

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENETİK FÜZYON YOLUYLA FLORESAN İŞARETLİ REKOMBİNANT  
ANTİKORLARIN TANIYA YÖNELİK GELİŞTİRİLMESİ**

**Öznur Özlem İBRAHİMOĞLU**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2011



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GENETİK FÜZYON YOLUYLA FLORESAN İŞARETLİ REKOMBİNANT  
ANTİKORLARIN TANIYA YÖNELİK GELİŞTİRİLMESİ**

**Öznur Özlem İBRAHİMOĞLU**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Dr. Berrin Erdağ

KOCAELİ  
2011

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**




Tez Adı: Genetik Füzyon Yoluyla Floresan İşaretli Rekombinant Antikorların Tanıya Yönelik Geliştirilmesi

Tez yazarı: Öznur Özlem İBRAHİMOĞLU

Tez savunma tarihi: 06.01.2012

Tez Danışmanı: Dr. Berrin ERDAĞ

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Doç. Dr. Fatıma Yücel	
ÜYE(DANIŞMAN):	Dr. Berrin Erdağ	
ÜYE:	Yard. Doç. Dr. Naci Çine	
ÜYE:		
ÜYE:		

**ONAY**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../200..

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Genetik Füzyon Yoluyla Floresan İşaretli Rekombinant Antikorların Tanıya Yönelik Geliştirilmesi

**Amaç:** Bu çalışmada floresan ELİSA veya hücre görüntüleme çalışmalarında kullanılması için genetik füzyon ile mCherry floresan protein işaretli anti-HBsAg fragmentlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda anti-HBsAg rekombinant antikor kodlayan gen bir floresan protein (mCherry) kodlayan geni içeren pQE-30 ekspresyon vektörüne klonlanmıştır.

**Yöntemler:** Bu çalışmada daha önce faj gösterim teknolojisi ile geliştirilen anti-HBsAg scFV kullanıldı. İlk olarak bu anti-HBsAg scFv *KpnI* ve *Sall* restriksiyon enzim kesim bölgeleri içeren spesifik primerler kullanılarak PZR ile amplifiye edildi. Daha sonra PZR ürünleri ve pQE30 vektörü *KpnI* ve *Sall* restriksiyon endonukleazları ile kesildi. Kesim ürünleri T4 DNA ligaz enzimi ile birleştirildikten sonra *E.coli* JM109 hücrelerine kalsiyum klorür yöntemi ile transforme edildi. Pozitif koloniler koloni PZR ve sonrasında DNA dizi analizi yöntemi ile doğrulandı. Hücreler 1 mM IPTG ile indüklendi ve His-tag afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Saflaştırılmış proteinlere SDS PAGE ve Western Blotlama analizleri uygulandı.

**Sonuçlar:** Anti-HBsAg scFv kodlayan gen PZR yöntemi ile amplifiye edilmiştir ve mCherry-pQE30 vektörüne klonlanmıştır. Moleküler klonlama koloni PZR ve DNA sekans analizi ile doğrulanmıştır. Genetik füzyon ürününün protein ekspresyonu SDS PAGE ve Western blot yöntemleri ile kontrol edilmiştir. Yaklaşık olarak beklenen 55.4 kDa değerinde protein bandı elde edilmiştir.

**Tartışma:** Yapılan çalışma sonucunda scFv /mCherry füzyon proteini başarılı şekilde eksprese edilmiştir. ELISA sonuçlarına göre saflaştırılmış proteinler HBsAg'ye zayıf bağlanma göstermişlerdir. Floresan rekombinant antikor füzyon yapısı ELISA çalışmalarında düşük bağlanma göstermesinin nedeni füzyon yapının doğru katlanmamış olmasından kaynaklanma ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle ileriki çalışmalarda öncelikle farklı koşullarda “refolding” çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** faj gösterim, floresan görüntüleme, HBsAg, mCherry, rekombinant antikor

## ABSTRACT

### Development of Fluorescently Labeled Recombinant Antibodies for Diagnostic

#### Purposes

**Aim:** In this study we aimed to develop mCherry fluorescent protein labeled anti-HBsAg fragments by genetically fusion in order to use in fluorescent ELISA or in cell imaging studies. In this context an anti-HBsAg recombinant antibody (scFv) coding gene was cloned into a pQE30 expression vector containing the gene encoding a fluorescent protein (mCherry).

**Methods:** In this study, an anti HBsAg scFv previously developed in the project ‘Development of recombinant antibody against Hepatit B surface antigen by Phage display technology’ was used. The anti-HBsAg scFv was first amplified by PCR using specific primers comprising Kpn I and Sal I restriction enzyme sites. Then the amplified PCR product and the pQE30 vector was digested with KpnI and Sall restriction endonucleases. Digestion products were ligated with T4 DNA ligase then transferred into *E.Coli* strain JM109 by calcium chloride transformation. Positive clones were confirmed by coloni PCR then by DNA sequencing. The fusion protein was induced with 1mM IPTG and purified with HIS tag affinity columns. Purified proteins were analyzed with SDS PAGE and Western blot.

**Results:** The scFv encoding gene was amplified by PCR and cloned into the mCherry-pQE30 vector. The cloning was confirmed by DNA sequence analysis. The protein expression of the genetic fusion product was controlled with SDS PAGE and werstern blot and protein band of approximately 55.4 kDa was detected as expected.

**Conclusion:** In this study a genetically fused scFv/mCherry fusion protein was successfully expressed. The results of ELISA show a low binding of the fluorescent recombinant antibody. This could because of the misfolding of the fusion protein. In order to overcome to this problem different refolding conditions must be tried.

**Keywords:** fluorescence imaging, HBsAg, mCherry, phage display, recombinant antibody

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca elinden gelen her türlü imkanı sağlayan, yeni fikirler ve yeni fırsatlar sunan tez danışmanım, Sayın Dr. Berrin Erdağ'a çok teşekkür ederim.

Bu tezin her sayfasında emeği olan, tez çalışmam boyunca bilgi birikimini ve sabrını benden esirgemeyen Sayın Koray Balcıoğlu'na ,

Tezimin teknik ve deneysel kısımlarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Aydın Bahar'a,

Eğitimimde emeği geçen tüm hocalarıma,

Kocaeli Üniversitesi ve TÜBİTAK ortak yüksek lisans programını oluşturmada emeği bulunan ve bize bu programda yer alma fırsatı tanıyan tüm yetkililere,

Bu tez çalışmasını kısmi olarak destekleyen Eczacıbaşı Topluluğu ve TÜBİTAK 1007 'Hepatit B enfeksiyonunun tanısında serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak tanı kitlerinin geliştirilmesi' projesine,

Bu süre boyunca birçok şey paylaştığımız sevgili arkadaşlarım Arzu Pınarbaşı, Betül Baykal, Duygu Yavuz, Emel Akgün, Elif Yolaç ve Zeynep Ünal'a,

Her zaman beni destekleyen, güvenen, her anımda yanımda olan aileme,

Sonsuz teşekkürler...

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1.Amaç ve Kapsam	1
1.2.Hipotezler	2
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Hepatit B'nin Tanımı ve Prevelansı	4
2.2.Hepatit B'nin Tanısı ve Tedavisi	5
2.2.1.Hepatit B'nin Tanısı	5
2.2.2.Hepatit B'nin tedavisi	5
2.3.Virolojik Hastalıkların Tanı Yöntemleri	7
2.3.1.Elektron Mikroskobu	7
2.3.2.Histoloji/Sitoloji	7
2.3.3.Virüs İzolasyonu	7
2.3.4.Seroloji	7
2.4.Temel Araştırmalarda Antikorlar	9
2.4.1.Biyolojik Belirteç Olarak Antikorlar	10
2.4.1.1.Rekombinant Antikorlar	11
2.4.1.2.Faj Gösterim Teknolojisi	13
2.4.2.Antikorların Tedavideki Yeri	13
2.4.3.Antikorların Tanıdaki Yeri	13
2.5.Belirteç Genler ve Floresan Proteinler	14
2.5.1.Floresan Proteinler	15
2.5.1.1.Kırmızı Floresan Proteinler	17
2.6.Belirteç Proteinler ve Sentetik Biyolojinin Gelişmesi ile Tanıda İleri Yaklaşımlar	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1.GEREÇLER	21



3.1.1.Araçlar	21
3.1.2.Oligonükleotit primerleri	21
3.1.3.Çalışmada Kullanılan Enzimler	22
3.1.4.Kimyasallar	22
3.1.5.Tamponlar ve Solüsyonlar	23
3.1.5.1.Bakteri Büyümesi için Kullanılan Besiyerleri	23
3.1.5.2.Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Stok Solüsyonlar	24
3.1.5.3.Agaroz Jel Elektroforezi için Stok Solüsyonlar	24
3.1.5.4.Enzim Kesiminde Kullanılan Tamponlar	24
3.1.5.5.Plazmit DNA İzolasyonu için Kullanılan Ticari Kit	24
3.1.5.6.Bakteri Hücrelerinin Lizisi için Tamponlar	25
3.1.5.7.Ni afinite kromatografisi Solüsyonları	25
3.1.5.8.SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi için Kullanılan Stok Solüsyonlar	25
3.1.5.9.Westen Blot Analizi için Kullanılan Solüsyonlar	27
3.1.6.Ekspresyon Vektörü	28
3.1.7.PZR Ürünü Kolon Saflaştırılması	28
3.2.Yöntem	
3.2.1.Lig7 scFv (Anti-HBsAg) Geninin pQE30 Vektörüne Klonlanması	28
3.2.1.1.Lig7 scFv Geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
3.2.1.2.PZR Ürünlerinin Saflaştırılması	29
3.2.1.3.Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforeziyle Analizi	30
3.2.2.Klonlama Çalışmasında Kullanılacak Vektörün Çoğaltılması Amacıyla Transformasyon Çalışması	30
3.2.3.Lig7 scFv 'nin pQE30mCherry Vektörüne Klonlanması	31
3.2.3.1.Lig7 scFv PZR Fragmentinin ve pQE30mCherry plazmitinin Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Reaksiyonu	31
3.2.3.2.Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmiş PZR ürünü ve pQE30 vektörünün saflaştırılması	31
3.2.3.3.PZR Fragmentinin ve pQE30 Vektörünün Ligasyonu	32
3.2.4.CaCl <sub>2</sub> Yöntemiyle Transformasyon	33

3.2.5.Plazmit pQE30mCherry'nin lig7 geninin içerdiğinin doğrulanması	33
3.2.5.1.Transforme olan bakteri kültüründen plazmit DNA izolasyonu	33
3.2.5.2.Plazmit DNA'nın Sall ve KpnI ile enzimleri ile kesim reaksiyonu	34
3.2.5.3.Koloni PZR	34
3.2.5.4.DNA dizileme çalışması için pQE30 plazmit PZR ile çoğaltılması	35
3.2.6.Transforme Bakterilerin Uzun Süre Stoklanması	37
3.2.7.pQE30mCherry lig7 Geninin Ekspresyonu	37
3.2.8.mCherryLig7 füzyon proteininin Ni-Affinite Kolon Kromatografisi ile pürifikasyonu	38
3.2.9.mCherryLig7 füzyon proteininin SDS PAGE ve Western Blot Analizi	39
3.2.9.1.mCherryLig7 füzyon proteininin SDS PAGE analizi	39
3.2.9.2. mCherryLig7 füzyon proteinin Western Blot analizi	41
3.2.10.ELISA	41
4.BULGULAR	43
4.1.Klonlama Stratejisi	43
4.2.pQE30mCherry Vektörünü çoğaltmak amacıyla yapılan transformasyon sonuçları	
4.2.1. <i>E.coli</i> JM109 Bakteri Sıvı Kültüründen Plazmit İzolasyonu Sonuçları	44
4.3.Çalışmada Kullanılacak Restriksiyon Endonukleaz Enzimlerinin Seçimi ve Primer Dizaynı	44
4.4.Lig7 scFv geninin PZR ile çoğaltılması	49
4.5.pQE30mCherry Ekspresyon Vektörünün ve Lig7 Rekombinant Antikörünün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi	49
4.6.Moleküler Klonlama (Ligasyon ) ve Transformasyon Sonucu Transforme Olmuş Bakterilerin Seçimi	50
4.7.Lig7 geninin pQE30mCherry vektörüne klonlandığının doğrulanması	
4.7.1.Koloni PZR	51

