldı.

Rose Bengal kloromfenikol (RBC) agar DRBC besiyerinin modifiye edilmiş şeklidir. Bileşimine dikloran ilave edilmiş, pH düşürülmüş ve Rose Bengal konsantrasyonu yarıya indirilmiştir. Bu şekilde mayalar ve bakteriler için daha iyi bir

inhibisyon sağlanırken küf kolonilerinin yayılması önlenerek sayımın daha iyi yapılması sağlanır [90].

2.1.1.3 Çözeltiler

2.1.1.3.1 Laktofenol Çözeltisi

Fenol	25,0 g
Laktik asit	20,0 g
Gliserin	40,0 g
Distile su	20 ml

Küflerin mikroskopik olarak incelenmesinde kullanıldı.

2.1.2 Moleküler Biyoloji materyalleri

2.1.2.1 Kullanılan Besiyerleri

2.1.2.1.1 Luria Bertani Broth (LB Broth)

Triptofan	10.0 g/L
Maya Özütü	5.0 g/L
NaCl	5.0 g/L

Ticari olarak satın alınan (Sigma L3022) besiyerinden 20,0 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Daha sonra yaklaşık 50°C’ye soğutularak kullanıldı.

E.coli için gerekli olan bu kültür ortamı içeriğindeki triptofan, aminoasitleri ve ufak peptitleri karşılarken, maya özütü şekerler, inorganik ve organik besinlerle birlikte azot gereksinimlerini sağlar [81].

2.1.2.1.2 Luria Bertani Agar (LB Agar)

Triptofan	10.0 g/L
Maya Özüdü	5.0 g/L
NaCl	5.0 g/L
Agar	15.0 g/L

Ticari olarak satın alınan (Sigma L2897) besiyerinden 35,0 gram tartılarak 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve kaynatılıp tamamen çözülünceye kadar ısıtıldı. Besiyeri, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi ve yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulularak steril petrilere paylaştırıldı.

2.1.2.2 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma Aldrich ve Merck'ten, moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılan kimyasal, enzim ve kitler ise Stratagene, İnvitrogen, Fermentas MBI, New England Biolabs, Promega, Qiagen ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.2.3 Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Gereçleri

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar alet ve malzemeleri üreticileri ile Tablo 2.2'de listelenmiştir.

Tablo 2.2: Tez çalışmasında kullanılan cihazları ve modelleri

Kullanılan Gereç	Modeli
-80 °C Derin Dondurucu	Sanyo, Japonya
Buz Makinesi	Fiocchetti Frigoriferi Scientifici, İtalya
Buzdolabı	Profilo, Türkiye
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, USA
Elektroforez	Apelex, İngiltere
Elektronik Tartı	Sartorius, Almanya
Etüv	WTB, German, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica, İspanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
Thermocycler	Techne Progene, İngiltere
pH Metre	WTW, Almanya
Jel görüntüleme sistemi	Bioimaging Systems
Saf su cihazı	Destilasyon 3.1 (Comecta Sa.)
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, Germany
SDS PAGE Aparatları	Atto, Japonya
Elektroforez için Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Sıcak su banyosu	Elektro-mag, Türkiye
Isı kontrollü çalkalamalı etüv	GFL, Almanya
Isıtıcı blok	FALC, İtalya
UV visible Spektrofotometreler	Heios(Unicam), Metro Lab,
Vorteks	Elektromag, Türkiye
Pipetler	Finnpipette, Eppendorf
MikroSantrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Germany

2.1.2.4 Çalışmada Kullanılan Küf Suşları

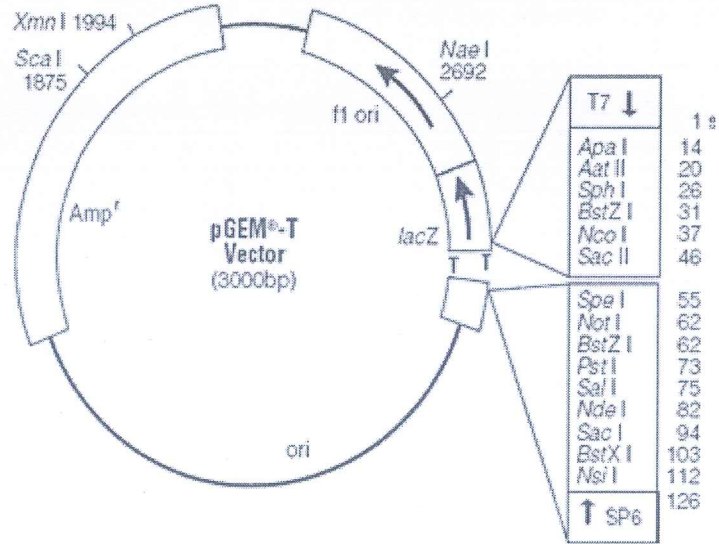
Çalışmada *Aspergillus flavus* küf suşu kullanıldı. Kullanılan bu küf suşu Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğretim üyesi danışmanım olan Doç. Dr. Tülin AŞKUN'dan temin edildi.

2.1.2.5 Bakteriyel Hücre Soyları

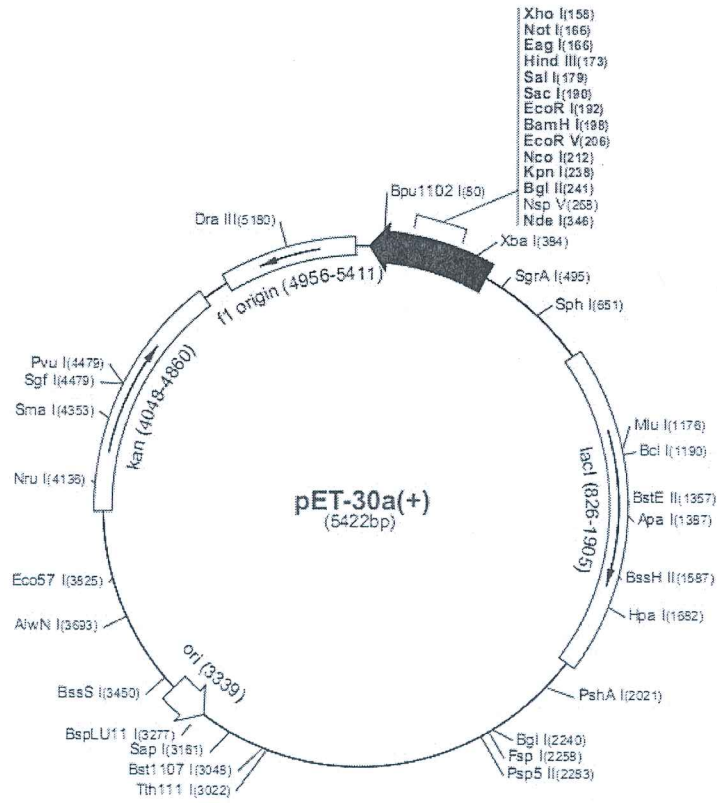
Klonlama ve stok amaçlı DH5 α (SupE44 Δ lacU169 (Φ 80 LacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thr-1 rI A1)kompetent *E.coli* soyu kullanıldı.Ekspresyon amaçlı çalışmada kullanılan bakteri soyu BL21(DE3) kodon plus olup, bu soyun genotipi (*E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ (DE3) şeklindedir [91].

2.1.2.6 Plazmidler

Çalışmada PCR ürünlerinin klonlanması amacıyla pGEM-T easy vektör sistem I kullanıldı. pEGM-Teasy vektör haritası Şekil 2.2'de gösterildiği gibidir. Ekspresyon amaçlı kullanılan plazmit pET30a(+) olupplazmit haritası Şekil 2.3'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.2: pGEM-T easy Vektör haritası



Şekil 2.3: pET30a(+) Vektör haritası

2.1.2.7 Tamponlar ve Çözeltiler

2.1.2.7.1 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

DEPC (Dietilpirokarbonat)'lı Su: 0.1ml DEPC, 100ml dH₂O'da çözüldü. 37°C'de 12 saat bekletildikten sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. RNA çalışmalarında kullanılacak olan tamponlar DEPC'li su kullanılarak hazırlandı.

Tablo 2.3:Liziz tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
Tris (pH:8)	100 mM
EDTA	10 mM
SDS	%2
Proteinaz K	100 µg/ml
β-merkaptioethanol	%1

2.1.2.7.2 Formaldehit-Agaroz Jel Elektrofrezisi Tamponları

Formaldehit agaroz jel elektrofrezisinde kullanılan jel tamponu Tablo 2.4'de ve tank tamponu Tablo 2.5'de gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2.4:Formaldehit agaroz elektrofrezisi jel tamponu

FA jel tamponu	Stok Çözelti	Son Konsantrasyon
MOPS(pH:7)	1M	0.2M
EDTA(pH:8)	0.5M	0.05M
Na-Ac	1M	0.01M
Tampon son konsantrasyonlar dikkate alınarak DEPC 'li su ile hazırlandı. pH: 7'ye ayarlandı, son konsantrasyon 1L'ye tamamlandı ve otoklavlandı.		

Tablo 2.5:Formaldehit jel elektroforez tank tamponu

FA Tank Tamponu	Son Konsantrasyon
10X FA Jel Tamponu	1X
%37 'lik (12.3M) Formaldehit	0.25M
DEPC 'li dH ₂ O	1L 'ye tamamlanır

2.1.2.8 E.coli için Bakteriyel Kültür Ortamları

E.coli için gerekli kültür ortamı olarak LB-broth ve LB-agar kullanıldı. Toz halinde temin edilen bakteriyel medyumlar üretici firmanın belirttiği şekilde dH₂O ile hazırlanarak otoklavlandı.

2.1.2.9 Antibiyotiklerin Hazırlanması

Kültürde kullanılan ampicillin stokları 100mg/mL olacak şekilde steril dH₂O ile hazırlanarak 0.22 mikronluk filtreler kullanılarak steril edildi ve -20 °C'de saklandı.

Kültürde kullanılan kanamisin stokları 50 mg/ml olacak şekilde sterildH₂O ile hazırlanarak 0.22 mikronluk filtreler kullanılarak steril edildi ve -20 °C'de saklandı.

2.1.2.10 Agaroz Jel Elektroforezi Tamponları

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan Tris-Borik Asit EDTA Tamponu Tablo 2.6'da belirtilen şekilde hazırlandı. DNA yükleme tamponu ise Tablo 2.7'de belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 2.6:(0,5)X-TBE (Tris-Borat) tamponu

Stok Solüsyon	Son Konsantrasyon
1M Tris-borat	0.045M
0.5M EDTA (pH:8)	0.001M

Tablo 2.7:6X DNA Yükleme tamponu

Kimyasal Madde	Son Konsantrasyon
99% Bromfenol Blue	0.25% (w/v)
99% Fikcol	15% (w/v)

2.1.2.11 Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlama Solüsyonu

DH5 α hücre hattının kompetan hale getirmek amacıyla kullanılan çözeltiler ve son konsantrasyonları Tablo 2.8’de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 2.8:Kompetan hücre hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar

Kimyasal madde	Son Konsantrasyon
1M CaCl ₂	100mM
%99 Gliserol	%40

BL21(DE3) hücre hattının kompetan hale getirilmesi amacıyla kullanılan tritilasyon tamponu Tablo 2.9’da gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 2.9:Tritilasyon tamponu

Kimyasal madde	Son Konsantrasyon
CaCl ₂	100mM
MnCl ₂	70mM
Na Asetat	40mM
pH 5.5 'e ayarlandı.	

2.1.2.12 Protein Ekspresyonunda Kullanılan Tamponlar

Protein ekspresyonun da kullanılan bakterileri yıkama tamponu Tablo 2.10'da belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 2.10:Bakteri yıkama tamponu

Kimyasal madde	Son Konsantrasyon
Tris-bese	20.19M
dH ₂ O	100mL'ye tamamlanır
Tris-base 90mL dH ₂ O'da çözüldü ve pH 7.6'ya ayarlanarak hacim 100mL'ye tamamlandı. Tampon 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi.	

Bakteri hücrelerini lizize uğratmak amacıyla kullanılan liziz tamponu Tablo 2.11'de belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 2.11:Liziz tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
20 mM Tris-base	2.44 gr
0.5 mM EDTA	1,0 mL
0.5 mM EGTA	1,0 mL
dH ₂ O	1L'ye tamamlanır.
Belirtilen miktarlar 800mL destile H ₂ O'da çözüldü ve HCl pH8.7'ye ayarlandı. Tamponotoklavlandı ve +4 °C 'de saklandı.	

5mM ZnCl₂ Solüsyonu: 0.068gr ZnCl₂, 100 mLdestile H₂O'da çözüldü ve otoklavlanarak steril edildi.

PMSF (Fenilmetilsülfonil Florid) Stok Solüsyonu (100X=100mM): 174mg PMSF 10ml 2-propanolde çözüldü ve ışık almayacak şekilde -20 °C 'de saklandı.

2.1.2.13 SDS – Poliakrilamid Jel Elektroforez Tamponları

Protein elektroforezinde kullanılan %10'luk ayırma jeli (Tablo 2.12), yığıma jeli (Tablo 2.13), tank tamponu (Tablo 2.14), yükleme boyası (Tablo 2.15) ve boyama çözeltisi (Tablo 2.16)'de belirtilen bileşen vekonsantrasyonlar da hazırlandı.

Tablo 2.12: %10 Ayırma Jeli

Stok Solusyonlar	Son Konsantrasyon
Alt Tampon	2,5 mL
Akrilamid- Bisakrilamid (37,5:1)	2,5 mL
ddH ₂ O	5 mL
%10 APS	100 µL
TEMED	10 µL

Tablo 2.13: Yığıma jeli

Kimyasal Madde	Miktar
Üst Tampon	1,25 mL
Akrilamid- Bisakrilamid (37,5:1)	625 µL
ddH ₂ O	3,07 mL
%10 APS	50 µL
TEMED	5 µL

Tablo 2.14: Tank tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
Tris	30,3 gr
Glisin	144,4 gr
dH ₂ O	1000 mL'ye tamamlanır. Jel yürütülürken 1X'e dilüe edilir. 500 mL'ye 5 mL %10 SDS eklenir.

Tablo 2.15: Yükleme boyası

Kimyasal Madde	Miktar
Tris	1,4 gr
SDS	4 gr
Sukroz	20 gr
Bromfenol Blue	4 mgr
dH ₂ O	pH 6,8'e ayarlanarak 100 mL'ye tamamlanır.
1 mL için 950 µL jel yükleme solusyonu + 50 µLβ-merkaptoethanol eklenir.	

Tablo 2.16: Boyama çözeltisi

Kimyasal Madde	Miktar
Coomassie Brilliant Blue 250	0.25g
%95 Etanol	100mL
%10 Asetik asit ile karıştırılır.	

Western Blot basamağında kullanılan transfer tamponu ve 10XTBS tamponu Tablo 2.17 ve 2.18'de belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 2.17: Transfer tamponu

Kimyasal madde	Miktar
10Xtank Tamponu	200 mL
Methanol	200 mL
dH ₂ O	1000 mL'ye tamamlanarak, %10'luk'den SDS 500 µL eklenir.

Tablo 2.18: 10XTBS

Kimyasal Madde	Miktar
0,2 M Tris	24,22 gr
1,5 M NaCl	87,66 gr
dH ₂ O	pH 7,5'e ayarlanarak 1000 mL'ye tamamlanır.
1 L 1XTBS'e 1 mL Tween 20 eklenir	

Tablo 2.19: Bloklama tamponu

Kimyasal Madde	Miktar
Bloklama Ajanı	0,1 gram
1XTBS +Tween20	18 ml
1 L için 10XTBS'den 100 ml alınarak 900 ml dH ₂ O ile tamamlanarak 1XTBS elde edildi. 1 L 1XTBS'ye 1 ml Tween20 eklendi.	

2.2 Metot

2.2.1 Mikrobiyolojik Yöntemler

2.2.1.1 Cam Malzeme ve Plastik Malzemenin Hazırlanması

Isıya dayanıklı malzemeler, pipet uçları, ependorflar, santrüfuj tüpleri, solusyonlar, kültür ortamları ve cam malzemeler, 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

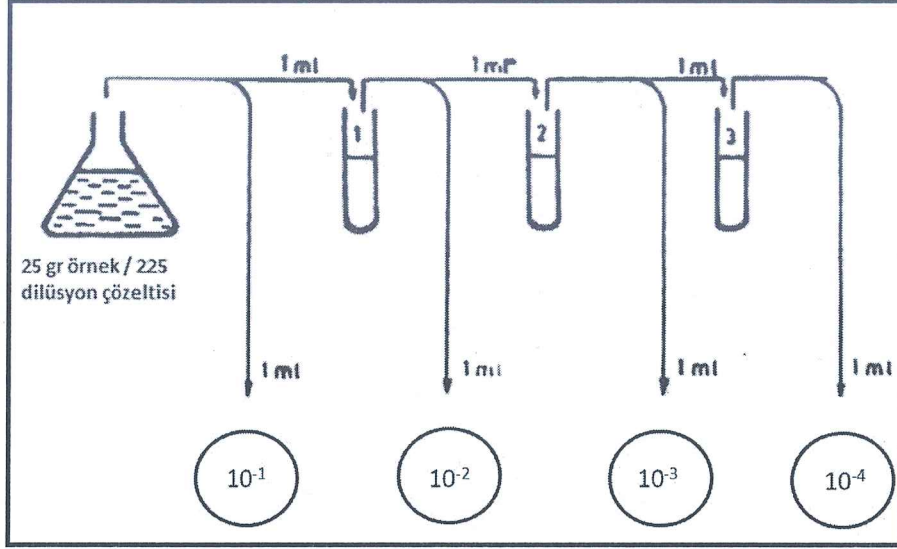
2.2.1.2 Örneklerin Analize Hazırlanması

Fungal floranın tayininde tüp dilüsyon metod yöntemi kullanıldı.

