

***Tetrahymena thermophila* TRANSFORMASYONUNDA
KULLANILAN REPLİKATİF PLAZMİDLERE
TETRAHYMENA KODON UYUMLU NEOMİSİN DİRENÇ
GENİNİN AKTARIMI VE ANTİBİYOTİK SEÇİCİLİĞİ**

Ayça Fulya Üstüntanır

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Temmuz – 2013

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 1109F146 ve 1208F131 nolu projeler kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayça Fulya Üstüntanır' ın “*Tetrahymena thermophila* transformasyonunda kullanılan replikatif plazmidlere *Tetrahymena* kodon uyumlu neomisin direnç geninin aktarımı ve antibiyotik seçiciliği” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 04/07/2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yrd.Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
Üye :	Prof.Dr. Sezai TÜRKEL
Üye :	Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Tetrahymena thermophila* TRANSFORMASYONUNDA KULLANILAN REPLİKATİF PLASMİDLERE TETRAHYMENA KODON UYUMLU NEOMİSİN DİRENÇ GENİNİN AKTARIMI VE ANTİBİYOTİK SEÇİCİLİĞİ**

Ayça Fulya Üstüntanır

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji

Danışman: Yard. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2013, 54 sayfa

Günümüzde neomisin dirençlilik geni bulunduran replikatif plasmidler ile *T. thermophila*' ya yapılan konjugant elektroporasyon (CET) verimliliğinin ~% 1-11 aralığında olduğu bilinmektedir; ne yazık ki bu verimlilik oranı cDNA ve genomik DNA kütüphanelerini taramak için yeterli sayıda vejetatif (somatik) veya germ-hattı (kalıtsal) üretmeye yeterli gelmemektedir. Bu çalışmanın amacı; CET' in verimliliğinin kodon optimize neomisin direnç geni (neo4) ile C3 ribozomal DNA (rDNA) replikasyon orijini içeren replikatif bir plazmid ile tanımlanmasıdır. Bu çalışma ile 3.8 kb C3 rDNA replikasyon orijini pH4T2 vektöründen üretilmiş ve pNeo4 vektörünün HindIII-Sall kısmına ligasyon ile eklenerek pNeo4-ori vektörü üretilmiştir. Konjugant *T. thermophila* hücrelerine 15 µg pNeo4-ori' nin elektroporasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformant hücreler ~12-24 saatlik bir beklemeden sonra SPP besiyerinde final konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde hücrelerin yarısı CdCl₂ indüklenirken, diğer yarısı CdCl₂' sız besiyerinde 7 gün boyunca paromomisin baskısı 100, 300 ve 600 µg/ml olacak şekilde seçim sağlanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma, neo4 kaseti ile C3 orijininin birlikte bulunduran pNeo4-ori vektörünün elektroporasyon ile *Tetrahymena*' ya transformasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *T. thermophila*, neo4, C3 orijin, elektroporasyon, konjugant elektroporasyon.

ABSTRACT

Master of Sciences Thesis

CODON OPTIMIZED NEOMYCIN RESISTANCE (NEO4) GENE IN A REPLICATIVE PLASMID INCREASES THE TRANSFORMATION EFFICIENCY OF CONJUGATIVE *Tetrahymena thermophila* by ELECTROPORATION

Ayça Fulya Üstüntanır

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Advance Technologies Program
Biotechnology

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU
2013, 54 pages

Today, efficiency of conjugant electrotransformation (CET) of *Tetrahymena thermophila* with a replicative plasmid containing a paromomycin-resistant gene is still known as ~1-11% range, which is not high enough for the efficient production of germline or vegetative transgenic strains to screen cDNA or genomic DNA library. The goal of this study is to determine the efficiency of CET by using a replicative plasmid containing a paromomycin-resistant codon optimized gene (neo4) and a C3 ribosomal DNA (rDNA) replication origin. In this study, the 3.8 kb C3 rDNA replicative origin from pH4T2 were amplified and ligated to HindIII-Sall site of pNeo4 vector to create pNeo4-ori. Conjugating cells of the ciliate *T. thermophila* were electroporated with 15 µg of pNeo4-ori. Transformed cells were selected with paromomycin following ~12-24 hr of growth on SPP medium. We observed resistant cells in first 2-3 days until 7th day under increasing paromomycin (100, 300 and 600 µg/ml) with CdCl₂ (final concentration 1 µg/ml) or without CdCl₂. These results indicate that the electroporation of *T. thermophila* with the pNeo4-ori constructed plasmid containing C3 replicative origin and neo4 gene cassette is duable.

Keywords: *Tetrahymena thermophila*, neo4, C3 origin, pNeo4-ori, electroporation, conjugant electrotransformation.

TEŞEKKÜR

Bana değerli vaktini ayıran ve hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen Hocam Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU' na,

Deneyimleriyle yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarıma,

Yüksek lisans hayatım boyunca her zaman destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tüm arkadaşlarıma,

Dünümde ve bugünümde yanımda olan hiç bir desteği esirgemeyen canım aileme teşekkür ederim.

Ayça Fulya Üstüntanır
Temmuz, 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
EK(ler).....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ	1
2.MATERYAL VE YÖNTEM	5
2.1 Kullanılan Besiyerleri ve Hücreler.....	5
2.2 Plazmid Yapılandırılması	5
2.3 <i>T. thermophila</i> Hücrelerine pNeo4-ori Plazmidinin Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu	6
2.4 <i>T. thermophila</i> pNeo4-ori Plazmidinin Elektroporasyon Verimliliğinin Seleksiyon ile Analizi.....	7
3.BULGULAR	8
3.1 C3 Replikasyon Orijini İçeren pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP Replikatif Plazmidlerinin Transformasyon Verimliliği Üzerindeki Etkisi	8
4.TARTIŞMA	17
5.SONUÇ	19
KAYNAKLAR	20

EKLER

Ek-1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	22
Ek-2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzimler	24
Ek-3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	25
Ek-4 Klonlama Konakçısı <i>Escherichia coli</i>	26
Ek-5 İfade Konakçısı <i>Tetrahymena thermophila</i>	27
Ek-6 <i>Tetrahymena thermophila</i> Plazmidleri	27
Ek-7 Yöntemler	28
Ek-8 pNeo4-ori ve pNeo4-ori GFP Dizi Bilgisi.....	43
Ek-9 Bulgular	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

3.1. pNeo4-ori oluşturulmasının adımları	9
3.2. pNeo4-ori-GFP oluşturulmasının adımları	9
3.3. pNeo-ori ve pNeo4-ori-GFP plazmidlerinin yapıları	10
3.4. pNeo4-ori plazmidinin dizi analizi sonucunun Blast analizi	11
3.5. 96' lık mikrotiter tabakların farklı yoğunluklardaki hücre içeriklerinin mikroskop görüntüsü	12
3.6. Orijinli pNeo4-ori ile pNeo4-ori-GFP ve orijinsiz pNeo4 ile pNeo3 plazmidlerinin elektroporasyon sonrası pozitif transformant verimliliği	15
3.7. Orijinli pNeo4-ori ile pNeo4-ori-GFP ve orijinsiz pNeo4 ile pNeo3 plazmidlerinin elektroporasyon sonrası tahmini pozitif transformant sayısı.....	15
3.8. pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP plazmidlerini içeren <i>T. thermophila</i> hücrelerinin koloni PZR deneyi	16

ÇİZELGELER DİZİNİ

- 3.1. 96' lık mikrotiter tabaklarında *T. thermophila* elektroporasyonu
sonucu paromomisine dirençli ++ ya da +++ pozitif kuyu sayıları 13

1.GİRİŞ

Biyoteknolojik araştırmalarda kullanılan gen klonlama ve ifadesi, mutant fenotiplerin tanımlanması, gen susturma, gen ürünlerinin hücre içi lokalizasyonu gibi yöntemlerde DNA plazmidleri kullanılır. Klonlama ve protein ifade plazmidlerinde DNA replikasyonun başlatılacağı konakçıya uygun bir replikasyon orijini ve antibiyotik seleksiyonu sağlayan antibiyotik direnç gen ifade kaseti bulunmaktadır. Hücre antibiyotik baskısına alınarak, plazmiddeki antibiyotik direnç gen ifade kasetini kullanmaya zorlanır ve plazmidin muhafazası sağlanır, böylelikle transform hücreler seçilir hale gelir. Bu seçilme işleminde verimlilik aynı zamanda görev yapan replikasyon orijin dizisinin düşük veya yüksek kopya replikasyon kapasitesi ile ilişkilidir; yani orijinin allelik dizi kapasitesi muhafazanın etkinliğini belirler (Sakai ve Komano, 1992). DNA replikasyon orijini ile antibiyotik direnç gen kaset ikilisinin konakçıya biyolojik uyumsuzluğu (direnç geninin kodon uyumsuzluğu gibi) replikasyon makinesinin yavaşlamasına ve hatta durmasına neden olabilir (Novick, 1987). Günümüzde bu anlatılan temel prensipleri kullanan, farklı araştırma ihtiyaçları karşılayacak çok iyi tasarlanmış plazmidler, *Escherichia coli*, *Homo sapiens*, *Pichia pastoris* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi birçok model organizma için kullanımdadır. Bu yaygın kullanılan konakçı organizmaların yetersiz kaldığı durumlar için tek hücreli ökaryot *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*); kolay ve hızlı üretilmesi, patojen olmaması, geniş bir sıcaklık aralığında yaşayabilmesi (18-41 °C), makroçekirdek genom projesinin tamamlanmış olması, translasyon sonrası glikolizasyon gibi modifikasyonları yapılabilmesi gibi özelliklerinden dolayı alternatif ökaryotik protein üretim konakçı adayı olarak araştırmalara konu olmaktadır (Asai ve Forney ,1999). *T. thermophila*'nın bu yönde kullanımının geliştirilmesi amacıyla, plazmidlerinde bulunan DNA replikasyon ve antibiyotik seleksiyon gen kombinasyonlarının birlikte çalışma verimliliklerinin tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüze kadar *T. thermophila*'nın vejetatif veya konjugatif hücre transformasyon plazmidlerinde, makroçekirdekte yer alan 10.000 kopya rDNA minikromozom orijini kullanılmıştır. Bu orijin dışında makroçekirdeğin telomerli

sentromersiz somatik minikromozomlarında ~45 kopya sağlayan fakat *T. thermophila* plazmidlerinde henüz kullanılmayan bir orijin daha bulunmaktadır (Asai ve Forney, 1999). *T. thermophila*'nın mikroçekirdeği kopya sayısı bir olan, telomerli ve sentromerli $2n=10$ adet kromozoma sahiptir ve sadece konjugasyonla ilgili olaylar ile gametik çekirdek üretiminde görev alır. rDNA minikromozom orijin bölgesi; çekinik B ve baskın C3 olarak bilinen iki farklı rDNA minikromozom alleleline sahiptir. B allelinde C3 alleleline göre 42 bazlık bir eksiklik bulunmaktadır (Løvlie ve ark., 1988). Dolayısıyla Tetrahymena konjugatif transformasyon deneylerinde, Tetrahymena eşlerinin her ikisinin B ırkından olmasına, aktarılacak plazmidin ise C3 orijinine sahip olmasına dikkat edilir. Böylelikle atılan geni taşıyan plazmid, replikasyon avantajını kullanarak endoreplikasyonda diğer orijine baskın hale gelerek hücre içi varlığını sağlamlaştırır (Asai ve Forney, 1999).

Tetrahymena plazmidlerinde neomisin gen ifade kasetleri birçok farklı promotor/terminatör dizi kombinasyonları (neo1, neo2, neo3... vs) halinde bulunur. Kasetlerde yer alan neomisin direnç geni aminoglikozid 3' fosfotransferaz enzimini kodlar ve paromomisini de içine alan neomisin antibiyotik ailesinin üyelerini fosforile ederek etkisiz hale getirir (Beck ve ark., 1982). İlk neo kaset kombinasyonu Tetrahymena'ya kodon uyumu yapılmamış bakteriyel transpozon neomisin direnç geninin 5' kısmına Tetrahymena histon4 (H4) promotor dizisi ile 3' kısmına da H4 geninin transkripsiyon terminasyon dizisi eklenmesiyle (H4/neo1/H4) oluşturulmuştur (Kahn ve ark., 1993). Kimerik neomisin gen içeren plazmidlerle Tetrahymena' da yapılan transformasyon deneylerinde antibiyotik baskısı altında, orijin kaynaklı antibiyotik direncine sahip kontrol hücrelerine göre neomisin gen direncine sahip hücreler, 30 kat daha fazla dirençlilik göstermiştir. Böylelikle neomisin geni Tetrahymena transformasyon çalışmalarında neomisin (paromomisin) direnç geni olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Kahn ve ark., 1993). Fakat bazı deneylerde H4/neo1/H4 kasetinde yer alan H4 gen dizi bölgelerinin homolog rekombinasyonla ana genom H4 lokusuna yerleşmesi, bu kasetin zayıf yönü olmuştur. Dolayısıyla neomisin gen kasetinin 3' bölgesinde yer alan H4 transkripsiyon sonlandırma dizisi, beta tübilin 2 (BTU2) geninin terminasyon

dizisi ile yer değiştirerek pH4T2 plazmidinde ki gibi hem orijin hem de H4/neo2/BTU2 kaseti içeren bir plazmid daha geliştirilmiştir (Gaertig ve ark., 1994). Oluşturulan bu orijinli plazmidler göstermiştir ki; antibiyotik baskısı altında düşük verimlilikte (pAU-3 ~% 7.6±4) de olsa hücrelerin seçilimi sağlanmıştır (Gaertig ve ark., 1994). İki adet 1,9 kb' lik rDNA orijini ile kodon uyumu yapılmamış neomisin gen ifade kaseti (H4/neo/BTU gibi) bulunduran pAUH4-12, pH4T2 ve p42L29B plazmidler, paromomisine dirençli ~% 6,2-11,5±3 verimlilik aralığında hücre seleksiyonu sağlamıştır. Neomisin kasetinde kullanılan H4 promotoru hücre döngüsünde H4 ihtiyacına göre regüle edilen artan azalan transkripsiyona sahiptir. Shang ve ark. (2002) tarafından H4/neo2/BTU2 kasetinde yer alan H4 promotoru yerine CdCl₂ (2 µg/ml) ile indüklenebilen, yüksek transkripsiyon sağlayan MTT1 promotoru yerleştirilmiş ve MTT1/neo3/BTU kasetini oluşturulmuştur. Bu plazmid ile yapılan “vejetatif hücreler ile sınırlı” biyolistik silah transformasyon deneyleri, transformasyon verimliliğini (2 µg/ml CdCl₂ ile 25.000-30.000 hücre/µg DNA) biraz daha arttırmıştır. Neomisin geninin H4 promotorlu kaseti ile MTT1 promotorlu kaseti karşılaştırıldığında, H4 promotorunun daha zayıf olduğu ve MTT1 promotorunun ise daha fazla paromomisine dirençli hücre sağladığı görülmüştür (Shang ve ark., 2002). MTT1 promotoru ile transformasyon verimliliğinde biraz artış sağlanmasına rağmen *E. coli* gibi organizmalara (% 95) göre düşük transformasyon gözlenmiştir. Bu antibiyotik seçiciliğinin, genomik DNA ya da cDNA kütüphaneleri oluşturmada yetersiz kaldığı bilinmektedir (Mochizuki, 2008). MTT1/neo3/BTU kasetinin transformasyon verimliliğinin MTT1 promotor gücü eklenmesine rağmen düşük kalmasının ana nedeni, neomisin geninin bakteriyel kodon sözlüğü kullanıyor olmasıdır. Neomisin direnç enzimini kodlayan gen dizisi üzerinde 120 baz değişikliği yapılarak, Tetrahymena' ya kodon uyumu sağlanmış ve MTT1/neo4/BTU kaseti oluşturulmuştur (Mochizuki, 2008). Orijinsiz lineer neo4 kaseti kullanılarak “vejetatif hücrelerde” yapılan biyolistik silah transformasyon deneylerinde orijinsiz neo3 gen susturma kasetine göre 13 kat daha fazla başarılı transformant üretilmiştir (Mochizuki, 2008). Vejetatif hücrelerde pozitif transformant seçiliminin kodon optimizasyonu yapılmış neomisini taşıyan plazmidlere göre 3. gün gibi daha erken bir sürede

seleksiyonun yapılabildiği bildirilmiştir. Bu çalışmalara karşılık genellikle Tetrahymena tranformasyonunun “konjugatif hücrelerde” orijinli bir plazmid kullanılarak yapılıyor olması ve bu kodon uyumlu neomisin geninin tranformasyon verimliliğinin “konjugatif hücrelerde” orijin ile birlikte nasıl bir verimlilikle alışacağıının henüz tanımlanmaması ise literatürde ki bilinmeyen olarak tanımlanabilir.