4.7.2. Koloni PZR ve Geriye Dönük Restriksiyon Enzim Kesimi ile Moleküler Klonlamanın Doğrulanması	52
4.8.DNA Dizi Analizi Bulguları	53
4.8.1.Geliştirmek istenilen rekombinant antikora ait beklenen aminoasit dizilimi ve gen sekansı	53
4.8.2.Beklenen mCherry-Lig7 DNA sekansının DNA Dizi analizi sonucuyla Karşılaştırılması	54
4.9. mCherryLig7 Geninin <i>E.Coli</i> JM109 Hücrelerinde Ekspresyonu	57
4.10.Ni-Afinite Kolon Kromatografisi sonrası SDS PAGE ve Western Blot Analizi Sonuçları	58
4.11.ELISA Sonuçları	61
5.TARTIŞMA	63
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR DİZİNİ	66
ÖZGEÇMİŞ	74

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- BSA: Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
- CAT: Cambridge Antikor Teknolojisi (Cambridge Antibody Technology)
- ELİSA: Enzim Bağlı İmmün Assay (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- EtBr: Etidyum Bromür
- FLIM: Floresan Yaşam Süresi Görüntüleme Mikroskobu (Fluorescence-lifetime imaging microscopy)
- FP: Floresan Protein
- FRAP: Florışıldama Bozulması Sonrası Floresan Geri Kazanımı (Fluorescence recovery after photobleaching)
- FRET: Floresan Rezonans Enerji Transferi (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- GFP: Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein)
- HBeAg: Hepatit B e antijeni
- HBsAg: Hepatit B s antijeni
- HBV: Hepatit B virüsü
- HCC: Karaciğer Kanseri (Hepatocellular Carcinoma)
- HIV: İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (Human immunodeficiency virus)
- IFN: Interferon
- IgG: Immunoglobulin G
- IgM: Immunoglobulin M
- IPTG: İzopropiltiyogalaktosid
- PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RFP: Kırmızı Floresan Protein (Red Fluorescent Protein)
- scFv: Single chain variable fragment
- SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
- WHO: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
- YFP: Sarı Floresan Protein (Yellow Fluorescent Protein)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HBV'nin global prevalansı.....	5
Şekil 2.2. Tek antikor kullanılan ELISA'nın ve geleneksel ELISA'nın şematik gösterimi....	8
Şekil 2.3. Antikor üretiminin, görüntülenmesinin ve karakterizasyonunun genel taslağı.....	10
Şekil 2.4. Rekombinant antikor formatları.....	12
Şekil 2.5. scFv fajgösterimi.....	13
Şekil 2.6. Floresan proteinlerin oluşumunun şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.7. Floresan ışık altında saflaştırılmış floresan proteinler.....	17
Şekil 2.8. mCherry konfokal floresan görüntüsü.....	19
Şekil 2.9. Sentetik sistemlerin uygulanma alanı.....	19
Şekil 3.1. Ekspresyon vektörü pQE30 mCherry.....	28
Şekil 3.2. Nanodrop Spektrofotometre.....	30
Şekil 3.3. CEQ 8800 Dye Terminator otomatik dizi analiz sistemi.....	35
Şekil 3.4. Histidin ve imidazolün kimyasal yapısı.....	38
Şekil 4.1. pQE-30 vektörünün klonlama bölgesi.....	43
Şekil 4.2. pQE30mCherry vektörünün klonlama bölgesi.....	43
Şekil 4.3. Transformasyon sonrası bakteri kolonileri.....	44
Şekil 4.4. Transformasyon sonrası bakteri kültüründen izole elden pQE30mCherry'nin %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. Lig7 scFv'nin baz dizisinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerin kesim bölgeleri.....	45
Şekil 4.6. Restriksiyon enzim kesim yerlerini içeren oligonükleotit primerleri.....	48
Şekil 4.7. PZR ile çoğaltılmış olan lig7 geninin agaroz jel görüntüsü.....	49
Şekil 4.8. PZR fragmenti ve pQE30mCherry vektörünün enzim kesimi agaroz jel Görüntüsü.....	49
Şekil 4.9. Restriksiyon kesimi sonrası lig7 PZR ürünü.....	50
Şekil 4.10. pQE30mCherrylig7 oluşumu için moleküler klonlama stratejisi.....	50
Şekil 4.11. Transformasyon sonrası elde edilen bakteri kolonilerinin görünümü.....	51
Şekil 4.12. Koloni PZR agaroz jel görüntüsü.....	51
Şekil 4.13. Plazmit DNA'nın SallI kesimi agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 4.14. Pozitif bakteri kolonilerine ait plazmit DNA'sının iki restriksiyon enzim ile kesimi agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 4.15. Beklenen aminoasit dizilimi ve gen sekanstı.....	53

Şekil 4.16. mCherryLig7 beklenen ve klon sekansı karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.17. IPTG ile indüksiyon sonra besiyerlerinin görünümü.....	57
Şekil 4.18. IPTG ile indüksiyon sonrası bakteri pelletlerinin görünümü.....	58
Şekil 4.19. Sonikasyon ile lizis sonrası lizat görüntüsü.....	58
Şekil 4.20. pQE30mCherry ekspresyon çalışması sonuçları.....	59
Şekil 4.21. pQE30 mCherry Western Blot analizi sonucu.....	59
Şekil 4.22. pQE30mCherry-Lig7 ekspresyon çalışması sonuçları.....	60
Şekil 4.23. pQE30mCherry –Lig7 Western Blot analizi sonucu.....	60
Şekil 4.24. pQE30mCherry ve pQE30mCherryLig7 ekspresyon çalışması sonuçları.....	61
Şekil 4.25. pQE30mCherry ve pQE30mCherry-Lig7 Western Blot analizi sonucu.....	61
Şekil 4.26. ELISA sonuçları.....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Viral hepatit B'nin rutin serolojik tanısı.....	6
Çizelge 2.2. Poliklonal, monoklonal ve rekombinant antikörlerin spesifik karakterleri.....	11
Çizelge 2.3. En iyi floresan proteinlerin özellikleri ve mCherry ile karşılaştırılması.....	18
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan araçlar.....	21
Çizelge 3.2. Lig7 geninin klonlanması için kullanılan oligonükleotit primerleri.....	21
Çizelge 3.3. Dizi analizi ve vektör klonlama bölgesi PZR çalışmalarında kullanılan oligonükleotit primerleri.....	22
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan enzimler.....	22
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	22
Çizelge 3.6. Ligasyon reaksiyonu.....	33
Çizelge 4.1. Örneklerin enzim kesim reaksiyonu sonrası nanodrop ölçüm değerleri.....	50

## 1. GİRİŞ

Faj gösterim teknolojisi ile tanı amaçlı uygulamalara yönelik antikorların üretilmesine ilişkin olarak pek çok örnek bulunmaktadır (Meyer, 2011, Shütte, 2009). Faj gösterim teknolojisinin en büyük avantajlarından biri geliştirilen rekombinant antikorların genetik bilgisine direk ulaşılabilmesidir. Bu da istenilen tanı testi için hızlı adaptasyona izin veren, scFv- Fc, biyotinlenmiş antikor veya scFv-phoA füzyon gibi antikor formatlarının üretilmesine sebep olmuştur (Hust, 2011).

Floresan işaretleme, birçok analitik prosedürde geniş aralıkta yüksek hassasiyet sağlar. Floresan işaretleme ve antikor arasındaki konjugasyon, organik floroforların kimyasal konjugasyonu kullanılarak konvensiyonel olarak tamamlanmaktadır (Hermanson, 1996). Floroforlar, antikorların antijen bağlanma bölgeleri ile birleşebilir. Sonuçta kısmi veya tamamen antikor reaktivite kaybı görülür. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için floresan protein ve scFv (single chain Fv) füzyon proteinleri kullanılabilir (Sakamoto, 2010).

İşaretleyici olarak floresan protein kullanmanın avantajları arasında farklı konakçıya uygulanabilirliği, hücre lizisine neden olmaması ve substrat eklemenin gerekli olmayışı gösterilebilir (Ghim, 2010). Floresan işaretli rekombinant antikorlar daha hassas tek aşamalı ELISA veya modern *in vitro* ve *in-vivo* floresan görüntüleme sistemlerinde kullanım olanağı bulmaktadır. *mCherry*, tek molekül floresan görüntüleme çalışmalarında diğer kırmızı floresan proteinlere göre yüksek fotostabilite ve parlaklık gösterir (Shaner 2004, 2005). *mCherry* son zamanlarda yapılan pek çok çalışmada floresan işaretleyici olarak kullanılmaktadır (Hillson, 2007, Lewenza, 2008, Malone, 2009).

Bu çalışmada floresan ELISA veya hücre görüntüleme çalışmalarında kullanılmasına yönelik genetik füzyon ile floresan protein işaretli anti-HBsAg rekombinant antikor geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda anti-HBsAg rekombinant antikor kodlayan gen *mCherry* genini içeren pQE-30 vektörüne klonlanmıştır ve ekspresyonu sağlanmıştır.

### 1.1. Amaç ve Kapsam

Parsher ve arkadaşları 1992'de GFP (Green Fluorescent Protein 'yeşil floresan protein') genini klonladıklarından beri GFP ile hedef proteinin kodlama sekansının birleştirilmesi mümkün olmaktadır. Erken dönemlerde GFP, takip eden gen ekspresyon dinamikleri ve protein lokalizasyonu için tek floresan füzyon etiketi olarak kabul edildi



(Chalfie, 1994, Lipincott-Schwartzs, 2001). Tsien ve arkadaşları daha parlak, geliştirilmiş fotostabilite ile öne çıkan ve geliştirilen eksitasyon ve emisyon spektraya sahip GFP çeşitliliğini oluşturdu (Tsien, 1998). Yakın zamanda geliştirilmiş olan yeni jenerasyon monomerik kırmızı FPs mRFP1'den oluşturulmuştur. Bunlar mOrange, mStrawberry ve mCherry, mRaspberry ve mPlum'dır (Shaner, 2004, Tsien, 2005). Bu proteinler yüksek parlaklık fotostabilite ve göreceli olarak hızlı kromofor olgunlaşması ile karakterize edilmişlerdir. Bu bulgular ve devrimsel başarı sayesinde FP'lerden faydalanan yeni biyoanalitik araçlar (genetik olarak kodlanmış biyosensörler) önemli moleküller ve anahtar olayları canlı hücrelerde görüntüleme ve algılama için geliştirilmektedirler.

Bu çalışmada genetik füzyon ile floresan protein işaretli anti-HBsAg rekombinant antikor geliştirilmeye amaçlanmıştır. Bu doğrultuda anti-HBsAg rekombinant antikor kodlayan gen *mCherry* genini içeren pQE-30 ekspresyon vektörüne klonlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Genetik füzyon ile floresan protein işaretli anti-HBsAg rekombinant antikor geliştirilmesi amacıyla yapılan moleküler klonlama başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız sonucunda scFv /mCherry füzyon proteini başarılı şekilde eksprese edilmiştir. Ancak Ni-afinite kolon saflaştırması için optimizasyon çalışmaları yapılması gerekmektedir. Saflaştırma çalışmaları optimize edildikten sonra bu proteinler ELISA ve *in vitro* görüntüleme çalışmalarında denenecektir.

## 2.1. Hipotezler

Önemli hedef madde ve biyolojik olayların *in vivo* ve *in vitro* tespit ve görüntüleme için yeni biyoanalitik araçların geliştirilmesi çalışmaları kolay olmayan bir alandır. Floresan proteinler, protein-protein interaksyonu ve protein-hücre izleme çalışmaları için kantitatif genetik olarak kodlanan imleyicilerden daha geniş çaplı kullanılmaktadır. Protein temelli floresan biyosensörler son zamanlarda öne çıkmaktadırlar.

Bu çalışmamızda tek molekül floresan deneylerinde yüksek fotofiziksel özellikleri nedeniyle ideal bir floresan protein alternatifi olan mCherry kırmızı floresan proteinini kullanmayı tercih ettik.