1. Balıkesir köylerinden toplanan her bir çavdar örneğinin 15 gr'ı alınarak aseptik koşullar altında 135 ml steril serum fizyolojik su içerisine aktarıldı. Böylece örnekler 1/10 oranında seyreltildi.
2. Homojenizasyon amacıyla çalkalayıcıda 30 dakika çalkalanarak küflerin suya geçmesi sağlandı. Elde edilen bu homojenat 10^{-1} 'lik dilüsyon olarak kabul edildi.
3. Homojenizasyonun ardından içlerinde 9'er ml serum fizyolojik bulunan steril tüplere seri halinde 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} seyreltmeler hazırlandı.
4. Her bir dilüsyondan çift paralel olacak şekilde 9 cm'lik steril petrilere 1'er ml aktarıldı.
5. İçerisinde 1'er ml örnek bulunan steril petrilere üzerine daha önceden 121°C'de 15 dk otoklavlanan ve daha sonra 45°C'ye kadar soğuması beklenen besiyerleri aseptik koşullar altında döküldü ve sekiz hareketi ile homojen bir şekilde karışması ve katılaşması sağlandı. Fungusların izolasyonunda DRBC besiyeri kullanıldı.
6. Katılaşan petrilere 25°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrasında petrilere ters çevrilip asetat kalemiyle işaretlenerek sayıldı ve sayım sonucu her bir petri için sulandırma katsayısı ve

seyreltme faktörü ile çarpılarak her bir örnekteki küf yükü hesaplandı. Sonuç kob/g (koloni oluşturan birim/g) cinsinden verildi.

- İzole edilen funguslar MEA veya PDA'lı yatık tüplere aseptik koşullarda çekildi ve inkübe edilerek saf kültürleri elde edildi. Tanılama aşamasına geçilene kadar izolatlar kısa süre için +4°C'de, uzun süre için -20 °C'de saklandı.



Şekil 2.4: Dilüsyon (seyreltme) tekniğinin şematik olarak gösterimi

2.2.1.3 İzolatların tanılanması

İzole edilen küfler ilk olarak genus düzeyinde tayinlerinin yapılabilmesi için MEA ve PDA ortamlarına alındı. 25°C'de 5-7 gün inkübasyonun sonunda koloniler makroskopik ve mikroskopik olarak incelendi ve tür düzeyinde tanımlandı.

Tür düzeyinde tanılamada *Aspergillus* türleri için "Identification of Common *Aspergillus* Species [3]" ve esas alındı ve bu genusun tür tayini için MEA, CZ, CYA25 ortamları kullanıldı.

İzolatlar 3 ayrı ortama üç nokta ekimi ile ekildi ve 25°C'de 7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petri arkası ve önü rengi, tekstür, koloni çapları gibi makroskopik özelliklerine ve laktofenol çözeltisi kullanarak hazırlanmış preparatlarda mikroskopik özelliklerine göre tayin gerçekleştirildi.

Koloni özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan ilk gözlemlerde düşük büyütme binoküler veya stereo mikroskop kullanıldı daha sonra detaylı incelemeler için Olympus CX41 marka mikroskop kullanıldı. Görüntüler Kameram 518CU marka kamera ile bilgisayara aktarıldı.

2.2.1.4 Seloteyp-Bant Metodu

Preparatların hazırlanmasında kullanılan bu yöntem, lamı uzunluğuna örtecek şekilde ve kenarlarından 1 cm dönecek kadar seloteyp bant kesilerek uygulandı. Seloteyp bant metodu kullanılarak koloni kenarına üstten hafifçe bastırıldı ve alınan misel ve sporlar lam üzerine damlatılan laktofenol çözeltisi üzerine kapatılarak incelendi. Bu yöntemde bantın altında bulunan ince hava kabarcığı alanlarının bulunması mikroskopik incelemede misel ve sporların hücre duvarlarının görünümünü daha belirgin hale getiren bir özelliktir [92].

2.2.1.5 Lam – Lamel Arası İnceleme Yöntemi

İncelenecek küf kültüründen alevde steril edilmiş öze yardımıyla küçük bir parça alındı ve bir damla laktofenol çözeltisi damlatıldıktan sonra lam-lamel arası inceleme yapıldı [95].

2.2.1.6 Kültürlerin Saklanması Kullanılan Yöntemler

İdentifikasyonu yapılan türlerin uzun süreli muhafazasını sağlamak amacıyla üç ayrı yöntem kullanıldı. Her üç yöntemde de kültürler kullanılmadan önce aktive edildi.

2.2.1.6.1 Derin Dondurucuda Muhafaza

Yatık malt ekstrakt agar'a çekilen suşlar 5-7 günlük inkübasyonun ardından -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

2.2.1.6.2 Gliserolde Muhafaza

Yatık malt ekstrakt Agar'a ekilmiş olan suşlar renklenme süresine göre 7-14 gün inkübasyon süresinden sonra üzerlerine 5 ml malt ekstrakt broth ilave edildi ve sporların dağılması için vortekslendi.

Daha önceden hazırlanmış olan %30'luk steril gliserolden 2 ml'lik ependorf tüpler içerisine 0,5 ml'lik gliserol mikropipet yardımıyla çekildi. Beki alevi başında mikropipet yardımıyla 0,5 ml'lik küf sporları gliserol içerisine eklendi ve -80°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.2 Moloküler Biyoloji Yöntemleri

2.2.2.1 RNA İzolasyonunun Yapılması

2.2.2.1.1 Mobio Kit ile RNA İzolasyonu

Aspergillus flavus sporlarının PDA ve MEA besiyerlerine tek spor ekimi yapıldı. Petriler 27 °C'de dört gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından hücre kazıcı yardımıyla kazınarak elde edilen sporlar 2 ml'lik ependorflara ayrıldı. Yaklaşık 200 mg örnek daha önceden pastörde steril edilip DEPC'li sudan geçirilen havanlara alınarak sıvı azot yardımıyla ezildi. Toz haline gelen örneklere liziz tamponu (bkz. Tablo2.3) eklendi ve 60°C'de bir saat inkübasyona bırakılarak kimyasal parçalama basamağı gerçekleştirildi. Elde edilen homojenattan Mobio mikrobial RNA izolasyon kitinde belirtilen prosedüre göre total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA, 35 µl RNaz içermeyen steril distile H₂O ile elüe edildi.

2.2.2.1.2 Qiagen Plant Mini Kit ile RNA izolasyonu

A. flavus sporlarının büyüme koşulları Bölüm 2.2.2.1.1'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Elde edilen yaklaşık 200 mg spor örneği daha önceden pastörde steril edilip DEPC'li sudan geçirilen havanlara alınarak sıvı azot yardımıyla ezildi. Toz haline getirilen örneklerden Qiagen Plan Mini Kitin'de belirtilen prosedüre göre total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA, 35 µl RNaz içermeyen steril distile H₂O ile elüe edildi.

2.2.2.1.3 STE Metod ile RNA İzolasyonu

Fungal Kültürün Hazırlanması aşamasında, +4 °C'de muhafaza edilen *A. flavus* suşları kullanıldı. Yatık platelerde bulunan örneklere 5 ml malt broth ilave edilerek sporların dağılması amacıyla maksimum hızda vortekslendi. 100 ml'lik erlenlerin içerisine 50 ml malt broth besiyeri ve toplam hacmin %10kadar sporlar kültüre inoküle edildi. Kültür 27°C'de 110 rpm'de iki gün inkübasyona bırakıldı.

1 g/örnek sıvı azotla ezilerek homojen hale getirildi. Homojen hale gelen örneğe 500 µl ekstraksiyon tampunu eklenerek yavaşça, daha sonra eşit hacimde fenol-kloroform- izoamil alkol(PCI) eklenerek otuz saniye kuvvetli bir şekilde vortekslendi. 12.000 rpm'de 4 °C'de on dakika çöktürüldü. Supernatant hacmine dikkat ederek yeni bir ependorfa aktarıldı ve ikinci kez PCI alkol uygulaması yapıldı. Bu işlemde amaç proteinleri uzaklaştırmaktır. Çöktürme işleminin ardından üst faz, hacmine dikkat edilerek yeni bir ependorfa alındı. Toplam hacmin 1/10'u kadar 3M Na-Ac (sodyum asetat) ve toplam hacmin 2,5 katı kadar etanol eklenerek iyice karıştırıldı. -20°C'de kırk dakika inkübasyona bırakıldı. 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika çöktürüldü. Elde edilen pellet %70'lik etanolle yıkanarak çeker ocakta kurumaya bırakıldı. İzole edilen RNA, 35 µl RNaz içermeyen steril distile H₂O ile elüe edildi [93].

2.2.2.1.4 Değiştirilmiş STE Metod

Fungal kültürün hazırlanması Bölüm 2.2.2.1.3'de bahsedildiği gibi hazırlandı. STE metodunda bahsedildiği gibi gerçekleştirilen basamaklara ilave olarak, sodyum asetat (Na-Ac) ve etanol presipitasyonun ardından elde edilen pelletler 60 µL TE bufferda çözüldü. Daha sonra hemen ardından 40 µl 5M LiCL eklenerek 4 °C'de 2-3 saat inkübasyona bırakıldı. 12.000 rpm'de 4°C'de 10 dakika çöktürüldü. Çöktürme sonrasında supernatant atılarak elde edilen pellet %70'lik etanolde yıkanarak kurumaya bırakıldı. İzole edilen RNA, 35 µl RNaz içermeyen steril destile H₂O ile elüe edildi [96].

2.2.2.1.5 Trizol ile RNA İzolasyonu

Tri reagent (sigma), guanidin tiyosiyonat ve fenol karışımı bir monofaz karışımıdır. Bir homojenatta yada lizis olmuş bir örnekte DNA, RNA ve proteinleri çözerek işlev gösteren bu ajan oldukça zehirli özelliğe sahiptir.

Fungal kültürün hazırlanması bölüm 2.2.2.1.3'de bahsedildiği gibi hazırlandı. Yaklaşık 200 mg örnek daha önceden pastörde steril edilip DEPC'li sudan geçirilen havanlara alınarak sıvı azot yardımıyla ezildi. Toz haline gelen örneğe 2 ml trizol eklenerek homojen bir görüntü olması beklendi. Trizol'ün etkisini artırmak amacıyla vorteks yapılarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 12.000 rpm'de +4°C'de 10 dakika çöktürüldü. Elde edilen supernatant temiz bir ependorfa aktarıldı. Tüplere 0,2 ml(200µl) kloroform eklenerek vorteks yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 12.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika çöktürüldü. Sıvı akışkan faz temiz bir 1,5 ml'lik ependorfa alındı ve ardından tüplere 0,5 ml (500µl) isopropanol eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 12.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika çöktürme işleminin ardından supernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Elde edilen pellete 1 ml%75'lik etanol eklenerek 15 saniye vortekslenerek pelletin tamamen çözünmesi sağlandı. 12.000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika çöktürülmenin ardından supernatant atılarak pellet çeker ocakta kurumaya bırakıldı. İzole edilen RNA, 35 µl RNaz içermeyen steril destile H₂O ile elüe edildi.

2.2.2.2 RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İzole edilen RNA 1:200 oranında RNaz içermeyen dH₂O ile sulandırıldı. Kuvartz küvet kullanılarak A₂₆₀ ve A₂₈₀ dalga boylarında absorbans alındı. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı hesaplanarak RNA'nın saflığı belirlendi. RNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{RNA miktarı} = 40\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL RNA}$$

2.2.2.3 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi

İzole edilen RNA örnekleri RNaz enziminin etkilerine karşı açık olduğundan kullanılan cam malzemeler, elektroforez tankı ve su RNaz enziminden arındırıldı. RNaz içermeyen su (DEPC) Bölüm 2.1.2.7.1'de belirtildiği gibi hazırlandı. Cam malzemeler % 0.1 DEPC içeren suda 12 saat bekletildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı. Elektroforez tankı öncelikle % 0.5'lik SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra RNaz içermeyen DEPC'li su ile durulanarak saf etanolden geçirildikten sonra kurumaya bırakıldı. İzole edilen RNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla %1'lik Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi (bkz. Tablo 2.5) yapıldı. Jelin yapımı için 0.5 gr agaroz tartılıp 5 ml 10XFA jel tamponu (bkz. Tablo 2.4) ve 45 ml DEPC'li su ile 50 ml'ye tamamlanarak çözüldü. Jel kaynatıldıktan sonra 50°C'ye kadar soğuması beklendi. %37'lik (12.3M) formaldehitten 0.9 ml (900µL) eklenerek homojen bir şekilde karışması sağlandı. Son konsantrasyon 0,5µg/mL olacak şekilde Et-Br eklenerek iyice karıştırıldı. Jel elektroforez kasetine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan jel kasete döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi. 4 µl RNA örneği ve 1 µL RNA yükleme tamponu karıştırıldı ve 5 µL RNA markır ile önce 65°C'de 10 dakika ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dakika buzda bekletildi. Örnekler jele yüklenerek 1X FA Jel tamponu (bkz. Tablo 2.5) içerisinde 90 Voltta yürütüldü. Elektroforez sonucu dijital jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi ve fotoğraflandı [97].

2.2.2.4 RT- PCR Reaksiyonu

RNA örneklerinden cDNA sentezlemek için Fermentas RT-PCR kitinde (#EP0441) kullanıldı.RNA örnekleri buz içerisinde çözüldü ve her RNA kalıbından 5 µg olacak şekilde hesaplanarak ependorf tüpü içersine konuldu.Reverse transkripsiyon reaksiyonu 20 µL'lik toplam hacimde belirtilen talimatlara göre Tablo 2.20 ve Tablo 2.21'de belirtilen şekilde çalışıldı [94].

Tablo 2.20: Reverse transkripsiyon bileşenleri

Kit İçeriği	Miktar ve Son Konsantrasyon
RNA kalıp	11,5µL
Oligo (dT) ₁₈ (0,5 µg)	1 µL
dH ₂ O	-
Toplam Hacim	12,5 µL

65°C'de 5 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda reaksiyon tüpüne Tablo 2.21'deki reverse transkripsiyon bileşenleri eklendi.

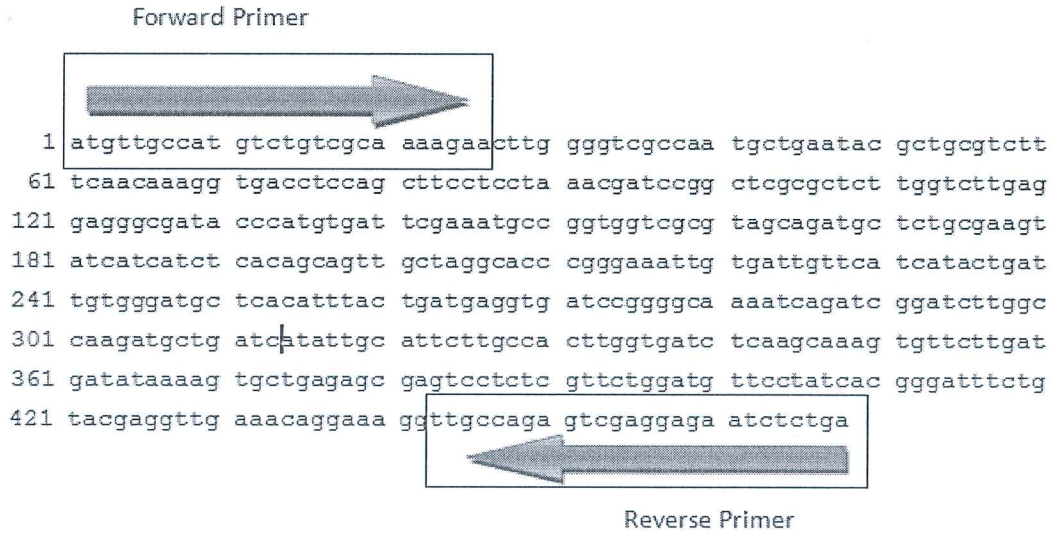
Tablo 2.21:Reverse transkripsiyon bileşenleri

Kit İçeriği	Miktar ve Son Konsantrasyon
5X Reaksiyon Buffer	4 µL
RiboLock Rnase İnhibitör (20u)	0,5 µL
dNTP Mix (10 mM)	2 µL
M-MuLVRevers Transkriptaz	1 µL
Toplam Hacim	20 µL

Reaksiyon tüpü 42°C'de 60 dakika ve 70 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.Bu sürenin sonunda cDNA elde edildi.Elde edilen cDNA -20 °C 'de kısa süreli saklandı.

2.2.2.5 Primerlerin Tasarlanması

Aspergillus flavus karbonik anhidraz gen bölgesinin NCBI’da taraması yapıldı ve çalıştığımız gen bölgesinin nükleotid dizisi belirlendi (Şekil 13). Belirlenen nükleotid dizisi baz alınarak genimize uygun restriksiyon enzimlerinin belirlenmesi amacıyla “Restriksiyon Mapper” sitesinden genimizi kesmeyen fakat klonlamada kullanılacak pET30a(+) vektörünü kesen enzimlerin listesi elde edildi. Uygun kesim bölgeleri belirlenerek *A. flavus* CA geninin 5’ ucuna NcoI enzimi ve 3’ ucuna HindIII enzimi eklenerek primerler dizayn edildi (Tablo 2.22) Belirlenen primerlerin baz uzunlukları IDT (Integrated DNA technologies) sitesinden Tm sıcaklıkları ve saç tokası yapıları göz önüne alınarak tasarlandı. %GC içeriğine, primerlerinin Tm değerlerinin birbirlerine yakın olmasına ve saç tokası oluşumunun meydana gelmemesine dikkat edildi. Ayrıca PCR’da kontrol grubu olarak kullanılması amacıyla çalışılan canlıya spesifik beta aktin primerlerinin dizaynı gerçekleştirildi.