Bu çalışmanın amacını, Tetrahymena kodon uyumlu neo4 (MTT1/neo4/BTU) antibiyotik seleksiyon kasetinin replikatif orijin ile birlikte, konjugatif tranformasyon hücrelerinin seleksiyonunda nasıl bir verimlilik ile çalışabileceğinin araştırılması oluşturmaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Besiyerleri ve Hücreler

T. thermophila CU428 ve B2086 ırkları Cornell Üniversitesi, Tetrahymena Stok Merkezi'nden sağlanmıştır. Hücreler PPY veya SPP besiyerlerinde gece boyunca logaritmik faza ulaşıncaya kadar 30 °C' de büyütülmüştür (Gaertig ve Gorovsky, 1992).

Klonlama deneylerinde NEB 10-beta kompetent *E. coli* (NEB, C3019I) hücreleri kullanılmış ve LB broth veya LB agar besiyerlerinde 37 °C' de gece boyunca büyütülmüştür.

2.2 Plazmid Yapılandırılması

pH4T2 plazmidinden C3 replikatif orijin bölgesi 5' TGATAAGCTTTAGGTTTTAGGAATCGCGGC 3' ileri primeri ve 5' TATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCC 3' geri primeri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile 3.8 kb olarak üretilmiştir. HindIII (Thermo, #ER0645) ve Sall (Thermo, #ER0501) restriksiyon enzimleri ile üretilen orijin DNA parçasının uç kısımları yapışkan uçlu hale getirilmiştir. Kodon optimizasyonu yapılmış neomisin direnç genini içeren pNeo4 plazmidi (NCBI Erişim no: EU606202) HindIII-Sall enzimleri ile yapışkan uçlu hale getirilmiştir. Plazmid ve hedef DNA % 0.7' lik agaroz jelde görüntülenmiş, 365 nm dalga boyundaki UV kabini altında jelden kesilmiş ve jelden saflaştırma kiti (Thermo, GeneJet Gel Extraction Kit, #K0691) ile saflaştırılmıştır. T4 DNA ligaz (NEB, M0202S) ile yapışkan uçlu C3 orijin ve pNeo4 birleştirilmiş ve NEB 10-beta kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku ile transforme edilmiştir. *E. coli* NEB 10-beta hücrelerinden plazmid izolasyonu ile elde edilen pNeo4-ori plazmidinin HindIII-Sall çiftli kesimi ve XbaI tekli kesimi parmakizi analizi ile klonlama teyit edilmiştir (bkz. Ek 7).

2.3 *T. thermophila* Hücrelerine pNeo4-ori Plazmidinin Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu

pNeo4-ori ve pNeo4-ori-sfGFP plazmidi ve kontrol olarak kullanılan pNeo3 (Gaertig ve ark., 1994; Shang ve ark., 2002), pNeo4 (Mochizuki, 2008), pH4T2 (Gaertig ve ark., 1994) plazmidleri 100 ml LB' de gece boyu 37 °C' de büyütülmüş *E. coli* NEB 10-beta hücrelerinden fenol-kloroform klasik yöntemiyle saflaştırılmış, 100 µl elüsyon tamponunda (EB; Tris pH 8.0, Thermo #K0691) çözülmüştür.

Transformasyonda kullanılacak CU428-VII ve B2086-II Tetrahymena ırkları, 50 ml PPY besiyerinde eksponansiyal büyüme fazına kadar 30 °C' de büyütülmüş ve ardından 10 mM Tris.HCl (pH 7.5) açlık tamponuyla yıkanmış hücreler, çalkalamalı etüvde 18-24 saat aynı tamponla açlığa alınmıştır. Sabah hücreler thoma lamında sayılmış, hücre sayısı 3×10^5 /ml' e getirilmiş ve her bir hücreden 50' şer ml alınarak, 2 lt' lik erlende konjugasyona alınmıştır. Konjugasyonun 7. saatinde hücrelerin çekirdekleri Hoechst ile boyanmış ve konjugasyonun aşaması floresan mikroskop altında teyit edilmiştir. Konjugasyonun 9. saatinde hücrelerin 100 ml' si 6.500 g' de 7 dk santrifüj edilmiş ve 50 ml' lik 10 mM HEPES (pH 7.5) ile hücreler yıkanmıştır. Santrifüjlemeyle tekrar toplanan hücre peleti, oda sıcaklığındaki steril 1 ml' lik 10 mM HEPES ile çözülmüştür. Bu aşamanın öncesinde 15 µg plazmid içeren hacimler 125 µl' ye HEPES ile tamamlanmıştır. 125 µl' lik plazmid DNA ve 125 µl' lik hücre karıştırılmış, hızlıca 0.4 cm' lik küvete aktarılmış ve BioRad Gene Pulser aletine yerleştirilerek, 200 Ω' da 25 µF kapasitör ile 0.44 kV ayarlanarak transform edilmiştir (Barchetta ve ark., 2008). Elektropore edilen küvetteki hücrelerin üzerine 1 ml SPP besiyeri (100U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 250 pg/ml amfoterisin B içeren) eklenmiş, ardından hücreler küvetten yavaş bir şekilde 5 ml SPP besiyerine steril olarak dökülmüştür. 3 ml' si CdCl₂ indüklemesi yapılmayacak 6' lık elisa petrisinin bir kuyusuna aktarılmış ve diğer 3ml' si ise CdCl₂ indüklemesi yapılacak diğer elisa petrisinin bir kuyusuna aktarılmıştır. Gece boyu 30 °C' de çalkalamasız olarak 15 saat konjugasyondan çıkış ve bölünme safhasına alınmıştır (bkz Ek 7).

2.4 *T. thermophila* pNeo4-ori Plazmidinin Elektroporasyon Verimliliğinin Seleksiyon ile Analizi

Elektroporasyon işleminin ardından 15 saat bekletilen konjugatif hücre kültürü 1 µg/ml olacak şekilde CdCl₂ ile 1 saat boyunca indüklenmiş sonunda 100 µg/ml paromomisin baskısına alınmıştır. Kültür 96' lık mikrotiterin her bir kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde paylaştırılmış ve 30 °C' de 6 günlük takibe alınmıştır. Takibin 3. gününde antibiyotik miktarı 300 µg/ml' ye, 5. gününde ise 600 µg/ml' ye çıkarılarak pozitif transformant sayısı belirlenmiştir. Ardından toplam transformant hücre sayısı Poisson Dağılım formülünde $[S = 30 \times A \times (-\log e^{(96-B)/96})]$ A yerine poisson dilüsyon faktörü (A=elektroporasyondan sonra hücreler Poisson dilüsyon faktörü olarak 8 kat dilüe edilmiştir), B yerine 96 kuyuda paromomisin antibiyotiğine direnç gösteren transformantları içeren kuyu sayısı yazılarak, elektroporasyonun genelinde elde edilen pozitif transformant sayısı bulunmuştur (Mochizuki, 2008). Formülde yer alan 30 değeri elektroporasyon sonrası ilk dilüsyon olan 3 ml' nin kuyulara dağıtılan hacim olan 100 µl' ye bölünmesi sonucunda bulunmuştur. Formülde yer alan $(-\log e^{(96-B)/96})$ kısmı her kuyudaki tahmini pozitif transformant sayısını vermektedir (bkz. Ek 7).

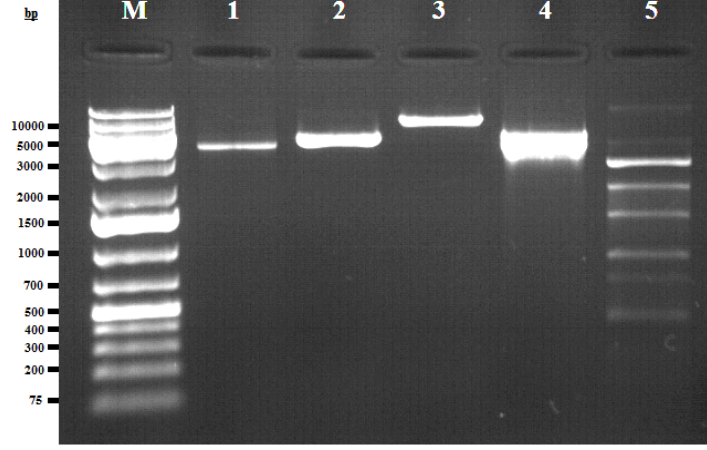
3. BULGULAR

3.1 C3 Replikasyon Orijini İçeren pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP Replikatif Plazmidlerinin Transformasyon Verimliliği Üzerindeki Etkisi

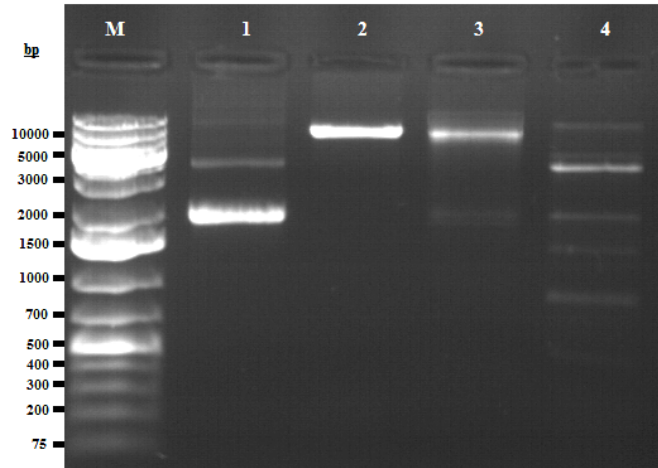
Tetrahymena thermophila' ya göre kodon optimizasyonu yapılmış Neo4 kaseti içeren pNeo4 plazmidine, pH4T2 plazmidinden polimeraz zincir reaksiyonuyla elde edilen 4.1 kb büyüklüğündeki C3 replikatif orijininin (Şekil 3.1-1) eklenmesi sonucunda, pNeo4-ori replikatif plazmidi oluşturulmuştur (Şekil 3.1-4 ve Şekil 3.3-A). Orijin klonlama işlemi HindIII-Sall restriksiyon enzimleri yapılmış ve klonlamanın doğruluğu XbaI enzim kesimiyle teyit edilmiştir (Şekil 3.1-5). Webcutter programı kullanılarak XbaI enziminin pNeo4-ori vektörünü kesmesiyle oluşması beklenen bantlar, 6123bç, 2066 bç, 1458bç, 928 bç, 807 bç, 432 bç' dir (Şekil 3.1-5). Fakat sadece 2066 bç, 1458bç, 928 bç, 807 bç, 432 bç bantları klonlamayı teyit etmiştir (Şekil 3.1). 6123bç ve 2066 bç bantların oluşmamasının nedeni olasılıkla ilave bir veya birkaç XbaI kesim bölgesinin klonlanan orijin içinde bulunması ile izah edilebilir.

Oluşturulan pNeo4-ori' nin protein ifade plazmidini kullanarak kullanılabilişliğini araştırmak amacıyla pNeo4-ori plazmidine gen lokalizasyonunda belirteç bir takı olarak kullanılan ve *Tetrahymena*' ya göre kodon optimizasyonu yapılmış TtSfGFP geni eklenmiştir. Genin başına Cd₂CI ile indüklenebilen bir promotor olan MTT1 promotoru, sonuna da BTU2 sonlandırma dizisi yerleştirilerek bir kaset oluşturulmuştur. pNeo-ori vektörünün NotI-SacI enzim kesim bölgesine 2 kb büyüklüğünde MTT1-TtSfGFP-BTU2 kaseti klonlanarak, pNeo4-ori-GFP plazmidini yapılandırılmıştır (Şekil 3.3-B). XbaI enzimiyle kesimi sonucu jelde 6123bç, 2066 bç, 1458bç, 928 bç, 807 bç, 432 bç bantları beklenmektedir. Fakat sadece 2066 bç, 1458bç, 928 bç, 807 bç, 432 bç bantları klonlamayı teyit etmiştir (Şekil 3.2-4). 6123bç ve 2066 bç bantların oluşmamasının nedeni olasılıkla ilave bir veya birkaç XbaI kesim bölgesinin klonlanan orijin içinde bulunması ile izah edilebilir. Kasetin

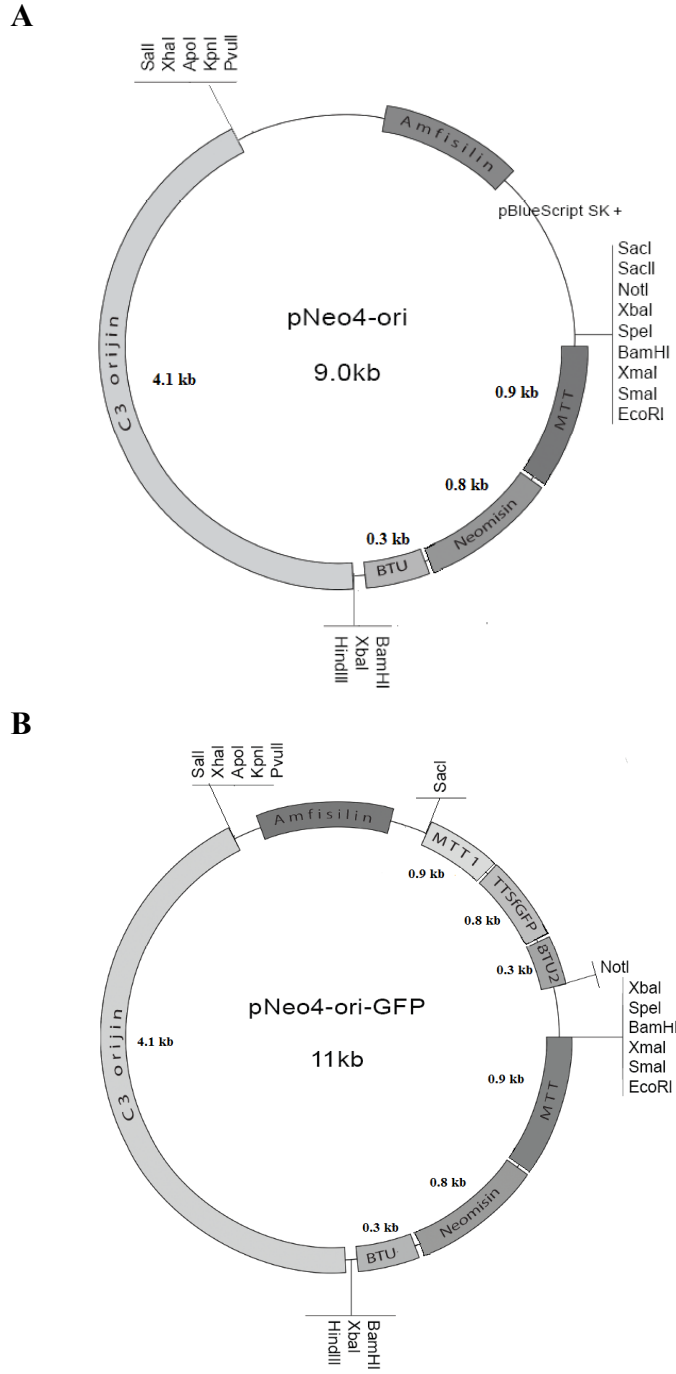
büyüklüğü 2 kb olduğu için pNeo4-ori XbaI kesim reaksiyonundan oluşan kaset içeren DNA parçası 2066 bp'lik bandın içene girdiği düşünülmektedir.



Şekil 3.1. pNeo4-ori oluşturma adımlarının agaroz jel analizi. TBE ile hazırlanmış % 0,7' lik agaroz jelde 70 V' da 1 saat **1:** PZR ile üretilen C3 replikatif orijininin (4.1 kb,100 ng) **2:** pNeo4 (5 kb, 500 ng) **3:** Lineerize pNeo4-ori (9 kb, 300 ng) **4:** pNeo4-ori, HindIII-SalI enzimleri ile kesilm, üst bant 5kb pNeo4 plazmidi (300 ng), alt bant 4.1 kb C3 replikatif orijini (300 ng) **5:** pNeo4-ori (600 ng) XbaI enzimiyle kesim **M:** 3 µl belirteç DNA, Thermo (#SM1331) Fermentas GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 75 to 20,000 bp.