Hipotezimize göre rekombinant floresan antikorların elde edilmesi geleneksel immunoassayleri kolaylaştırabileceğini ve modern floresan görüntüleme teknikleri için bir katkı sağlayabileceği düşünülmüştür. Daha önce faj gösterim teknolojisiyle geliştirilmiş olan anti-HBsAg rekombinant antikorunu kodlayan genini klonlamak için *mCherry* genini içeren pQE-30 ekspresyon vektörün kullanılması hedeflenmiştir. pQE-30 plazmitini

transforme etmek için *E.coli* JM109 bakteri soyunu uygun bakteri boyu olarak tercih ettik. Tercih ettiğimiz pQE-30 plazmitinin içerdđi 6X His dizisi bulunması sebebiyle protein saflaştırma deneylerinde Ni afinite kolon kromatografisi kullanarak rekombinant proteinleri saflaştırılması hedeflenmiştir. Saflaştırılmış bu proteinler ELISA deneylerinde kullanılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

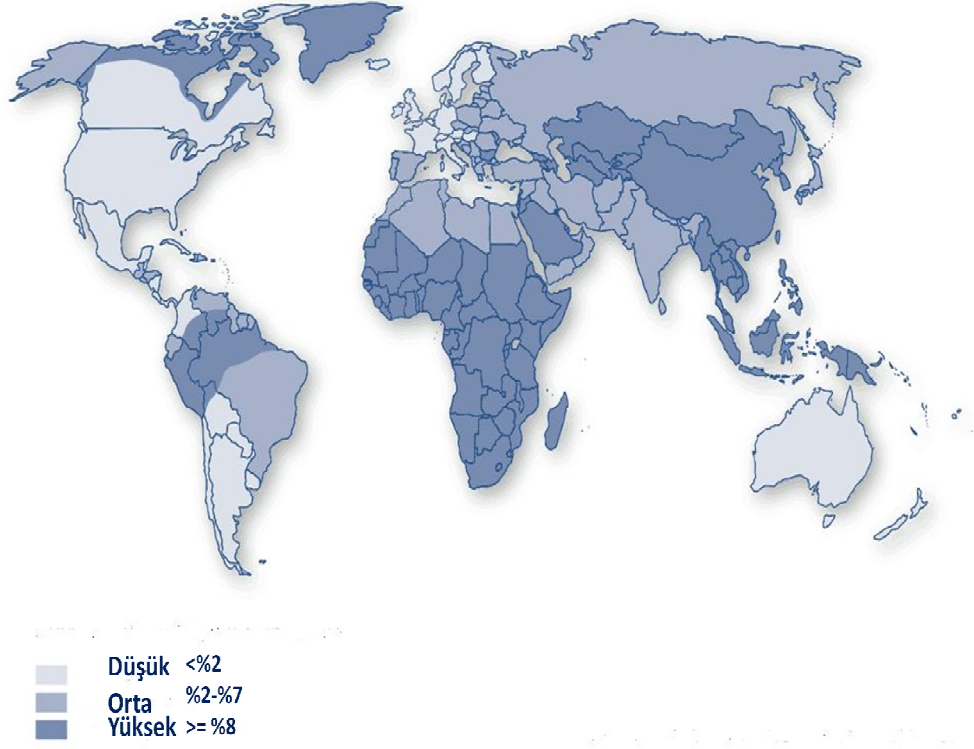
### 2.1.Hepatit B Tanımı ve Prevelansı

Hepatit B virüsü (HBV), proteinleri, genomu tanımlanan ve karakterize edilen ilk insan hepatit virüsüdür (Howard, 2008). Epidemiyolojik gözlemlerin temelinde iki tip hepatit taşınma yolu bulunmuştur: A tipi'nin çoğunlukla fekal-oral yolla, B tipi'nin ise parenteral olarak kişiden kişiye taşındığı düşünülmüştür. 1963'te Blumberg ve arkadaşları tarafından polimorfik serum proteinleri araştırmasında bir Avustralya aborjininin kanında, daha öncesinde bilinmeyen bir antijen keşfedilmiştir (Avustralya antijeni). Daha sonra bu antijenin görünümünün B tipi hepatit ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Conjeeveram, 2003).

Dane ve çalışma arkadaşları immün elektron mikroskopunun kullanımı ile Hepatit B hastalarının serumunda, yüzeylelerinde bu antijeni taşıyan virüs benzeri partikülleri bulmuşlardır (EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 2003). Bu partiküllerin Hepatit B virüsü olduğu düşünülmüştür.

HBV enfeksiyonunun akut ve kronik karaciğer hastalığı ile sonuçlandığı bilinmektedir, epidemiyolojik bilgiye dayanarak, 1970'lerden önce bu virüsün karaciğer kanserinin bir sebebini gösterebileceği varsayılmıştır. Bu bilgi Kuzey Amerika'da sincapgiller familyasından kemirgen memeli cinsi marmot benzeri hayvanlardan woodchuckta HBV benzeri bir etken için bir araştırmayı başlatmıştır ve bu hayvanlarda karaciğer kanseri gelişimi gözlemlenmiştir (Robinson, 1974).

HBV virüsünün yaklaşık olarak dünya popülasyonunun üçte birinin hayatı boyunca enfekte ettiğine dair serolojik kanıtlar mevcuttur ve 350 milyon insan kronik olarak enfekte olmuştur. (Zuckerman, 2009)



**Şekil 2.1.** Hepatit B virüsü kronik enfeksiyonu global prevalansı, 2006 (Health Information for Overseas Travel, 2010)

Kronik HBV enfeksiyonunun hastalık spektrumu, düşük viremik inaktif taşıyıcılık durumundan kronik HBV enfeksiyonuna kadar çeşitlilik gösterir. HBV ilişkili karaciğer kanserindeki son evre veya HCC (Karaciğer Kanseri ‘Hepatocellular Carcinoma’), her yıl 1 milyondan fazla kişinin ölümünden ve karaciğer transplantasyon olgularının %5-10’undan sorumludur (Ganem, 2004, Lok, 2007).

## 2.2.Hepatit B Tanı Ve Tedavisi

### 2.2.1. Hepatit B Tanısı

Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) serumda 6 aydan daha fazla bulunması halinde Hepatit B tanısı konur. Bu yüzden hastanın aktif ya da pasif taşıyıcı olduğunun saptanması akut veya klinik HBV ilişkili karaciğer hastalığının ayırt edilmesi için moleküler yöntemlere nazaran serolojik yöntemler tercih edilir (Mangia, 2008).

**Çizelge 2.1.** Viral hepatit B'nin rutin serolojik tanısı (Poynard, 2004)

	HBsAg	HBeAg	Anti-HBs	Anti-HBe	Anti-HBc	HBV-DNA
Akut HBV enfeksiyonu						
Erken	+	+	-	-	IgM	+
Pencere Periyodu	-	-	-	-	IgM	+/-
İyileşmek	-	-	+	+	IgG	+/-
Kronik HBV enfeksiyonu					IgG, IgM <sup>+</sup>	
Replikatif	+	+	-	-	IgG	>10 <sup>8</sup> kopya/ml
Replikatif olmayan inaktif taşıma süreci	+	-	+	+	IgM veya IgG	<10 <sup>8</sup> kopya/ml
HBV reaktivasyonu	+	+	-	-	IgG	+
HBeAg(-) kronik HBV	+	-	-	+	IgG	>10 <sup>8</sup> kopya/ml

HBsAg pozitif hepatit hastalığının iki temel formu vardır (Fattovich 2008, Holoman, 2009). HBeAg-negatif form yabancıl tip ile ilişkilidir. HBeAg-negatif formu esas olarak promotör mutant virüsler ile ilişkilidir. Daha öncesinde, aktif taşıyıcı durumu, HBV DNA seviyesinin  $\geq 1.8 \times 10^4$  IU/ml olmasıyla tanımlanmıştır. Bu viremia seviyesi genellikle karaciğer hastalığı ile ilişkilidir.

### 2.2.2. Hepatit B Tedavisi

Kronik hepatit B enfeksiyonu görülen her üç kişiden birinde, hastalığın belirtileri göze çarpar. Hastaların çoğunda siroz, karaciğer yetersizliği ve karaciğer kanseri görülme riski son derece yüksektir. Tedavide temel amaç virüs replikasyonunu durdurup, olası bir karaciğer hasarını minimuma indirmektir. Hepatit B hastalığına karşı spesifik tedavi yöntemleri arasında alfa interferon, nükleosid analogları, adefovir dipivoxil ve entecavir gösterilebilir (Zuckerman, 2009).

- Alpha Interferons: IFN (Among interferon )kronik hepatit B için karşılaştırma değerlendirmeli tedavi sağlar. Hücrelerde antiviral durumu engelleyici hücresel proliferasyonu, tedavi edici olarak kullanılan hücre içi sinyal proteinlerini doğal olarak sağlar.
- Nükleotid Analogları: Nükleotit ile gözlemlenen cevabın yapısı benzerdir. Bu ajanlar farklı yapılara sahip ve farklı fazlarda hepatit B replikasyonunu önlerler.
- Lamivudine: Lamivudine (2dideoksi-3tiasitidin veya 3TC) sitidin analogudur ve viral DNA sentezinde sitozin ile rekabet eder.

- Adefovir Dipivoksilil: Adefovir dipivoksil ağız yoluyla kullanılabilen adefovir ön ilacıdır. Adenozi monosulfatın bir fosfonat-asiklik nükleotit analogudur.
- Entecavir: Entecavir siklopentil guanizon analogudur. Son zamanlarda HIV karşıtı aktivitesi ileri sürülmektedir.

### **2.3.Virolojik Hastalıkların Tanı Yöntemleri**

İnsan viral enfeksiyonları, her yaşta kişide ve her şiddette görülebilir. Bu viral enfeksiyonlar, akut veya kronik olabilir, nüksedebilir veya bireye ömür boyu bağışıklık sağlayabilir.

Aşağıda sunulan tanı yöntemleri gelişim sırasıyla ortaya koyulmuştur.

**2.3.1. Elektron mikroskopu:** Elektron mikroskopu (EM) virüsleri direkt görüntüleme için uygun tek yöntemdir. Alternatif tanı yöntemlerinin gelişimi ile virüs gastroenteritis ve herpes ve pox virüsleri için kısıtlı olarak kullanılmaya başlanmıştır (Beards, 1998).

**2.3.2. Histoloji/Sitoloji:** Direk mikroskopik deneylerde boyanmış histolojik veya sitolojik mikroskopik örnekler bazen ilk indikasyonu sağlayabilir, bir virüs patolojik süreçten sorumlu olabilir.

**2.3.3. Virüs İzolasyonu:** Klinik virolojide birçok gelişme laboratuvarında virüs geliştirebilme yeteneğinden ileri gelir. Geçmişte virüsler laboratuvar hayvanlarında ve embriyonal yumurtalarda çoğaltılırdı. Fakat pek çok virüs izolasyon teknikleri şu anda kültür hücrelerine dayanır. Bu teknik uygun örnekler ve optimal hücre hatları ve karakteristik sitopatik etkiye (CPE) dayandırılarak yapılan olası tanı ile çok spesifik ve hassas olabilir. Viral enfeksiyonların rutin tanısında konvensiyonel hücre kültürünün rolü tartışılan bir konudur (Carman, 2001, Ogilvie, 2001).

**2.3.4. Seroloji:** Seroloji terimi çoğu kez spesifik antikorların tespiti için yapılan tanı testlerini ifade etmek için kullanılır. Bu terim spesifik antijen veya antikorun varlığı için kan serumu örneklerinin testlerini içerir.

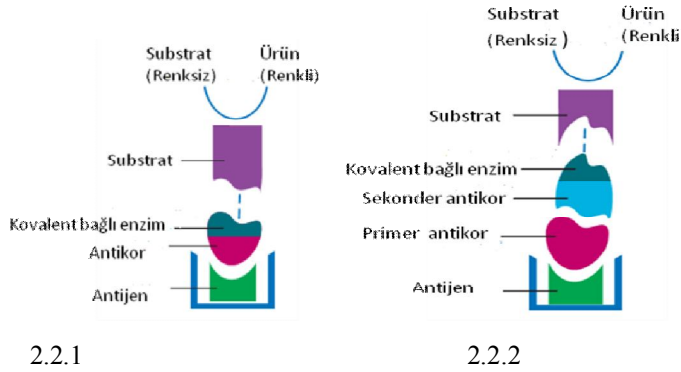
Hem antijen hem de antikor deneylerinde tüm kana, plazmaya veya kandan başka vücut sıvılarına başvurulur. Vücut sıvılarında yapılan bütün testler için seroloji terimi kullanılabilir. Tekniklerin birçoğu viral antijen teşhisi için kullanılabilir. Bu teknikler immunofloresan, enzim bağlı immunoassay ve floresan temelli immunoassay'dir.