Şekil 2.5: *Aspergillus flavus* karbonik anhidraz genin 475 baz çiftlik nükleotid dizisi

Tablo 2.22: *A.flavus* CA ve Beta Aktin genine spesifik olarak tasarlanan primerler (Kesim bölgeleri işaretlenmiştir)

Primerin Adı	Tm (°C)	Uzunluk (bç)	Primer Dizisi (5' - 3')
<i>A.flavus</i> CA F.primier	72,5	32	CCATGGATGTTGCCATGTCTGTCGCA AAAGAA
<i>A.flavus</i> CA R.primier	72,5	32	AAGCTT TCAGAGATTCTCCTCGACTCTGGCAA
<i>A.flavus</i> Beta aktin F.primier	62,5	25	TCCAATCTACGAAGGTTTCTCTATG
<i>A.flavus</i> Beta aktin R.primier	64,2	25	ACTCTCATCATACTCCTGTTTCGAG

2.2.2.6 Semi Kantitatif RT- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR reaksiyonu, optimize edilerek ayarlanan cDNA, spesifik *A.flavus* karbonik anhidraz primerleri, Taq polimeraz tamponu, dNTP karışımı ve taq polimeraz enzimi kullanılarak 50µl toplam hacimde Tablo 2.23'de belirtilen spesifik PCR döngüsü kullanılarak yapıldı. PCR koşulları 1 döngü 95 °C'de 2 dakika; 38 döngü 94 °C'de 1 dakika, 59 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1,5 dakika; ve enson uzatma döngüsü 72 °C'de 5 dakika olarak belirlendi. PCR sonuçları, %0,8'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak 90 voltta yarım saat boyunca yürütülerek dijital görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

Tablo 2.23: PCR reaksiyonu

PCRİçerikleri	Miktar ve Son Konsantrasyon
cDNA	1 µL
Taq Buffer	5 µL
MgCl ₂	4 µL
dNTP	1 µL
Forward Primer (100 ng/µL)	1 µL
Reverse Primer (100 ng/µL)	1 µL
Taq polimeraz	0,5 µL
dH ₂ O	36,5 µL
Toplam Hacim	50 µL

Tablo 2.24: PCR koşulları

	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95 ⁰ C	2 dk	1
Denatürasyon	94 ⁰ C	1 dk	38
Bağlanma	59 ⁰ C	1 dk	
Uzama	72 ⁰ C	1.5 dk	
Final uzama	72 ⁰ C	5 dk	1

2.2.2.7 Agaroz Jel elektroforezi

DNA'nın jelde görüntülenmesi amacıyla %0,8'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel elektroforezi, yürütülmek istenen DNA'nın büyüklüğüne göre farklıkonsantrasyonlarda hazırlanmaktadır. Bu amaçla jel elektroforezi aparatına uygun miktarda 0.4 gr Agaroz tartılarak 0,5xTBE tamponunda (bkz.Tablo 2.6) çözüldükten sonra kaynatıldı. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra son

konsantrasyon 0,5µg/mL olacak şekilde Et-Br eklenerek iyice karışması sağlandı. Tarakların önceden yerleştirilmiş olduğu agaroz jel elektroforezi aparatına jel döküldü. Jel polimerleştikten sonra taraklar çıkarılıp aparat elektroforez tankına yerleştirildi. 0.5xTBE tamponu ile elektroforez tankı dolduruldu. 5µL DNA örneği, 2 µL yükleme tamponuyla (bkz. Tablo 2.7)s karıştırıldı, 1kb DNA markırdan 5 µL ve hazırlanan örnekler agaroz jele yüklendi. Agaroz jelleri 90 Voltta 30 dakika boyunca yürütüldü. Elektroforez sonucu UV luminator kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen jelin görüntüsü Dijital görüntüleme Sistemi kullanılarak kaydedildi.

2.2.2.8 PCR Ürünlerinin Jelden Geri Kazanılması

PCR ürünleri, Thermo GeneJET Gel Extraction Kit'de belirtilen prosedüre göre geri kazanıldı [94]. 35µL dH₂O ile elüe edildi. Agaroz jelden kazanılan PCR ürünlerinin miktarı ve saflığı spektrofotometrik olarak belirlendi. Ayrıca örnekler % 0,8'lik Agaroz jel elektroforezinde Bölüm 2.2.2.7'de anlatılan şekilde yürütülerek kontrol edildi.

2.2.2.9 Spektrofotometrik Yöntemler

DNA, 1:200 oranında enjeksiyonlu su ile sulandırıldı ve kuvarz küvetler kullanılarak OD_{260nm}'de DNA'nın UV absorpsiyonu okundu. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplandı. Aynı zamanda elde edilen DNA'nın saflığı da OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı ile değerlendirilerek öğrenildi [96].

$$\text{DNA miktarı} = 50\mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} = \mu\text{g/mL DNA}$$

2.2.2.10 Plazmit DNA İzolasyonu

Plazmit izolasyonu için Fermentas GeneJET Plazmid Miniprep Kit protokolüne göre yapıldı. İzole edilen plazmit DNA 35 µl dH₂O ile elüe edildi. İzole edilen plazmitin saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik olarak belirlendi.

2.2.2.11 Restriksiyon Endonükleazlarla Kesim

Klonlamalar sırasında izole edilen plazmit, primer dizaynı sırasında eklenmiş olan restriksiyon bölgelerinden restriksiyon endonükleazlarla kesildi. Kesim enzimi olarak Fermentas FastDigest HindIII ve NcoI enzimleri kullanıldı. Kesim Tablo 2.25’de belirtilen şekilde gerçekleştirildi ve 37°C’de 2 saat kesime bırakıldı. Kesim sonuçları Bölüm 2.2.2.7’de belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, dijital görüntüleme sisteminde değerlendirildi.

Tablo 2.25: Restriksiyon endonükleaz kesim reaksiyonu

Kesim İçeriği	Miktar
Plazmid DNA	4 µl
10X FastDigest Tamponu	5 µl
HindIII	1 µl
NcoI	1 µl
dH ₂ O	39 µl
TOPLAM	50 µl

2.2.2.12 PCR Ürünlerinin pGEM-T Vektör Sistem I’e Ligasyonu

Agaroz jelden geri kazanılan PCR ürünlerinin pGEM-T vektör sistem I (Promega)’e ligasyonu kitle belirtilen talimatlara göre yapıldı. Buna göre 20 µl toplam hacme; 2 µl ligasyon tamponu (2X), 1 µl pGEM T vektör (50ng µl), 15 µl jelden kazanılmış DNA ve 2 µl T4 DNA ligaz (3U/µl) eklendi.

Ligasyonreaksiyonları +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Aynı zamanda negatif kontrol olarak DNA içermeyen bir ligasyon reaksiyonu da ortamda denendi.

2.2.2.13 Ligasyon

Alt klonlamalarda Fermentas T4 DNA ligaz sistemi kullanıldı. Öncelikle pET30a(+) ekspresyon vektörü belirlenen restriksiyon enzimleri olan NcoI ve HindIII ile kesildi. 20µl toplam hacimde; aynı kesim enzimlerinin tanıma dizilerini içeren karbonik anhidraz cDNA'sı, ligasyon T4 DNA ligaz tamponu, pET30a(+) vektörü ve en son olarak da T4 DNA Ligaz enzimi 16 saat +4°C'de inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında Bölüm 2.2.3.2'de belirtildiği şekilde önceden hazırlanmış BL21(DE3) kompetan hücrelerine ligasyon ürünü transforme edildi.

2.2.3 Bakteri Deneyleri

2.2.3.1 *DH5α* Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi

Ön hazırlık olarak teflon tüpler, gerekli hacimlerde erlen ve LB besiyeri ve gerekli solusyonlar otaklavlandı.

Bir gece önceden 10 mL LB sıvı besiyerine tek koloni ekim yapılarak 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. 100 mL taze LB sıvı besiyeri içerisine önkültürden 5 mL inoküle edildi ve belirli zaman aralıklarında absorbans alınarak $OD_{600} = 0.5 - 0.6$ değerleri arasına ulaşması için beklendi. 100 mL'lik bakteri süspansiyonu 4°C'de, 3000 rpm'de 5 dakika çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bakteri süspansiyon hacminin yarısı kadar hacimde 0,1M CaCl₂ solüsyonundan eklendi ve dikkatlice pipetaj yapılarak pellet çözdürüldü ve 25 dakika buz üzerinde beklemeye bırakıldı. 4°C'de 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Başlangıç hacminin 1/10'i kadar hacimde 0,1M CaCl₂ ile tekrar hücre pelleti çözüldü ve 1-4 saat buz üzerinde bekletildi. Eşit hacimde %40'luk gliserol

ilave edilerek dikkatlice karıştırıldı. Son olarak buz üzerinde bekletilen ependorflara 200 µl olacak şekilde paylaşılırak -80°C’de derin dondurucuda saklandı [91].

2.2.3.2 BL21(DE3)Kodon Plus Hücrelerinin Kompetan Hale Getirilmesi

BL21(DE3) Kodon Plus hücreleri aşağıda verilen protokole göre kompetan hale getirildi. Bir gece önceden 10 mL LB sıvı besiyerine -80 °C’de muhafaza edilen BL21(DE3) ekspresyon suşundan öze yardımıyla alınarak ampisilinli petrilere tek koloni ekimi yapıldı ve 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 50 mL taze LB sıvı besiyeri içerisine önkültürden 2,5 mL inoküle edildi ve OD₆₀₀= 0,2’ye ulaşınca kadar bakteri süspansiyonu 37°C çalkalamalı etüvde yaklaşık 2–3 saat bekletildi. Son konsantrasyon 20mM olacak şekilde MgCl₂ ve son konsantrasyon yaklaşık olarak % 0,2 olacak şekilde glukoz ilave edilip 37°C’de çalkalayıcı etüvde OD₆₀₀ = 0,5 olana kadar büyütüldü. OD₆₀₀= 0,5 ulaştıktan sonra buz üzerinde 2 saat bekletildi ve +4°C’de 5000 rpm ’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, hücre pelleti başlangıç hacminin yarısı kadar tritilasyon tamponu (Tablo 2.9) ile çözüldükten sonra +4°C ’de 3000 rpm ’de 5 dk santrifüj edildi. Pellet %15’lik gliserol içeren 25mL tritalasyon tamponu ile çözülür. Önceden buz üzerinde bekletilmiş ependorflara aktarılarak -80°C’de derin dondurucuda saklandı [97].

2.2.3.3 Ampisilinli LB Agar Petrilerinin Hazırlanması

LB agar üretici firma tarafından belirtilen miktarda dH₂O ’da çözüldü. 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. 50°C civarına kadar soğuması beklendikten sonra 100 mg/ml ampisilin stoğundan, son konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde eklendi. Köpürmeyecek şekilde karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Petrilerin etrafı parafilmlelenerek +4 °C buzdolabına ters vaziyette kaldırıldı.

2.2.3.4 Kanamisinli LB Agar Petrilerinin Hazırlanması

Üretici firma tarafından belirtilen miktarda LB agar dH₂O 'da çözüldü. 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra 50°C civarına kadar soğuması beklendi. 50 mg/ml kanamisin stoğundan son konsantrasyonu 30 µg/ml olacak şekilde besiyerine eklendi. Köpürmeyecek şekilde karıştırıldıktan sonra bek alevi yanında petri kaplarına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Petrilerin etrafi parafilmlelenerek +4 °C buzdolabına ters vaziyette kaldırıldı.

2.2.3.5 Transformasyon

Transformasyon pGEM-T vektör sistem I de belirtilen prosedüre göre yapıldı. Belirtilen prosedüre göre işlem basamakları şöyledir:

Kompetan hücreler -80 °C 'den çıkarılarak buza konuldu ve buzda çözünene kadar bekledildi. Steril 15 ml'lik ependorflara 200 µl kompetan hücrelerden 5 µl plazmit DNA eklendi. Yavaşça pipetaj yapılarak karışması sağlandıktan sonra 40 dakika buzda inkübasyona bırakıldı. Hücreler daha önceden 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 90 saniye çalkalanmadan tutularak ısı şokuna tabi tutulduktan sonra tekrar 2 dakika buzda bekletildi. Önceden 37 °C'ye ılıtılmış olan LB medyumdan 400 µl eklenerek 1,5 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Her ligasyon reaksiyonu için 2 adet Ampisilinli LB Agar petri hazırlandı. Ampisilinli agar petrilere bek alevi yanında önce 100mM IPTG stok solüsyonundan 100µl IPTG ve 50mg/mL X-Gal stok solüsyonundan konularak steril bir öze yardımıyla yayıldı. Inkübasyon süresinin sonunda hazırlanan petrilere transformasyon kültüründen 150 µl yayıldı. Artan transformasyon kültürü 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenip 150 µl LB medyumda çözülmek suretiyle tekrar petriye yayıldı. 15-20 dakika petrilerin kültürü emmesi beklendikten sonra petrilere ters çevrilerek 37 °C'deki inkübatörde hücrelerin büyümesi için 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Beyaz renkli kolonilerden gliserol stok hazırlandı.

2.2.3.6 Gliserol Stoğun Hazırlanması

100 µg/mL ampicilin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak önkültür hazırlandı. % 30'luk steril gliserol çözeltisi hazırlandı. Bek alevi yanında ependorflara önkültür ile eşit hacimde gliserol çözeltisi eklenerek -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.4 Rekombinant Proteinin Ekspresyonu, Analizi ve Saflaştırılması

2.2.4.1 Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi

Rekombinant plazmit ve pET30a(+) vektörü ekspresyon amacıyla BL21(DE3) Kodon Plus hücrelerine transforme edildi. pET30a(+) vektörünün kanamisine dirençli olduğu göz önüne alınarak son konsantrasyonu 30 µg/mL olacak şekilde kanamisinli LB broth besiyeri hazırlanarak, medyuma rekombinant plasmid ve vektördentek koloni ekimi yapıldı, aynı zamanda antibiyotik içermeyen LB medyumuna BL21(DE3) Kodon Plus hücrelerinden de tek koloni ekimi yapıldı ve kültürler 16 saat 37°C'de inkübasyona bırakılarak önkültürler hazırlandı. Hazırlanan bu önkültürlerin 20 mL'si son konsantrasyonda 30 µg/mL kanamisin içeren 200 mL LB besiyerine inoküle edildi. 37°C 'de inkübasyona bırakılan bakteri kültürü OD₅₅₀ = 0.6-0.8 aralığına ulaşana kadar belirli zaman aralıklarında ölçümler alındı. Son konsantrasyonu 0,8 mM olan IPTG ile indüklendi. Son konsantrasyonu ~250 µM olacak şekilde ZnCl₂ kültüre eklendi [88]. İnkübatörün sıcaklığı 30°C'ye indirilerek indüklenme süresi 1 ve 24 saat olacak şekilde çalışıldı.

2.2.4.2 Hücrelerin Yıkanması

İndüklenme süresi sonunda bakteri kültürü 3000rpm'de +4°C'de 10 dakika çöktürüldü. Hücre pelleti yıkama tamponunda (bkz. Tablo 2.10) çözüldükten sonra tekrar santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlanmak suretiyle hücreler yıkanarak kurutuldu. -20 °C'ye kaldırıldı [88].

2.2.4.3 Lizis İşlemi

Bakteriyal hücre pelleti buz üzerine alınıp çözünmesi beklendi. 10 mL soğuk lizis tamponunda (bkz. Tablo 2.11) çözülerek vortekslendi ve buzda inkübasyona bırakıldı. Son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde PMSF eklendi. Taze olarak hazırlanmış 10 mg/mL lizozim stok solüsyonundan 250 µl eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kültüre 50 µM son konsantrasyonda ZnCl₂ eklenip 10 dakika buz üzerinde bekletildi. 30 mg/mL Protamin Sülfat stok solüsyonundan 1 mL eklenerek santrifüj tüpü 2 dakika süreyle alt üst edildi. 3000 rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan kısım temiz bir tüpe alındı [88].

2.2.5 SDS PAGE

Ekspresyon sonucunda elde edilen protein ekstraktaları moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasında ve ayrıca rekombinat bir proteinin sentezlenip sentezlenmediğini ve sentezleniyorsa işlevsel olup olmadığı hakkında da bilgi veren SDS-poliakrilamid jel elektroforezi metodu uygulandı.

Öncelikle, %10'luk ayırma jelini oluşturan çözeltiler (bkz. Tablo 2.12), APS hariç karıştırıldı. APS eklendikten sonra karışım, jel kasetine çizgi hizasına kadar döküldü. Jelin yüzeyini düzgünleştirmek için %90 izopropanol yada H₂O kasete kenarından enjekte edildi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yüzeydeki su veya izopropanol döküldü. Başka bir erlende yığıma (yükleme) jeli (bkz. Tablo 2.13) hazırlandı. Yine APS hariç tüm malzeme manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. APS de eklenerek polimerize haldeki ayırma jelinin üzerine döküldü ve jelde kuyular oluşturmak için tarak yerleştirildi ve jel polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirilerek tank tamponu (bkz. Tablo 2.14) ile dolduruldu. Son yüklem miktarı 30 µL olacak şekilde 5 µl Yükleme boyası (bkz. Tablo 2.15) ve protein miktarı 30 µg olacak şekilde hesaplanarak geri kalan hacim upper buffer ile tamamlanarak karıştırıldı ve 5 dakika 95°C'de proteinlerin üç boyutlu yapısını kırmak amacıyla örnekler denatüre edildi. Denatürasyon sırasında buharlaşma olacağı için örnekler kısa bir süre santrifüj edilerek hemen kuyulara yüklendi. Örnekler ile beraber 5 µl Rainbow markır da

beraberinde yüklenerek önce tankın tamamı daha sonra tankın dışı yarıya kadar 1X tank tamponu ile dolduruldu. 90 Voltta üst yığıma jeli 15 dk yürüdüktan sonra akım 140 volta çıkarılarak yükleme tamponundaki Bromfenol mavisi, jelin altında 1 cm kalana dek işleme devam edildi. Bu işlem bitiminde, düzenek açıldı ve cam plaklar birbirinden ayrıldı. Yığıma jeli uzaklaştırıldı ve ayırma jeli boyama çözeltilisi (bkz. Tablo 2.16) içine alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar çalkalayarak boyandı. Daha sonra boyayı uzaklaştırmak için jelin üzerine saf su eklenerek hafifçe karıştırıldı. Böylece boyanın fazlası alınmış oldu. Daha sonra UV ışığı altında protein bantları incelendi. Jel, distile suya alınarak saklandı [98].

2.2.6 WESTERN BLOT

Denatüre edici SDS-PAGE (sodyum dedoksil sülfat poliakrilamid jel elektroforez) kullanılarak proteinler molekül ağırlığına göre ayrılır ve proteinlerin membrana aktarılmasından sonra spesifik antikorun hedef proteine bağlanması sonucu hedef proteinler belirlenir. Western Blot (veya immünblot) protein ekspresyonunu doğrulamak için kullanılan standart laboratuvar prosedürlerine göre, farklı örneklerdeki proteinin göreceli miktarlarının belirlenmesinde ve yardımcı immünopresipitasyon deney sonuçlarının analizinde kullanılmaktadır. Bu metod ile, homojenat doku ya da ekstresi örneğinde jel sistemi ve spesifik bir antikor kullanarak protein belirlenir.