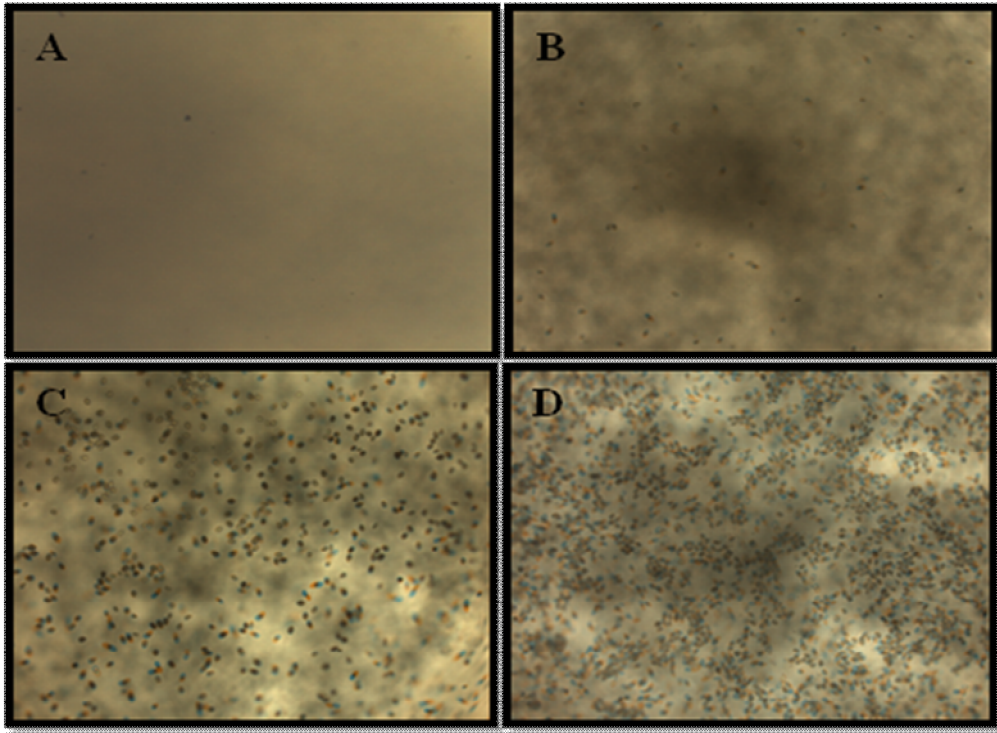


Şekil 3.2. pNeo4-ori-GFP oluşturma adımlarının agaroz jel analizi. TBE ile hazırlanmış % 0,7' lik agaroz jelde 70 V' da 1 saat **1:** MTT1-TtSfGFP-BTU2 kaseti (2 kb, 300 ng), **2:** pNeo4-ori-GFP (11 kb, 500 ng), **3:** Linear pNeo4-ori-GFP (9kb, 500 ng), **4:** pNeo4-ori-GFP (500 ng, 9kb). **M:** 3 µl belirteç DNA, Thermo (#SM1331) Fermentas GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 75 to 20,000 bp.



Şekil 3.3. pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP plazmid yapıları. Plazmidlerin ana iskeletleri pBlueScript SK(+)' dir. **A)** pNeo4-ori plazmid yapı, **B)** pNeo4-ori-GFP plazmid yapı

elektroporasyon deneyleri, 3 bağımsız tekrar olarak gerçekleştirilmiştir. Neomisin baskısı altında 6 günlük seleksiyon; 1. günde antibiyotik miktarı 100 µg/ml' ye, 3. günde antibiyotik miktarı 300 µg/ml' ye, 5 günde ise 600 µg/ml' ye çıkarılarak yapılmıştır. 96' lık mikrotiter tabaklarının kuyuları Şekil 3.5' de verilen görüntülere göre sayılmış ve kuyulardaki hücre yoğunluğu +, ++, +++ olacak şekilde sınıflandırılmıştır. Kuyulardaki yüzeyde yüzen hücreler 50 ve altındaysa +, 50 ila 100 arasında ise ++ , 100 den fazla ise +++ olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikrotiter tabakların farklı yoğunluklardaki hücre içeriklerinin mikroskop görüntüsü. **A)** Canlı hücre barındırmayan (negatif) 96' lık mikrotiter tabağın bir kuyusu (5X büyütme) **B)** + olarak adlandırılan mikrotiter kuyusu (5X büyütme) **C)** ++ olarak adlandırılan 50 ila 100 canlı hücre içeren 96' lık mikrotiter tabağın bir kuyusu (5X büyütme) **D)** +++ olarak adlandırılan 100 hücreden daha fazla canlı hücre içeren 96' lık mikrotiter tabağın bir kuyusu (5X büyütme)

Deney setleri, genel değerlendirildiğinde, ilk gün tüm tabakların her kuyusu çok fazla canlı hücre içermektedir (Şekil 3.5-D). İkinci gün kuyularda hücre canlılığı devam etmiştir. Üçüncü günde, önce sayım yapılmış ve CdCl₂ ile indüklenmemiş tüm hücrelerin öldüğü gözlenmiştir. CdCl₂ ile indüklenen

grupta ise pNeo4 ve pNeo3 plazmidlerinin yer aldığı tabaklarda canlı hücre bulunmadığı için sadece pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP içeren hücrelerin tabaklarında seleksiyona devam edilebilmiştir. Bu mikrotiter seleksiyon gözlem deneyleri devam ederken ayrıca 6' lık mikrotiter tabaklarda antibiyotik seleksiyonu yapılan hücrelerden hergün 1 ml hücre örneği alınarak hücre peletlemesi yapılmış ve alınan hacim kadar besiyeri eklemesi yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Mikrotiter tabaklarında *Tetrahymena thermophila* elektroporasyonu sonucu paromomisine dirençli ++ ve +++ pozitif kuyu sayıları.

1.set	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
pNeo4-ori	0	28	21	60	78	83	73
pNeo4-ori-GFP	0	50	42	77	63	88	83
2.set	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
pNeo4-ori	0	80	71	80	93	92	88
pNeo4-ori-GFP	0	29	28	44	57	83	65
3.set	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
pNeo4-ori	0	33	61	81	91	95	95
pNeo4-ori-GFP	0	4	9	20	20	46	45

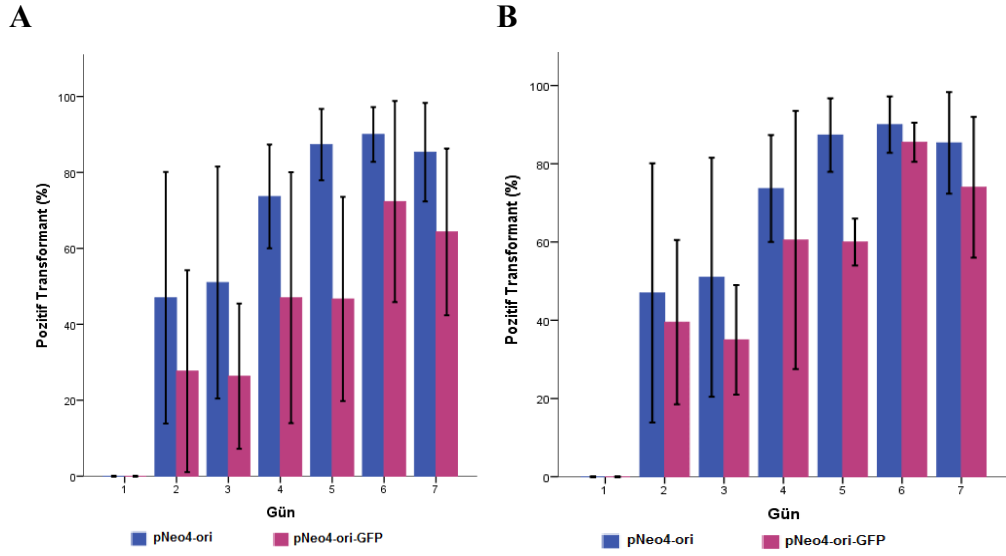
Üç Deney Ortalaması	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
pNeo4-ori	0	47	51	74	87	90	85
pNeo4-ori-GFP	0	27	26	47	47	72	64

CdCl₂ ile indüklenmemiş pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP hücre grubunda, canlı hücreye rastlanılmazken 6' lık mikrotiter tabaklarındaki dilüsyonsuz direk büyütme kültürlerinde antibiyotiğe dirençli hücre gözlemlenmiştir. CdCl₂ ile indüklenmiş pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP hücre deney grubunda ise antibiyotik seleksiyonu sonucunda Çizelge 3.1' deki gözlem verilerine ulaşılmıştır. Bu

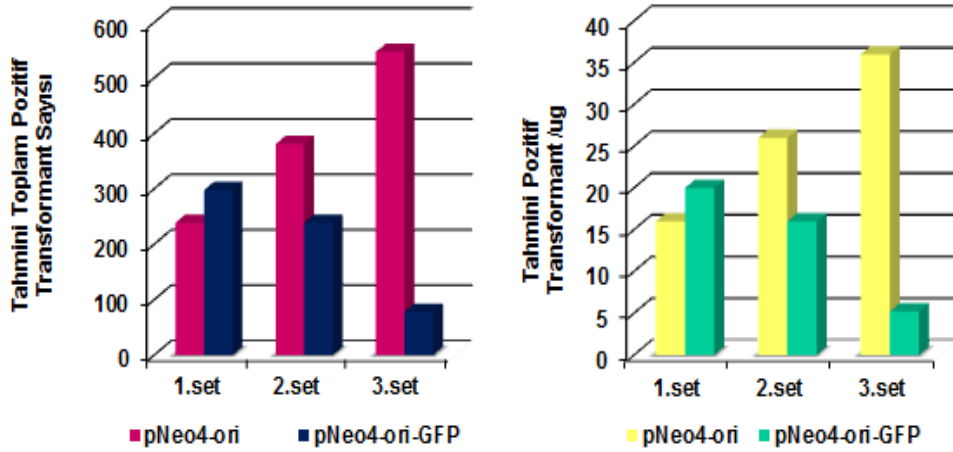
çizelgeler oluşturulurken ++ ve +++ olan hücre kuyucuklarının toplam sayısı dikkate alınmıştır. Orijinsiz pNeo3 ve pNeo4 kontrol grubu hücrelerine ait mikrotiter tabağında canlı hücre bulunmamasından dolayı çizelgede yer verilmemiştir.

Çizelge 3.1-A' da verilen değerler kullanılarak SPSS programında ortalama % transformant/gün grafikleri çizilmiştir. Grafikler aynı veri setiyle çizilmiş olmasına rağmen, Şekil 3.6-B' de 3. setin pNeo4-ori-GFP seti, değerlerin kısmen kabul edilebilir olmasından dolayı çizimlere dâhil edilmemiştir. Böylelikle Şekil 3.6-B' de ortalama hata barları küçültülmüş, pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP plazmidlerinin % pozitif transformant sayılarının barları birbirine yaklaştırılmıştır. Grafiklere bakıldığında pNeo4-ori plazmidinde % 47 ile % 90 iken, pNeo4-ori-GFP plazmidinde ise % 27 ile % 72 arasında % pozitif transformant gözlenmiştir. pNeo4-ori plazmidine antibiyotik seçicilik geni ile aynı promotora sahip farklı bir gen eklendiğinde pNeo4-ori-GFP vektörünün % pozitif transformant sayısında düşüşler görülmüştür (Şekil 3.6). pNeo4-ori için pozitif transformant sayısı 1. günden 6. güne doğru artış göstermiş, 7. günde düşüşe geçmiştir.

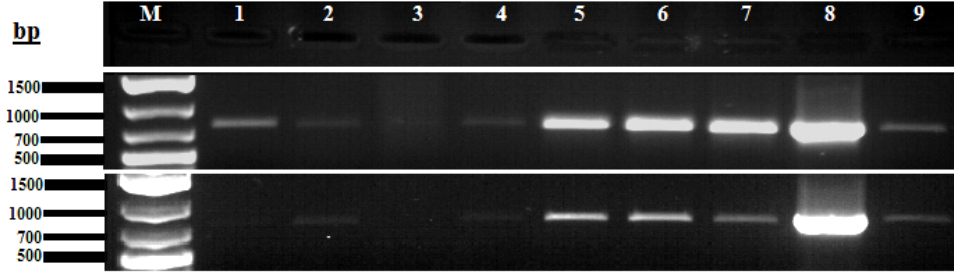
Güne bağlı transformant takip deneyi esnasında hücreler pelet olarak saklanmış ve kaynayan suda patlatılan hücrelerden santrifüj ile elde edilen genom DNA' sını kaynak DNA olarak, neomisin genine uygun primerlerle PZR' de kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin durumu agaroz jel ile analiz edilmiştir (Şekil 3.8). Pozitif kontrol kuyusunda (Şekil 3.8-kuyu 8) görüldüğü üzere neo4 DNA ürünü 800 bp' lik ürün vermektedir. Buna karşılık, 9. kuyuda yer alan negatif kontrolde ise oldukça zayıf aynı büyüklükte bir bant görülmüştür. Yani 9.kuyu seviyesinde bant içeren kuyular negatif olarak kabul edilmelidir. pNeo4-ori-GFP ve pNeo4-ori gruplarında negatife göre daha yoğun bant içermektedir, özellikle 5., 6. ve 7. günlerde neo4 geninde artış görülmektedir. Bu bulgular elektroporasyonun pozitif transformant verecek şekilde gerçekleştiğini ve hücrelerin gerçek transformant olduğunu desteklemektedir. Ayrıca jel görüntüsüne bakıldığında 6. güne kadar pNeo-ori bantlarının yoğunluğunda artış olması ve 7. günde ise bir düşüş yaşaması grafiklerdeki sayısal değerlerle de uyum içerisindedir.



Şekil 3.6. Orijinli pNeo4-ori ile pNeo4-ori-GFP ve orijinsiz pNeo4 ile pNeo3 plazmidlerinin elektroporasyon sonrası pozitif transformant verimliliği. **A.** pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP barları 3 tekrarlı deney verileri. **B.** pNeo4-ori barları 3 tekrarlı deney verilerinden çizilmişken pNeo4-ori-GFP iki tekrarlı deney verileri.



Şekil 3.7. Orijinli pNeo4-ori ile pNeo4-ori-GFP ve orijinsiz pNeo4 ile pNeo3 plazmidlerinin elektroporasyon sonrası tahmini pozitif transformant sayısı.



Şekil 3.8. pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP plazmidlerini içeren *T. thermophila* hücrelerinin koloni PZR deneyi. **1-7: Deney Grubu;** Elektroporasyonun 1.gününden 7. gününe kadar toplanan 1 ml kültürden elde edilen peletlerden neomisin geni primeleri kullanılarak yapılan koloni PZR (Beklenen ürün 800 bç). , **8: Pozitif Kontrol;** pNeo4-ori-GFP plazmidini kullanarak yapılan neomisin geni PZR' si **9: Negatif Kontrol;** B2086 hücrelerinin koloni PZR' si. Üst sırada yer alan bantlar pNeo4-ori-GFP, alt sırada yer alan bantlar ise pNeo4-ori deney seti. TBE ile hazırlanmış % 0,7' lik agaroz jelde 70 V'da 1 saat **M:** 3 µl belirteç DNA, Thermo (#SM1331) Fermentas GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 75 to 20,000 bp.

4.TARTIŞMA

Paromomisin (muadili neomisin) antibiyotiği, ökaryot ve prokaryotlarda protein sentezini durduran ya da yavaşlatan bir antibiyotiktir (Bruns ve ark., 1985). *Tetrahymena thermophila*'nın bazı mutant ırklarının rDNA geninde mutasyon oluşturularak antibiyotiğe direnç kazandırılmıştır. Fakat birçok deneyde kullanılan yabancı Tetrahymena ırklarında, paromomisin dirençliliği yoktur. Buradan yola çıkılarak Tetrahymena plazmidlerine neomisin geni eklenerek transform olan hücrelerde paromomisin antibiyotik direnci sağlanır ve böylelikle plazmid taşıyan pozitif hücreler seçilmiş olur. Gaertig ve ark. (1994) tarafından tanımlanan konjugatif hücre elektroporasyon çalışmalarına göre neomisin direnç geni ve orijin içeren pH4T2 (neo3 geni) vektörünün transformasyon verimliliği % 6.5 ±5.2 olarak bildirilmiştir. Verimliliği arttırmak için orijinsiz bir vektörde H4-neo3-BTU2 kasetinde promotor bölgesi değiştirilerek Cd⁺ ile indüklenebilen güçlü bir promotor olan MTT1 yerleştirildiğinde, pNeo3 plazmidi oluşturularak (MTT-neo3-BTU2) transformasyon etkinliği daha da arttırılmıştır (Shang ve ark., 2002). İlave olarak, bu neomisin direnç kasetindeki neo3 geni kodonları Tetrahymena kodon sözlüğüne göre değiştirilmiş, pNeo4 vektörü oluşturulmuş ve biyolistik silah ile vejetatif hücre transformasyon verimliliği pNeo3 göre 13 kat arttırılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda kullanılan promotor dizilerinin farklı olması kullanılan transformasyon yönteminin elektroporasyon ve biyolistik silah olmak üzere farklılaşması ile transforme edilen DNA miktarlarının farklı olmasından ötürü literatür verileri kendi içinde ve çalışmamızdaki veriler ile tam olarak karşılaştırılamamaktadır. Doğru bir karşılaştırma yapılması istenirse, deney plazmidine kontrol olarak belirlenen bir diğer plazmid aynı anda, aynı şartlarda transforme edilip, seleksiyonu yapılarak deney tekrarlanmalıdır.