ELISA yöntemlerinden biri olan direk ELISA yönteminde florofor ile bağlı bir tek antikor kullanılır. Antikor hedef molekülü tanır ve ona bağlanır. Taşıdığı florofor mikroskop yoluyla belirlenebilir. Bu teknik, antikorun floroforla direk konjugasyonu sayesinde sekonder (indirek) protokolün yanında çeşitli avantajlara sahiptir. Bu

avantajlardan biri, tek antikor kullanıldığı için hızlı bir şekilde uygulanmasıdır. Boyama prosedüründeki basamak sayısındaki azalma sayesinde daha kısa sürmektedir. Diğer antikorlar arası çapraz reaksiyonu elimine ederek spesifik antikor- antijen reaksiyonlarını test etmek için kullanılabilir. (www.protocol-online.org)

Dezavantajlarından biri ise primer antikorun ayrı olarak işaretlenmesi gerekliliğinin zaman alıcı olmasıdır. Sinyal direk ELISA'da daha güçsüzdür. Bu durum bazı durumlarda dezavantaj olarak görülebilir. Hızlı ve hassas tek antikor ELISA'nın kullanılması kısa deney süresi avantajına sahiptir. Tek antikor ELISA, geleneksel ELISA'da kullanılan sekonder antikora ihtiyaç duymaz. Bu yüksek arka plana neden olabilir.

Sekonder veya indirekt ELISA yönteminde iki antikor kullanır. İlki (primer antikor) hedef molekülü tanıyıp ve bağlanır. İkincisi (sekonder antikor) floroforu ve primer antikoru taşıyıp, primer antikora bağlanır. Bu protokol direk protokolden daha kompleksdir ve daha uzun sürer.



**Şekil 2.2.** Tek antikor kullanılan ELISA'nın (2.2.1.) ve geleneksel ELISA'nın (2.2.2.) şematik gösterimi.

150 kDa büyüklüğündeki tüm antikor yapısı nedeniyle antikorlar hücre membranından geçemedikleri için, yapılar hücre içinde görüntülenmek istendiğinde immunofloresan kullanımı sadece sabitleştirilmiş (örneğin ölü hücrelerle) hücrelerle kısıtlıdır. Supernatanttaki veya hücre membranı dışındaki proteinler, antikorlar tarafından bağlanabilirler. İlgilenilen proteinler çapraz bağlanabilirler. Bu spesifik olmayan bağlanma, yanlış pozitif veya yanlış negatif sinyallerle sonuçlanabilir. Buna alternatif yaklaşım, floresan protein (örneğin GFP) domainleri içeren rekombinant proteinlerin kullanımınıdır. Böyle 'işaretli' proteinlerin kullanılması canlı hücrelerde lokalizasyonlarının belirlenmesine izin verir.

## 2.4. Temel Biyolojik Araştırmalarda Antikorlar

Antikorlar, birçok biyolojik araştırmalar için temel araçlardır. Pek çok metot, proteinleri veya başka molekülleri spesifik olarak tespit etmek için antikorlara ihtiyaç duyar. Sık kullanılan standart metotlar immnblotlama, ELISA, immunfloresan mikroskopu, flow sitometri, moleküllerin veya hücrelerin afinite kromatografisi ile prifikasyonudur (Renard, 1979, Coons, 1941, Bonner, 1972, Porter, 1962). Temel araştırmalar için faj gösterim teknolojisiyle elde edilen ilk antikorlar piyasada bulunmaktadırlar. Axxora firmasından anti-CD256 antikoruna buna örnek olarak verilebilir.

Antikorların temel araştırmalarda önemli bir kullanım alanı proteom çalışmalarıdır. İnsan genom dizisi elde edildikten sonra, araştırmalar gen ürünlerinin analizine odaklanmıştır. İnsan genomu 20,000-25,000 protein kodlayan gen kodlamaktadır (International Human Genom Sequencing Consortium, 2000, Levy, 2007).

Alternatif mRNA splicing ve translasyon sonrası modifikasyonlar (rneğın glikozilasyon, fosforilasyon ) farklı insan proteinlerinin sayısını, çeşitli katlanmalar ile arttırdığı kabul edilmiştir (Harrison, 2002). Aynı genetik içeriğın farklı yorumlanması ile çok büyük morfolojik varyasyonlar belgelenmiştir. Bu yüzden her gen düzeninin, gen ürünlerinin miktarının ve lokalizasyonunun araştırılması için gereklidir. Genotip bir organizma türlerini tanımlıyorken, proteom fenotipi tanımlar. Burada antikorlar insan proteom şifresinin zm için kilit rol oynamaktadır (Hust, 2004, Berglund 2008, Wingren, 2009). Bu amaçla tüm insan proteomu için antikor geliştiren pilot projeler tamamlanmış ve antikor üreten sistemler geliştirilmiştir (Hust, 2011, Mersman, 2010, Pershad, 2010). İnsan proteinlerine karşı özel bağlayıcılar hakkındaki bilgi ‘‘Antibodypedia’’ projesinde analiz edilmiştir ([www.antibodypedia.org](http://www.antibodypedia.org), Björling, 2008) İnsan proteinlerinin bilgileri ‘‘Human Proteom Atlası’’nda verilmiştir ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org), Berglund, 2008).

Bazı kaynaklara göre (faj gösterim veya ribozom gösterim gibi in vitro teknolojiler antikor fragmentleri benzeri bağlayıcıların gereksinimi karşılamaktadırlar (Schirnan, 2011, He, 2008). DARPins ve anticalin gibi alternatif bağlayıcıların üretimi örnek olarak gösterilebilir (Stener, 2008, Skerra, 2008).

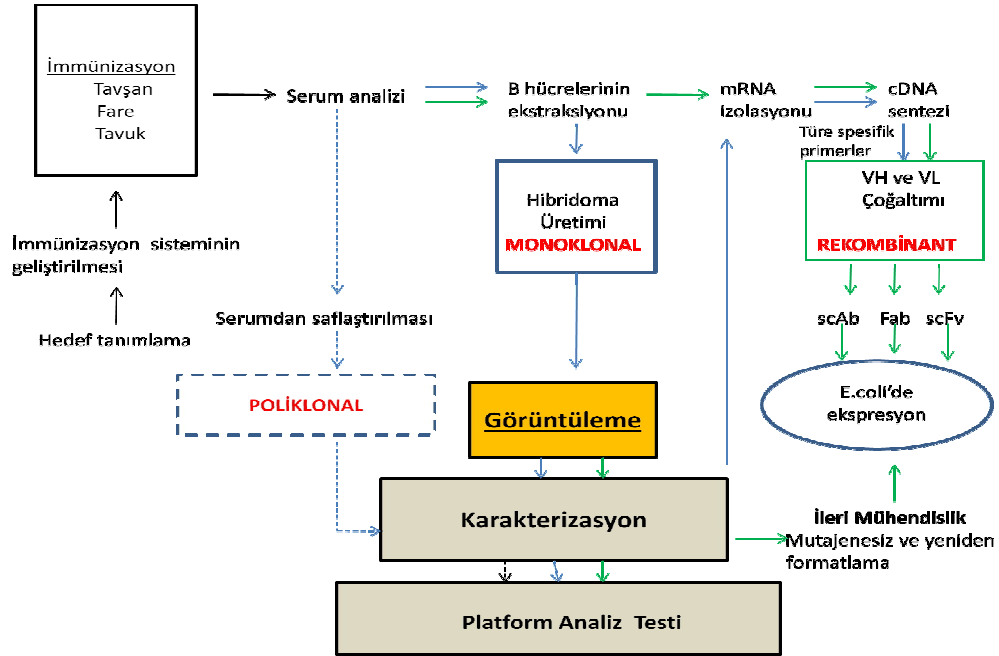
*in vitro* teknolojiler hayvanların immnizasyonuna nazaran otomasyon uygulanabilirler (Buckler, 2008). Ayrıca limitsiz ve tanımlanmış bağlayıcı kaynağı *in vitro* teknolojiler ile sağlanabilir.



### 2.4.1. Biyolojik Belirteç Olarak Antikorlar

Antikorlar ideal biyolojik tamamlayıcı elementlerdir. Çünkü antijenlerine karşı hassas özelliklere ve güçlü afiniteye sahiptirler. Şekil 2.3.'te poliklonal, monoklonal ve rekombinant antikorların oluşumu gösterilmektedir.

Poliklonal antikorlar çoklu plazma hücrelerinden, monoklonal antikorlar tek klonal hibridomadan geliştirilirler. Hepsi son olarak bir antijene cevap için farklılaştırılırlar (Harlow, 1999, Kendall, 2007). Rekombinant antikorlar, antikor genlerinin genetik manipulasyonlarının ürünüdür. Poliklonal, monoklonal ve rekombinant antikorların spesifik karakterleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Antikor üretiminin, görüntülenmesinin ve karakterizasyonunun genel taslağı (Conroy, 2009).

Poliklonal, monoklonal ve rekombinant antikorların spesifik karakterleri Çizelge 2.2' de gösterilmiştir

**Çizelge 2.2.** Poliklonal, monoklonal ve rekombinant antikorların spesifik karakterleri (Conroy, 2009)

Karakteristik	Poliklonal	Monoklonal	Rekombinant
Üretim Kolaylığı	++++	+++	+++
Maliyet (Düşük)	++++	+++	++
Stabilite	+++	++	++
Ticari Olarak Bulunma Durumu	++++	+++	+
Immobilizasyon Kolaylığı	++++	++++	++++
Hassaslık -Afinite	+++	++++	+++++
Mühendislik Afinite Kapasitesi	-	-	+++++

Antikorların biyosensör uygulamaları için bazı anahtar parametreler bulunmaktadır. Bunlar hassaslık, seçicilik, stabilite, immobilizasyon işaretleme ve antikor büyüklüğüdür. Rekombinant antikorlar bu faktörlerin optimizasyonu için mevcut bulunmaktadırlar. Öncelikle genetik modifikasyon kolaylıkları ile hassaslık, stabilite ve büyüklükleri geliştirilebilir. Ek olarak yeni antikor fragmentleri etkili immobilizasyona yardımcı olur (Townsend, 2006).

Yeni rekombinant antikorların oryantasyonu ve immobilizasyonuna yardımcı olan metotlar, immobilizasyon için etiketlerin kimyasallarla bağlanması veya genetik insersiyon ile kullanılmasıdır.

Hibridoma teknolojisi kullanılarak monoklonal antikorlar üretimi 1975 yılında tanımlanmıştır (Kohler, 1975). Immunoglobulin yapısının ve DNA temelli rekombinasyon bilgisinin artmasıyla, geniş kullanım için antikorların genetik manipülasyonları kolaylaşmıştır (Winter, 1991). Antikorların büyüklük ve afinite gibi özelliklerini değiştirme yeteneği, diagnostik ve teröpatikte yeni antikorların geliştirilmesine öncülük eder. Kardiyovasküler hastalıkların tanısı için ticari olarak bulunan monoklonal antikor temelli biyosensörlere örnek olarak Abbott's i-STST<sup>1</sup> (cTnI) ve Roche's CARDIAC porBNP testi gösterilebilir (Roche assay, 2008) (Abbott precision ,2008).

Tüm immunosensörlerin özellikleri tamamlayıcı elementler tarafından belirlenir (Patel, 2002, Lupa, 2001). Bu yüzden daha hassas ve dirençli sistemleri geliştirmek, antikorların modifikasyonuna dayanır.

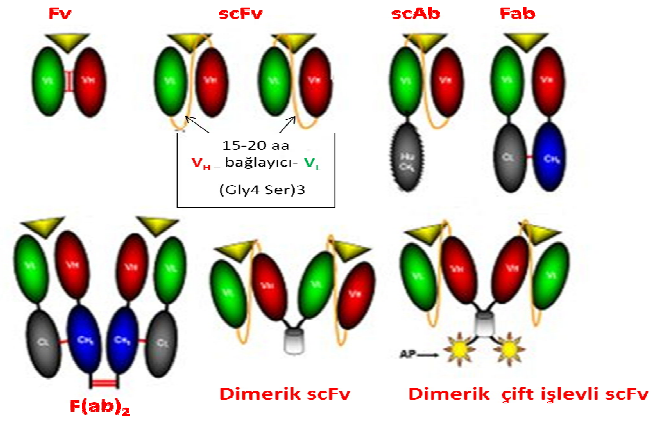
#### **2.4.1.1.Rekombinant Antikorlar**

Vektörlerin bakteriyel ekspresyon sisteminde kullanımı, doğru katlanan antikor fragmentlerini üretebileceği 1980'lerin sonunda gösterilmiştir (Skerra, 1988). Bundan sonra rekombinant antikor fragmentleri memelilerde, böceklerde, mayalarda, bitkilerde ve

hücresiz sistemlerde üretilmişlerdir ( Racher, 1994, Dorai, 1994, Reavy, 2000 , Edelman 1997, Boder, 1997, Whitlam, 1994, Hanes, 1997). Bu çeşitli ekspresyon sistemlerini kısıtlayan faktör, aktif proteinin büyük miktarlarda eksprese edilememesidir (Verma, 1998).