Bölüm 2.2.5’de belirtildiği şekilde SDS poliakrilamid jel elektroforezinden elde edilen jel protein örneklerinin diffüze olmasını engellemek amacıyla hemen transfere konuldu. Jel transfer tamponunun içine alındı. Transfer işleminde jelin büyüklüğüne göre dört parça kurutma kağıdı kesildi. Kesilen kurutma kağıtları ve transferde kullanılacak sünger transfer tamponuna (bkz. Tablo 2.17) alınarak iyice ıslatıldı. PVDF (0.45 µM milipore) membrandan 8,5x5,2 ebatlarında kesilerek metanol içerisinde 1 dakika aktive etmek amacıyla bekletildi. Daha sonra membran transfer tamponuna alınarak bir süre buradada bekletildi.

Transferde kullanılan aparatın siyah tabanı üzerine sırasıyla sünger, kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma kağıdı ve sünger yerleştirildi. Aparatın siyah kısmı transfer tankının siyah kısmına denk gelecek şekilde dikey jel sistemine yerleştirildi.

Transfer sistemi transfer tamponu ile doldurulduktan sonra +4 °C'de 15 volt akımda bir gece transfere bırakıldı. Transferin ardından membran blokma tamponuyla (bkz. Tablo 2.19) bir saat oda ısısında çalkalamalı inkübatörde bloklanmaya bırakıldı. Bloklamanın ardından membran 1XTBS + tween 20 ile beş dakika aralarla yıkandı. Daha sonra 1 µl/ 2000 µl konsantrasyonda his-taq antikoruyla 1 saat oda ısısında çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun ardından üç kez beşer dakika arayla 1XTBS + tween 20 yıkandı.

Yıkama işleminin ardından bantların parlaması amacıyla membran ECL tamponuna alındı. ECL tamponunda 60-70 saniye çalkalandıktan sonra sıvı kalmamasına dikkat edilerek membran şeffaf dosya içerisine konuldu ve kaset içerisine yerleştirildi. Filmde 30 saniye, 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika ve 1 saat sürelerindeki kaset içerisine yerleştirilen membran üzerinde ışık almayacak bir şekilde bekletildi. Daha sonra film önce develop solusyonunda 2 dakika, fixer solusyonunda 2 dakika ve en son olarak distile su içerisinde 1 dakika sürece bekletilerek tab işlemi gerçekleştirildi.

3. Bulgular

3.1 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

3.1.1 Küf Sayımı Sonuçları

Balıkesir ili ve çevre köylerinde satışa sunulan çeşitli bölgelerden toplanan (bkz. Tablo2.1) çavdar örnekleri küf florası bakımından incelendi. Örneklem il çevresindeki çeşitli köy ve ilçelerden temin edilen 10 örnekten oluşmaktadır. Örneklerin tümü açıkta satıldığı gibi ilçelerdeki semt pazarlarından en az 500'er gram olmak üzere satın alındı.

Toplam 601 küf izole edildi. İzole edilen küflerin sayısı Tablo 3.1'de verildiği gibidir. Herbir örnekteki küf florası, seyreltme metodunda 10^{-2} seyreltmede saptanan türler olacak şekilde hesaplandı.

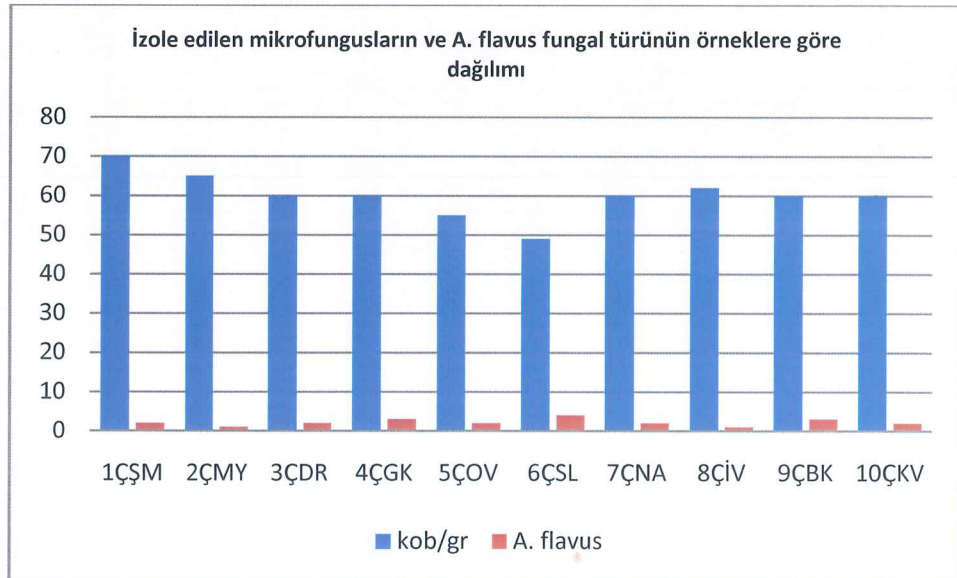
Tablo 3.1: Çavdar örneklerinden izole edilen küflerin sayısı (kob/gr)

Örnek No	Örnek Türü	Küf Kolonilerin Sayısı
1	Çavdar,Edremit-Şamcı Köyü	$7,0 \times 10^3$ kob/gr
2	Çavdar, Manyas-Merkez	$6,5 \times 10^3$ kob/gr
3	Çavdar, Gökçeyazı- Merkez	$6,0 \times 10^3$ kob/gr
4	Çavdar, Dursunbey Köyü	$6,0 \times 10^3$ kob/gr
5	Çavdar, Ovaköy	$5,5 \times 10^3$ kob/gr
6	Çavdar, Selimiye Köyü	$5,0 \times 10^3$ kob/gr
7	Çavdar, Naipli Köyü	$6,0 \times 10^3$ kob/gr
8	Çavdar, İvrindi- Merkez	$6,2 \times 10^3$ kob/gr
9	Çavdar, Bakacak Köyü	$6,0 \times 10^3$ kob/gr
10	Çavdar, Kavacık Köyü	$6,0 \times 10^3$ kob/gr

Tablo 3.2: *Aspergillus flavus* olarak tanımlanan suşlar

No	Örneğin Cinsi	Örnek No	Toplandığı Yer	İzolat No
1	Çavdar	1ÇŞM	Edremit-Şamcı Köyü	3ŞM/7ŞM
2	Çavdar	2ÇMY	Manyas-Merkez	4MY
3	Çavdar	3ÇDR	Gökçeyazı-Merkez	3DR/4DR
4	Çavdar	4ÇGK	Dursunbey Köyü	1GK/3GK/5GK
5	Çavdar	5ÇOV	Ovaköy	2OV/3OV
6	Çavdar	6ÇSL	Selimiye Köyü	4SL/5SL/6SL/8SL
7	Çavdar	7ÇNA	Naipli Köyü	3NA/4NA
8	Çavdar	8ÇİV	İvrindi- Merkez	5İV
9	Çavdar	9ÇBK	Bakacak Köyü	4BK/6BK/7BK
10	Çavdar	10ÇKV	Kavacık Köyü	3KV/4KV

Tablo 3.3 : İzole edilen mikrofungusların ve *A. flavus* fungal türünün örneklere göre dağılımı



3.1.2 avdar rneklerinden İzole Edilip Tanımlanan Fungal Tür

3.1.2.1 İzole Edip Tanımlanan *A. flavus* Mikrofungusun Sistematığı

avdar örneklerinden izole edilip, genus ve tür düzeyinde tanımlanan *A. flavus* mikrofungusun sistematığı aşağıda verilmiştir.

Regnum: Fungi

Phylum: Ascomycota

Classis: Eurotiomycetes

Subclassis: Eurotiomycetidae

Ordo: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus* P. Micheli ex Link 1809

Species: *A. flavus* Link, 1809

3.1.2.2 *Aspergillus flavus* Türünün Makroskopik özellikleri

Türün tanılanmasın da “Identification of Common *Aspergillus* Species [3]” esas alındı ve bu genusun tür tayini için MEA, CZ, CYA25 ortamları kullanıldı. Makroskopik ve mikroskopik özelliklerin belirlenmesi amacıyla MEA(Malt Extract Agar, 25 °C), CZ (Czapeks Extract Agar, 25 °C) ve CYA (Czapeks Yeast Extract Agar, 25 °C) olmak üzere üç farklı besiyerine üç nokta ekimi yapıldı.

CYA25 besiyerinde koloniler koyu yeşil yada yeşilin yeşil renkte ve miselyumlar beyaz renkte gözlemlendi. Petri arkası yüzey rengi ise soluk kahve renkte gözlemlendi. Koloni apı 6,5 cm olarak kaydedildi. CZ besiyerinde koloni morfolojisi CYA25’e ile benzer özellikteydi. Koloni apı 5 cm olarak kaydedildi.

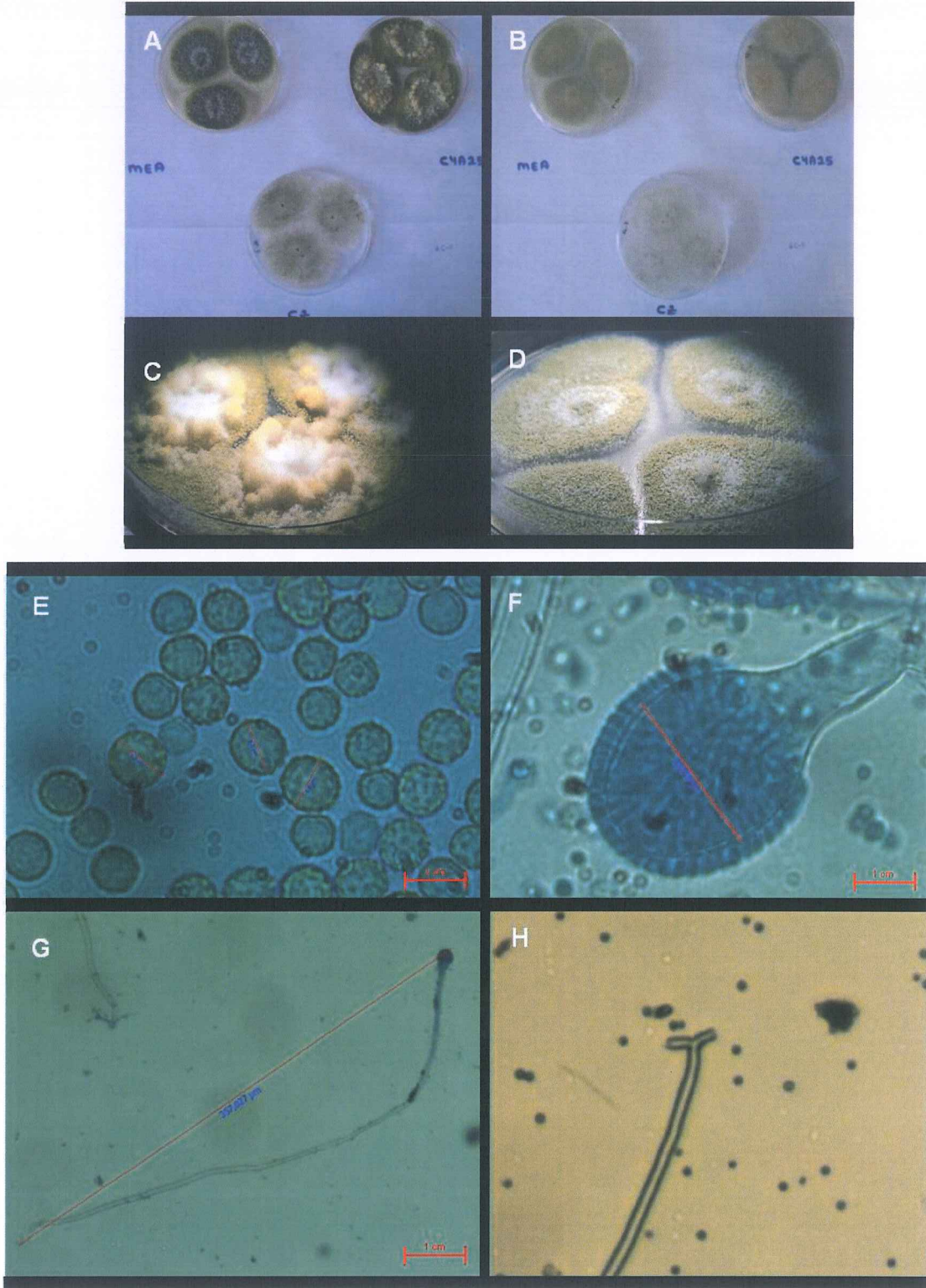
MEA besiyerinde koloniler, CYA ve CZ besiyerinden farklı olarak daha koyu koyu yeşil formda ve miselyum rengi beyaz olarak gözlemlendi. Koloni apı 6 cm olarak kaydedildi.

3.1.2.3 *Aspergillus flavus* Türünün Makroskobik özellikleri

A. flavus türünün mikroskobik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla seloteyp bant metodu ve lam lamel arası inleme yöntemi kullanıldı. Seloteyp bant metodunda koloni kenarına üstten hafifçe bastırıldı ve alınan misel ve sporlar lam üzerine damlatılan laktofenol çözeltisi üzerine kapatılarak incelendi. Lam-lamel arası inceleme yönteminde ise alevde steril edilmiş öze yardımıyla küçük bir parça örnekten alındı ve bir damla laktofenol çözeltisi damlatıldıktan sonra lam-lamel arası inceleme yapıldı.

Konidiyaların şekli globoz yada elipsoidal yapıda olup, çapları 3-6 µm uzunlukta ölçüldü. Konidioforlar uzunlukları 8-17 µm aralıklarında değişen uzunlukta ölçüldü. Vezikül küresel şekilde gözlemlendi ve çapı 20-45 µm arasında değişen oranlarda ölçüldü. Konidiyaların yüzey çeperleri düz yada hafif pürüzlü olarak kaydedildi.

Kolonilerin makroskobik ve mikroskobik özellikleri Şekil 3.1'de gösterildi gibidir.



Şekil 3.1: *Aspergillus flavus*: CYA25, MEA ve CZ üzerinde 25 °C'de 7 günlük inkübasyon sonrası koloniler (A), CYA25, MEA ve CZ üzerinde 25 °C'de 7 günlük inkübasyon sonrası kolonilerin ters yüzey görüntüsü (B), stereo mikroskop CYA25 koloni görüntüsü (C), stereo mikroskop MEA koloni görüntüsü (D), konidio yapısı (x1000) (E), kanidial baş yapısı (x40) (F), konidiofor yapısı (x10) (G), ayak hücre yapısı (x4) (H)

3.2 Moleküler Biyoloji Analiz Sonuçları

3.2.1 Farklı *Aspergillus* Türlerinde Karbonik Anhidraz Proteinlerinin Biyoinformatik Analizi

Aspergillus türlerindeki beta karbonik anhidrazların biyoinformatik analizi öncelikli olarak yapılmıştır. Databankasında bulunan farklı karbonik anhidrazilere ait protein dizileri belirlenmiştir. İlgili protein dizileri ve onların DNA databankası numaraları Tablo 3.4’de verilmiştir. Yapılan araştırmada *A. Flavusa* ait 283aa (XM_002374193), ve 155aa (XM_002378906)’lık iki adet cDNA bulunmuştur. Bunlar ve diğer proteinler çoklu hizalama testi ile benzer bölgeleri tespit edilmiştir. Bunun için Bioedit Clustalw analizi kullanılmıştır. Buna göre bu proteinlerin enzimin aktif bölgesine karşılık gelen bölgelerin oldukça korunmuş olduğu fakat proteinin N terminal bölgesinin değişiklik gösterdiği görülmektedir (Şekil 3.2). Proteinlerin filogenetik analizinde yine Bioedit programı ve UPGMA programı kullanılarak yapılmıştır. Treeview programı kullanılarak ağaç elde edilmiştir (Şekil 3.3). Buna göre *Aspergillus flavus*’un en fazla benzerlik gösterdiği türün *A. oryzae* olduğu belirlenmiştir. *A. oryzae*’nın ve *Aspergillus flavus* proteininin % 79 oranında benzer olduğu blast analizi ile tespit edilmiştir (Tablo 3.5). Protein dizilerinde özellikle N terminal bölgede farklılıklar dikkat çekmektedir (Şekil 3.4).