Deney verilerinin Poisson dağılım formülüne göre analizi; pNeo4-ori plazmidinin µg DNA başına 47 pozitif transformant, pNeo4-ori-GFP' nin ise µg DNA başına 27 pozitif transformant verebileceğini tahminlemiştir. Literatürde yer alan Mochizuki (2008)' nin yaptığı çalışma da ise pNeo3 plazmidinin 68-73 hücre/µg DNA, pNeo4 plazmidinin ise 840-1000 hücre/µg DNA oluşturduğu,

Gaertig ve ark. (1994) ise pH4T2 plazmidi kullanarak 1325 hücre/ μg DNA başına elde ettikleri bildirilmiştir. Fakat deneysel yöntemlerin birbirinden farklı olmaları sebebiyle bu veriler birbirleriyle karşılaştırılmak yerine kendi iç kontrolleriyle karşılaştırılmıştır. Genel olarak deney verilerine bakıldığında, pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP plazmidleri ile yapılan transformasyon deneylerinden literatüre göre daha düşük sayıda pozitif transformant elde edilmiştir. Bunun nedeni olarak Poisson dağılımında kullanılan ve makalelerde önerilen transformasyon sonrası ilk dilüsyon ile Poisson formülü kullanımını sağlayan dilüsyon katının yöntem içinde yapılmamış veya çok az yapılmış olmasıdır. Kuyu başına çok fazla transformant düşmesinden dolayı çok düşük tahminleme yapılmış olduğu düşünülmektedir. Bundan dolayı tekrar deneylerinde transformasyon sonrası hücrelerin 20 ml' ye alınması, 15 saatlik konjugasyon tamamlama ile iyileşme adımlarından sonra 80X ile 320X arasında bir Poisson formülü kullanımı için dilüsyon uygulanması tavsiye edilebilir.

CdCl_2 indüklemesi yapılmayan kuyularda görülen % 1 seviyesinde pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP içeren pozitif transformantlar elde edilmesi ise Shang ve ark. (2002) makalesindeki MTT1 promotorunun sızıntılı transkripsiyonu ile izah edilebilir. Olasılıkla sızıntılı transkripsiyon sırasında üretilen neomisin direnç geniyle düşük miktarda da olsa pozitif transformant elde edilmiş olmasıdır.

pNeo4-ori-GFP plazmidinin transformasyonu ile oluşan pozitif transformant sayısının tüm deney setlerinin pNeo4-ori' ye göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.6). Shang ve ark. (2002) tarafından bildirilen MTT1 promotorunun 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CdCl_2 ile indüklenmesi durumunda promotorun en üst seviye ile transkripsiyon yaptığını bildirilmiştir. Bu da maksimum pozitif transformantın elde edildiği indüklemeye seviyesi olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmaya göre pNeo4-ori-GFP' de pNeo4-ori' ye göre bir ilave MTT1 promotoru bulunmasına rağmen CdCl_2 seviyesinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde bırakılması, bu plazmidin taşıyan hücrelerin seçilimi için yeterli neomisin direnç enziminin üretilmemesine neden olmuş olabilir. Bu plazmiddeki MTT1 promotorlarından birinin farklı bir promotor ile değiştirilmesi bu problemin çözümüne yardımcı olabilir.

5. SONUÇ

Güçlü bir promotor olan MTT1, kodon optimizasyonu yapılmış neomisin geni ve Tetrahymena hücresinde plazmidin sayısal artışını sağlayacak C3 orijiniyle bu çalışmada olduğu gibi bir araya getirildiğinde, Tetrahymena replikatif vektörlerinin elektroporasyon yöntemiyle uyum içinde bir arada çalıştığı, vektörün paromomisin baskısı altında 7 gün boyunca hücre içinde stabil kaldığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- Barchetta, S., La Terza, A., Ballarini, P., Pucciarelli, S. ve Miceli, C. (2008), *Combination of two regulatory elements in the Tetrahymena thermophila HSP70-1 gene controls heat shock activation. Eukaryotic Cell*, 7(2), 379–386. doi:10.1128/EC.00221-07.
- Blackburn, E.H. ve Gall J.G. (1978), *A tandemly repeat ed sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena.* Mol Biol 120: 33–53.
- Bruns, P. J., Katzen, A.L., Martin, L., ve Blackburn, E. H. (1985), *A drug-resistant mutation in the ribosomal DNA of Tetrahymena. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(9), 2844–6. Retrieved from
- Brown, T.A. (1997), *Gene Cloning*, Chapman & Hall, New York,.
- Brownell, J.E. ve ark. (1996) *Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. Cell* 84, 843–851
- Coyne, R. S ve ark. (2008), *Refined annotation and assembly of the Tetrahymena thermophila genome sequence through EST analysis, comparative genomic hybridization, and targeted gap closure. BMC Genomics*, 9:562 doi:10.1186/1471-2164-9-562
- Eisen, J.A, Coyne, R.S, Wu, M., Wu, D. ve Thiagarajan M. (2006), *Macronuclear genome sequence of the ciliate Tetrahymena thermophila, a model eukaryote. PLoS Biol* 4(9): e286.DOI:10.1371.
- Asai, D. J. ve Forney, J.D. (1999), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, USA,.
- Gaertig, J. ve Gorovsky, M. (1992), *Efficient mass transformation of Tetrahymena thermophila by electroporation of conjugants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9196–200.
- Gaertig, J., Gu, L., Hai, B. ve Gorovsky, M. A. (1994), *High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in Tetrahymena. Nucleic acids research*, 22(24), 5391–8.
- Greider C. W. ve Blackburn E. H. (1985), *Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts, Cell*, Volume 43, Issue 2, Part 1, 405-413.

- Greider C. W. ve Blackburn E. H. (1989), *A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis*, Nature Vol. 337.
- Sakai, H. ve Komano, T. (1992), *DNA Synthesis of Plasmids in Escherichia coli*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews Vol.10 209-252
- Johnson K.A. (1986), *Methods Enzymol*, 134,306-317
- Kahn, R. W., Andersen, B. H. ve Brunk, C. F. (1993), *Transformation of Tetrahymena thermophila by microinjection of a foreign gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(20), 9295–9.
- Løvlie, A., Haller, B. L., ve Orias, E. (1988), *Molecular evidence for somatic recombination in the ribosomal DNA of Tetrahymena thermophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85(14), 5156–60.
- Mochizuki K. (2008), *High efficiency transformation of Tetrahymena using a codon-optimized neomycin resistance gene*. Gene, 425(1-2), 79–83. doi:10.1016/j.gene.2008.08.007
- Novick R. P. (1987), *Plasmid Incompatibility*, Microbiological Reviews, Dec. 1987, p. 381-395
- Orias E. ve Hamilton E.P. (2000), *Methods in Cell Biology*, (Chapter 26 Transient and Stable DNA Transformation of *Tetrahymena thermophila* by Electroporation)
- Sambrook, J. ve Russell D. (2001), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd., Cold Spring Harbour Laboratory
- Sanger F., Nicklen S., ve Coulson A. R., (1977) *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, Vol. 74, No. 12, pp. 5463-5467,.
- Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J., ve Gorovsky, M. a. (2002). *A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in Tetrahymena thermophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(6), 3734–9. doi:10.1073/pnas.052016199.
- Yao, M.C. (1981) *Ribosomal RNA gene amplification in Tetrahymena may be associated with chromosome breakage and DNA elimination*. Cell, 24, 765-74.

EK-1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Tris Base (Applichem A2264)
- Tris.HCl (Sigma, 05432)
10 mM pH7.5 olarak hazırlanan steril Tris.HCl Tetrahymena elektroporasyon deneylerinde, 5 mM pH 8.0 olarak hazırlanan Tris.HCl *E.coli* hücrelerinden plazmid DNA izolasyon deneylerinde kullanılmıştır.
- Borik Asit (Bio Basic BB0044)
- EDTA (Sigma,E6758)
EDTA 0,5 M olarak plazmid izolasyonu ve tampon hazırlanmasında kullanılmış olup, pH' sı 8.0' e NaOH tabletleriyle getirilmiştir.
- Sodyum Asetat (NaOAc) (Sigma, 241245)
Plazmit DNA izolasyonunda 0.3 M pH5.5 olarak kullanılmıştır.
- Amonyum Asetat (NH₄C₂H₃O₂) (Reidel de Haen, S170594)
Plazmit DNA izolasyonunda 7.5 M pH7.5 olarak kullanılmıştır.
- Fenol-Kloroform-İzoamil alkol (25:24:1) (Sigma P2069-100ml)
Plazmit DNA izolasyonunda pH8 civarında olan DNA izolasyonlarına uygun iki fazlı Fenol-Kloroform-İzoamilalkol kullanılmıştır. Kullanılmadan önce 10 mM Tris ve 1 mM EDTA ile fenol doyurulmuş ve iki fazlı forma geçmesi sağlanmıştır.
- % 1' lik SDS (AppliChem, A2263)
Sodium dodecyl sulfat % 1 (w/v oranında) dH₂O' da çözülerek hazırlanmıştır.
- NaOH
Plazmid izolasyonunda 0.2 M olarak kullanılmıştır.
- İzopropanol (Riedel de Haen, 24137).
- Etanol (Riedel, 071029)
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma, E8751)
Konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde dH₂O' da çözülerek hazırlanmış ve çözelti +4 °C' de muhafaza edilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde jel içerinde farklı büyüklüklerde DNA' lara bağlanarak 312-365 nm UV ışığında

DNA'ların görünür olmasını sağlamaktadır. Agaroz jel içerisine 0.5 µg/ml EtBr olacak şekilde eklenmektedir.

- Agaroz A(Biomax, IB70073)
Agaroz jel elektroforezinde DNA'ların büyüklüklerine göre ayrılması için % 0.7 ve % 1 aralığındaki farklı yoğunluklarda hazırlanan jellerde kullanılmıştır. Jelin hazırlanması sırasında agarozun çözücü tamponu olarak 1X'lik TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) tamponu kullanılmıştır.
- 10X TBE (Tris- Borik Asit- EDTA)
108 gr Trizma base ve 55 gr borik asit tartılarak 600 ml dH₂O' da tamamiyle çözülür ve ardından çözeltiye 40 ml 0.5 M pH 8.0 EDTA eklenir. EDTA'nın çözülmesinin ardından tampon 1 lt' ye tamamlanır. Hazırlanan tampon 1/10 oranında seyreltilerek 1X TBE olacak şekilde seyreltilmiş ve agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır.
- 6X DNA Yükleme Tamponu (Thermo, #R0611)
- DNA Marker 0.5 µg/ml (Thermo, #SM0331)
- Tripton (Sigma, 95039)
- Maya ekstratı (Sigma, Y1625)
- Proteaz Pepton (Sigma, 82450)
- Sodyum Klorür (Merck, 1.06400)
- D(+)Glikoz monohidrat (Riedel-de Haen, 16301)
- Kalsiyum Klorür (CdCl₂) (Sigma, C1016)
E. coli hücrelerinin kimyasal transformasyonda kullanılması için kompotent hale getirilmesinde 50 mM kullanılmıştır.
- Gliserol (Sigma, G2289)
% 80' lik gliserol *E. coli* hücrelerinin -80 °C stok yapılmasında ve kimyasal kompotent hücre hazırlığında sırasında kullanılmıştır. % 99' lik gliserolden dH₂O ile % 80' liğe steril dH₂O ile seyreltilen gliserol otoklav edildikten sonra +4 °C' de muhafaza edilir.
- Kadminyum Klorür (CdCl₂) (Sigma, 439800)
Protein ekspresyon deneylerinde MTT1 promotorunun indükleyecisi olarak kullanılan CdCl₂, promotor bölgeye bağlanarak, o promotor kontrolündeki genin kontrollü bir şekilde üretilmesine yardımcı olur.

Stok solüsyonu 1000 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış olan CdCl₂ deneylerde 1 µg/ml şekilde kullanılmıştır.

- Paramomisin (Sigma, P9297)
- Stok solüsyonu 50 µg/ml hazırlanmış olan paramomisin, Tetrahymena antibiyotik direnç geni varlığında, transforme edilen plazmidin seçiciliğini sağlar.
- Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Sigma, P4333)
PPY ve SSP besiyerlerinde bakteri ve küf kontaminasyonunu engellemek amacıyla kullanılmıştır.
- Amfisilin (Sigma, A0104)
E. coli' de yapılan klonlama deneylerinde pozitif klon seçiciliğinin sağlanmasında kullanılmıştır. Stok solüsyon (1000X) 100 mg amfisilinin 1 ml steril dH₂O' da çözülmesiyle hazırlanır ve 0.45 µm por çaplı membran filtre ile sterilizasyon yapılır. -20 °C' de muhafaza edilir.
- HEPES (Bio Basic Canada, HB024)
Tetrahymena' nın konjugatif elektroporasyon deneyinde oda sıcaklığında kullanılmıştır. HEPES 10 mM pH 7.5 olarak hazırlanır ve 0.45 µm por çaplı membran filtre ile steril edilerek +4 °C' de muhafaza edilir.
- Paraformaldehit (Sigma, P6148)
- Hoechst 33342 Fluorescent Stain (Sigma Aldrich, 33258)
1mg/ml stok solüsyonundan Tetrahymena çekirdek boyama deneylerinde 500 µl hücreye boyadan 15 µl eklenerek kullanılmıştır.

EK-2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzimler

- **Kullanılan Cihazlar**

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Applied Biosystem, Veriti Thermal Cycler) , Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel

Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Crison, Basic 20), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Mettler D-91126), Isı bloğu (Thermoblock Clifton B11), Nanodrop (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazi (Ohaus pro AV812), Gene Pulser Xcell (BioRad, 165-2666), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6), Dizi Analizi Cihazı (Beckman Coulter, CEQ8000), Leica DM6000 Flüoresan Mikroskop, Ultra dondurucu (Thermo, Model 906 UltraFreezer)

- **Kullanılan Kitler**

QIAGEN plazmid mini kit (Qiagen, 12123), GeneJet Jel Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), Dizi Analizi Kiti (Beckman Coulter, GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, 608120), Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter, A29151)

- **Kullanılan Enzimler**

PrimeStar HS DNA Polimeraz (Takara, R010Q), Taq DNA Polimeraz (Fermantas, EP0401), Phusion High Fidelity DNA Polimeraz (Finnzyme, F530-S), Sall (Fermantas, #ER0645), HindIII (Fermantas, #ER0501), XbaI (Takara, 1039A), NotI (Thermo,#ER0591), SacI (Takara, 1078A), T4 DNA Ligaz (NEB, M0202S), Lizozim (Sigma, 62970), Rnase A Solution (BioBasic),

EK-3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

- **LB Broth Besiyeri (Lizojen Broth)**

1 lt hazırlamak için 5 gr Maya ekstratı, 10 gr Tripton ve 5 gr Sodyum Klorür kullanılır. Hazırlanan karışım otoklav edilerek steril edilir ve oda sıcaklığında saklanabilir. *E. coli* hücrelerinin sıvı ortamda büyütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

- **LB Agar Besiyeri**

37 gr. LB agar 1 lt dH₂O' da çözülüp, 121 °C' de 15 dk otoklavda steril edildikten sonra antibiyotik eklenmesi amacıyla 55 °C' deki su banyosuna alınır ve ısı düşüğünde 1000X amfilisinden her 1 ml için 1 µl olacak şekilde 1X

olarak eklenir ve petrilere yaklaşık 20' şer ml olarak paylaşılır. Kontaminasyonun engellenmesi amacıyla +4 °C' de saklanır. *E. coli* hücrelerinin büyütülmesinde kullanılan katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

- **PPY Besiyeri**

10 gr Proteose pepton, 1,5 gr Maya ekstraktı, 999 ml dH₂O ile çözülür ve üzerine stok 10 mM FeCl₂.6H₂O' den 1 ml eklenerek toplam hacim 1 lt olacak şekilde hazırlanır ve otoklavda steril edilir. *T. thermophila* hücrelerinin büyütülmesinde kullanılmıştır.