Rekombinant antikor teknolojileri gelişmeden önce, antikor parçaları sadece proteolitik bölünme esnekliği ile üretilebiliyordu. Rekombinant antikor üretiminin temeli, üretim sonunda antikor fragmentlerinin stabilitelelerini ve spesifik özelliklerini devam ettirmektir.

Rekombinant teknolojiler, diagnostik uygulamalarda kullanılmak üzere istenilen afinite ve özelliklere sahip belirli sayıda antikor fragmentlerinin üretimini sağlar. (Şekil 2.4.)



Şekil 2.4. Rekombinant antikor formatları (Conroy, 2009)

Tüm antikorun özellikle kullanılan en küçük fragmenti Fv'dir. Fv, V<sub>H</sub> ve V<sub>L</sub> domainlerini içerir, bunlar disülfid bağıyla birleşmişlerdir. Fv fragmentine bir esnek peptit bağlayıcı katılarak tek zincir Fv oluşumu ile düşük konsantrasyonlardaki stabilite problemlerinin üstesinden gelinmiştir (Bird, 1988, Glockshuber, 1990).

Genel anlamda esnek (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> bağlayıcısı ikincil yapıların oluşumuna eğilimi olmadığı ve M13 pIII proteininde doğal olarak bulunduğu bu yüzden de faj gösteriminde çok iyi tolere edildiği için kullanılır. Bağlayıcı mutasyonlarına dayalı seçim scFv üretimini, stabilitesini ve tanıma özelliklerini etkileyebilir (Tang, 1996). Diabody üretimi, daha kısa bir polipeptit bağlayıcı (5-12 amino asit) ile iki scFv moleküllerinin birleşmesiyle başarılmıştır (Atwell, 1999). Genetik olarak kodlanan alkalen fosfataz (AP) enzim proteininin scFv'ye bir birleşim olduğu bildirilmiştir (Muller, 1999, Mousli, 2007). Antikor fragmentlerinin bu şekilde bağlanması ile direk teşhisi sağlanabilir. Dimerik

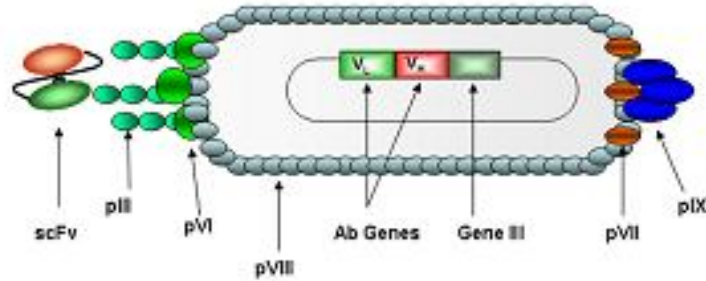
scFv'deki direk deteksiyona yardımcı olan dikkat çekici bir varyasyon AP işaretli scFv'lerden oluşan bir fonksiyonel scFv 'dir (Lindner, 1997).

#### 2.4.1.2. Faj Gösterim Teknolojisi

Faj gösterim protein- protein, protein-peptit, protein DNA etkileşimlerini çalışmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile yabancı proteinler faj yüzeylerinde eksprese edilebilmektedirler. Faj gösterim ilk olarak Smith ve arkadaşları tarafından tanımlandığı 1985 yılından beri antikorlar için kullanılan en geniş seleksiyon platformu olmuştur (Smith, 1985). McCafferty ve arkadaşları bir antikoru büyük kombinasyonel kütüphaneden izole etmişlerdir ve dayanıklı yapısı sebebiyle, faj gösterim antikor izolasyonunun 'iş atı' olmuştur (McCafferty, 1990).

Antikor seleksiyonu metotları immobilize antijen kullanımına dayanır (Barbas, 1991, Schier, 1996). Solüsyondaki antijen kaplı manyetik boncuklar, Biacore<sup>TM</sup> yüzey gösterim hedefleri, memeli hücre kültürü, *in vivo* yaklaşımlar faj gösterimde başarılı bir şekilde uygulanabilir (Nagumo, 2004, Wassaf, 2006, Malmberg, 1996, Schier, 1996, Figini, 1998, Hoogenboom, 1999, Mutuberria, 1999).

Filamentöz faj partikülleri tek zincir DNA (ssDNA) içerirler ve *Escherichia coli* hücrelerini enfekte edebilir. Filamentöz faj (Şekil 2.5.), litik fajın aksine (örneğin T4) konak hücreyi öldürmeden enfekte eder ve çoğalır (Paschke, 2006).



Şekil 2.5. scFv faj gösterimi (Conroy, 2009).

#### 2.4.2. Antikorların Tedavideki Yeri

2010 yılında, 28 teröpatik monoklonal antikorlar FDA((US Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından onaylanmıştır (<http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/about>).

Kabul alan teröpatik antikorların çoğu kanser ve otoimmün hastalıkları için olan antikorlardır (Mousli, 2007). Teröpatik antikorların mekanizmaları çok çeşitlidir ve maddelerin nötralizasyonunu içerir. Bunlara örnek olarak oksinler (Micheli, 2005), tümör nekroz faktör alfa gibi sitokinler, epidermal büyüme faktör reseptörü gibi bloklama reseptörleri gösterilebilir (Lindner, 1997).

Klinik gelişimde bugüne kadar çeşitli antikorlar faj gösterim teknolojisinden üretilmişlerdir (Xu, 2002). Faj gösterim teknolojisinden sağlanan pek çok antikor CAT (Cambridge Antibody Technology) ile üretilmiştir. Bunlara örnek olarak MedImmune, AstraZeneca'nın bir kısmı, Morphosys ve Dyax verilebilir.

Antikor faj gösteriminin avantajı, insan antikorlarının yorucu humanizasyon fare hibridoma teknolojiyle üretilmesi yerine direk izolasyonunun sağlanmasıdır. Belirteç insan antikorları transgenik fareler kullanılarak izole edilebilmesine rağmen antikor jenerasyonu immün sistem tarafından kısıtlanmıştır. Antikor faj gösterimi bu kısıtlamanın önüne geçmektedir. Faj gösterim teknolojiyle seçilen antikorların, daha ileride kolaylıkla stabilite ve afinite optimizasyonları yapılabilir (Tang, 2005). Antikor faj gösterim teknolojisi ile pek çok antikor temelli teröpatikler devamlı gelişme halindedirler (Kim, 2005).

#### **2.4.3. Antikorların Tanıdaki Yeri**

Diagnostikte antikorların kullanımı için üç genel yöntem vardır. Bunlardan ilki antikorlar kullanılarak antijenlerin saptanmasıdır (Winter, 1991). İkincisi antijenleri kullanarak serum antikorlarının tespitidir (Abbott precision, 2007). Üçüncü yol ise rekabet testidir. Bir antikor preparasyonu ile rekabet eden serum antikorları tarafından antijenlerin tespit edilmesi örneği verilebilir (Roche assay, 2008).

Bir antikor rekabet testinin avantajlarından biri tür çeşitliliğine elverişli olmasıdır (Skerra, 1988). Tanı için kullanılan diğer ileri teknolojiler lateral flow strip testleri, Luminex gibi boncuk tabanlı testler, flow sitometri hemaglutinasyon testi ve daha çok son zamanlarda proksimite ligasyon deneyleri veya moleküler görüntüleme yöntemleridir (Plükthun, 1989, Dorai, 1994, Lathrop, 2003, Whitelam 1994, Boder, 1997).

Dikkat çekici bir başka diagnostik yöntem ise antikorlarla birleşmiş faj partiküllerinin tanı için direkt kullanımınıdır (Hanes, 1997). Antikor faj partikülleri immüno-PCR için de kullanılabilir (Azzazy, 2002).

#### **2.5. Belirteç Genler ve Floresan Proteinler**

1980 yılında *LacZ* gen füzyonunun ilk yayınıyla belirteç genler ortaya çıkmışlardır. İlk çalışmalar promotor veya genin özel bir belirteç gen ile basit füzyonuna dayanır. Bunun gibi oluşumlar özel koşullar altında, hücre ya da organ içerisinde promotor aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır.

Belirteç genler ve onların proteinleri, yenilikçi klonlama ve sentetik biyoloji tekniklerinin gelişmesiyle yükselen yeni uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Örneğin, araştırmacılar floresan proteinleri biyofilm formasyonu çalışmak için kullanmış ve biyofilm içerisinde gelişen mikrokanalları bulmuşlardır. Bunun yanı sıra bilimsel çalışmalarda ‘füzyon’ kavramı ortaya çıkmıştır. Genetik NIH ‘nin (National Center for Biotechnology Information) internet sayfasında GFP füzyon ve belirteç füzyon anahtar kelimeleri içeren makale aramalarında erişilen 7000’leri bulan yayın sayısı bu dikkate değer proteinlerin potansiyelini göstermektedir ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)).

Moleküler ve genetik olayların belirlenmesi için  $\beta$ -galaktosidaz (lacZ), firefly lusiferaz (luc), bakteriyel lusiferaz (luxCDABE) ve yeşil floresan protein (GFP) hızlı ve elverişli araçlar olarak geniş çapta kullanılmaktadırlar. Bir belirteç genin kavramı basittir ve biyolojik sistemin içinde kolaylıkla ölçülebilir (Wood, 1995).

Bu şekilde literatürde çok bulunan üç belirteç sistem ve proteinler,  $\beta$ -galaktosidaz, lusiferaz ve floresan proteinlerdir.

**$\beta$ -galaktosidaz (lacZ):** Her ne kadar daha önceki çalışmalar lac operon füzyonlarına odaklanmış olsa da lacZ gen füzyonu bildirim için ilk çalışma 1980 yılında yapılmıştır (Casadaban 1980). Kısa bir süre sonra Lis ve arkadaşları *E.coli*’den lacZ geni ile *Drosophila hsp70* genini organizma içinde ısı şokuna cevap çalışması için birleştirilmişlerdir (Lis, 1983).

Bu belirteçin iki zorlayıcı özelliklerinden ilki çok pahalı olmasıdır. İkincisi ise deneylerde potansiyel toksik kimyasallar olmalarıdır. Ayrıca hücre lizisine neden olur.

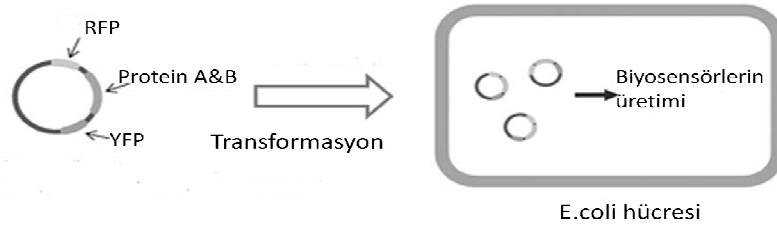
**Lusiferazlar:** Lusiferazlar, biyolojik temelli ışıldanım üreten ve genelde orjinine göre ökaryotik veya prokaryotik olarak kategorize edilen proteinlerdir. 1985 yılında klonlanan firefly lusiferaz (luc) yüksek hassasiyete sahip olması gibi çeşitli sebeplerle en sık kullanılan belirteç genlerinden biridir (de Wet, 1985, Ow, 1986). Luc geni çeşitli organizmalarda gen ekspresyonu modeli çalışmalarında kullanılmaktadır (Brasier, 1989). Luc gen füzyon sistemleri de lacZ belirteç sistemleri gibi deneylerde ek olarak pahalı bir substrata ihtiyaç duyar.

### 2.5.1. Floresan Proteinler:

En iyi bilinen floresan protein GFP (Yeşil Floresan Protein (Green Fluorescent Protein))’dir. GFP proteini ilk olarak *Aequoria victoria* deniz anasından izole edilmiştir (Morin, 1971). Fakat GFP proteinin geni 20 yıl sonrasına kadar klonlanmamıştır. Bu floresan protein hem prokaryotik (*E.coli*) hem de ökaryotik (*Caenorhabditis elegans*) konaklarda fonksiyoneldir. Bu bulgu 2008 yılında Kimya alanında ABD’li bilim adamları

Roger Tsien ve Martin Chalfie ile Japon bilim adamı Osamu Shimomura'ya Nobel ödülü getirmiştir.