Tablo 3.4: *Aspergillus* cinsi küflerin CA nükleotid dizilerinin databank numaraları

Tür Adı	Databank Numaraları
<i>A.clavatus</i>	XM_001273458
<i>A.clavatus</i>	XM_001271987
<i>A.clavatus</i>	XM_001273459
<i>A.flavus</i>	XM_002374193
<i>A.flavus</i>	XM_002378906
<i>A.fumigatus</i>	XM_746611
<i>A.fumigatus</i>	XM_001481362
<i>A.fumigatus</i>	XM_001481363
<i>A.niger</i>	XM_001390127
<i>A.niger</i>	XM_001398581
<i>A.niger</i>	XM_003188745
<i>A.oryzae</i>	XM_003190290
<i>A.oryzae</i>	XM_001820141

```

A. clavatus CA 225 aa -----MEDIKREIVSYLQKQKERTPEKIRAWVAKQKRD
A. clavatus CA 235 aa -----MPTANP-----SGSLRI--FAAHAGANDTPADKPTSLIARDKQAAQTTRKQ
A. clavatus CA 162 aa -----ITROSC-ATEKRPDPTSSLPAKRCQK--
A. flavus CA 283aa HMIILARLLFRSOTLIRPLAVRREIQCSGQSVILPFP--VRIARTHPVIGQSQRLSLSSTSASLQCKRRIHQKATHTES--FDRIPTTALQVREKHAARTALEH
A. flavus CA 165 aa -----MLPCLSQRLQSSPMLITLRLST-----
A. fumigatus CA 267 aa -MIDHLLFRSIALSSPTAVAPATRCRGAIVISFSSQTVAKCPTSAVSLMRCSPCSTSAFLRSQKQVAGTSANDSLSDKYSALAAKQKHAATKSCHE
A. fumigatus CA 228 aa -----MEPSDQKQDVTQTLKQKSERIFKIRAWVAIQKQD
A. fumigatus CA 161 aa -----MIFQLLDRVQLQPLSLDVPVRRKQK--
A. niger CA 267 aa -DASTTSTQ-----SQSKDPRQLS-----TLPKSTSTVMLRIRFASLFLYH--CFIRPTKPFACANFASIDRPTFALQKQKNAQDAKRD
A. niger CA 220aa -----MIVTDLRSCQKPKYCDPYTVALTLLHINACTTLCQ
A. niger CA 275 aa -IKSTRVSRIGRINSSVGIITSPRSQ-----ACPSRNASLPLPSQKVSITTPQKACPSYTRQFACMI--TDSDRPTSLQKQKNAQDAKRD
A. oryzae CA 282 aa -MGLARLLFRSOTLIRPLAVRREIQCSGQSVILPFP--VRIARTHPVIGQSQRLSLSSTSASLQCKRRIHQKATHTES--FDRIPTTALQVREKHAARTALEH
A. oryzae CA 165 aa -----MSVAKELQVNAETASEKIQKQLCLFP-----

```

```

A. clavatus CA 225 aa PAFTRKGGAGQTPQTLITQCSDSRVPADIDMLTAGVGVVIRIADIVPTDQVMSVVDIIVRHLVQKIDVCGKTIQGGVQALTPS-----DL
A. clavatus CA 235 aa FDLPLQAVAGQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVICQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. clavatus CA 162 aa -----QILMTQCSDSQCKEPEHLAGSRDEVEYRHLQITIMD-DLSVITTLRATASLQKRDIVICQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. flavus CA 283aa FDLPTTLAGQKQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVLSCQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. flavus CA 165 aa -----KVTSSFLN-----DPARALALEKQDITVIRIAGKRVAD----ALRSIISQCLLATREIVTVRHTDQCHLTPDQVIR-----
A. fumigatus CA 267 aa FRLPTTLAGQKQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVLSCQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. fumigatus CA 228 aa PAFTRKLSAGQKQKFEILMTQCSDSRVPADIDMLTAGVGVVIRIADIVPTDQVMSVVDIIVRHLVQKIDVCGKTIQGGVQALTPS-----DL
A. fumigatus CA 161 aa -----QVMTQCSDSQCKELESGLFADIEFERSLQNMND-DLQKATLQTLQDLSLQKRVICQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. niger CA 267 aa PSLPTTLAGQKQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVLSCQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. niger CA 220aa PSLPTTLAGQKQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVLSCQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. niger CA 275 aa PSLPTTLAGQKQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVLSCQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. oryzae CA 282 aa FDLPTTLAGQKQKFEILMTQCSDSRCPETTLQLLQKQVITTRKIAIVIPADLSSQAVIEIIVRHLVQKIVLSCQKTYKQGGVQALQK-----GL
A. oryzae CA 165 aa -----IKKVAIVAGDARLDPARALALEKQDITVIRIAGKRVAD----ALRSIISQCLLATREIVTVRHTDQCHLTPDQVIR-----

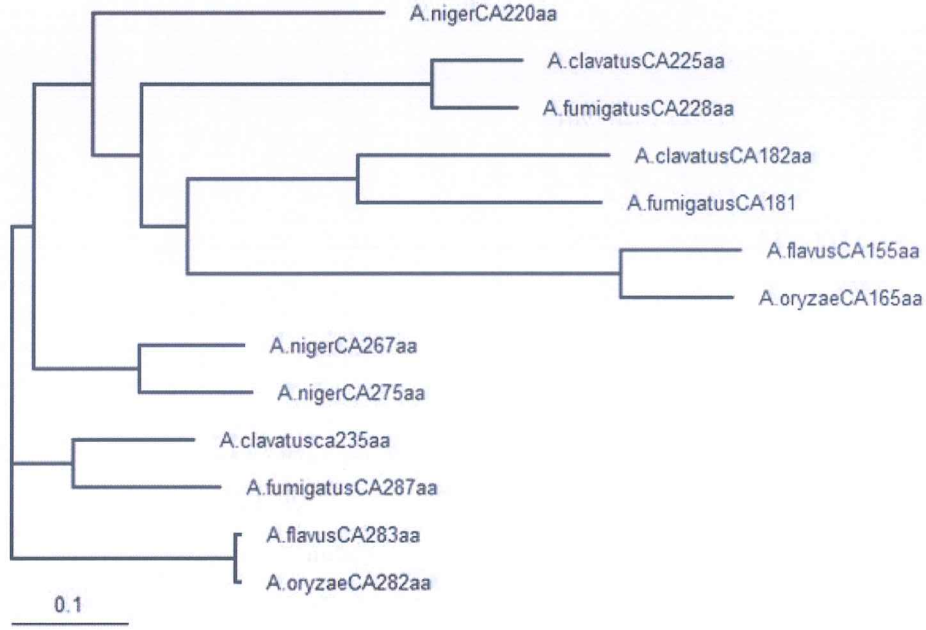
```

```

A. clavatus CA 225 aa GLLIPLWRINQVIRLREKRLDAEKEKAKRIRIVEIIMVESCRIWIKTAAGQSDIDQTFWVIGWITDVRGGLRQDVIDFEKTLRQIKKIIITKQ-
A. clavatus CA 235 aa GILDWLLPRLQRLRQKTELETLPQD-EATVRLAEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. clavatus CA 162 aa -LSSQVSSILDRLRSTYITLQVSEK-DQRTIIVELVMLQKRAMSRVYIAKAVQSDL-KIISVVIDAARNGQILIEFOR-----
A. flavus CA 283aa GILDWLLPRLQRLRQKTELETLPQD-EATVRLAEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. flavus CA 165 aa -----GKIRSDLQCADHIAFLPLQ-----DLQSDVLDITVLRASFLIQLVQ-----ITGELIYEVTQVAVRVEESL-----
A. fumigatus CA 267 aa GILDWLLPRLQRLRQKTELETLPQD-EATVRLAEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. fumigatus CA 228 aa GLLIPLWRINQVIRLREKRLDAEKEKAKRIRIVEIIMVESCRIWIKTAAGQSDIDQTFWVIGWITDVRGGLRQDVIDFEKTLRQIKKIIITKQ-
A. fumigatus CA 161 aa -LQKQVSSVLDPLRSTERTPLDLYGT-ERRALVIEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. niger CA 267 aa GILDWLLPRLQRLRQKTELETLPQD-EATVRLAEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. niger CA 220aa -SVLDWLLSLLRVRDRDASELQIIEYERIVRVEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. niger CA 275 aa GILDWLLPRLQRLRQKTELETLPQD-EATVRLAEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. oryzae CA 282 aa GILDWLLPRLQRLRQKTELETLPQD-EATVRLAEIIVRSLRSLRQSWLEKIDRGL-QVIGLITDVSQVLRLEDSFEEDATKRIASERTEA-
A. oryzae CA 165 aa -----GKIRSDLQCADHIAFLPLQ-----DLQSDVLDITVLRASFLIQLVQ-----ITGELIYEVTQVAVRVEESL-----

```

Şekil 3.2: Fungal β -sınıf CA enziminin aktif katalitik bölgelerindeki çinko (Zn^{2+}) iyonu konumuna göre multiple sequence alignment çalışması



Şekil 3.3: Fungal β -CA enziminin aktif katalitik bölgelerindeki çinko(Zn^+) konumuna göre filogenetik ağacı

A.flavus CA 155 aa ----MLPCLSQKRLGSPMLNTRLRLSTKVTSSFLN----DPARALGLEEGDTHVIRNAGGRVADALRSIIISQQLLGTREIVIVHHTDCGMLTPTDEV
A.oryzae CA 165 aa MSVAKELGVANAEYAASFNKEDLQLPPKRVAVACMDARLDPARALGLEEGDAHVIRNAGGRVADALRSIIISQQLLATREIVIVHHTDCGMLTPTDEV

A.flavus CA 155 aa IRGKIRSDLGQDADHIAFLPLGDLKQSVLDDIRVLRASPLVLDVPITGFLYEVEVKVARVEENL
A.oryzae CA 165 aa IRGKIRSDLGQDADHIAFLPLGDLKQSVLDDTRVLRASPLILDVPITGFLYEVEVKVARVEESL

Şekil 3.4: *A. flavus* ve *A. oryzae*'nin beta karbonik anhidraz genlerinin ikili karşılaştırması

Tablo 3.5: *A. flavus* ve *A. oryzae*'nin karşılaştırılması

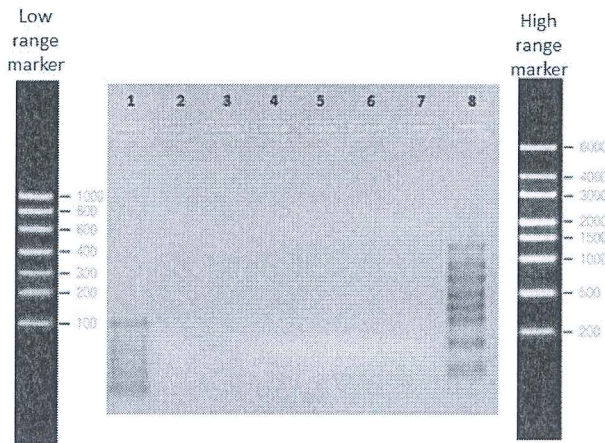
	Eşlik %	Benzerlik %
<i>A.flavus</i> / <i>A.oryzae</i>	%75	%79

3.2.2 *Aspergillus Flavus* Karbonik Anhidraz Geninin Klonlanması

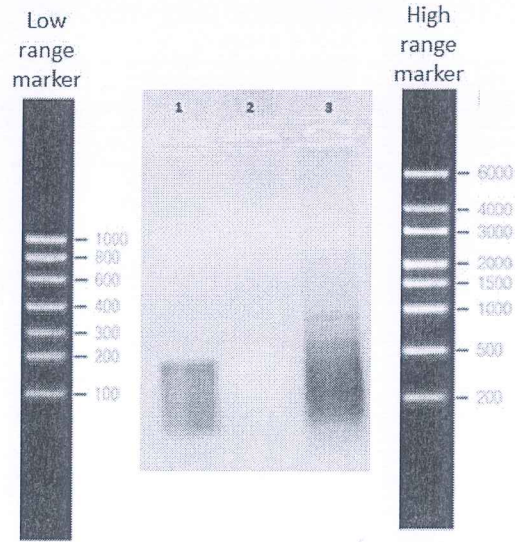
Karbonik anhidraz geninin izolasyonu için RT-PCR tekniği kullanılmıştır. Bunun nedeni genin transkribinin intron içermesidir. Bu amaçla ilk olarak filamentli funguslardan olan *A.flavus* mikrofungusundan RNA izolasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda bir mikotoksin üretici olan fungal türünde beş farklı RNA izolasyon metodu denenmiştir.

Farklı RNA izolasyonlarının denenmesinin nedeni; fungal hücre duvarlarının sahip olduğu yüksek oranda polisakkaritler ve lipitlerin yanı sıra polifenolik gibi problematik biyomolekülleri içermesidir. Bu durumda fungal kültürlerden RNA izolasyonunu hem zorlaştırmakta hemde saf ve yüksek kalitede RNA'nın elde edilmesinde sorunlar yaşatmaktadır.

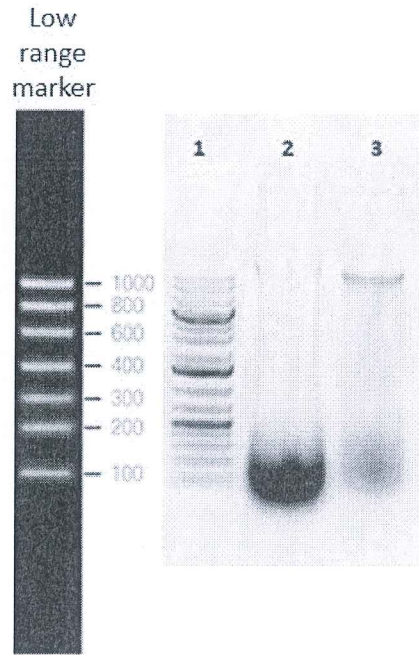
Buna göre çalıştığımız fungal tür olan *A.flavus*'un Bölüm 2.2.2.1'de belirtilen şekilde total RNA izolasyonları yapıldı. Elde edilen total RNA'nın varlığı ve saflık derecesi %1'lik formaldehit agaroz jel elektroforeziyle belirlendi. RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçüldü. Uygulanan RNA izolasyonları sırasıyla Şekil 3.5' de Mobio Mikrobiyal RNA İzolasyon Kiti, Şekil 3.6'de Qiagen Plant MiniKiti, Şekil 3.7'de STE ve değiştirilmiş STE RNA İzolasyonu, Şekil 3.7'de Trizol RNA izolasyonu aşağıda verilmiştir.



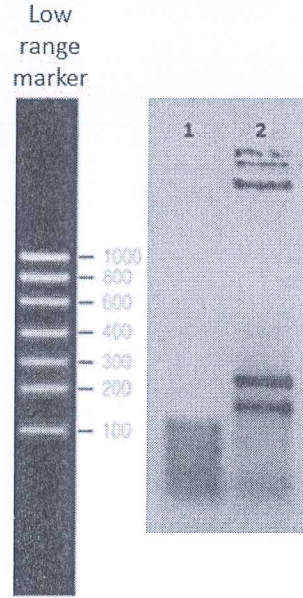
Şekil 3.5: *A. flavus* Mobio mikrobiyal RNA izolasyon Kit, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü (1; RNA Low Range Marker, 2; 1.eluant, 3; 2.eluant, 4; 3.eluant, 5; 4.eluant, 6; 5.eluant, 7; 6.eluant, 8; RNA High Range Marker)



Şekil 3.6: *A. flavus* Qiagen Plant Mini Kit, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü (1; RNA Low Range Marker, 2; 1.eluant, 3; 2.eluant)

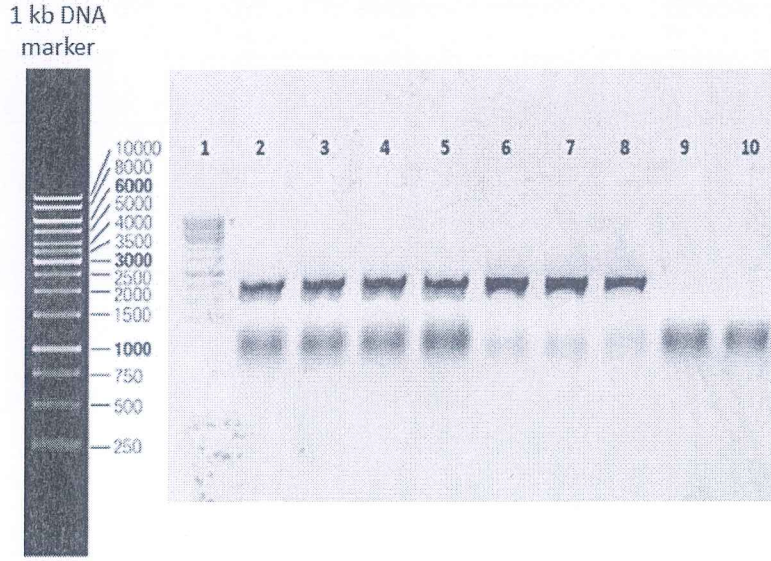


Şekil 3.7: *A. flavus* STE ve değiştirilmiş STE Metod RNA İzolasyonu, Total RNA Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi Görüntüsü (1; RNA Marker, 2;STE metod 1.eluant, 3;STE modifiye metod 2.eluan)



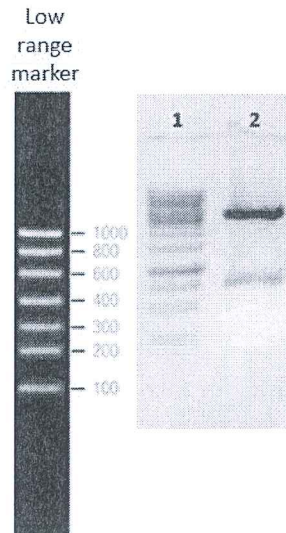
Şekil 3.8: *A. flavus* Trizol RNA İzolasyonu, Total RNA Formaldehit Agaroze Jel Elektroforezi Görüntüsü (1; 1.RNA Marker, 2; 1.eluant)

RT-PCR reaksiyonu Bölüm 2.2.2.4’de belirtilen şekilde uygulandı. Trizol metod ile gerçekleştirilen total RNA izolasyonunda elde edilen RNA’lar kullanıldı. *A. flavus* karbonik anhidraz geninin 5’ ve 3’ ucuna spesifik primerler, genin NCBI (National Center for Biotechnology Information)’da yer alan mRNA nükleotid dizisinden yararlanılarak tasarlandı. Primerler tasarlanırken genin klonlanacağı vektörlerin restriksiyon kesim bölgeleri de göz önünde bulunduruldu. % GC içeriğine, primerlerinin Tm değerlerinin birbirlerine yakın olmasına ve saç tokası oluşumunun meydana gelmemesine dikkat edildi. Klonlanmayı kolaylaştırmak amacıyla forward primerine NcoI, revers primerine HindIII kesim bölgesi yerleştirildi. Tasarlanan primerler bkz. Tablo 2.22’de verilmiştir. *A. flavus* CA genine spesifik PCR reaksiyonu belirtilen primerler ile ve Bölüm 2.2.2.6’da bahsedildiği gibi 2mM, 4mM ve 6mM MgCl₂ konsantrasyonları denenerek optimize edildi ve PCR çalışmalarına 4 mM MgCl₂ konsantrasyonu ile devam edildi. *A. flavus*’a özgü tasarlanan Beta Aktin primerleri ile RT-PCR’da elde edilen cDNA’ların kontrol grubu olarak amplifikasyonu da çalışmalara dahil edildi. PCR şartlarının kontrol edilmesi amacıyla negatif kontrol gruplarında cDNA kaynağı eklenmeyerek çalışıldı. PCR denemelerinde 444 ng/µl RNA kullanılarak sentezlenen cDNA’dan 1 µl ve 5 µl kullanarak optimize edildi. Aynı zamanda GC’ce zengin kalıbmızda PCR amplifikasyonunu etkili bir şekilde arttırabilme amacıyla PCR arttırıcı bileşenler kullanıldı. PCR amplifikasyonunda *A. flavus*’dan elde edilen cDNA’lar ve spesifik olarak tasarlanan primerler ile 750bp uzunluğunda bantlar elde edildi.