- **SPP Besiyeri**

% 2 proteaz pepton (10 gr), % 0.1 maya ekstraktı (1 gr), % 0.2 glikoz (2 gr) ve % 0.0003 10 mM FeCl₂.6H₂O' den (finalde 33 µM olacak şekilde yani 3300 µl) eklenerek 1lt besiyeri hazırlanmaktadır. PPY besiyerine benzemekle birlikte içeriği glikoz sayesinde zenginleştirilmiş, böylelikle elektroporasyon sonrasındaki kullanımlarında hücrelerin kendilerini daha kolay iyileştirmelerine yardımcı olmuştur.

EK- 4 Klonlama Konakçısı *Escherichia coli*

Klonlama konukaçısı olarak NEB 10-beta kompetent *E. coli* hücreleri kullanılmış olup, bu hücreler DH10B ırkından türevlendirilmiştir. Irkın genotipi araD139 Δ(ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK (φ80 Δ(lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL (*Str^R*) Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) şeklindedir. Büyük plazmidlerin ve bakteri yapay kromozomlarının transformasyondaki verimliliği diğer ırklara oranla daha fazla olduğundan tercih edilmiştir ve yapılan deneysel çalışmalarda 1 µg pUC19 DNA' sının transformasyon verimliliği 1–3x10⁹ cfu/µg olarak belirtilmiştir.

EK- 5 İfade Konakçısı *Tetrahymena thermophila*

T. thermophila'nın organizmal özelliklerine baktığımızda; silli, tek hücreli, 50 µm x 20 µm çaplı, 18 °C-41 °C gibi çok geniş bir sıcaklık aralığında tatlı sularda yaşayabilen bir organizmadır. Bu organizmanın hücresel fonksiyonlarını kontrol eden makroçekirdek (45ploid) ile kalıtım faaliyetlerini idare eden mikroçekirdek (2n=10) organizmanın sitoplazması içinde birlikte bulunmaktadır. Basit ve ucuz kültüre edilmesi, 2-4 saat gibi kısa bölünme zamanı ve tamamlanmış bir makroçekirdek genom projesine sahip olması *T. Thermophila*'yı biyolojik ve biyoteknolojik araştırmalarda yaygın kullanılan bir organizma haline getirmiştir (Orias ve ark., 2000). Ayrıca telomer (Blackburn ve ark., 1978; Yao ve ark., 1981), telomeraz (Greider ve ark., 1989) ve ribozimlerin keşfi, dinein motor proteinlerinin basit analizleri (Johnson ve ark., 1986), histon asetiltransferazın transkripsiyondaki rolünün de (Brownell ve ark., 1996) ilk defa *T. thermophila*'da çalışılmış olması bilim dünyasında bu organizmanın yerini sağlamlaştırmıştır. Ökaryotik tek hücreli silli *T. thermophila*'da Eisen ve ark. (2006) tarafından yapılan makroçekirdek genom projesi verileri, Coyne ve ark. (2008) tarafından gözden geçirildiğinde bu organizmanın toplamda 24,725 protein kodlayıcı gen bulundurduğu görülmüştür. Tetrahymena'nın bu gen sayısı diğer canlılara eşdeğer bir biyolojik farklılaşmayı destekleyecek genom kapasite derinliğine sahip olduğunu göstermektedir.

EK-6 *Tetrahymena thermophila* Plazmidleri

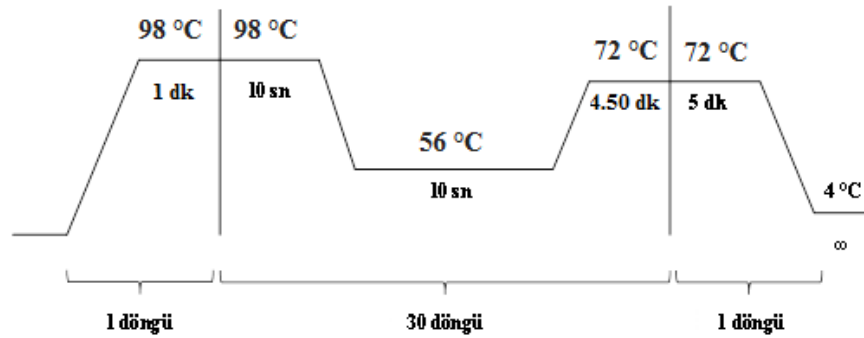
Deneylerde kullanılan Tetrahymena plazmidleri pNeo4, pNeo3 ve pH4T2' dir. Kullanılan her bir plazmidin ortak noktası neomisin direnç geni taşımaları olup, neomisin ifade kasetleri kimerik olarak oluşturulmuştur. İçlerinden ilk tasarlanan orijinli relikatif plazmid pH4T2' de H4 promotörü kontrolünde neomisin direnç geni ve BTU2 sonlandırma dizisi bulunmaktadır. Bu plazmidten tasarlanan pNeo3 plazmidinde neomisin direnç geni indüklenebilir MTT1 promotörü kontrolündedir ve bu plazmiddeki neomisin direnç geninin

(neo3) 243 aminoasitinde mutasyon yapılarak Tetrahymena kodon uyumlu neomisin direnç geni (neo4) oluşturulmuştur.

EK- 7 Yöntemler

C3 Orijininin Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla Üretilmesi, Agaroz Jel Elektforezinde Görüntülenmesi ve Jelden İzolasyonu

C3 orijininin üretilmesi amacıyla pH4T2 plazmidinde bulunan orijin dizisi için 5' TGATAAGCTTTAGGTTTTAGGAATCGCGGC 3' ileri primeri ve 5' TATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCC 3' geri primeri tasarlanmıştır. 100 µM' lık stokdan 2.5 µM' lık ileri ve geri primer seti hazırlanarak her bir 25 µl' lık reaksiyon için 2.5 µl ileri primer, 2.5 µl geri primer, 2 µl Takara 2.5mM dNTP, Takara 5X PrimeStar (Mg⁺) tampon, 2.5U/µl Takara HS DNA polimerazdan 0.25 ve pH4T2 plazmidinden 6 ng kullanılarak 3.8 kb' lik orijin elde etmek amacıyla (1.9 kb' lik orijininin art arta yerleşmiş formu) aşağıdaki ısı döngüsü ile polimeraz zincir reaksiyonu Applied Biosystem PZR cihazında gerçekleştirilmiştir.



Üretilen parça % 0.7' lik agaroz jelde (TBE tamponu ile hazırlanmış) 70 V' da 1 saat yürütülmüş ve ardından GeneJet jel saflaştırma kitiyle (Thermo, #K0691) jelden saflaştırılıp 30 µl EB (Tris-HCl pH 8,5) tamponunda çözülmüştür. Bu DNA' ların miktar tayinleri nanodropta yapılmış ve HindIII (Thermo, #ER0645) - Sall (Thermo, #ER0501) restriksiyon enzimleriyle

aşağıdaki şekilde çiftli kesime alınmış ve böylelikle üretilen parçanın uç kısımları yapışkan uçlu hale getirilmiştir.

	<u>C3 orijin DNA'sı</u>	<u>pNeo4 plazmidi</u>
10X Tango Tamponu	4 µl	4 µl
Sall Enzimi (10U/ µl)	2 µl	2 µl
HindIII Enzimi (10U/ µl)	2 µl	2 µl
Kaynak DNA	10 µl (~1000ng)	1 µl (~1000ng)
Distile Su	2 µl	11 µl
Toplam Hacim	20 µl	20 µl

Yukarıda verildiği şekliyle hazırlanan reaksiyon 37 °C' de 16 saat kesim reaksiyonuna bırakılmış ve ardından 80 °C' de enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Uçları yapışkan forma getirilmiş DNA parçaları sırasıyla % 0.7' lik agaroz jelde 70V' da 1 saat yürütülmüş, 365 nm dalga boyundaki UV kabininde DNA' ya zarar vermeden görüntülenmiş, steril bir jilet yardımı ile jelden kesilmiş ve GeneJet jel saflaştırma kitiyle (Thermo, #K0691) jelden saflaştırılmış ve 30 µl EB (Tris-HCl pH 8,5) tamponunda çözülmüştür. İşlemlerin aynısı eşzamanlı olarak pNeo4 (EU606202) plazmidi için de gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon Reaksiyonu

T4 DNA Ligaz rekombinant DNA teknolojileri alanında DNA'nın 5' P grubu ile 3' OH grubu arasındaki fosfodiester bağı ATP ya da NAD kofaktörü yardımıyla oluşturan bir enzimdir. Bu bağı oluşturulması için hazırlanan pNeo4 plazmidi ve C3 orijinin bir ucu HindIII ile diğer ucu Sall ile yapışkan hale getirilmiştir.

HindIII-Sall enzimleri uçları kesilmiş pNeo4 plazmidi ve C3 orijini 3:1 oranında, $((pNeo4 \text{ ng} \times C3 \text{ orijin büyüklüğü}) / pNeo4 \text{ büyüklüğü}) \times C3 \text{ orijin} / pNeo4 \text{ molar oran} = C3 \text{ orijin ng}$ formülüne göre NEB T4 DNA ligazla (NEB, M0202S) aşağıdaki ligasyon reaksiyonuna alınmıştır.

10X T4 DNA ligaz	1 µl
T4 DNA ligaz	0,5 µl
pNeo4 plazmid (4kb, 50 ng)	3 µl
C3 orijin (3,8 kb, 123 ng)	5 µl
Distile Su	0,5 µl
Toplam Hacim	10 µl

Yukarıda verildiği gibi hazırlanan reaksiyon 16 °C’ de 16 saat bekletilmiş ve 65 °C’ de enzim inaktivasyonu yapılarak NEB 10-beta kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku transformasyon işlemine geçilmiştir.

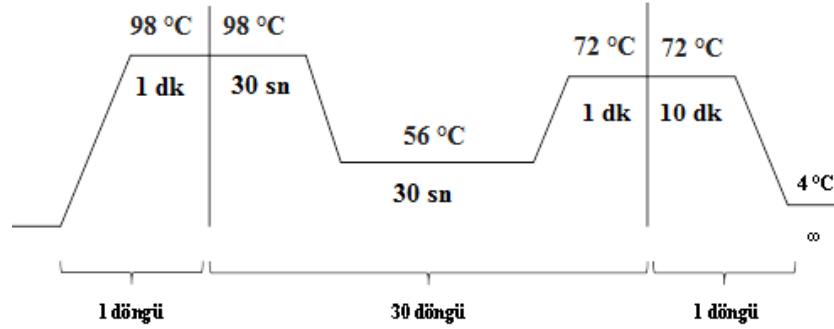
MTT-TtSfGFP-BTU2 Gen Kasetinin Oluşturulması ve pNeo4-ori Vektörüne Klonlanması

MTT-TtSfGFP-BTU2 gen kasetinin oluşturulması amacıyla tüm parçalar teker teker PZR ile çoğaltılmıştır. Reaksiyonlar Finnezyme F530-S High Fidelity DNA Polimeraz ile gerçekleştirilmiştir. Primerlere daha sonrasında hibridizasyon yapmak amacıyla kullanılacak örtüşen bölgeler yerleştirilmiştir. Klonlamanın yapılması amacıyla da MTT1 dizisinin 5' bölgesine SacI kesim dizisi, BTU2 dizisinin 3' bölgesine ise NotI kesim dizisi eklenmiştir. Üretilcek parçaların ileri ve geri primer dizileri aşağıda verilmiştir.

<u>Primer İsmi</u>	<u>Primer Dizisi</u>
MTT1 ileri	5' AAAGAGCTCACAATTTATTTCTAAAAAATATTT 3'
MTT1 geri	5' TATTTTAAGTTTAGTATTATTATTTATT 3'
BTU2 ileri	5' GATCCTTAAATTAATAAATTCAATA 3'
BTU2 geri	5' AAAGCGGCCGCTGCATTTTCCAGTAAAAATTTGA 3'
TtSfGFP ileri	5' CTAAACTTAAAATAATGCACCACCACCACCAC 3'
TtSfGFP geri	5' AATTTAAGGATCGGGCCCTCATCACTCGAG 3'

Yukarıdaki primer dizilerinin 100 µM’ lık stoklarından 2.5 µM’ lık ileri ve geri primer setleri hazırlanarak her bir 25 µl’ lık reaksiyon için 2.5 µl ileri primer, 2.5 µl geri primer, 2 µl 2.5mM dNTP, 5X Phusion HF tampon 2.5U/µl Finnezyme F530-S High Fidelity DNA Polimerazdan 0.25 µl ve çoğaltılacak

ürünlerden 6 ng' a denk gelen hacim alınmıştır. Reaksiyon hacmi dH₂O ile 25 µl' ye tamamlanmış ve aşağıdaki ısı döngü ile polimeraz zincir reaksiyonları ayrı ayrı Applied Biosystem PZR cihazında gerçekleştirilmiştir.



Üretilen parçalar % 0.7' lik agaroz jelde (TBE tamponu ile hazırlanmış) 70 V' da 1 saat yürütülmüş ve ardından GeneJet jel saflaştırma kitiyle (Thermo, #K0691) jelden saflaştırılıp 30 µl EB (Tris.HCl pH8.5) tamponunda çözülmüştür. Ardından bu parçalar aşağıdaki reaksiyonla örtüşen bölge polimeraz zincir reaksiyonuna bırakılmıştır. Bunun için yukarıda aynı reaksiyon kurulmuş ve her bir parça reaksiyona eklenmiştir. % 0.7 ' lik agaroz jelde (TBE tamponu ile hazırlanmış) 70 V' da 1 saat yürütülmüş ve 2 kb' lik ürün GeneJet jel saflaştırma kitiyle (Thermo, #K0691) jelden saflaştırılmış, 30 µl EB (Tris-HCl pH 8,5) tamponunda çözülmüştür. Miktar tayinleri nanodropta yapılmış ve SacI- NotI restriksiyon enzimleriyle sıralı kesim aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiş ve üretilen parçanın uç kısımları yapışkan uçlu hale getirilmiştir. Bu reaksiyonlarla eş zamanlı pNeo4-ori plazmidi de kesime alınarak ligasyona hazırlanmıştır.

	<u>MTT1-TtsFGFP-BTU2</u>	<u>pNeo4-ori</u>
10X O Tamponu	2 µl	2 µl
NotI Enzimi (10U/ µl)	1 µl	1 µl
Kaynak DNA	10 µl (~1000ng)	1 µl (~1000ng)
Distile Su	7 µl	16 µl
Toplam Hacim	20 µl	20 µl

Yukarıda verildiği şekliyle hazırlanan reaksiyon 37 °C’ de 16 saat kesim reaksiyonuna bırakılmış ve ardından 80 °C’ de enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Uçların yapışkan forma getirilmiş DNA parçaları sırasıyla % 0.7’ lik agaroz jelde 70 V’ da 1 saat yürütülmüş, 365 nm dalga boyundaki UV kabininde DNA’ ya zarar vermeden görüntülenmiş, steril bir jilet yardımı ile jelden kesilmiş ve GeneJet jel saflaştırma kitiyle (Thermo, #K0691) jelden saflaştırılmış ve 30 µl EB (Tris-HCl pH 8.5) tamponunda çözülmüştür. Ardından aşağıdaki reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

	<u>MTT1-TtsFGFP-BTU2</u>	<u>pNeo4-ori</u>
10X L Tamponu	2 µl	2 µl
SacI Enzimi (10U/ µl)	1 µl	1 µl
Kaynak DNA	15 µl (~1000ng)	15 µl (~1000ng)
Distile Su	3 µl	2 µl
Toplam Hacim	20 µl	20 µl

Yukarıda verildiği şekliyle hazırlanan reaksiyon 37 °C’ de 16 saat kesim reaksiyonuna bırakılmış ve ardından 80 °C’ de enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Uçların yapışkan forma getirilmiş DNA parçaları sırasıyla % 0.7’ lik agaroz jelde 70V’ da 1 saat yürütülmüş, 365 nm dalga boyundaki UV kabininde DNA’ ya zarar vermeden görüntülenmiş, steril bir jilet yardımı ile jelden kesilmiş ve GeneJet Jel Saflaştırma Kitiyle (Thermo, #K0691) jelden saflaştırılmış ve 30 µl EB (Tris-HCl pH 8,5) tamponunda çözülmüştür.