Belirteç olarak floresan protein kullanmanın çok sayıda faydası vardır. Bunlar arasında çok sayıda konakçıya uygulanabilirliği, hücre lizisine neden olmaması ve substrat eklemenin gerekli olmayışı faydaları arasında gösterilebilir. Floresan proteinlerinin farklı renklerdeki çeşitleri ticari olarak bulunmaktadır. Floresan proteinler kullanılarak genetik olarak kodlanmış floresan biyosensörlerin oluşumunun bakteri hücresinde genel şematik gösterimi Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



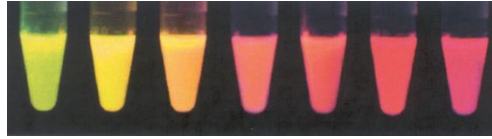
**Şekil 2.6.** Floresan proteinlerin oluşumunun şematik gösterimi (Wang, 2009)

Floresan protein kullanımının faydalarının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Cansız konak içinde fonksiyonel olamayan lusiferazın aksine, floresan proteinler genelde stabil proteinlerdir ve konak öldükten sonra uzun süre floresan yaymaya devam ederler. Bunun yanı sıra GFP, protein oluşumu için doğal bir sürece ihtiyaç duyar. Bu süre iki saati geçebilir. GFP proteininin mutantlarının ise düzenek zamanlarının 5.3 dakikaya düştüğü rapor edilmiştir (Katranidis, 2009).

Daha etkili olan yeni GFP benzeri proteinler, yeşil, sarı, kırmızı proteinlerin ve floresan olmayan kromoproteinlerin klonlanması ile yapılabilir (Labas, 2002, Carter, 2004, Bulina, 2002). GFP benzeri proteinler, Anthozoa ve Hydrozoa sınıflarına ait yaklaşık 200 floresan protein (FP) ve kromoproteinleri içeren ve hızla gelişmekte olan bir ailedir.

GFP benzeri proteinlerin yan kofaktörsüz, enzimsiz veya substratsız ve oksijensiz internal kromofor oluşumu için tanımlanması diğer floresan etiketlere göre büyük avantajdır (Campbell, 2002). Floresan proteinler, protein-protein etkileşimi ve protein-hücre izleme çalışmaları için kantitatif genetik olarak kodlanan imleyicilerden daha geniş çapta kullanılır. Ek olarak, floresan protein çeşitleri farklı kimyasal ve fiziksel özellikler gösterir. *in vivo* uygulamalardaki önemli aşama monomerik varyantları üreten oligomerik DsRed'in yönlendirilmiş mutajenezi tarafından sağlanır. Buna karşın bütün meyve floresan proteinleri monomerik kırmızı floresan proteininin ( mRFP) türevidir.

GFP benzeri proteinler, ahtapot resiflerinin floresan ve floresan olmayan renklendirmesinden sorumludur. Anthozoa türlerinden sağlanan GFP benzeri proteinler, floresan spektra pozisyonları bakımından 3 temel gruba ayrılabilir. Bunlar yeşil (~485–520 nm, Anthozoa GFP), sarı (~540 nm, Anthozoa YFP) ve turuncu-kırmızı (>570 nm, Anthozoa RFP)'dır (Carter, 2004). Bu üç sınıfa ek olarak, çift-renk floresan ( yeşil-kırmızı) ve floresan olmayan CPs bulunmuştur (Bulina, 2002). CPs ışığı verimli absorblayabilmesine rağmen hiç yayamaz.



**Şekil 2.7.** Floresan ışık altında saflaştırılmış floresan proteinler (Shaner, 2005) (Soldan sağa; mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, mCherry.)

Şekil 2.7.'de saflaştırılmış proteinlerin floresan görüntüleri 480 nm'den 560 nm'e uzanan eksitasyon ile çeşitli görüntüleri içerir. Maksimum eksitasyon 584 nm ve maksimum emisyon 607 nm ile DsRed monomerik mutanti mRFP(Kırmızı floresan protein) oluşturulmuştur. Yakın zamanda yeni jenerasyon monomerik kırmızı olan floresan proteinler mRFP1'den oluşturulmuşlardır. Bunlar mOrange, mStrawberry ve mCherry (Shaner, 2004), mRaspberry ve mPlum'dır. (Shaner, 2004, Wang, 2004). Bu proteinler yüksek parlaklık, fotostabilite ve hızlı kromofor maturasyonu ile karakterize edilmişlerdir. Mevcut floresan proteinlerde (FP) çeşitlilik artışı biyolojik görüntüleme için yeni araçların geniş çaplı değişikliğini gösterir (Labas, 2002).

Floresan proteinler sıklıkla floresans rezonan enerji transferi (FRET), foto beyazlatma sonrası floresan iyileştirme gibi teknikler (FRAP) ve floresan yaşam boyu görüntüleme mikroskobu (FLIM) ile kombinasyonda kullanılır (Dixit, 2006, Takanishi, 2006). Son dönemde floresan proteinler tek molekül spektroskopisi ve mikroskobi alanına da girmişlerdir (Dedecker, 2007). Kırmızı floresan olan proteinler özellikle ilgi çekicidirler. Çünkü hücreler ve dokular daha uzun dalga boylarında indirgenmiş otofloresans sergilerler. Ayrıca kırmızı floresan proteinler (RFPs) diğer daha kısa dalga boyundaki floresan proteinler ile hem çok renkli işaretlemeye hem de floresans rezonans enerji transferi için kombinasyon oluşturmada kullanılabilirler.

### **2.5.1.2. Kırmızı Floresan Proteinler**

Yeni floresan proteinler, Anthozoa türlerinden keşfedilmiştir. Bunların içinde kırmızı floresan protein DsRed dikkat çekicidir (Matz, 1998). DsRed maksimum 560 nm



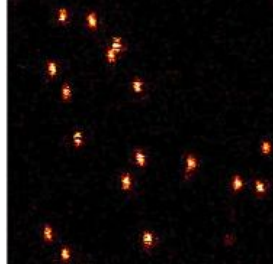
absorpsiyona ve 585 nm emisiyona sahiptir. Daha uzun eksitasyon dalga boyu kullanımından dolayı hücrel otofloresan indirgemedede avantaj sağlar. Bunun yanı sıra yavaş maturasyon, ve oligomerizasyon gibi üstesinden gelinmesi gereken bazı olumsuzluklar bulunmaktadır. Böylece *in vivo* belirteç olarak özellikle tek molekül floresan spektroskopi uygulamalarında verimli kullanılabilir. Bugün bulunan floresan proteinler, DsRed'ten mCherry, mOrange ve mPlum (mFruit floresan protenler) gibi bir dizi yeni çeşitlerinin üretilmesiyle tüm görünen spektrumu içermektedir. (Shaner, 2004, Tsien, 2005).

mCherry üstün fotostabilitesine sahip en iyi kırmızı monomerdir. Onun türediği mRFP1 şu anda kullanılmamaktadır. tdTomato floresan proteini mCherry ile eşit ölçüde fotostabildir. Fakat molekül ağırlığı mCherry'nin iki katıdır. Füzyon etiket ölçüsü, protein fonksiyonlarını etkilemediği sürece kullanılabilir. J-Red ve DsRed-Monomer kullanımı önerilmemektedir. mStrawberry ise en parlak kırmızı monomer olmasına rağmen fotostabilitesi mCherry'den düşüktür. Fotostabilitenin kiritik olduğu durumlarda kullanımından kaçınılması önerilmektedir (Shaner, 2005).

**Çizelge 2.3.** En iyi floresan proteinlerin özellikleri ve mCherry ile karşılaştırılması (Shaner, 2005)

Sınıf	Protein	Eksitasyon (nm)	Emisyon (nm)	Parlaklık	Fotostabilite	pKa	Oligomerizasyon
Far-kırmızı	mPlum	590	649	4.1	53	<4.5	Monomer
Kırmızı	mCherry	587	610	16	96	<4.5	Monomer
	tdTomato	554	581	95	98	4.7	Tandem dimer
	mStrawberry	574	596	26	15	<4.5	Monomer
	J-Red	584	610	8.8	13	5	Dimer
	Ds-Red-monomer	556	586	3.5	16	4.5	Monomer
Turuncu	mOrange	548	562	49	9	6.5	Monomer
	mKO	548	559	31	122	5	Monomer
Sarı-yeşil	mCitrine	516	529	59	49	5.7	Monomer
	Venus	515	528	53	15	6	Zayıf Dimer
	YPet	517	530	80	49	5.6	Zayıf Dimer
	EYFP	514	527	51	60	6.9	Zayıf Dimer
Yeşil	Emerald	487	509	39	0.69 <sup>k</sup>	6	Zayıf Dimer
	EGFP	488	507	34	174	6	Zayıf Dimer
Cyan	CyPet	435	477	18	59	5	Zayıf Dimer
	mCFPm	433	475	13	64	4.7	Monomer
	Cerulean	433	475	27	36	4.7	Zayıf Dimer
	T-Sapphire	399	511	26	25	4.9	Zayıf Dimer

mCherry, bulunan floresan proteinler arasında en düşük floresan kuantum kazancı gösterir. Buna rağmen grup veya tek molekül floresan deneyleri, mCherry'nin tek molekül uygulamaları için ideal bir florofor olduğunu ispat etmektedir. Yüksek fotostabilitesi ve nadir floresan yoğunluk dalgalanma özellikleri bu özelliğini kanıtlar.

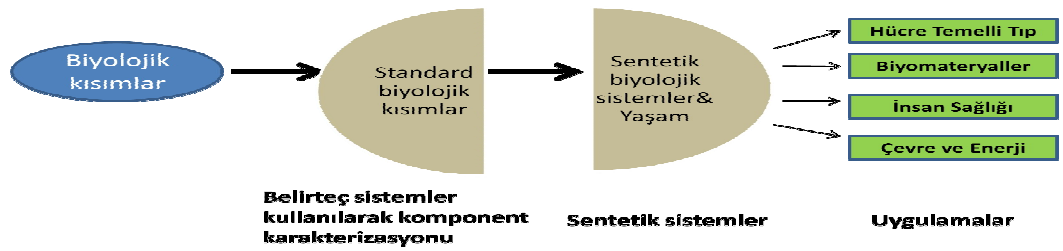


**Şekil 2.8.** mCherry konfokal floresan görüntüsü ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) (Seefeldt 2008)

mCherry, tek molekül floresan görüntüleme şartlarında yüksek fotostabilite ve parlaklık gösterir. Spektral karakteristiği ve 1.46 ns olan kısa floresan ömründen dolayı, mCherry diğer floresan proteinleri tamamlar.

## 2.6. Belirteç Proteinler ve Sentetik Biyolojinin Gelişmesiyle ile Tanıda İleri Yaklaşımlar

Sentetik biyoloji hızla gelişen bir alandır. Belirli bir amaç için tasarlanmış biyolojik komponentlerinin, cihaz ve organizmalarının araştırılmasını içerir. Sentetik biyolojinin nihai amacı insan sağlığı, enerji, çevre ve diğer alanlarda doğal olarak bulunan biyolojik sistemler tarafından çözülemeyen sorunları çözebilecek biyolojik sistemler oluşturmaktır.



**Şekil 2.9.** Sentetik sistemlerin uygulanma alanı

Farklı biyolojik bölümler belirteç sistem aracılığıyla gösterilmektedir. Bu sentetik sistemlere pek çok bilimsel disiplinler başvurur. Bu teknolojinin daha pratik olarak bilimsel ve potansiyel olarak medikal uygulamaları yakın zamanda yayınlanmıştır (Levskaya, 2006). Literatürde hücre içi süreçleri görüntülemek için sarı floresan protein

veya mCherry ile birleştirilmiş hedef proteinler kullanılmıştır ([http://www.clontech.com/upload/images/WP9X2790\\_FP.html](http://www.clontech.com/upload/images/WP9X2790_FP.html)).

Gen füzyon teknolojisi, immunokonjugat belirteci üretimi için alternatif bir yol sunar. Burada antikor ve GFP genetik olarak birleştirilir ve bunu rekombinant ekspresyon takip eder (Shimomura 2005, Cao, 2008, Naumann, 2011). Bu olay kimyasal bağlanma ve kontrollü tam katlanma ile sonuçlanır. Bu antikor fragmentleri (tek zincir variable fragment (scFv)) çoğunlukla GFP veya onun varyantları ile füzyon edilmişlerdir. Bunlar belirteç olarak kullanılmaktadırlar (Casey, 2000, Cao, 2008). Bunun gibi yaklaşımların daha verimli kullanılabilmesi için antikor fragmentlerine ait uygun genlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Rekombinant floresan antikorların elde edilmesi geleneksel immunoassaylerin kolaylaştırılması zamandan kazanım ve modern floresan görüntüleme tekniklerine alternatif yaklaşımların oluşturulmasına olanak sağlamaktadır.