Şekil 3.9 : *A.flavus* Ca geni PCR amplifikasyonu Agaroz Jel Elektroferez Görüntüsü (1; 1 kb DNA marker, 2-3; CA geni, 4-5; CA geni, 6-7-8; pozitif kontrol, 9-10; negatif kontrol)

PCR ile amplifiye edilen 750bp'lik DNA fragmenti Bölüm 2.2.5.7'de belirtilen şekilde jelden kazanıldı ve pGEM-T easy (promega) vektörüne Bölüm 2.2.5.10' belirtildiği şekilde klonlandı. Mavi-beyaz seleksiyonu uygulandı ve seçilen beyaz koloniler HindIII ve NcoI restriksiyon kesim enzimleri ile kesilerek rekombinat olup olmadığı ikinci kez kontrol edildi (Şekil 3.6). Bu rekombinat kolonilerden gliserol stok hazırlandı.



Şekil 3.10: pGEM-T rekombinat kontrolü(1; 1 kb DNA marker, 2; pGEM-T vektör ve *A.flavus* CA geni)

3.2.3 *A.flavus* Karbonik Anhidraz Geninin Biyoinformatik Analizi

pGEM-T vektörüne klonlanan ve *A.flavus* CA geni olduğu düşünölen DNA fragmenti RefGen Gen Araştırma ve Biyoteknoloji firmasına dizi analizine gönderildi.

Dizi analizden gelen sonuçlara göre 5' ve 3' yönde dizi hizalandı. Buna göre dizi analizine bağlı herhangi bir hataya rastlanmadı (şekil 3.11). Dizi analizden elde edilen veriler ile yapılan blast sonuçlarında çalıştığımız klonladığımız putatif *A.flavus* beta karbonik anhidraz geninin data bankasında bulunan XM_002378906nolu *A .flavus* cDNA'sı ile %99 benzerlik göstermektedir (şekil 3.12). Ayrıca databankasındaki cDNA klonunda genin 94. Pozisyonunda 189 bağlık ve genin 234. Pozisyonunda 87 bę lik 2 insersiyon göze çarpmaktadır (şekil 3.13). Bu iki insersiyon haricinde bazı bölgelerde nükleotid yer değişim mutasyonları dikkat çekmektedir(şekil3.12). Daha sonra <http://molbiol.ru/eng/scripts/0113.html> adresinde bulnan 6 frame translasyonu yapılmış elde edilen protein dizisi databankta protein dizisiyle karşılaştırılmış ve toplm 5 adet stop kodonu bulunmuştur (şekil 3.14). Ayrıca klonladığımız *Aspergillus flavus* ve databankasındaki *Aspergillus flavus* proteinleri %84 benzerlik göstermiş ve ayrıca N terminal bölgede bir insersiyon dizisi tespit edilmiştir (şekil 3.15). Klonlanan *Aspergillus flavus* geninin taşımış olduğu 2 insersiyon ve nükleotid değişimleri göz önüne alındığında klonlanan bu genin yalancı gen olduğu tahmin edilebilir. Yalnız bundan evvel ekspresyon çalışmasıyla aktif bir protein üretilip üretilmediğinin test edilmesi gerekir.


```

Klon CA 7 ATGTTGCCATGTCTGTGCGAAAAGAAGCTTGGGGTCGCCAATGCTGAATACGCTGCGTCTT 66
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 1 ATGTTGCCATGTCTGTGCGAAAAGAAGCTTGGGGTCGCCAATGCTGAATACGCTGCGTCTT 60

Klon CA 67 TCAACAAAGGTGACCTCCAGCTTCCTCCTAAACG 100
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 61 TCAACAAAGGTGACCTCCAGCTTCCTCCTAAACG 94

Klon CA 289 GATCCGGCTCGCGCTCTTGGTCTTGAGGAGGGCGATGCCCATGTGATTGCGAAATGCCGGT 348
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 94 GATCCGGCTCGCGCTCTTGGTCTTGAGGAGGGCGATACCCATGTGATTGCGAAATGCCGGT 153

Klon CA 349 GGTTCGCGTAGCAGATGCTCTGCGAAGTATCATCACCTCACAGCAGTTGCTAGCCACCCGG 408
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 154 GGTTCGCGTAGCAGATGCTCTGCGAAGTATCATCATCTCACAGCAGTTGCTAGCCACCCGG 213

Klon CA 409 GAAATTGTGATTGTTTCATCAT 429
          |||||||||||||||||||
DATA CA 214 GAAATTGTGATTGTTTCATCAT 234

Klon CA 516 ACTGATTGTGGGATGCTCACATTTACTGATGAGGTGATCCGGGGCAAATCAGATCCGGAT 575
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 235 ACTGATTGTGGGATGCTCACATTTACTGATGAGGTGATCCGGGGCAAATCAGATCCGGAT 294

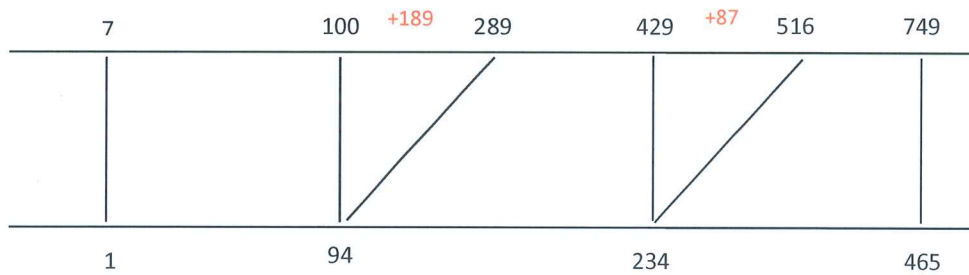
Klon CA 576 CTTGGCCAAGATGCTGATCATATTGCATTTCTTGCCGCTTGGTGTATCTCAAGCAAAGTGTC 635
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 295 CTTGGCCAAGATGCTGATCATATTGCATTTCTTGCCACTTGGTGTATCTCAAGCAAAGTGTT 354

Klon CA 636 CTTGATGATATAAAAAGTGCTGAGAGCGAGTCTCTCATTCTGGATGTTCCATACACGGGA 695
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 355 CTTGATGATATAAAAAGTGCTGAGAGCGAGTCTCTCGTTCTGGATGTTCCATACACGGGA 414

Klon CA 696 TTTCTGTACGAGGTTGAAACAGGAAAGGTTGCCAGAGTCGAGGAGAATCTCTGA 749
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
DATA CA 415 TTTCTGTACGAGGTTGAAACAGGAAAGGTTGCCAGAGTCGAGGAGAATCTCTGA 468

```

Şekil 3.12: Dizi analizinden elde edilen sonuçlar ile *A. flavus* β -CA geninin (XM_002378906) BLAST sonucu



Şekil 3.13: Analiz edilen *A. flavus* β -CA genin blast sonucu diyagramı

DNA : atgttgccatgtctgtcgcaaaagaacttggggtcgccaatgctgaatacgtgcgtctt
Protein: ·M·L·P·C·L·S·Q·K·N·L·G·S·P·M·L·N·T·L·R·L·

DNA : tcaacaaggtgacctccagcttcctcctaacggtaagcacatagtcctttcactcaga
Protein: ·S·T·K·V·T·S·S·F·L·L·N·G·K·H·I·V·L·S·L·R·

DNA : taccctgtgggtggtctatcattagcacaagttcaaggcctgataaagtcaatccggct
Protein: ·Y·P·L·W·W·S·I·I·S·T·S·S·R·P·D·K·V·N·P·A·

DNA : tggtaggaaggttgccatcgctggcgtgatggatgctcgtttaggtgagattcggaatct
Protein: ·W·*·E·G·C·H·R·G·V·Y·G·C·S·F·R·*·D·S·E·S·

DNA : atcgcagcacttatacattcgtgtttcactgactgagaccaagatccggtcgcgctctt
Protein: ·I·A·A·L·I·H·S·C·F·T·D·*·D·Q·D·P·A·R·A·L·

DNA : ggtcttgaggagggcgatgcccatgtgattcgaaatgccgggtggtcgcgtagcagatgct
Protein: ·G·L·E·E·G·D·A·H·V·I·R·N·A·G·G·R·V·A·D·A·

DNA : ctgcgaagtatcatcacctcacagcagttgctagccaccgggaaattgtgattgttcat
Protein: ·L·R·S·I·I·T·S·Q·Q·L·L·A·T·R·E·I·V·I·V·H·

DNA : catgtatgtgggagcgcgatgggtactcgtggaagggggggccagattgtttgaagaaagt
Protein: ·H·V·C·G·S·A·W·Y·S·W·K·G·G·P·D·C·L·K·K·V·

DNA : atactcactgatatcttgataactctagactgattgtgggatgctcacatttactgatg
Protein: ·I·L·T·D·I·L·D·N·S·R·L·I·V·G·C·S·H·L·L·M·

DNA : aggtgatccggggcaaaatcagatcggatcttggccaagatgctgatcatattgcattct
Protein: ·R·*·S·G·A·K·S·D·R·I·L·A·K·M·L·I·I·L·H·S·

DNA : tgccgcttggtgatctcaagcaaagtgtccttgatgatataaaagtctgagagcgagtc
Protein: ·C·R·L·V·I·S·S·K·V·S·L·M·I·*·K·C·*·E·R·V·

DNA : ctctcattctggatgttcctatcacgggatttctgtacgaggttgaacaggaaaggttg
Protein: ·L·S·F·W·M·F·L·S·R·D·F·C·T·R·L·K·Q·E·R·L·

DNA : ccagagtcgaggagaatctctgaaagctta
Protein: ·P·E·S·R·R·I·S·E·S·L·

Şekil 3.14: Elde ettiğimiz *A.flavus* protein dizi

```

Klon A. flavus      1  MLFCLSQKNLGSFMLNTRLRLSTKVTSSFLNGKHIVLSLRYPLWWSIIISTSSRPDKVNPA 60
A.flavus databank 1  .....----- 31

Klon A. flavus      61  WEGCHRGVYGCSEFRDSEISAAALHSCFTDDQDPARALGLEEGDAHVIRNAGGRVADALRS 120
A.flavus databank 31  .....T..... 60

Klon A. flavus      121 IITSQQLLATREIVIVHHVCGSANYSWKGGPDCLKKVLTDILDNSRLIVGCSHLLMRSG 180
A.flavus databank 61  ..I....G.....T-----GMLTFTDEVIRG-----KI..D 98

Klon A. flavus      181 AKSDRILAKMLIILHSCRLVISSKVSLMIKCERVLSEFWMFLSRDYCTRLKQERLPESRRI 240
A.flavus databank 99  LGQ.---DHIAF.FLGD.KQ.-----VLDDIK..RASPL.DVPITGF.YEVETGKVA.V 150

Klon A. flavus      241 SESL 244
A.flavus databank 151 E.N. 154

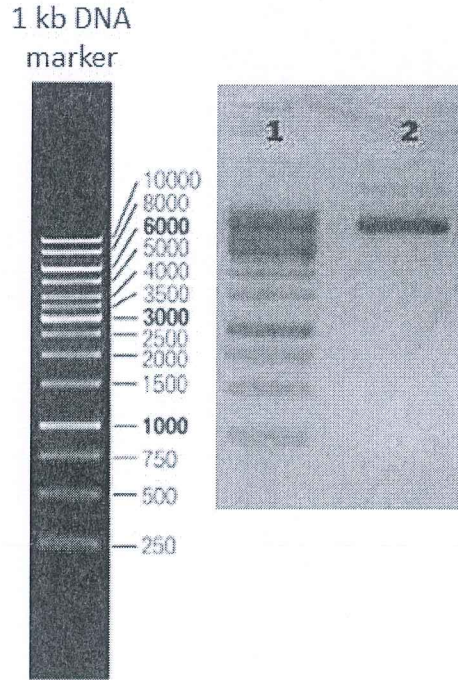
```

Şekil 3.15: Klon *A. flavus*, bizim klonladığımız gen ve databankasındaki *A. flavus* protein dizisinin karşılaştırması

Şekil 3.15’de “.....” sembolü eş aminoasit benzerliklerini, “-----” sembolü yeni eklenmiş aminoasit dizisini ve renki gösterilen harfler de farklılıkları bize göstermektedir.

3.2.4 *A. flavus* Karbonik Anhidraz Geninin pet30a(+) Vektörüne Alt Klonlanması

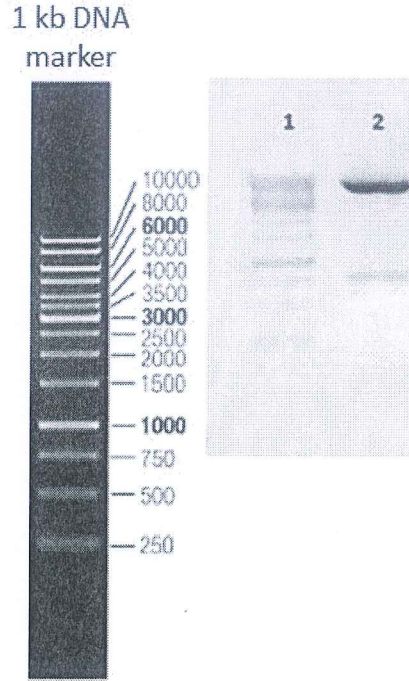
A. flavus CA geninin ekspresyonu için pET ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla, ekspresyon amacıyla kullanılacak olan pET30a(+) plazmit vektörü *DH5 α* kompetan hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonucu oluşan kolonilerden kontrol ve alt klonlama amacıyla Bölüm 2.2.2.10'da belirtilen yöntemle plazmit DNA izolasyonu yapıldı ve Şekil 3.16'da gösterildiği gibi HindIII/NcoI restriksiyon kesim enzimleri ile kesilerek vektör doğrusal hale getirildi. Jel görüntüleme sistemi ile değerlendirildikten sonra iki enzimle kesilmiş olan vektör jelden geri kazanıldı.



Şekil 3.16 : pET30a(+) restriksiyon kesim sonucu(1; 1 kb DNA Merker, 2; Doğrusal Hale Getirilmiş pET30a(+) Vektörü)

pGEM-T vektörüne klonlanan *A. flavus* CA geni de HindIII ve NcoI restriksiyon enzimleriyle kesildi. CA geni HindIII/NcoI restriksiyon enzimleri ile Tablo 2.25'de belirtilen şekilde ve koşullarda kesildikten sonra %1'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Restriksiyon enzimleri ile kesimi yapılan CA geni jelden geri kazanıldı ve 750 bp'lik CA geni pET30a(+) vektörü içine Bölüm 2.2.2.13'de belirtilen koşullarda ligasyona bırakıldı. Ligasyonu kontrol amacıyla pET30a(+) vektörüne klonlanan CA geninin ligasyon kontrolü amacıyla HindIII/NcoI restriksiyon enzimleri ile Bölüm

2.2.2.11'de belirtildiği şekilde kesime konuldu (Şekil 3.17). Ekspresyon amacıyla BL21(DE3) kodon plus hücre hattına elde edilen ligasyon ürünü transforme edildi. 16 saat 37 °C inkübasyondan sonra oluşan kolonilerden gliserol stok yapıldı ve -80 °C derin dondurucuda saklandı.

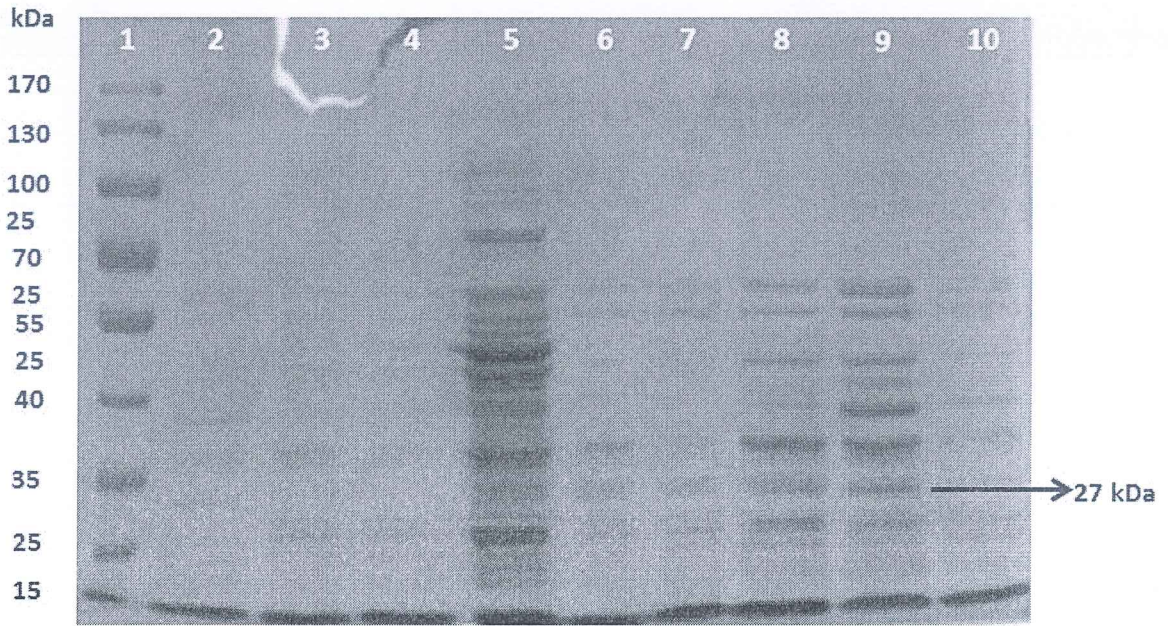


Şekil 3.17 :pET30a(+) ve *A. flavus* CA Geninin Agoroz Jel Elektroforez Görüntüsü(1; 1kb DNA Marker, 2; *A. flavus* CA Geni ve pET30a(+)vektörü)

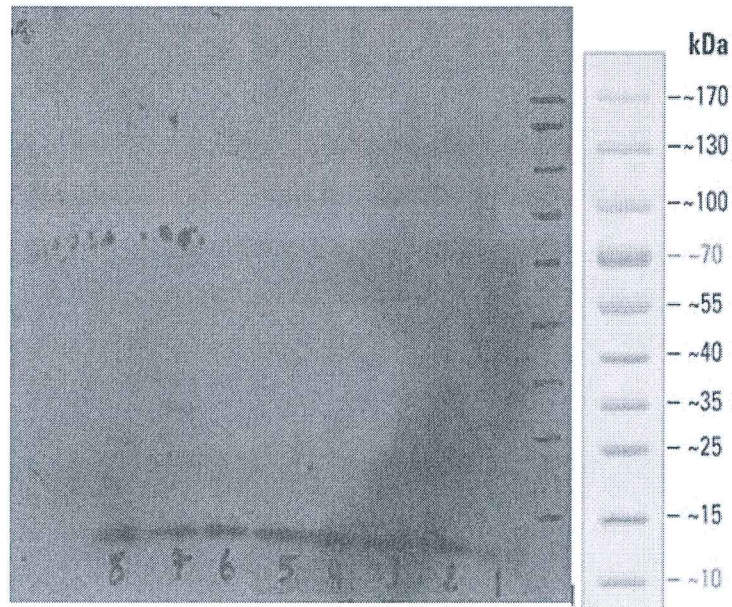
3.2.5 Rekombinant *A. flavus* Karbonik Anhidraz Geninin *E.coli*'de Ekspresyonu