SacI-NotI enzimleri ile uçları traşlanmış pNeo4-ori-GFP ve MTT1-TtsFGFP-BTU2 gen kaseti 3:1 oranında, ((pNeo4 ng x C3 orijin büyüklüğü)/pNeo4 büyüklüğü) x C3 orijin/pNeo4 molar oran = C3 orijin ng formülüne göre NEB T4 DNA ligazla (NEB, M0202S) aşağıdaki ligasyon reaksiyonuna alınmıştır.

10X T4 DNA Ligaz	1 µl
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
pNeo4-ori (9kb, 50 ng)	3.5 µl
MTT1-TtSfGFP-BTU2 (2kb, 33 ng)	0.4 µl
Distile Su	4.6 µl
Toplam Hacim	10 µl

Yukarıda verildiği gibi hazırlanan reaksiyon 16 °C’ de 16 saat bekletilmiş ve 65 °C’ de enzim inaktivasyonu yapılarak NEB 10-beta kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku transformasyon işlemine geçilmiştir.

Transformasyon İçin Kompetent Hücre Hazırlanması

DNA’ nın ısı şoku ile transformasyonun yapılabilmesi için öncelikli olarak hücrelerin, DNA’ yı almaya hazır hale gelmesi gerekmektedir. Isı şokuyla transformasyon yönteminde hücre içine atılmak istenen DNA hücre çeperine tutunmalıdır, bu tutunmanın gerçekleştirilmesi için de hücre çeperinin CaCl₂ ile + yüklü hale getirilmeli ve yapılan işlemlere hücre çeperi zayıflatılmaktadır. Bu işlem aşağıdaki gibi gerçekleştirilmektedir (Sambrook, J. ve Russell D., 2001).

- Ticari olarak satın alınmış NEB 10-beta hücreleri LB agar besiyerine ekilmiş ve yayılmıştır. Besiyerinde oluşan tek kolonilerden LB broth’ a inokülasyon yapılmış ve gece boyu 150 rpm’ de 37 °C’ de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün büyütülen kültürden 0.5 ml alınarak 100 ml’ lik LB broth besiyerine inokülasyon yapılmış ve 150 rpm 37 °C’ de inkübasyona bırakılmıştır.
- 100 ml’ lik kültürün erken logaritmik fazının yakalanması için inokülasyon yapıldıktan 2-3 saat sonra spektrofotometrik ölçüm yapılarak 550 nm’ de OD değerinin 0.4 -0.6 olmasına dikkat edilmiştir. Kör olarak dH₂O kullanılmıştır.

- OD 0.4 ila 0.6 arasına eriştiğinde kültür 6000 rpm' de 15 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant dökülür ve 100 ml kültürden elde edilen peletin tümü 50 ml, 50 mM soğuk CaCl₂ ile çözülmüş ve 15 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- Karışım tekrar 6000 rpm' de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonunda süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve hücre peleti 4 ml 50 mM soğuk CaCl₂ ile çok dikkatli ve yavaş bir şekilde pipetlenmiştir. Üzerine 0,6 ml %80' lik gliserol eklenmiş ve tekrar yavaş bir şekilde pipetlenerek steril edilmiş önceden soğutulmuş ependorf tüplere 200 µl hacimde bölünmüş ve -86 °C' de saklanmıştır.

Isı Şoku ile Transformasyon Reaksiyonu

Hücrelerin içerisine DNA aktarımında ısı şoku, elektroporasyon ve biyolistik silah olmak üzere birçok farklı yöntem bulunmaktadır. *E. coli* NEB 10-beta kompetent hücrelerine hedeflenen dairesel plazmid plazmidin ısı şoku ile aktarılması aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Sambrook, J. ve Russell D., 2001).

- -86 °C' de alınan kompetent hücreler 5 dk boyunca buzda bekletilmiştir. Üzerine enzim inaktivasyonu yapılan 10 µl ligasyon reaksiyonu eklenmiş ve 30 dk buzda bekletilmiştir.
- 42 °C' de bekletilen 2 dk ısı şoku yapılmış ve hemen ardından 3 dk buzda bekletilmiştir.
- 500 ml LB sıvı besiyeri tüpe eklenmiş ve 37 °C' de çalkalamalı etüvde 120 rpm' de 1 saat bekletilmiştir.
- 8.000 rpm' de 3 dk santrifüj yapılmış ve süpernatant dökülmüş, dipte kalan az bir besiyeriyile hücreler çözülmüş ve son hacimi 1X olan LB agar besiyerine yayılmıştır.
- Gece boyu 37 °C' de hücreler inkübe edilmiştir.
- Ertesi gün tabakta gelişen kolonilerden kürdanla yeni bir LB agara çizgi ekim yapılmış ve tekrar 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün

kolonilere doğru parçanın yerleşip yerleşmediğini anlamak için aşağıdaki şekilde hücrelerden koloni pZR yapılmıştır.

Koloni PZR ve Plazmid İzolasyonu

Koloni PZR yöntemi pozitif olduğu düşünülen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmaksızın, direk hedef gen bölgesinin primerleri kullanılarak çoğaltılması ve jelde görüntülenmesine dayanan yöntemdir.

- 25 µl distile su ependorf tüpe aktarılmış, ateşte steril edilen öze ile master tabaktan alınan kültür suyun içerisinde çözülmüştür.
- Daha öncesinde kaynatılan suda 5 dk tüpler bekletilmiş, ardından birkaç sn buzda bekletilmiş tüpler 14000 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatantın 20 µl' si yeni bir tüpe aktarılmış ve 2 µl' si polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonunun kalıpları yukarıda anlatılan şekli ile yapılmış, fakat her plazmid için farklı primerler üst başlıkta anlatılan gibi kurulmuş, % 0,7' lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Pozitif olduğu düşünülen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Plazmid İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Teyit Reaksiyonu

Plazmid izolasyonu iki farklı yöntemle yapılmıştır. Bunlardan birincisi hızlı olarak kolonilerin taranması ve elde edilen plazmidlerin restriksiyon enzimleri ile teyit edilmesi içindir. İkincisi ise Fenol-Kloroform yöntemiyle yapılan plazmid izolasyonudur. Bu yöntemle elde edilen µl başına düşen plazmid DNA miktarı fazla olduğundan elektroporasyon deneylerinde bu yöntemle elde edilen DNA kullanılmıştır.

1-)Kit ile Yapılan Plazmid İzolasyonu

QIAGEN plazmid mini kit (Qiagen, 12123) ile saflaştırılan plazmid DNA 30 µl EB' de çözülmüştür. Ardından HindIII-Sall enzimleri ile çiftli kesime alınmıştır. Diğer bir teyit işlemi olarak C3 orijini içten kestiği bilinen ve orijinin parmak izini çıkarabileceğimiz XbaI restriksiyon enzimiyle de plazmid kesilmiştir.

10X M Tampon	2 µl
XbaI Enzimi (10U/ µl)	1 µl
BSA	2 µl
Kaynak DNA	1 µl
Distile Su	14 µl
Toplam Hacim	20 µl

2-)Fenol-Kloroform Yöntemiyle Plazmid İzolasyonu

- Üretilmek istenen plazmidleri taşıyan *E. coli* NEB10β hücreleri 100 ml amfisilin içeren LB besiyerine inoküle edilmiştir.
- Gece boyu 37 °C' de 150 rpm' de çalkalamalı etüvde büyüten hücreler 10000 rpm' de santrifüjlenmiştir.
- Pelet 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)' de çözülmüş ve 15 ml' lik falkon tüpe aktarılmış ve 10.000 rpm' de 2 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir.
- Peletin üzerine 750 µl Lizozim-Tris solüsyonu, 100 µl 0.5 M EDTA (pH 8.0), 50 µl RNase eklenmiş, kürdan yardımıyla karıştırılmış ve 1 saat buzda inkübe edilmiştir.
- Liziz ve genomik DNA denetürasyonu aşamasına geçilerek 2 ml 0.2 M NaOH ve 2 ml SDS eklenmiş, dikkatlice tüp alt üst edilmiş ve 10dk buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- Üzerine tuz ile nötralizasyonu sağlamak için 3 ml 7.5 M NH₄OAc eklenmiş, tüp birkaç defa yavaşça alt üst edilmiş ve 10 dk buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- Ardından 10.000 rpm' de 15 dk santrifüj gerçekleştirilmiştir.

- Pelete dokunulmadan süpernatant temiz bir tüpe aktarılmış ve üzerine 4 ml Tris ile doyurulmuş fenol;kloroform;izoamilalkol (25:24:1)eklenmiştir.
- 5 dk boyunca çalkalayıcıda tüpler çalkalanmış ve ardından 10.000 rpm’ de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Oluşan iki fazın alt tarafındakine değilmeden üst faz alınmış ve yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- Elde edilen sıvı kısmın 0.6 katı hacimde isopropanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir.
- 10.000 rpm’ de 10 dk santrifüj gerçekleştirilmiş ve süpernatant yavaşça boşaltılmıştır. 5 dk isopropanolün uçması beklenmiş ve ardından 1ml 0.3 M NaAc eklenmiş ve pelet çözülmüştür. Çözülen peletin üzerine 2 ml %100’ lük etanol eklenmiş ve gece boyu – 20 °C’ de bırakılmıştır.
- Sabahında 10.000 rpm’ de 5 dk santrifüj yapılmış ve tüplerden etanolün uçması için kapakları açık bir şekilde bırakılmıştır.
- Pelet 100 µl dH₂O’ da çözülmüştür.

pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP Plazmidlerinin Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizinin yapılmasındaki amaç pNeo4 vektörüne klonlanan C3 replikatif orijinin varlığının teyit edilmesidir. Bir diğer dizi analizi reaksiyonu pNeo4-ori vektörüne klonlanan MTT-TtSfGFP-BTU2 kasetinin düzgün yerleşip yerleşmediğini göstermek amacıyla yapılmıştır. Oluşturulan vektörlerin dizi analizi reaksiyonu Sanger methodu ile Beckman Coulter, CEQ8000 aletinde aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir (Sanger, 1977).

Dizi analizi reaksiyonunun ilk adımı dizi analizine özelleşmiş polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirilmesidir. Bu aşamada tek ipilikli DNA üretilirken zincir sonlandırıcısı olarak ddNTP’ ler kullanılır. PZR sonucu elde edilen farklı uzunluklardaki DNA’ lar saflaştırılır ve aletin 96 kuyulu mikrotiter tabaklarına yüklenir. Bundan sonraki aşamada elektroforez mantığı ile jel üzerinde yürütülen DNA, elektiriksel alandan dolayı kısalar önde, uzunlar arkada olacak şekilde sıralanır. Böylelikle baz sıralaması bir algılayıcı tarafindana belirlenir.

1-)Dizi Analizi Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Beckman Coulter Genome Lab DTCS Quick Start Kit ile reaksiyon kurulmuştur. pNeo4-ori vektörü için 2 adet 1.6 μM ' lık ileri (Ftetoridizi, ForiklonH1) ve 2 adet 1.6 μM ' lık geri primer (Rtetoridizi, RoriklonP) kullanılarak 4 tüp reaksiyon, pNeo4-ori-GFP vektörü için de bir 1.6 μM ' lık ileri (FsfGFP) bir 1.6 μM ' lık geri primer (RsfGFP) kullanılarak 2 tüp reaksiyon hazırlanmıştır. Çift zincirli DNA' nın 100 fmol olarak reaksiyona girmesine karar verilmiştir. Buna göre 9 kb' lik pNeo4-ori vektörü için 585 ng (0.7 μl) iken, 11 kb' lik pNeo4-ori-GFP vektörü için 715 ng (2 μl)' dir. Bu DNA' ların üzerine 10 μl reaksiyon hacmi olacak şekilde dH₂O eklenmiş ve ardından 96 °C' de 3 dk ön denatürasyona bırakılmıştır. Arkasından yukarıda belirtilen her bir primerden kendi tüpüne 2 μl eklenmiş ve üzerine 8 μl DTCS eklenerek son hacmi 20 μl olan reaksiyon 96 °C' de 20 sn, 58 °C' de 20 sn ve 60 °C' de 4 dk olacak şekilde 30 kez tekrarlanan ısıl döngüye PZR aletinde bırakılmıştır.

2-) Dizi Analizi Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Manyetik Boncuklarla Saflaştırılması ve Dizi Analizinin Gerçekleştirilmesi

Polimeraz zincir reaksiyonundan DNA dışındaki bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla bu saflaştırma işlemi gerçekleştirilir. Bu yöntemde DNA' ya bağlanan pozitif yüklü Beckman Coulter Clean SEQ (A29151) manyetik boncuklar kullanılır.

- İlk olarak taze olarak durdurucu solüsyon hazırlanmıştır. Solüsyonun 100 μl ' si 50 μl dH₂O, 20 μl 3M NaAc (pH 5.2), 20 μl 100 mM Na₂EDTA (pH 8.0) ve 10 μl 20 mg/ml glikojen ile hazırlanmıştır.
- Hazırlanan bu solüsyondan her 20 μl polimeraz zincir reaksiyonuna 11 μl eklenmiş ve ardından pipetör yardımıyla karıştırılıp 1.5 ml' lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Bu karışımın üzerine her bir μl reaksiyon hacmi için 1 μl manyetik olacak şekilde 20 μl manyetik boncuk eklenmiştir, pipetleme yapılmaksızın

hemen ardından 110 µl % 73' lük izopropanol eklenmiş ve yavaşça pipetör ile karıştırılmıştır.

- Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon işleminin ardından tüpler manyetik tutucuya yerleştirilmiş ve 5 dk inkübasyona bırakılmıştır.
- Tüpler manyetik tutucudan çekilmeden pipetör yardımıyla izopropanol uzaklaştırılmıştır.
- Manyetik boncukların üzerinden dikkatlice 200 µl %73' lük izopropanol tüplere eklenmiştir ve 3 dk inkübasyon yapılmıştır.
- İnkübasyon süresinin ardından isopropanol uzaklaştırılmış ve son iki adım tekrarlanmıştır.
- Bu adım sonunda isopropanolün tamamen uzaklaşması için tüpler kapakları açık bırakılmış ve 15-20 dk beklenmiştir. Bu işlemin son 5dk' sında tüpler manyetik tutucudan alınmıştır.
- İsoopropanolün tamamen uzaklaşmasının ardından tüm tüplere 40 µl örnek yükleme solüsyonu (SLS: sample loading solution) ilave edilmiştir. 10-12 pipetleme ile duvara yapışmış olan pelet çözülmüştür.
- Tüpler tekrar manyetik tutucuya yerleştirilmiş ve 3-5 dk inkübasyonun ardından solüsyondan boncuklara değdirmeden 35 µl alınmış ve örnek yükleme tabağına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yükleme yapılmıştır.
- Üzerlerine birer damla mineral yağ damlatılarak buharlaşma önlenmiştir.
- Diğer şeffaf renkli tabağa da yükleme tamponu (sample buffer) yüklenmiş ve örnek tabakları alete yerleştirilmeye hazır hale gelmiştir.
- Saf olarak elde edilen DNA örneklerini içeren tabaklar Beckman Coulter dizi analizi cihazına yerleştirilmiş ve LFR-α programı kullanılarak dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir (Sambrook, J. ve Russell D., 2001)

***Tetrahymena thermophila* Hücrelerine Konjugatif Elektroporasyon**

- 50 ml' lik PPY besiyerine (250 µl penisilin-streptomisin içeren) *Tetrahymena thermophila* Cu428 ve B2086 ırklarından 300 µl inokule

edilmiş ve 30 °C’ de çalkamalı etüvde 2 gün boyunca büyüme bırakılmıştır.