### 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

#### 3.1. GEREÇLER

##### 3.1.1. Araçlar

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan araçlar.

Buzdolabı (+4 <sup>0</sup> C)	Arçelik
Derin Dondurucu (-20 <sup>0</sup> C)	Arçelik
Derin Dondurucular (-80 <sup>0</sup> C)	Arçelik
Güç kaynakları	Bio-rad Power Pac 300 Bio-rad Power Pac Basic
Isı Bloğu	Techne DB 2D
İnkübatör	Innove 4230
Manyetik karıştırıcı	Cole Parmar Instrument Company Model 4658
Otoklav	Sytec-150
ph metre	Hanne 8521
Rötorlar	Beckman JLA 16.250, JA 2550
Sanrifüjler:	Eppendorf 450
	Beckman Ajin
Spektrofotometreler	Beckman DU 730
	Nanodrop ND 1000
Su banyoları	Innova 3100
UV transillüminatör	Bio-rad Gel Doc 200
Vorteks	Scientific Endustry G-560E
ELISA Okuyucusu	Bio-Tech EIA Reader

##### 3.1.2.Oligonukleotid Primerleri

Çalışma boyunca kullanılan oligonukleotid primerleri Çizelge 3.2 ve 3.3’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Lig7 geninin klonlanması için kullanılan oligonükleotit primerler

RLigSall	ATAACAGTCGACCCGTTTTGATTTCCAGCTGGTGCC
FLigKpnI	ATTACTGGTACCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAG

**Çizelge 3.3.** Dizi analizi ve vektör klonlama bölgesi PZR çalışmalarında kullanılan oligonükleotit primerleri

pQE_reverse	GTTCTGAGGTCATTACTGG
pQE_promotor_region	CCCGAAAAGTGCCACCTG

### 3.1.3. Çalışmada Kullanılan Enzimler

**Çizelge 3.4.** Çalışmada kullanılan enzimler

KpnI	Fermentas, ER0521
RNase-A	Fermentas, EN0531
Sall	Fermentas, ER0641
T4 DNA ligaz	Fermentas, ER0014
Taq DNA polimeraz	Fermentas, EP0402

### 3.1.4. Kimyasallar

**Çizelge 3.5.** Çalışmada kullanılan kimyasallar

DNA moleküler markırı	Fermentas, SM0390
DNA moleküler markırı	Fermentas, SM0403
10X Tampon O	Fermentas, BO5
2-β-merkaptoetanol	Biorad
4-N-1-C tablet	Sigma, C-6788
6X Yükleme tamponu	Fermentas, R0611
Agar	Bacto, 214010
Agaroz	Sigma, A-5093
Akrilamit	Biorad, 161-0107
Amonyum persülfat	Biorad, 161-0700
Amonyum Asetat	Sigma, 1542
Ampisilin	Roche, 10 835242001
Bacto Tripton	BD Difko, 211705
Brillant Blue R	Sigma, B019
Commessie Brillant Mavisi	Sigma, B8522
D-Glukoz	Sigma, G8270

DNA molekül büyüklük markırları	Fermentas, SM0383
EDTA	Biorad, 161-0729
Etidyum Bromür	Sigma, E1510
Gliserol	CarloErba, 346165
Glisin	Sigma, G 8889
His-Select Kobat Affinite Jel	Sigma, 8162
Imidazole	Sigma, I5513
IPTG	Fermentas, R0392
Maya ekstraktı	BD Difko, 211929
Metanol	Merck, 106008
N <sup>3</sup> N <sup>3</sup> -bis-metilen-akrilamit	Sigma, 149072
Protein moleküler ağırlık markırlar	Thermo Scientific, 26619
Sitrik asit	Sigma, C2404
Sodyum Dodesil Sulfat	Sigma, L-4390
Temed	Bio-rad, 161-0800
Triton X 100	Sigma, T9284
Trizma Base	Biorad, 161-0731
Tween 20	Sigma, 1379
Üre	Biorad, 1610731
Talon Afinite Metal Afinite Resin	Clontech, 635502
Bis-akrilamid	Biorad, 161-0201
Kalsiyum Klorür	Sigma , 1016

### 3.1.5. Tamponlar ve Solüsyonlar

#### 3.1.5.1. Bakteri Büyümesi için Kullanılan Besiyerleri

*E.coli* JM 109 ve DH5 $\alpha$  bakteri büyümesi için besiyerleri aşağıdaki belirtilmiştir.

2XTY Besiyeri :

16.0 gr tripton (Bacto)

10.0 gr maya özütü

5.0 gr NaCl

Distile su ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C'ta 30 dakika sterilize edildi.

Sıvı LB Besiyeri :

10.0 gr tripton (Bacto)

5.0 gr maya özütü

10.0 gr NaCl

Distile su ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C'ta 30 dakika sterilize edildi.

Petri kabı için LB/ Ampisilin/ Agar besiyeri :

10.0 gr tripton (Bacto)

5.0 gr maya özütü

10.0 gr NaCl

15 .0 gr Agar

Distile su ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 121°C'ta 30 dakika sterilize edildi.

Ilık haldeyken 100 µg/ml'sinde olacak şekilde ampisilin ilave edildi ve petri kaplarına döküldü.

**3.1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu( PZR) için Stok Solüsyonlar**

10X PZR Buffer

MgCl<sub>2</sub>

Deoksiribonükleotit karışım

**3.1.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi Stok Solüsyonları**

TAE 50X Tamponu

242 gr Tris base, 57.1 ml Glasiyal Asetik asit; 100 ml 0.5 M EDTA ilave edildi ve pH=8.3'e ayarlanarak 1 litreye tamamlandı

%1 ve %1.2 Agaroz Jel Hazırlanması:

%1'lik jel için 1 gram, %1.2'lik jel için 1.2 gram agaroz tartılır. 50 ml 1X TAE tamponuna eklenir ve 0.5 µg/ml etidyum bromür ilave edilir.

**3.1.5.4. Enzim Kesiminde Kullanılan Tamponlar**

10X Kpn I Enzimi Tamponu

10X Sal I Enzimi Tamponu

10X T4 DNA Ligaz Tamponu

**3.1.5.5. Plazmit DNA İzolasyonu için Kullanılan Ticari Kit**

'High Pure Plasmid Isolation Kit' (Roche Applied Science, Katalog no: 11 754 777 001) kullanılmıştır.

### 3.1.5.6. Bakteri Hücrelerinin Lizisi için Kullanılan Tamponlar

#### B Tamponu:

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.8 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (M.A. 137.99 g/mol)

10 mM Tris.Cl 1.2 gr Trizma (M.A. 121.1 g/mol)

8M Üre 480.5 gr (M.A. 60.06 g/mol)

Toplam hacim 1 litreye tamamlanır. NaOH kullanılarak pH: 8'e ayarlanır.

### 3.1.5.7. Ni Affinite Kromotografisi için Kullanılan Tamponlar

His Select Cobalt Afinitite jeli proteinleri denatüre koşullar altında saflaştırmak için kullanıldı. Denatüre koşulların kullanılmasından dolayı protein önce 8 M üre ile çözüldü. Afinitite jel ile deneye başlamadan önce denatüre hücre ekstraktının pH'sının 7.0 -8.0 aralığında olmasına dikkat edildi. Üre içeren tamponlar günlük olarak taze hazırlandı. Üre denatüre sistemi için kullanılan tamponlar aşağıda belirtilmiştir:

#### Dengeleme/Yıkama Tamponu:

0.1 M Sodyum fosfat pH 8.0

8 M Üre

#### Elüsyon Tamponu:

0.1 M Sodyum Fosfat, pH 8.0

8 M Üre

250 mM İmidazol

### 3.1.5.8. SDS Poliakrilamit Jel Elektrofrezinde Kullanılan Stok Solüsyonlar

#### SDS- Yükleme Tamponu:

Distile su 4.80 ml

0.5 M Tris-HCl, pH:6.8 1.00 ml

Gliserol 0.80 ml

% 20 SDS 0.80 ml

2-β-merkaptotanol 0.40 ml

% 0.05 bromofenol mavisi 0.20 ml

#### 5X SDS Elektrofrez Tamponu:

Tris baz 9.0 gr



Glisin 43.2 gr

SDS 3.0 gr

Toplam hacim 600 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

SDS-PAGE Stok Solüsyonları:

%30 Akrilamit/Bisakrilamit solüsyonu (300 ml) :

87.5 gr akrilamit

2.4 gr N'N'-bis-metilen-akrilamit

Toplam hacim 300 ml'ye distile su ile tamamlandı. Hazırlanan solüsyon Whatman 3MM ile filtre edildikten sonra karanlıkta +4°C' de saklandı.

4X Tris-HCl/SDS, pH:8.8 (1.5M Tris-HCl, 0.4% SDS) :

18.2 gr Tris baz yaklaşık 40 ml distile suda çözüldükten sonra 1N HCl kullanılarak pH: 8.8'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml' ye distile su ile tamamlandı. Solüsyon 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 0.4 gr SDS ilave edilerek + 4°C'ta saklandı.

4X Tris-HCl, pH:6.8 (0.5M Tris-HCl, 0.4% SDS) :

6.05 gr Tris baz yaklaşık 40 ml distile suda çözüldükten sonra 1N HCl kullanılarak pH: 6.8'e ayarlandı ve toplam hacim 100 ml' ye distile su ile tamamlandı. Solüsyon 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 0.4 gr SDS ilave edilerek + 4°C'ta saklandı.

%20 SDS :

20 gr SDS 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

Boyama Çözeltisi ( Coomassie Blue):

% 10 asetik asit

% 0.1 Coomassie Blue R

% 50 Metanol

Aritma Çözeltisi:

% 7 asetik asit

% 10 metanol

### **3.1.5.9. Western Blot Analizi Tampon ve Solüsyonları**

#### SEMI-DRY Transfer Tamponu :

3.03 g Tris

14.4 g Glisin

200 ml Metanol toplam hacim 1000 ml olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı.

10X PBS

80 g NaCl

2 g KCl

14.4 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 700 ml distile suya ilave edilip çözüldükten sonra 1 litreye tamamlandı.

#### 1X PBS:

100 ml 10 X PBS distile suyla total hacim 1 litre olacak şekilde tamamlandı ve iyice karıştırıldı.

#### Bloklama Tamponu:

4 g Yağsız Süt tozu 90 ml 1X PBS içine ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra hacim 100ml'ye 1xPBS ile tamamlandı.

#### Yıkama Tamponu:

100 ml 1X PBS içine 50µl Tween-20 ilave edilip karıştırıldı.

#### Triethanolamine Tamponu:

7.5 g NaCl ve 2.8 ml ml triethanolamine 800 ml dH<sub>2</sub>O ya ilave edildi ve konsantre HCl ile pH'sı 7.5'a ayarlandı. Daha sonra hacim 1 litreye tamamlandı.

#### 4-kloro 1-Naftol substrat solüsyonu:

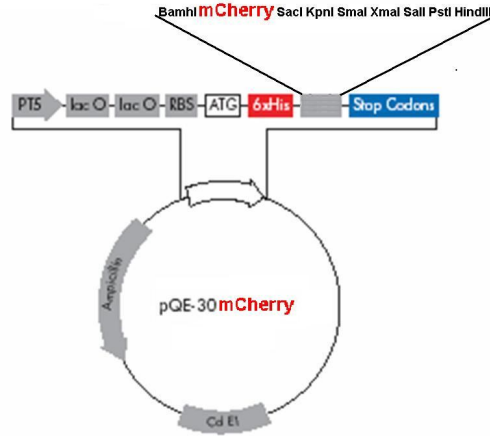
Stok 4-C-1-N solüsyonu: 1 adet 4-C-N tableti ( 30 mg/tablet; Sigma Katolog no, C-6788)

10 ml metanol içinde çözüldü.

12 ml çalışma substrat solüsyonu: 2 ml 4-C-1-N stok solüsyonu ve 50 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi 10 ml triethanolamin tamponuna ilave edildi.

### 3.1.6. Ekspresyon Vektörü

Bu çalışmada *Ekspresyon vektörü* olarak 6x *His-tag* dizisi ve *mCherry* floresan protein geni içeren pQE30 vektörü kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Ekspresyon vektörü pQE30 mCherry

### 3.1.7. PZR Ürününün Kolon Safılaştırması

“High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche Applied Science, Katalog no: 11732668001) kullanılmıştır.