BL21(DE3) kompetan hücreleri minimal besi ortamlarında büyüeyebilen ve proteaz aktivitesinin az olduğu hücrelerdir. Optimal protein ekspresyonu ve T7 promotor ile ekspresyonun kontrolünün sağlandığı *E.coli* hücre soylarıdır.pET vektörleri ise rekombinant proteinlerin *E.coli*'de üretiminde sıklıkla tercih edilen sistemlerdir. Bu çalışmada kullanılan pET30a(+) vektörü rekombinantların seçimi amacıyla kanamisine direnç geni taşımaktadır veIPTG ile indüklenebilen bir plazmittir. N ve C terminus bölgesinde iki adet histidin kuyruğu içermektedir. Bu sayede üretilen rekombinant proteinin özellikle Nikel-NTA afinite kromatografisi gibi yöntemler kullanılarak yüksek verimde saflaştırılmasını sağlamaktadır. Ekspresyon amacıyla pET30a(+) vektörüne

klonlanan *A.flavus* karbonik anhidraz rekombinant plazmiti ile çalışıldı. Buna göre Bölüm 2.1.2.13'de belirtilen şekilde deney kuruldu. Kontrol grubu olarak sadece BL21(DE3) kompetan hücreleri ve pet30 plazmitini içeren BL21(DE3) kompetan hücreleri kullanıldı. Ayrıca indüklenme öncesi ve indüklenme işleminden 1 saat sonra bakteri kültüründen bir miktar ayrılarak daha sonraki analizler için -20 °C'de muhafaza edildi. Rekombinant proteinin ekspresyonu için en verimli ekspresyon koşulları 0,8 mM IPTG konsantrasyonunda ve 24 saat inkübasyon sonucunda olduğu tespit edildi. İndüklenme gerçekleşikten sonra; bakteri kültürünün tamamı 4000rpm'de +4 °C'de 10 dakika süresince santrifüj edildi. Hücre pelleti yıkama tamponu (Tablo 2.10) ile iki kez yıkandıktan sonra Bölüm 2.1.2.12'de anlatılan şekilde lizize uğratıldı. IPTG indüksiyonu öncesi ve sonrasında; sadece pET30a(+) plazmitini içeren, rekombinant plazmiti içeren ve herhangi bir plazmit içermeyen BL21(DE3) kodon plus hücrelerinden elde edilen ham ekstraktlarve pellet ayrılarak SDS jele yüklendi.Şekil 3.18'de görüldüğü gibi sadece pET30a(+) plazmitini ve rekombinant plazmiti içeren hücrelerin IPTG indüklenme sistemi ile 24 saat sonunda oldukça iyi bir şekilde indüklendiği gözlenmektedir. Gözlenmesi beklenen rekombinant karbonik anhidraz proteinin büyüklüğü yaklaşık olarak 27 kDa olarak tahmin edilmektedir. Şekil 3.18'de görüldüğü gibi 27 kDa seviyesinde bir indüklenme gözlenmektedir. Ancak aynı indüklenmenin plazmit içermeyen bakteri hücrelerinde de gözlenmesinden dolayı aynı büyüklükte bakteriye ait başka bir protein olabileceğinden şüphelenildi. Bu nedenle rekombinant proteinin kesin olarak belirlenebilmesi amacıyla özellikle vektörde bulunan ve üretilen rekombinant proteinin de yapısında bulunması beklenen histidin kuyruklarını işaretleyebilen his taq antikoru kullanılarak westernblot yöntemiyle immunolojik olarak işaretlenmesine karar verildi.İşaretleme sonucun da herhangi bir spesifik işaretleme görülmemiştir. Bu sonuç da rekombinant proteininin fonksiyel bir ifade göstermediğini aydınlatmıştır.



Şekil 3.18: SDS PAGE Görüntü1; protein marker, 2; BL21(DE3) indüklenme öncesi, 3; pET30a(+)/BL21(DE3) indüklenme öncesi, 4; pET30a(+)/BL21(DE3) 1h indüklenme, 5; pET30a(+)/BL21(DE3) 24h indüklenme, 6; pET30a(a)/CA indüklenmeden önce, 7; pET30a(+)/CA 1h indüklenme, 8; pET30a(+)/CA 24h indüklenme, 9; BL21(DE3) 24h indüklenme, 10; BL21(DE3) 1h indüklenme)



Şekil 3.19: Western blot jel görüntüsü

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Aspergillus flavus ekonomik açıdan önemli birkaç fungal türden biridir. Bitkilerde, hayvanlarda ve böceklerde patojen özellik göstermekte olup pekçok ekinde yaygın olarak kansinojenik toksin olan sekonder metabolitler üretmektedir. Bu tür ekinlerin fırsatçı patojenlerindedir. Ürünlerin hasat öncesi ve sonrasında ve özellikle tohumlarda üretmiş oldukları sekonder metabolitlerden olan aflotoksin ile ciddi derecede tehlike yaratmaktadır. Aflatoksin kuvvetli kansinojen özelliğe sahip olup özellikle mısır, yerfıstığı, pamuk çekirdeği ve kabuklu yemişler gibi yağlı tohuma sahip ürünlerde yaygın bir şekilde görülmektedir. Tahıl örneklerinde saptanan mikrofungus florası bozulma ve mikotoksin üretimi dışında ürünün kalitesini de düşürebilmektedir. Gıdaların raf ömrü ve güvencesini belirleyen en önemli faktörlerden biri ürünün mikroflorasının nitel ve nicel özellikleridir.

Çalışmamızın ilk basamığında, dünya genelinde yaygın olarak besin kaynağı olarak kullanılan çavdardan *Aspergillus* genusuna dahil olan *A. flavus* türünün izolasyonu ve tanılanması yer almaktadır. Bu amaç doğrultusunda Balıkesir bölgesinin 10 farklı çevre köylerinden aseptik koşullar altında çavdar örnekleri toplanmış ve herbir örneğin küf florası seyreltme metodunda 10^{-2} seyreltmede saptanan türler olacak şekilde hesaplanmıştır. Aynı zamanda çalıştığımız tür olan *A. flavus*'un herbir örnekte bulunma yüzdeleride hesaplanmıştır.

İlk örneğimiz Edremit-Şamcı köyünden alınan çavdar örneği olup bu örnekten toplamda 70 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar içerisinde 2 tanesi *A. flavus* olarak tanımlanmış olup yüzde olarak bulunma oranı % 2,8 dir. İkinci örneğimiz Manyas merkezden toplanan çavdar örneği olup 65 izolat elde edilmiş ve tek bir izolat *A. flavus* olarak tanımlanmış olup yüzde olarak bulunma oranı ise % 1,5 dir. Üçüncü örnek grubumuz Gökçeyazı merkezden temin edilen çavdar örneği olup elde edilen toplamda 60 adet izolat içerisinde 2 izolat *A. flavus* olarak tanımlanmış olup yüzde olarak bulunma oranı ise % 3,3 dür. Dördüncü örneğimiz Dursunbey köyünden tahmin edilen çavdar örneği olup 60 izolat elde edilmiş ve bu izolatlar içerisinde 3'ü *A. flavus* olarak tanımlanmış yüzde olarak bulunma oranı % 5 olarak tespit edilmiştir. Beşinci örneğimizin toplandığı yer Ovaköy olup toplamda 55 izolat elde edilmiş ve 2 izolat *A. flavus* olarak tanımlanmıştır. Yüzdece bulunma oranı ise % 3,6 dir. Altıncı örneğimiz Selimiye köyünden

teymin olan olup 49 izolat elde edilmiş ve 4 izolat *A. flavus* olarak tanımlanmış olup yüzdece bulunma oranı % 8,2 olarak belirlenmiştir. Yedinci çavdar örneğimiz Naipli köyünden toplanmış ve 60 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlarda 2 tanesi *A. flavus* olarak tanımlanmış ve yüzde olarak bulunma oranı ise %3,3 olarak belirlenmiştir. Sekizinci örnek grubumuzu oluşturan çavdar örnekleri İvrindi merkezden teymin edilmiş ve toplamda 62 izolat elde edilmiştir. 1 tanesi *A. flavus* olarak tanımlanmış olup yüzdece bulunma oranı % 1,6 olarak belirlenmiştir. Dokuzuncu örneğimizi Bakacak köyünden toplanan çavdar örneği oluşturmakta olup toplamda 60 izolat elde edilmiş ve 3 tanesi *A. flavus* olarak tanımlanmıştır. Yüzdece bulunma oranı ise %5 dir. Onuncu örnek grubumuzu Kavacık köyünden teymin edilen çavdar örnekleri oluşturmakta olup toplamda 60 izolat elde edilmiş ve 2 tanesi *A. flavus* olarak tanımlanmıştır. Yüzdece bulunma oranına ise % 3,3 olarak belirlenmiştir. Sonuçta 10 farklı bölgeden toplanan çavdar örneklerinde toplamda 601 adet izolat elde edilmiştir. 601 izolat içerisinde toplamda 22 adet *A. flavus* 'un teşhisi ve tanımlanması yapılmıştır. Elde edilen izolatlar içerisinde *A. flavus* türünün bulunma oranı %3,6 dır.

Karbonik Anhidraz (CA, E.C 4.2.1.1 Karbonat Hidroliyaz), bakterilerden engelişmiş hayvanlara kadar dağılım gösteren aktif bölgelerinde Zn^{+2} iyonu bulunduran metaloproteinler olup monomer yapıdadır. CA izoenzimlerinin temel görevi karbondioksitin bikarbonata geri dönüşümlü hidratasyonunu sağlamaktır. CA izoenzimleri enzimleri organizmada metabolik yollarla oluşan CO_2 'in taşınması, elektrolit sekresyonu, asit-baz dengesinin düzenlenmesi ve biyosentetik HCO_3^- oluşturulması gibi olaylarda rol oynar. Evrimsel olarak karbonik anhidrazlar amino asit dizileri ve yapıları temel alınarak birbirinden bağımsız beş gen ailesi (α -, β -, γ -, δ -, ζ -) tarafından temsil edilmektedir [10].

β -karbonik anhidraz (β -CAs)'lar bakterilerde, Archaea'lar da, alglerde, bitkilerde ve funguslarda içeren canlı gruplarında bulunurken memelilerde bulunmamaktadır. Yapısal olarak aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduran karbonik anhidraz enzim ailesinin dahil metaloenzimdir [53].

Fungal CA'lar ilk olarak bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'de karakterize edilen Nce103 genidir. Patojen funguslarda CA'nın rolü tam olarak anlaşılammış ve henüz aydınlatılamamıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda; Ascomycetelerden olan *C. albicans*'in sahip olduğu Nce103 geni olarak adlandırılan tek bir β -CA içerirken, basidiomycetelerden olan *C. neoformans*'da ise Can1 ve Can2 olmak üzere iki tip β -CA

bulunduğu aydınlatılmıştır. *C. neoformans*'da yapılan araştırmalar özellikle karbonik anhidrazın fizyolojik fonksiyonu üzerine ışık tutmaktadır [42].

Fungal genom veritabanı analizleri temel alındığında pekçok fungal türün karbonik anhidraz izoenzimlerinde yaygın olarak β -sınıf CA'ları içerdiği görülmektedir. Şimdiye kadar aydınlatılan Fungal türler içerisinde α -sınıf CA izoenzimi içeren tek tür *Aspergillus oryzae* fungal türüdür ve söz konusu bu CA ezmiminin aktivitesi tam anlamıyla bilinmemektedir. Akciğerlerde enfeksiyona neden olan *Aspergillus fumigatus* türü ise β -sınıf CA'ların üç izoformunu içermektedir [42].

Yukarıda değindiğimiz bilgiler ışığında çalışmamızda patojen bir fungus olan *Aspergillus flavus*'da beta karbonik anhidraz enziminin klonlanması ve gen ekspresyon analizleri ile moleküler karakterizasyonu yapılması amaçlanmıştır. Bu plan doğrultusunda, filamentli funguslardan olan *A.flavus* sahip olduğu kompleks hücre duvarı yapısı ve yüksek oranda polisakarit içermesinden dolayı yapılan total RNA izolasyonundabiyolojik olarak yüksek saflıkta ve kalitede RNA izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Söz konusu polisakaritler RNA ile ko-presipite olmakta ve RNA'nın yüksek saflıkta elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle fungal kültürden saf ve yüksek kalitede RNA elde etmek amacıyla beş farklı izolasyon tekniği kullanılmıştır. OD=260/280 nm de absorbansları alınarak izole edilen RNA'nın saflığı kontrol edilmiştir. Bunu takiben *A. flavus* CA genini elde etmek için RT-PCR'a dayalı strateji kullanılması uygun görülmüştür. Bunun nedeni ise CA geninin transkribinin intronlar içeriyor olmasıdır. *A. flavus* CA genine aitspesifik primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda çalışan amplifikasyonlarda 750bp'lik bölgede CA geninin amplifiye olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın daha sonraki basamaklarında *A.flavus* CA total RNA'sı kullanılarak amplifiye edilen CA geni sırasıyla önce pGEM-T vektörüne daha sonra mutagenез ve ekspresyon çalışmalarının yapılabilmesi amacı ile pET30a(+) vektörüne klonlanmıştır. 0,8 mM IPTG ile 1 ve 24 saat indüklenen örneklerin toplam protein miktarları SDS PAGE ile görüntülenmiştir.

Yapılan biyoinformatik analizlerde klonlanan *Aspergillus flavus* geninin taşımış olduğu 2 insersiyon ve nükleotid değişimleri göz önüne alındığında klonlanan bu genin yalancı gen olduğu tahmin edilmiştir. cDNA klonunda genin 94. Pozisyonunda 189 bazlık ve genin 234. Pozisyonunda 87 bazlık 2 insersiyon bölgesi saptanmış ve bu iki insersiyon haricinde bazı bölgelerde nükleotid yer değişim mutasyonlarının olduğu gözlenmiştir. Bu

sonuçlar doğrultusunda biyoinformatik analizlerle sınırlı kalınmayıp klonlanan *A. flavus* geninin ekspresyon çalışmasıyla aktif bir protein üretilip üretilmediğinin test edilmeştir. Bu amaçla protein ekspresyon analizlerine geçilmiş ve öncelikle rekombinat protein analizi için SDS PAGE yapılmıştır. SDS PAGE uygulamasında rekombinant proteinimizin 27 kDA büyüklünde olması beklenmektedir. İndüklenmenin sonrasında hem salt bakteri hücrelerinde hem ekspresyon vektörü olarak kullanılan pET30a(+)'da hemde rekombinat proteinimizde aynı büyüklükte bant verdiği gözlenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde rekombinat proteinimizin doğru yerde bant verip vermediğinden emin olunamamıştır. Bunun bakteriyal bir protein mi yoksa *A. flavus*' a ait CA olup olmadığı anlaşılması amacıyla western blot çalışması gerçekleştirmiştir. Ekspresyon vektörünün histidin kuyrukları içermesi nedeniyle elde edilen rekombinat proteinin his kuyruğu taşması beklenmektedir. Bu doğrultuda bu westernblotta rekombinant protein his antikoru tarafından işaretlenmeye çalışılmıştır. Yapılan western blot analizinde his antikoru spesifik olarak 27 kDA'luk proteine bağlanmamıştır. Bu da rekombinant proteinin üretilmediği işaret etmektedir. Genin içinde bulunan insersiyon ve yer değiştirme mutasyonları potansiyel bir pseudogen olduğu düşünölmektedir. Fomksiyonel analizle genin protein şeklinde ifade olmaması bunu bir kez daha doğrulamaktadır.

Yapılan bu çalışma ile *A. flavus*'a ait CA klonlanmıştır. Bu sonuçların bile enzimin ekspresyonun aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacağı kanatindeyiz. Bu çalışmanın ileride yapılacak enzim aktivite çalışmaları için temel bir basamak olacaktır. Aynı zamanda cDNA kütöplerinin başarılı bir şekilde oluşturulmasında temiz bir RNA elde edilmesi kritik önem taşımaktadır. Bu doğrultuda yapılan RNA çalışmalarında elde edilen verilerin filamentli funguslarda yüksek kalitede RNA elde edilme çalışmalarına katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

- [1] Eltem, R., Aksoy, U., Altındışli, A., Sarıgöl, N., Taşkın, E., Aşkun, T., vd., “Ege Bölgesinde Çekirdeksiz Kuru Üzümlerde Ota Oluşumunun Belirlenmesi”, (Eds: D. Heperkan, G. Dalkılıç ve H. Şenyuva), *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, İstanbul, 54-59, (2003).
- [2] Topal, Ş., “Gıda Maddelerinden Ayrılan ve Tanınan Küfler Üzerine Araştırmalar” *Gıda*, 9 (5), 253-261, (1984).
- [3] Klich, M. A., *Identification of Common Aspergillus Species*, Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, (2002).
- [4] Stevens, D. A., Kan, V. L., Judson, M. A., Morrison, V. A., Dummer, S., Denning, D. W., et al., “Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*”, *Clin. Infect. Dis*, 30, 696-709, (2000).
- [5] Ünlütürk, A., Turantas, F., Acar, J., Karapınar, M., Temiz, A., Aktug Gönül, S., vd., *Gıda Mikrobiyolojisi*, izmit: Mengi Tan Basımevi, 598, (1999).
- [6] Maren, T. H., “Carbonic Anhydrase, Physiology and Inhibition” *Physiol*, 47, 595, (1967).
- [7] Supuran, C. T., “Carbonic anhydrases” *Curr Pharm Des*, 14, 603-614, (2008).
- [8] Tripp, B. C., Smith, K. and Ferry, J. G., “Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme” *J Biol Chem*, 276, 48615-48618, (2001).
- [9] Aydın, M., “İnsan Karbonik Anhidraz I (HCA I) Geninin Klonlanması, *E.Coli* 'de Ekspresyonu ve Phe91Asn Yönlendirilmiş Mutageneziyle Elde Edilen Mutant Enzimin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması” Yüksek lisans tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2007).