- İstenen yoğunluğa erişen hücreler 8000 rpm’ de 7 dk santrifüjlenerek peletlenmiştir.
- Pelet 10 mM Tris.HCl (pH 7.5) açlık tamponu ile 2 defa yıkanmış ve besiyeri hacmi olan 50 ml açlık tamponunda (penisilin-streptomisin içeren) bir gece boyunca 30 °C’ de çalkamalı etüvde açlığa alınmıştır.
- Ertesi sabah hücrelerden 3 tekrarlı olarak thoma lamında sayım yapılmıştır ve hücre sayısı ml’ de 3×10^5 olacak şekilde açlık tamponunda (penisilin-streptomisin içeren) çözülmüştür.
- Bu işlemin ardından her iki ırktan da eşit hacimde hücre alınarak (50 ml) 2 lt’ lik erlende konjugasyon işlemi çalkalamasız olarak 30 °C’ de konjugasyon başlatılmıştır.
- Konjugasyonun başlatıldığı üç saatin sonunda ışık mikroskobu altında hücrelerin en az % 80’ ninin konjugasyona girip girmediği kontrol edilmiştir.
- Konjugasyonun 7. saatinde hücrelerden 500 µl alınarak üzerine 15 µl hoechst boyası eklenmiş ve 10 dk inkübasyonun ardından 1 µl fiksatif ile hücreler öldürülmüş ve floresan mikroskop altında çekirdek durumları incelenmiş ve konjugasyonun saati teyit edilmiştir.
- Doğru şekilde ilerlediği teyit edilen konjugasyonun 9. saatinde hücrelerin tamamı 6.500g’ de 6 dk santrifüjlenmiş ve 50 ml oda sıcaklığında bekletilmiş HEPES ile yıkanmıştır.
- HEPES ile yıkanan hücreler 6.500g’ de 6 dk santrifüjlenmiş ve oluşan pelet 1 ml HEPES ile çözülmüştür.
- Bu aşamaya gelmeden önce daha önceki bölümde anlatılan plazmidler, çok miktarda elde edilmiş ve 15 µg plazmid DNA(pNeo3, pNeo4, pNeo4-ori, pNeo4-ori-GFP, pH4T2)’ ya denk gelen hacim hesaplanmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Bu plazmid DNA’ ların üzerine toplam hacim 125 µl olacak şekilde HEPES eklenmiş ve karışım transformasyon saatine kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- Elektroporasyon için hazırlanmış 1 ml HEPES' de çözülmüş hücrelerden 125 µl alınarak hazırlanan plazmidin üzerine eklenmiştir, bir kez pipetörle al-ver yapılarak 250 µl' lik karışım hassas bir şekilde 0.4 cm' lik BioRad elektroporasyon kuvetine aktarılmış ve hızlı bir şekilde elektroporasyon cihazının şoklayıcısına yerleştirilmiştir.
- Elektroporasyon aletinin ayarları 200 Ω' da 25 µF kapasitör ile 0.44 kV ayarlanmış ve elektrotransfomasyon gerçekleştirilmiştir (Barchetta ve ark., 2008).
- Elektropore edilen kuvetteki hücrelerin üzerine 1 ml SPP besiyeri eklenmiştir ve pipetörle bir kere al ver yapılmıştır.
- Ardından hücreler hızlı ve dikkatli bir şekilde kuvetten 6 ml SPP (30 µl Penisilin-streptomisin; 30 µl Amfoterisin B) içeren tüplere aktarılmıştır.
- Her farklı plazmid için elde edilmiş 6 ml' lik SPP'nin 3 ml' si CdCl₂ indüklemesi yapılmayacak 6' lık mikrotiter petrisinin bir kuyusuna aktarılmış ve diğer 3ml' si ise CdCl₂ indüklemesi yapılacak diğer elisa petrisinin bir kuyusuna aktarılmıştır.
- Gece boyu 30 °C' de çalkamasız bir şekilde tutulmuştur.

***T.thermophila* pNeo4-ori, pNeo4-ori-GFP Plazmidinin Elektroporasyon Verimliliğinin Seleksiyon ile Analizi**

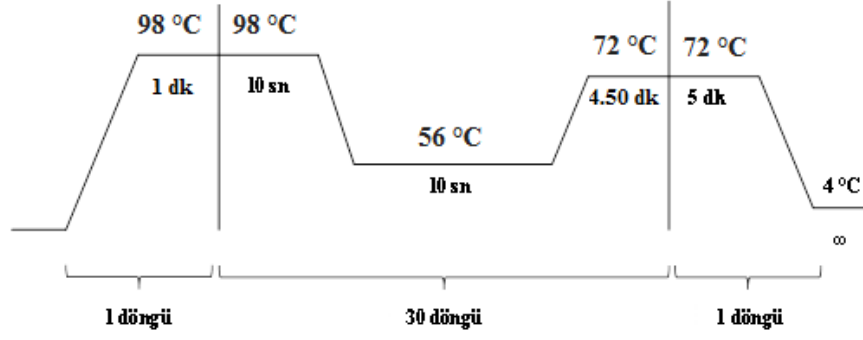
- Elektroporasyon işleminin ardından 15 saat bekletilen kültür 1 µg/ml olacak şekilde CdCl₂ ile 1 saat boyunca indüklenmiştir. Bunun için 6 ml SPP içerisine 12 µl CdCl₂ eklenmiş ve 6 ml' lik kültürün üzerine eklenmiştir.
- 30 °C' de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 3 ml SPP' ye final hacmi 100 µg/ml olan paromomisin eklenmiş ve 9 ml CdCl₂ indüklenmiş hücrelerin üzerine eklenmiştir. CdCl₂ baskısına alınmamış hücrelerin üzerine ise 9 ml SPP (final hacmi 100 µg/ml olan paromomisin eklenmiş) eklenmiştir.
- 12 ml' lik kültürün 9.6 ml' si 96' lık mikrotiterin her bir kuyucuğuna 100 µl olacak şekilde paylaştırılmış ve 30 °C' de 7 günlük takibe alınmıştır.

- Takibin 3. gününde antibiyotik miktarı 300 µg/ml' ye, 5. gününde ise 600 µg/ml' ye çıkarılmıştır.
- Hergün miktotiter tabağının kuyuları sayılmış ve kuyulardaki hücre yoğunluğu +, ++, +++ olacak şekilde simgelenmiştir. Simgeler + ≤50, 50 ≤ ++ ≤100, +++ ≥100 olarak ifade edilmiştir.
- Elde edilen değerlerden yararlanarak Poisson Dağılım ile pozitif transformant sayısı hesaplanmış ve grafikler çizilmiştir.

pNeo4-ori ve pNeo4-ori-GFP' nin günlere bağlı DNA örneklerinden PZR

6' lık mikrotiter tabakta bulunan hücrelerden hergün 1 ml alınarak pelet elde edilmiş ve -86 °C' de saklanmıştır. Seleksiyonun tamamlanmasının ardından 7 gün toplanan hücreler 1 ml SPP besiyerinde çözülmüş ve ardından kaynayan suda 7 dk bekletilmiştir. Süre sonunda buza alınan hücreler 8000 rpm' de 5 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantlar alınarak PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır.

Reaksiyon neomisin genine uygun primerlerle gerçekleştirilmiştir. 5' ATGATTGAACAAGATGGTTTACAC 3' ileri primeri ve 5' TCAGAAGAATTCGTCAAGAAGACG 3' geri primeri ile gerçekleştirilmiştir. 100 µM' lık stokdan 2.5 µM' lık ileri ve geri primer seti hazırlanarak her bir 25 µl' lık reaksiyon için 2.5 µl ileri primer, 2.5 µl geri primer, 2 µl Takara 2.5mM dNTP, Takara 5X PrimeStar (Mg⁺) tampon, 2.5U/µl Takara HS DNA polimerazdan 0.25 ve yukarıda elde edilen kaynaktan 2 µl alınarak aşağıdaki ısı döngüsü ile polimeraz zincir reaksiyonu Applied Biosystem PZR cihazında gerçekleştirilmiştir.



Üretilen parça % 0,7 ' lik agaroz jelde (TBE tamponu ile hazırlanmış) 70 V' da 1 saat yürütülmüştür.

EK-8 pNeo4-ori ve pNeo4-ori GFP Dizi Bilgisi

pNeo4-ori (9 kb)

Sarı ile boyalı kısım MTT1 promotoru, mor ile boyalı kısım kodon optimizasyonu yapılmış neomisin direnç geni, gri boyalı kısım BTU2 dizisidir. Mavi ile gösterilen kısım ise 4.1 kb büyüklüğünde Replikatif C3 orijin dizisidir.

```

gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatttttctaaa
tacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaat
aatattgaaaaaggaagagtatgagattcaacatttcggtgctgcaccttattc
ccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcaccagaaacgctgggtga
aagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgacagagtgggttacatcgaactgg
atctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaa
tgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacg
cggggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttgggtg
agtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaat
tatgcaagtgctgccataaccatgagtgataacactgcggccaacttacttctga
caacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcaacatgggggatc
atgtaactcgccttgatcggtgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacg
acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaactat
taactggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatgg
aggcggataaaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctgg
ttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcag
cactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggga
gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcac
tgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattg
atthaaaacttcatttttaattthaaaaggatctaggtgaagatcctttttgata
atctcatgacaaaatccctaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc

```



ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccctttttctgcgcgtaatct
 gctgcttgcaaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggttggttgcccggatc
 aagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatac
 caaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctg
 tagcaccgcctacatacctcgtctgctaatacctggtaccagtggtgctgctgcca
 gtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggata
 agggcgagcggctcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagc
 gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcca
 cgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaa
 caggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctgggtatctttatagtc
 ctgtcgggtttcggcacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag
 gggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctgg
 ccttttgctggccttttgctcacatggttctttcctgcttatcccctgattctg
 tggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcggcgcagccgaa
 cgaccgagcgcagcagtgagtgagcaggaagcgggaagagcggccaatacgc
 aaccgcctctcccgcgcggtggccgattcattaatgcagctggcacgcaggt
 tcccgcactggaaagcgggcagtgagcgcacgcaattaatgtgagttagctca
 ctattaggcaccaccaggctttacactttatgcttccggctcgtatggtgtgtg
 gaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacg
 ccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaaacaaaagctggagctccaccgcg
 gtggcggcgcgtctagaactagtggatccccgggctgcaggaattcgatat**ac**
aatttattttctaaaaaatat**tt**taaaaaataaaaaataataaggg**tt**ttgaataac
tcctttaatttaatacacattttttaaatttttttagctctttaaatattcat
 aaaaaataaaaaataactaactaaaaataaaataaaaaagataataatgattaaagg
 tataatactgaataagaaaaaacataatagagtacttatttttatatcactat
 ttttaatatcttgaaagcaaaacttttttatatatctttaaataatattgtatcg
 tttattcaattattttctttaaatttcaaataatattgataaaaaagatgacatg
 ttttttaaagaaaacatgaaatataaaatagataaatatcaattattttattta
 ttaaataatataagctgctcaaaacatagctcattcatcaattataatattgtgaa
 tcattaattttcaaaatattactcattatttaggctatcatttattttttattt
 tcaattatccgtttctattataattttaatattaagtgtgattccttgaattttg
 tgtcatgaattatttgtaaacttttttatttctgataaaaaataaaattgatt
 gactcatgatttaaatacatgagtcacctaactaattttcaaaattcttctatt
 ctaaaatatagatgtgattccttgaatctctcttgaatataaaagtaattttttat
 atttctgatataattcttagctacgtgattcacgatttatacaatgatccatat
 aaaataatgtaaatagtgtatataatataatctcgtcttttttattctttatata
 atttaaaaaaatttaaaaaaatttaataaaagctctaataaaataaataataatac
taaact**ta**aaataatgattgaacaagatgggtttacacgctgggttctcccgcgcg
 ttgggtcgaaagacttttcggttatgactgggctcaacaacatcggttgctc
 tgatgccgcgctcttccgtctttctgctcaaggtcgtcctgctcttttctgctcaa
 gaccgacctttctgggtgcccttaatgaacttcaagatgaagctgccgctcttcc
 ttggcttgccaccaccgggtgttccctgocgctgctgctccttgacggttgactga
 agccggtagagactggcttcttttaggtgaagtccccgggtcaagatcttctttc
 ttctcaccttgctcctgccgaaaaagtttctatcatggctgatgctatgctgctg
 tcttcataaccttgatcccgctacctgccctttcgaccaccaagccaaacatcg
 tatcgaacgtgctcgtactcgtatggaagccggctcttgctgatcaagatgatct
 tgacgaagaacatcaaggtcttgcccctgccgaacttttcgccagacttaaggg
 ccgatatgcccgacgggtgaagatcttgtcgtcaccatgggtgatgctgcttacc
 caatatcatgggtgaaaatgggtcgtttttctgggttcatcgactgtgggtcgtct



tgggtgctgcgaccggttatcaagatattgccttagctaccggtgatattgctga
 agaacttgggtggtgaatgggctgaccggttcccttgctcctttacgggatcgcg
 tcccgattctcaacgtatcgccttctatcgtcttcttgacgaattcttctga
 tccttaaatataaaattcaatatatttacaaactttcatataaaataaatat
 attatataaaattaatTTTTtagtgtatttatattaacattaagcaccacaaaaa
 cgtgtaataataactataaaatataatTTTtattccaaattgactaaaatcatt
 atTTTtacaactcatttgtatataatTTTtatgtcaattTTTTTTTTtaactTTc
 taaaaaaaaaaattcctcttcacatacatgtttagctcttaaaaatttTgtctgca
 aatccaataataatTTTTTTTTtgccattaaatttTcaaattTTTactggaaa
 aatgcagcccggggatccactagttctagagcggccatcaagcttttaggtttt
 agaatcgcggctTTTTtaataggttagtcttagtcagaaagatctctaagtcta
 aactacgaagttattccaacttaattaaaattacaaaataaaaatatcaaac
 taaatacgtctaattaatggaagattattaaactttattaaattaggtatgaaa
 cttctatagttcgaatagctatggcagctggagctccccccgggcatgggtc
 gaaaacaagggaaatcactcccaattTcgaaaatcacttaaaattgagtaataa
 ttgggtttaaatttaaatttgagtagataagaattagatgTTTTtatattctgct
 aattTcactggtgaaaatgtagcaaatagaaattTTTTaatctaataaactag
 caaatagtatTTTaaacaaaaatattTgTTTTtatgTTgTaaaatgTTTTaaa
 ttagataaaattTacaattTacaattTTTcaagcaaaaataggtTctaaaaat
 gagaaaatattacataTTTTtagctattTgactactTTaatgctagtaaaTTaaa
 atgaattTaatTcattTTTcactTTTaaacacttattTTaataaaatatatgatt
 tTaaaatgataaaatatTTTTtaagaggtaaattTaaagaatttagTTaaattTT
 aaagaaaagcatctaaaaatggacaaaaatgaagtattTcTTTTTTTTataca
 tTaaaatgctagaaaattTaaagTaaaacattTataaataaaagTaaaatagTTT
 taggaatatgagTaaatagTTTTTTTTatgTaaaaaacattTTtatcaattTcat
 ttattTcattTTtagTTaaattTTTcattTcaaaaaaactTTTTTTTTggTaaaata
 aagactTTataaagataactTaaagaaaaagTTtatctagaattaaaaatattg
 atTTTgaaaattgctcattagatattTTTTTggcaaaaaaaaaaacaaaaatag
 TaaaaaatcactTTTTTgagagTTgaaaaaaagacttagaaaaaatTTTaaa
 gtgTaaaaaaagacttagagaaaaaatcaaaaagagataaaaagacttagagaa
 aattTataaattaaaaatgatagaaaagTaaaattTattTTtatTTTTTTaatc
 attTaaatgctagTaaattTaaataaaacatatataaaaaaacataaaacaatt
 tTaaacagcatgcgtatatcattTTTTtatatgTaaaaaacattTTtatcaattTca
 tTTattTcattTTtagTTaaattTTTcattTcaaaataaattTTTTTTgattaaata
 aagactTTataaagagaactTaaagaaaaagTTtatctagaattaaaaatattg
 atTTTgaaaattgctcattagaaattTTTTTggcaaaaaaaaaaacaaaaatag
 TaaacTTTccgaactTTTgcaactTTTgagactTcgtgaaaaaagacttagaaa
 aattTTTgaaaaatgaaaaaaaagacttagagaaaaaatcaaaaaagtgaaa
 aaagacttagaaaaattTTTTTaaatgaaaaaatgatttaggagaaattTTgag
 attgCGcttagatTTTgtgtgaagTcactTcaaaaaatgagcggactCGctca
 aatattTaaTggactCGcataaaaaatgagTggagTcactaaaaaaattaagTg
 aactcactTaaaaatgagTggagcactcaaaaaatTaaTggactCGctTaat
 attCGcggagTtaaacaAAAAataagTggactcacagaaaaatTaaTggattgc
 gTaaaaaaatgagTggactcactcaaaaaatgaagcagactCGctTaaaaatgag
 TggagcactcaaaaagTTcagcagagccactTaaaaatttagctTaaaaatcag
 ctctaattTaaattagacttagTgaaaaatagcGaaaatgaaaaaatgaaaa
 atgaatgaaaactgaaaaattTacaagggattgaaaattTTggcagagTctTTT
 tTTTggcaaaaaaaaaaacaaaaatagTaaacTTTccgaactTTTTTgactTTg
 agaaaaattCTTTggcaaaaaaaataaaaaataatatcaggggggTaaaaatgca