- [10] Elleuche, S. and Pöggeler, S., "Evolution of carbonic anhydrases in fungi" *Curr Genet*, 55, 211-222, (2009).
- [11] Özkaya, F., Kuleasan, H., "Maya ve Küf. Ln:", (Eds: M. Akçelik, K. Ayhan, İ. Çakır, H. B. Dogan, V. Gürgün, A. K. Halkman, vd.), *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara: Sim Matbaacılık, 229-230, (2000).
- [12] Halkman, K., "Gıdalarda bulunan mikroorganizmalar ve bulaşma kaynakları [online]", (18 Ağustos 2006), www.mikrobiyoloji.org, (2005).
- [13] Öner, M., *Genel Mikrobiyoloji*, No 4, izmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 99, (2001).
- [14] Temiz, A., *Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri*, Ankara: Şafak Matbaacılık, 266, (1994).
- [15] Kabak, B., "Lactobacillus acidophilus ve Bifidobacterium bifidum'un Aspergillus flavus gelişimi ve aflatoxin B1 ve aflatoxin M1 üzerine etkisinin in vitro şartlarda araştırılması" Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 88, (2002).
- [16] Madigan, M. T., Martinko J. M. and Parker, J., *Brock Biology of Microorganisms*, 10th Edition, USA: Pearson Education International, 994, (2003).
- [17] Durlu-Özkaya, F. ve Kuleaşan, H., *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara: Sim Matbaası, 522, (2000).
- [18] Yoltaş, A., "İzmir ili ve Çevresinde Satışa Sunulan Tahıl Gevreği ve Müslilerin Küf izolasyonu ve Küflerin Tanımlanması" Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (2007).
- [19] Steyn, P. S., Stander, M. A., "Mycotoxins with Special Reference to the Carcinogenic Mycotoxins: Aflatoxins, Ochratoxins and Fumonisin", (Eds: B. Ballantyne, T. C. Marrs and T. C. M. Syversen), *General And Applied Toxicology*, 32, United Kingdom: Macmillian Reference Ltd., 2145, (1999).

- [20] Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. and Dutler, H. "Mycotoxin Detoxification of Animal Feed by Different Adsorbants" *Toxicol. Lett*, 122, 179, (2001).
- [21] Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J., *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Washington D.C: ASM Press, (1997).
- [22] Sage, L.; Garon, D; Murandi, S. F., "Fungal Microflora and Ochratoxin A Risk in French Vineyards" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5764-5768, (2004).
- [23] Kabak, B. ve Var, I., "Meyve Suyu ve Şaraplarda Mikotoksin Varlığı" *Dünya Gıda*, 73-79, (2006).
- [24] Woloshuk, C. P. and Shim, W. B., "Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge", *FEMS Microbiol*, 94-109, (2013).
- [25] Eltem, R., "Toksijenik Küflerin Gelişimini ve Toksin Üretimini Etkileyen Faktörler" *Mikotoksinler Biyoteknolojisi; Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı*, Bornova/İzmir, (2003).
- [26] Yu, J., Cleveland, T. E., Niermann, W. C. and Bennett, J. W., "Aspergillus flavus genomics: gateway to human and animal health, food safety and crop resistance to diseases", *Rev Iberoam Micol*, 22, 194-202, (2005).
- [27] Bossche, H. V., Mackenzie, D. V. R. and Cauvenbergh, G., *Aspergillus and Apeergilosis*, New York: Plenum, (1988).
- [28] Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I. and Samson, R. A., *Infrageneric taxa of Aspergillus*, New York: Plenum, 55-62, (1985).
- [29] Huang, A. F., Edwards F., Bernard, E. M., Armstrong, D. and Schmitt, J. H., "In vitro activity of the new semi-synthetic polypeptide cilofungin against *Aspergillus* and *Candida* species", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 9, 697-699, (1990).
- [30] Hara, S., Kitamoto, K. and Gomi, K., *New developments in fermented bevarages and foods with Aspergillus*, Boston: Butterworth-Heinemann, 133-153, (1992).

- [31] Roehr, M., Kubicek, C. P. and Kominek, J., *Industrial acids and other small molecules*, Boston: Butterworth-Heinemann, 91-131, (1992).
- [32] Dixan, D. M. and Walsh, T. J., *Human pathogenesis*, Boston: Butterworth-Heinemann, 249-267, (1992).
- [33] Young, L. S., *Aspergillosis*, New York: McGraw Hill, 933-940, (1990).
- [34] Klich, A. M., "Aspergillus flavus: the major producer of aflatoxin" *Molecular Plant Pathology*, 8 (6), 713-722, (2007).
- [35] Sridhar M. S., Gopinathan, U. and Rao, G. N., "Fungal keratitis associated with vernal keratoconjunctivitis" *Cornea*, 22, 80-81, (2003).
- [36] Lindskog, S., "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Pharmacol. Ther*, 74, (1), 1, (1997).
- [37] Leppilampi, M., "Functional and immunohistological studies on cancer-associated carbonic anhydrase IX" Ph.D Thesis, *Faculty of Medicine, Department of Clinical Chemistry*, Department of Pathology, Finland, (2006).
- [38] Mohanty, A. K., Kannan, K.K. and Mahajan S.K., "Human Carbonic Anhydrase I: Effect of Specific Site Mutations on Its Function", *J. Biosci*, 23, (3), 235, (1998).
- [39] Jones, N. L., "An obsession with CO₂", *Appl Physiol Nutr Metab* 33, 641-650, (2008).
- [40] Wistrand, P. J., "The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO₂ by the human erythrocyte" *Acta Physiol Scand*, 113, 417-426, (1981).
- [41] Moroney, J. V., Bartlett, S. G. and Samuelsson, G., "Carbonic anhydrases in plants and algae", *Plant Cell Environ*, 24, 141-153, (2001).
- [42] Bahn, Y. S. and Mühlshlegel, F. A., "CO₂ sensing in fungi and beyond" *Curr Opin Microbiol*, 9, 572-578, (2006).
- [43] Breton, S., "The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases", *JOP J Pancreas*, 2, (4), 159, (2001).

- [44] Almajan, G. L., Innocenti, A., Puccetti, L., Manole, G., Barbuceanu, S., Saramet, I., et al., "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic and tumor-associated carbonic anhydrase isozymes 116 I, II, and IX with a series of 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole-thiols", *Bioorg Med Chem Letters*, 15 (9), 2347-2352, (2005).
- [45] Sawaya, M. R., Cannon, G. C., Heinhorst, S., Tanaka, S., Williams, E. B., Yeates, T. O., et al., "The structure of beta-carbonic anhydrase from the carboxysomal shell reveals a distinct subclass with one active site for the price of two", *J Biol Chem* 281, 7546-7555, (2006).
- [46] Lane, T. W. , Saito, M. A., George, G. N., Pickering, I. J., Prince, R. C. and Morel, F. M., "Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom", *Nature* 435-442, (2005).
- [47] Park, H., Song, B. and Morel, F. M., "Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters", *Environ Microbiol*, 9, 403-413, (2007).
- [48] Hassan, I., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F. and Sly, S. W., "Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1570-1582, (2013).
- [49] Smith, K. S., and Ferry, J. G., "Prokaryotic carbonic anhydrases", *FEMS Microbiological Reviews*, 24, 335-366, (2000).
- [50] Badger, M. R. and Price, G. D., "The role of carbonic anhydrase in photosynthesis" *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 369-392, (1994).
- [51] Park, Y., Karlsson, J., Rojdestvenski, I., Pronina, N., Klimov, V., Oquist, G., et al., "Role of a novel photosystem II-associated carbonic anhydrase in photosynthetic carbon assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*", *FEBS Letters*, 444, 102-105, (1999).

- [52] Supuran, C. T., "Carbonic Anhydrases: Catalytic and Inhibition Mechanisms Distribution and Physiological Roles"(Eds: H. J. Smith and C. Simons),*Carbonic Anhydrase Its Inhibitors and Activators*, USA:CRC Press LLC, 1-23, (2004).
- [53] Rowlett, R. S., "Structure and catalytic mechanism of the β -carbonic anhydrases", *Biochimica et Biophysica Acta*, 362-373, (2010).
- [54] Neish, A. C., "Chloroplasts. II. Their chemical composition and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf", *Biochem J*, 33, 300-308, (1939).
- [55] Burnell, J. N., Gibbs, M. J. and Mason, J. G., "Spinach chloroplastic carbonic-anhydrase nucleotide-sequence analysis of cDNA", *Plant Physiol*, 92, 37-40, (1990)
- [56] Moroney, J. V., Bartlett, S. G. and Samuelsson, G., "Carbonic anhydrases in plants and algae", *Plant Cell Environ*, 24, 141-153, (2001).
- [57] Guilloton, M. B., Korte, J. J., Lamblin, A. F., Fuchs, J. A. and Anderson, P. M., "Carbonic anhydrase in Escherichia coli a product of the cyn operon", *J. Biol. Chem*, 267, 3731-3734, (1992).
- [58] Smith, K. S. and Ferry, J. G., "A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*", *J. Bacteriol*, 181, 6247-6253, (1999).
- [59] Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Muller, D., Klug, K. and Sultemeyer, D., "The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium", *Mol. Microbiol*, 56, 549-558, (2005).
- [60] Mitsuhashi, S., Mizushima, T., Yamashita, E., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Moriyama, H., et al., "X-ray structure of beta-carbonic anhydrase from the red alga, *Porphyridium purpureum*, reveals a novel catalytic site for CO₂ hydration", *J. Biol. Chem*, 275, 5521-5526, (2000).

- [61] Guilloton, M. B., Lamblin, A. F., Kozliak, E. I., Geraminejad, M., Tu, C., Silverman, D., et al., "A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli*", *J. Bacteriol*, 175, 1443-1451, (1993).
- [62] Nishimori, I., Onishi, S., Takeuchi, H. and Supuran, C.T., "The alpha and beta classes carbonic Anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets", *Curr. Pharm. Des*, 14, 622-630, (2008).
- [63] Mitsuhashi, S., Ohnishi, J., Hayashi, M. and Ikeda, M., "A gene homologous to beta-type carbonic anhydrase is essential for the growth of *Corynebacterium glutamicum* under atmospheric conditions", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 63, 592-601, (2004).
- [64] Hetherington A. M. and Raven J. A., "The biology of carbon dioxide", *Curr Biol*, 15, 406-410, (2005).
- [65] Suh, G. S., Wong, A. M., Hergarden, A. C., Wang, J. W., Simon, A. F., Benzer, S., et al., "A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*", *Nature*, 431, 854-859, (2004).
- [66] Makino, S., Sasakawa, C., Uchida, I., Terakado, N. and Yoshikawa, M., "Cloning and CO₂-dependent expression of the genetic region for encapsulation from *Bacillus anthracis*", *Mol Microbiol*, 2, 371-376, (1988).
- [67] Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J. and Cardenas, M. E., "Sensing the environment: lessons from fungi", *Nat Rev Microbiol*, 5, 57-69, (2007).
- [68] Klengel, T., Liang, W. J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J. R., et al., "Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence", *Curr Biol*, 15, 2021-2026, (2005).
- [69] Bahn, Y. S., Cox, G. M., Perfect, J. R. and Heitman, J., "Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence", *Curr Biol* 15, 2013-2020, (2005).
- [70] Götz, R., Gnann, A. and Zimmermann, F. K., "Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect", *Yeast*, 15, 855-864, (1999).

- [71] Innocenti, A., Leewattanapasuk, W., Muhlschlegel, F. A., Mastrolorenzo, A. and Supuran, C. T., "Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the beta-class enzyme from the pathogenic yeast *Candida glabrata* with anions", *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 4802-4805, (2009).
- [72] Li, W., Zhou, P. P., Jia, L. P., Yu, L. J., Li, X. L. and Zhu, M., "Limestone dissolution induced by fungal mycelia, acidic materials and carbonic anhydrase from fungi", *Mycopathologia* 167, 37-46, (2009).
- [73] Cleves, A. E., Cooper, D. N., Barondes, S. H. and Kelly, R. B., "A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*", *J Cell Biol*, 133, 1017-1026, (1996).
- [74] Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K. and Sültemeyer, D., "The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium", *Mol Microbiol*, 56, 549-558, (2005).
- [75] Aguilera, J., Van Dijken, J. P., De Winder, J. H. and Pronk, J. T., "Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure", *Biochem J* 391, 311-316, (2005).
- [76] Mogensen, E. G., Janbon, G., Chaloupka, J., Steegborn, C., Fu, M. S., Moyrand, F., et al., "*Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1", *Eukaryot Cell*, 5, 103-111, (2006).
- [77] Isik, S., Kockar, F., Aydin, M., Arslan, O., Ozensoy Guler, O., Innocenti, A., et al., "", *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 1662, (2009)
- [78] Innocenti, A., Hall, R. A., Scozzafava, A., Muhlschlegel, F. A. and Supuran, C. T., "Carbonic anhydrase activators: Activation of the b-carbonic anhydases from the pathogenic fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with amines and amino acids", *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 1034-1037, (2010).

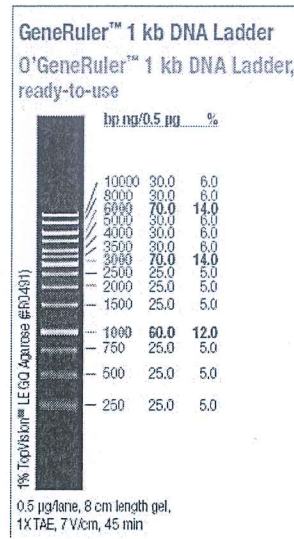
- [79] Kück, U., Pöggeler, S., Nowrousian, M., Nolting, N. and Engh, I., "The Mycota XV", (Eds: T. Anke and D. Weber), *Sordaria macrospora, a model system for fungal development*, Berlin: Heidelberg: Springer, 17-39, (2009).
- [80] Elleuche, S. and Pöggeler, S., "Carbonic anhydrases in fungi", *Microbiology*, 156, 23-29, (2010).
- [81] Bardakçı, F., Yenidünya, A. F. ve Yılmaz, N. (Eds), *Gen klonlama ve DNA analizi*, Ankara: Nobel Basım Evi, (2009).
- [82] Demirdağ, Z., Beldüz, A. O. ve Demir, İ., "Baculovirus'ün Ekspresyon Vektörü Olarak Biyoteknolojide Kullanılması", *Tr J of Biology*, 22, 249-262, (1998).
- [83] Aydoğan, S., Yönlendirilmiş Mutagenезle Mutant HCAII Genin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [84] Yin, J., Li, G., Rena, X., Herrler, G., "Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes", *Journal of Biotechnology*, (2007), 127, 335.
- [85] Aydoğan, S., "Yönlendirilmiş Mutagenезle Mutant HCAII Genin Eldesi ve Mutant Proteinlerin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2006).
- [86] http://labs.fhcrc.org/hahn/Methods/biochem_meth/pet.pdf (25.08.2013).
- [87] <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Causey/pET.html>(25.08.2013).
- [88] Silverman, D., *Molecular techniques: Protein Chemistry and Molecular Cloning*, Florida: Interdisciplinary Center for Biotechnology Research University, 2-7, (2002).
- [89] Thom, C. and Church, M. B., *The Aspergilli*, USA: Williams & Wilkins, (1926).

- [90] King, D. A., Hocking, A. D. and Pitt, J. I., "Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of moulds from foods", *Appl. Environm. Microbiol.* 37, 959-964, (1979).
- [91] Köçkar, F. T., "Characterisation of the coding and promoter region of the *Xenopus laevis* C/EBP alpha gene", Ph. D. Thesis, University, Cardiff School of Biosciences, Cardiff, (1999).
- [92] Askun, T., "Çekirdeksiz kuru üzümlerden potansiyel okratoksijenik küflerin izolasyonu ve identifikasyonu ile bazo okratoksijenik türlerde okratoksin-A oluşumunun zamana bağlı olarak değişiminin incelenmesi", Doktora tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2002)
- [93] Ye, W., Liu, L., Zheng, W., Lin, J. and Yin, J., "Comparison of RNA extraction methods applied to gene cloning of the taxol-producing fungi", *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3(10), 632-636, (2009).
- [94] [http:// www. thermoscientificbio. com/ uploadedFiles/Resources/prod-inf-ep0441-revertaid-reverse-transcriptase.pdf](http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/prod-inf-ep0441-revertaid-reverse-transcriptase.pdf) (28.08.2013).
- [95] <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/k069-product-information.pdf> (28.08.2013).
- [96] Temizkan, G. ve Arda, N., "*Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*", İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, (2004)
- [97] <http://www.protocol-online.org> (29.08.2013).
- [98] Laemmli, U. K., "Cleavage of the Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227-229, (1970).

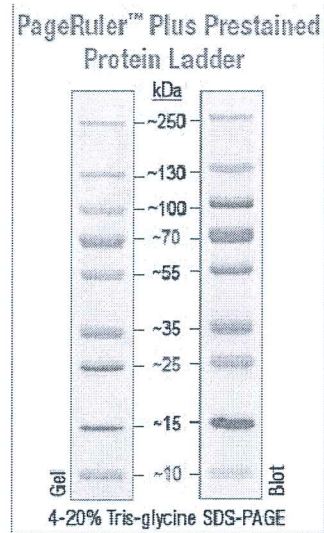
EKLER

6. EKLER

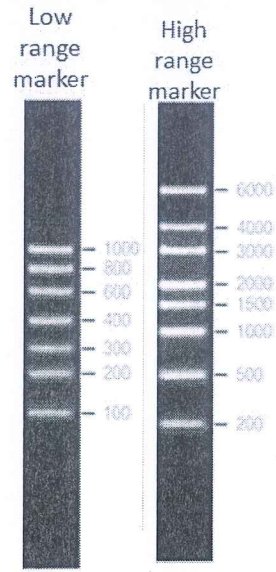
6.1 Kullanılan Markerlar



Şekil 6.1: Fermentas 1 kb marker



Şekil 6.2: PageRuler Prestained Protein marker (Thermo)



Şekil 6.3: Düşük ve yüksek ağırlıklı RNA markerları