tatttaagaaggggaaacatctccggtcgaaaatcacttaaattgagtaataa
 ttgggtttaaaatttaaatttgagtagataagaattagatgtttatattctgct
 aatttcactggtgaaaatgtagcaaatagaaattattttaatctaataaactag
 caaatagattttaaaacaaaaatatttggtttttatggttgtaaaatgttttaaa
 ttagataaaatttacaatttacaattttcaagcaaaaataggttctaaaaaat
 gagaaaatattacatatttttagctatttgactactttaatgctagtaaaattaa
 atgaatttaattcattttcactttaaaacacttattttaataaaaatatagatt
 ttaaaatgataaaatattttttaagaggtaaatttaagaattagttaaatttt
 aaagaaaaagcatctaaaaatggacaaaaatgaagtatttcctttttttataca
 tttaaatgctagaaaatttaagtaaaacatttataaataaaaagtaaaatagttt
 taggaatatgagtaaatagttttttttatgtaaaaaacattttatcaatttc
 ttattcatttttagttaaatttttcattcacaaaaaactttttttggtaaaata
 aagactttataaagataacttaagaaaaagtttatctagaattaaaaatattg
 attttgaaaattgctcattagatatttttttgcaaaaaaaacaaaaatag
 taaaaaatcacttttttgagagttgaaaaaaagacttagaaaaattttaaaa
 gtgtaaaaaagacttagagaaaaaatcaaaaagagataaaaagacttagagaa
 aatttataaattaaaaatgatagaaaagtaaaatttattttatattttttaatc
 atttaaatgctagtaaatttaataaaaacatatataaaaaaacataaaacaatt
 ttaacagcatgcgtatatcatttttttatatgtaaaaaacattttatcaatttc
 ttattcatttttagttaaattttacattcaaaataaatttttttgattaaata
 aagactttataaagagaacttaagaaaaagtttatctagaattaaaaatattg
 attttgaaaattgctcattagaaatttttttgcaaaaaaaacaaaaatag
 taaaccttccgaacttttgcaacttttgagacttcgtgaaaaaagacttagaaa
 aattttgaaaaatgaaaaaaagacttagagaaaaaatcaaaaaagtga
 aaagacttagaaaaatttttaaaatgaaaaaatgatttaggagaaattttgag
 attgcgcttagattttgtgtgaagtcacttcaaaaaatgagcggactcgtca
 aatatttaagtggactcgcataaaaatgagtggagtcactaaaaaattaagt
 aactcacttaaaaatgagtggagccactcaaaaaattaagcggactcgtta
 attcgcggagttaaacaaaaataagtggactcacagaaaaattaagcggattgc
 gctaaaaaatgagtggactcactcaaaaatgaagcagactcgttaaaaatgag
 tggagccactcaaaaagttcagcagagccacttaaaaatttagcttaaaaatcag
 ctctaaattaaattagacttagtgaaaaatagcgaatgaaaaaatgaaaa
 atgaatgaaaactgaaaaatttacaagggattgaaaattttggcagagtcttt
 ttttgcaaaaaaaacaaaaatagtaaaccttccgaactttttgactttg
 agaaaaattctttggcaaaaaaataaaaataatcaggggggtaaaaatgca
 tatttaagaaggggaaacatctccggtggtatcctctagagtcgacctcgagggg
 ggcccggtacccaattcgcctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggcc
 gtcgttttacaacgctcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgc
 cttgcagcacatccccctttcgcagctggcgtaatagcgaagaggcccgacc
 gatcgcccttcccaacagttgctgcagcctgaatggcgaatgggacgcgcctgt
 agcggcgcatagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctaca
 cttgccagcgcctagcgcggcctctttcgttttcttcccttcttctcgc
 acgttcgcggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggtc
 cgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaacttgattagggtgatggt
 tcacgtagtgggcatcgcctgatagacggtttttcgccccttgacgttgag
 tccacgttctttaatagtgactcttggttccaaactggaacaactcaaccct
 atctcggctattcttttgatttataaggatttttgccgatttcggcctattgg
 ttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatatta
 acgcttacaatttag

pNeo4-ori-GFP (11 kb)

Yeşil ile boyalı kısım MTT1 promotörü, mor ile boyalı kısım kodon optimizasyonu yapılmış TtSfGFP geni, gri boyalı kısım BTU2 dizisidir. Sarı ile gösterilen kısım ise 4.1 kb büyüklüğünde replikatif C3 orijin dizisidir.

```

gtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttatttttctaaa
tacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaat
aatattgaaaaaggaagagtatgagattcaacatttccgtgctgcccttattc
ccttttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcaccagaaacgctgggga
aagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggttacatcgaactgg
atctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaa
tgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacg
ccgggcaagagcaactcggtcgcccgcatacactattctcagaatgacttgggtg
agtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaat
tatgagtgctgccataacctgagtgataacactgcgggccaacttacttctga
caacgatcggaggaccgaaggagctaacgccttttttgcacaacatgggggcatc
atgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacg
acgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaactat
taactggcgaaacttacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatgg
aggcggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttcccggctggctggg
ttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcag
cactggggccagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggga
gtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagatagggtgctcac
tgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattg
atttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttttgata
atctcatgaccaaatacccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagacc
ccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaactc
gctgcttgcaaacaacccaccgctaccagcgggtggtttggttgccggatc
aagagctaccaactccttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagatac
caaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccaccacttcaagaactctg
tagcaccgcctacatacctcgtctgctaactcctgttaccagtggtgctgctgcca
gtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggata
aggcgcagcggtcgggctgaacgggggggttcgtgcacacagcccagcttggagc
gaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagccca
cgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggctcggaa
caggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagtc
ctgtcgggtttcggcacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcag
gggggaggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctgg
ccttttgctggccttttgcctacatgttctttcctgcggtatcccctgattctg
tggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgataaccgctcgcgcagccgaa
cgaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaagcgggaagagcgcaccaatacgc
aacgcctctccccgcgcggttgccgattcattaatgcagctggcagcagcaggt
tccccgactggaaagcgggagtgagcgcacgcaattaatgtgagttagctca
ctcattaggcaccaccaggctttacactttatgcttccggctcgtatggtgtgtg
gaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacctgattacg
ccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctgagactcacaattt

```




tttcaaaattcttctatttctaaaatatagatgtgattcttgaatctctcttgaa
 tataaagtaattttttatatttctgatataattcttagctacgtgattcacgat
 ttatacaatgatccatataaaaataatgtaaatagtgatataatataatctgc
 ttttttattctttatataatttaaaaaaatttaaaaaatttaataaagctctaa
 taaaataaataataactaaacttaaaaataatgattgaacaagatgggtttaca
 cgctggttctcccgcgcttgggtcgaaagacttttcggttatgactgggctca
 acaaaccatcgggttgctctgatgccgcgctcttcgctctttctgctcaaggctg
 tcctgttcttttcgtaagaccgacctttctgggtgcccttaatgaacttcaaga
 tgaagctgcccgctctttcttggcttggcaccaccgggtgttccttgcgctgctgt
 ccttgacggttgactgaagccggtagagactggcttcttttaggtgaagtccc
 cgggtcaagatcttctttcttctcacttgctcctgcccgaaaaagtttctatcat
 ggctgatgctatgctgctcttcatacccttgatcccgctacctgccctttcga
 ccaccaagccaaacatcgtatcgaacgtgctcgtactcgtatggaagccggctc
 tgcgatcaagatgatcttgacgaagaacatcaaggtctgcccctgccgaact
 tttcgccagacttaaggccggtatgcccgacgggtgaagatcttgctgctacca
 tgggtgatgctgcttacccaatatcatgggtgaaaatggctggttttctgggtt
 catcgactgtggctgcttgggtgctgcccgcgaccttatcaagatattgccttagc
 taccctgatattgctgaagaacttgggtgggtgaatgggctgaccgtttccttgt
 cttttacgggtatcgccgctcccgattctcaacgtatcgcttctatcgcttct
 tgacgaattcttctgagatccttaaaatttaaaaaattcaatatatttacaact
 ttcataaaaaataaataatataataaaaatttaatttttagtgattatattaac
 attaaagcaccaaaaaacgtgttaataactactataaaaataaatttattcc
 aaattgactaaaatcattattttacaactcatttgtatataattttatgtcaa
 ttatttttttaacttttctaaaaaataattcctcttcacatacatgtagct
 cttaaaaatttgtctgcaaatccaataataatattttttttgccattaaattt
 tcaaatttttactggaaaaatgcagcccggggatccactagttctagagcggc
 catcaagcttttaggttttaggaatcgcggttttttaataggttagtcttagtca
 gaaagatctctaagtctaaaactacgaagttattccaacttaattaaaattaca
 aaataaaaatatcaaaacttaaacgtctaatgaagattattaactt
 tattaattaggtatgaaacttctatagttcgaatagctatggcagctggagctc
 cccccgggcatgggtcgaaaacaagggaaatcactcccaatttcgaaaatca
 cttaaaattgagtaataattgggtttaaaatttaatttgagtagataagaatt
 agatgtttatattctgctaatttctactgggtgaaaatgtagcaaatagaattat
 tttaatctaataaactagcaaatagtattttaaaacaaaaatatttgtttttat
 gttgtaaaatgttttaattagataaaaatttacaatttacaattttcaagca
 aataggttctaaaaaatgagaaaaattacataatttttagctatttgactactt
 taatgctagtaaattaaaatgaatttaattcattttcactttaaaacacttatt
 ttaataaaatatatgatttttaaaatgataaaatattttttaagaggtaaattta
 agaaattagttaaatttttaagaaaaagcatctaaaaatggacaaaaatgaagt
 atttcctttttttatacattttaaattgctagaaaaatttaagtaaaacatttataa
 ataaaagtaaaatagtttttaggaatatgagtaaatagttttttttatgtaaaaa
 acattttatcaatttctatttattcatttttagttaaatttttcttccaaaaaa
 cttttttttggtaaaataaagactttataaagataacttaagaaaaagtttat
 ctagaattaaaaatattgattttgaaaattgctcattagatatttttttggtcaa
 aaaaaaaacaaaaatagtaaaaaatcacttttttttgagagttgaaaaaagac
 ttagaaaaatttttaaaagtgtaaaaaaagacttagagaaaaaatcaaaaagag
 ataaaaagacttagagaaaaatttataaattaaaaatgatagaaaagtaaaattt
 attttatatttttttaattcattttaaattgctagtaaattttaataaaacatatata
 aaaaaacataaaacaatttttaacagcatgctgctatatttttttatatgtaaaa

at t t t g g c a g a g t c t t t t t t t t t g g c a a a a a a a a a a c a a a a a t a g t a a c c t t c
c g a a c t t t t t t g a c t t t g a g a a a a a t t c t t t g g c a a a a a a a t a a a a t a a t a t
c a g g g g g g t a a a a t g c a t a t t t a a g a a g g g g a a c a t c t c g g g g a t c c t c t a
g a g t c g a c c t c g a g g g g g c c c g g t a c c c a a t t c g c c c t a t a g t g a g t c g t a t
t a c g c g c g c t c a c t g g c c g t c g t t t t a c a a c g t c g t g a c t g g g a a a c c c t g g c
g t t a c c c a a c t t a a t c g c c t t g c a g c a c a t c c c c t t t c g c c a g c t g g c g t a a t
a g c g a a g a g g c c c g c a c c g a t c g c c t t c c c a a c a g t t g c g c a g c c t g a a t g g c
g a a t g g g a c g c g c c c t g t a g c g g c g c a t t a a g c g c g g c g g g t g t g g t g g t t a c g
c g c a g c g t g a c c g t a c a c t t g c c a g c g c c c t a g c g c c c g t c c t t t c g c t t t c
t t c c c t t c c t t t c t c g c c a c g t t c g c c g g c t t t c c c c g t c a a g c t c t a a t c g g
g g g c t c c c t t t a g g g t t c c g a t t t a g t g c t t t a c g g c a c c t c g a c c c a a a a a
c t t g a t t a g g g t g a t g g t t c a c g t a g t g g g c a t c g c c c t g a t a g a c g g t t t t
c g c c c t t t g a c g t t g g a g t c c a c g t t c t t t a a t a g t g g a c t c t t g t t c c a a a c t
g g a a c a a c a c t c a a c c c t a t c t c g g t c t a t t c t t t t g a t t t a a a g g g a t t t t g
c c g a t t t c g g c c t a t t g g t t a a a a a t g a g c t g a t t t a a c a a a a t t t a a c g c g
a a t t t t a a c a a a a t a t t a a c g c t t a c a a t t t a g

EK- 9 Bulgular

SET 1			100 µg/ml			300µg/ml			600µg/ml		
			+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
1.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP		96							
		pNeo4.ori		96							
		pNeo4		96							
		pNeo3		96							
	Cd+	pNeo4.ori.GFP		96							
		pNeo4.ori		96							
		pNeo4		96							
		pNeo3		96							
2.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	96								
		pNeo4.ori	96								
		pNeo4	96								
		pNeo3	96								
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	46		50						
		pNeo4.ori	68		28						
		pNeo4									
		pNeo3									
3.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	96			90					
		pNeo4.ori	96								
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	46		50	51		42			
		pNeo4.ori	68		28	70		21			
		pNeo4									
		pNeo3									
4.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	10		50						
		pNeo4.ori	15		5						
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	10		50	4		77			
		pNeo4.ori			50	1		60			
		pNeo4									
		pNeo3									
5.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	31		3						
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	6		55	5		77	18		63
		pNeo4.ori	1		39	1		63	8		78
		pNeo4									
		pNeo3									
6.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	27	2	3						
		pNeo4.ori	10		4						
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	3	13	45		1	84			88
		pNeo4.ori	3	13	26	1	1	75	2		83
		pNeo4									
		pNeo3									
7.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	18	3	4						
		pNeo4.ori	7	2	2						
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	3		59	1	1	83	1		83
		pNeo4.ori		7	29	1		75	10	7	66
		pNeo4									
		pNeo3									

SET 2			100 µg/ml			300µg/ml			600µg/ml		
			+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
1.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	96								
		pNeo4.ori	96								
		pNeo4	94	2							
		pNeo3	96								
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	88	8							
		pNeo4.ori	96								
		pNeo4	96								
		pNeo3	96								
2.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	47	10	19						
		pNeo4.ori	2	8	72						
		pNeo4									
		pNeo3									
3.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	51	7	22	39	19	9			
		pNeo4.ori	8	8	75	20	21	50			
		pNeo4									
		pNeo3									
4.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	34	13	30	17	20	24			
		pNeo4.ori	8	4	79	5	6	74			
		pNeo4									
		pNeo3									
5.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	5	18	60	34	18	35	17	11	46
		pNeo4.ori	4		90	5	9	82	1	4	89
		pNeo4									
		pNeo3									
6.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	19	9	64	6	13	57	7	30	53
		pNeo4.ori	2	4	88	2	1	93	1		92
		pNeo4									
		pNeo3									
7.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	6	6	69	7	21	48	25	23	42
		pNeo4.ori	2	10	82		8	88	7	2	86
		pNeo4									
		pNeo3									

SET 3			100 µg/ml			300µg/ml			600µg/ml		
			+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
1.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	49	47							
		pNeo4.ori	94	2							
		pNeo4	72	24							
		pNeo3	94	2							
	Cd+	pNeo4.ori.GFP		96							
		pNeo4.ori	76								
		pNeo4	87	9							
		pNeo3	6	90							
2.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	5								
		pNeo4.ori	1								
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	7	12	4						
		pNeo4.ori	11	38	33						
		pNeo4									
		pNeo3									
3.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	11	2	17	23	4	5			
		pNeo4.ori	8	4	75	35	15	46			
		pNeo4									
		pNeo3									
4.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP	8	8	14	9	5	20			
		pNeo4.ori	4	9	84	7	11	75			
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	7	6	17	4	2	27	24	10	10
		pNeo4.ori	29	15	47	6	2	86	2	14	67
		pNeo4									
		pNeo3									
5.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	7	6	17	3	2	27	25	10	10
		pNeo4.ori	29	14	47	6		88	2	14	77
		pNeo4									
		pNeo3									
6.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP	2	1	26	5	3	33	4	7	39
		pNeo4.ori	2	15	75	4		91		1	94
		pNeo4									
		pNeo3									
7.gün	Cd-	pNeo4.ori.GFP									
		pNeo4.ori									
		pNeo4									
		pNeo3									
	Cd+	pNeo4.ori.GFP		3	29	7	13	23	7	17	28
		pNeo4.ori	3	5	83	3	26	66		17	78
		pNeo4									
		pNeo3									