## 3.2. YÖNTEMLER

### 3.2.1. Lig7 scFv geninin pQE30 vektörüne klonlanması

#### 3.2.1.1. Lig7 scFv geninin PZR ile Çoğaltılması

Lig7 scFv geni , 500 µL'lik mikrosantrifüj tüplerinin içine , buz üstünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdakiler sırasıyla eklendi.

- 35 µl dH<sub>2</sub>O
- 5 µl Tag Buffer (10X)
- 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25Mm)
- 1 µl dNTP / 10 mM her birinden

- 2 µl primer KpnI ( 10 pmol/µl)
- 2 µl primer Sall (10 pmol/ µl)
- 2 µl kalıp DNA (Lig7)
- 1 µl Tag DNA polimeraz

50 µl = Toplam hacim

500 µl'lik mikrosantrifüj tüpler ısıl döngü cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki ısı döngü programı uygulandı.

94°C'ta 5 dakika ön denatürasyon	}	X30
94°C' de 1 dakika denatürleme		
55°C' de 2 dakika tutunma		
72°C' de 2 dakika sentez		
72°C'de 10 dakika tamamlama reaksiyon		

PZR işleminden sonra ürünleri kontrol etmek amacıyla %1.2 'lik agaroz jel hazırlandı. 1.2 gr Agar tartıldı ve 100 µl 5X TAE çözeltisine eklendi. Mikrodalga fırında kaynatılarak eritildi. Eridikten sonra 60°C'ye kadar soğutuldu ve final konsantrasyonu 0.3 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik etidyum bromürden 3 µl eklendi. Tarak yerleştirilmiş ve su terazisiyle dengelenmiş kasetin içine jel döküldü ve donması beklendi. İlk kuyucuğa 5 µl DNA markır yüklendi. 5 µl PZR ürünü , 2 µl 6X jel yükleme tamponuyla karıştırıldı ve kuyulara yüklendi. Örnekler 0.5X TAE çözeltisi içinde 80 V'da 50 dakika yürütüldükten sonra UV ışığı altında incelendi. İstenilen bant görülen örnekler ileriki çalışmalar için -20 °C 'de muhafaza edildi.

### 3.2.1.2. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Klonlama ve DNA dizi analizi gibi çalışmalarda kalıp DNA'nın arındırılması deneylerin iyi sonuç vermesi açısından önemlidir. PZR ürünleri alkol çöktürmesiyle temizlenmiştir. Deney yöntemi aşağıdaki gibidir.

- PZR ürünleri 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı.
- Eppendorf tüpü içine 450 µl -20 °C % 95 alkol (Merck, Germany) eklendi.
- Üzerine 4.5 µl NaOH ilave edilerek -20°C'de bir gece bekletildi
- Bekleme süresi sonunda örnekler 12.000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı.
- Pellet -20°C % 70'lik alkol ile 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı.

### 3.2.1.3. Saflaştırılmış PZR Ürünlerinin Agoraz Jel Elektroforeziyle Analizi

Alkol çöktürmesiyle saflaştırma sonucunda ürün miktarını görebilmek için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için yukarıda bahsedildiği gibi % 1.2 'lik agaroz jel döküldü. Bant büyüklüğünü görebilmek için ilk kuyuya 5 µl low marker yüklendi. 5 µl saflaştırılmış PZR ürünü 2 µl jel yükleme tamponuyla karıştırıldı. Diğer her bir kuyucuğa 7 µl örnek yüklendi. Örnekler 0.5X TAE tamponu içinde 80 Volt uygulanarak 45-50 dakika yürütüldü. Jel UV ışık altında incelendi ve PZR ürünlerinin saflaştırma sonrası nitel kalitesi hakkında bilgi sahibi olundu.

#### PZR Ürünlerinin Nicel Olarak Belirlenmesi:

Alkol çöktürmesiyle saflaştırma sonucunda elimizde kalan DNA miktarının belirlenmesi için spektrofotometrik ölçüm yapıldı. ND-1000 Nanodrop 260 nm dalga boyunda yapılan ölçümde PZR ürünlerinin ortalama 120 ng/ µl olduğu görüldü.



Şekil 3.2. ND-1000 Nanodrop Spektrofotometre

### 3.2.2. Klonlama Çalışmasında Kullanılacak Vektörün Çoğaltılması Amacıyla Transformasyon Çalışması

Sırasıyla *E. coli* DH5α ve *E. Coli* JM109 kompetant hücrelerine CaCl<sub>2</sub> Yöntemi ile pQE30mCherry vektörü transformasyonu aşağıdaki gibi yapıldı.

- Ayrı iki cam tüpte 1000 ng (pQE30-mCherry vektörü (ticari) steril 50mM Tris pH 7.2 ile 50µl'ye tamamlandı. Steril cam kültür tüpüne aktarıldılar.
- Steril 50mM Tris pH 7.2 ile 50µl'ye tamamlanmış vektör bulunan camlar tüplerden birinin üzerine hazırlanmış olan 300 µl'lik kompetan *E.coli* DH5α hücresi, diğerinin üzerine hazırlanmış olan 300 µl'lik JM 109 hücresi eklenerek karıştırıldı ve buz içerisinde 40-60 dakika bekletildi.
- Bu süre sonunda tüpler 42°C'a ayarlanmış su banyosunda 3 dakika bekletildi.

- Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp içeriğine 1 ml LB besi yeri eklendi ve 37°C'ta 220 rpm de 30-60 dakika çalkalandı.
- Bekletme süresi sonunda her LB/ Ampisilin (100µg/ml)/ Agar petri kabı için 150 µl alınarak yayımlar yapıldı ve gece boyu 37°C'ta bekletildi.
- Geri kalan bölüm 50 ml sıvı LB/ Ampisilin (100µg/ml) besi yerine aktarılarak 37°C'ta 220 rpm'de gece boyu çalkalandı.

### **3.2.3. Lig7 scFv geninin pQE30mCherry Ekspresyon Vektörüne Klonlanması**

#### **3.2.3.1. Lig7 scFv PZR Fragmentinin ve Plazmit pQE30mCherry'nin Restriksiyon Enzimleriyle Kesim Reaksiyonu**

Restriksiyon enzim kesimi iki aşamalı olarak uygulandı. Lig7 scFv PZR fragmenti ve plazmid pQE30mCherry ayrı tüplerde eş zamanı olarak iki farklı restriksiyon endonükleaz ile kesime tabi tutuldu.

İlk olarak aşağıda belirtilen malzemeler 0.5 ml'lik eppendorf tüplerine yerleştirildi. KpnI enzimi en son eklendi.

##### Kpn I Kesim Reaksiyonu:

1.5 µg kesim ürünü üzerine ;

4 µl 10x KpnI enzim tamponu

1 µl enzim (10 u/µl)

Distile su ile 40 µl'ye tamamlandı.

Tüpün içeriği karıştırılarak 37°C'a ayarlanmış ısı bloğunda 4 saat inkübe edildi. Kesim sonrasında örnekler -20°C'ye kaldırıldı. Daha sonra kesilmiş örneklerin 5 µl'si agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Geri kalan 35 µl SalI kesimi için kullanıldı.

##### Sal I Kesim Reaksiyonu:

35 µl Kpn I kesim ürünü üzerine, 4 µl O tamponu 1µl Sal I enzimi ilave edildi ve distile su ile 40 µl'ye tamamlandı. Sal I enzimi en son eklendi ve tüpün içeriği karıştırılarak 37°C'a ayarlanmış ısı bloğunda gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesim ürünleri 95°C'de 5 dakika tutularak enzimlerin inaktive olması sağlandı

#### **3.2.3.2. Restriksiyon Endonükleazlarla kesilmiş PZR ürünü ve pQE30 vektörünün saflaştırılması**

İki kesim yapılmış PZR fragmenti ve pQE30 plazmidinin saflaştırılması için High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche Applied Science, Katalog no: 11732668001) kullanıldı. Aşağıda yazıldığı gibi, ticari kitin protokolü uygulandı;

- Saflaştırılmak istenen örnekler 100 µl'ye steril su ile tamamlandı ve üzerlerine 500 µl “Bağlama Tamponu” ilave edildi ve örnekler karıştırıldı.
- 2 ml'lik toplama tüpleri içerisine filtreli kolonlar yerleştirildi.
- Örnekler filtreli kolonlara aktarıldıktan sonra 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Filtreli kolon / toplama tüpü sistemi 13,000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüplerinde toplanmış olan sıvı dökülerek uzaklaştırıldı.
- Yıkamalar için, kolona 500 µl “Yıkama Tamponu” ilave edildi ve 1 dakika boyunca 13,000 rpm'de tüpler santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri boşaltıldıktan sonra kolona 200 µl yıkama solüsyonundan ilave edildi. Tüpler 13,000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüpleri boşaltıldı.
- Kolonlar, 1,5 ml'lik temiz eppendorf tüpülerine aktarıldıktan sonra membranın ortasına gelecek şekilde 50 µl “Elüsyon Tamponu” ilave edildi ve 13,000 rpm'de 1 dakika boyunca kolonlar santrifüj edildi.
- Kolonlar atıldı, eppendorf tüpünde toplanmış olan DNA solüsyonundan 2 µl alındı ve %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

### 3.2.3.3. PZR Fragmentinin ve pQE30 mCherry Plazmidinin Ligasyonu

T4 DNA Ligaz enzimi, çift iplikli iki DNA molekülünde yan yana gelen 5' fosfat grubu ile 3' hidroksil grubunun fosfodiester bağı ile birleştirilmesini katalizleyen bir enzimdir. Ligasyon reaksiyonunun belirlenmesinde en önemli faktör, vektör ile içerisine takılacak olan DNA parçasının (insert) oranıdır. Vektör / insert oranı 1:3 olarak belirlendikten sonra konulacak insert miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Insert (ng)} = (\text{insert} / \text{vektör}) \times \frac{\text{Vektör (ng)} \times \text{Insert (kb)}}{\text{Vektör (kb)}}$$

Reaksiyona girmesi gereken insert miktarı <http://www.gibthon.org/ligate.html> sayfasında bulunan hesaplama kısmına, belirlenen insert oranı ve ligasyon girecek insert ve vektör boyu (kb) yazılarak hesaplandı. Bu bilgiler ışığında, PZR aracılığı ile çoğaltılıp KpnI ve Sall restriksiyon enzimleri ile kesilen gen parçası ile aynı enzimlerle kesilmiş olan plazmit kesim ürünleri aşağıdaki tabloya göre ligasyona alındı:

**Çizelge 3.6.** Ligasyon reaksiyonu

	1 numaralı deney tüpü	2 numaralı deney tüpü
10xLigasyon tamponu	2µl	2µl
İnsert (Lig7 scFv)	12µl	14.7µl
Vektör	5µl	2.5µl
Saf su	0	0
T4 DNA Ligaz enzimi	1µl	1µl
Toplam hacim	20µl	20µl

### 3.2.4. CaCl<sub>2</sub> Yöntemiyle Transformasyon

Ligasyon ürünlerinin *E. Coli* JM109 bakteri strainine CaCl<sub>2</sub> Yöntemi ile transformasyonu yapıldı.

1) Ligasyon karışımı steril 50mM Tris pH 7.2 ile 50µl'ye tamamlandı Steril cam kültür tüpüne aktarıldı.

2) Ligasyon karışımı üzerine hazırlanmış olan 300 µl'lik kompetan *E.coli* hücresi eklenerek karıştırıldı ve buz içerisinde 40 dakika bekletildi.

3) Bu süre sonunda tüpler 42°C'a ayarlanmış su banyosunda 3 dakika bekletildi.

Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tüp içeriğine 1 ml LB besi yeri eklendi ve 37°C'ta 220 rpm'de 60 dakika çalkalandı.

4) Bekletme süresi sonunda her LB/ Ampisilin (100µg/ml)/ Agar petri kabı için 200 µl alınarak yayımlar yapıldı ve gece boyu 37°C'ta bekletildi.

5) Geri kalan bölüm 50 ml sıvı LB/ Ampisilin (100µg/ml) besi yerine aktarılarak 37°C'ta 220 rpm'de gece boyu çalkalandı.

### 3.2.5. Plazmit pQE30mCherry'nin lig7 scFv genini içerdiğinin doğrulanması

#### 3.2.5.1. Transforme olan bakteri kültüründen Plazmit DNA izolasyonu

Hedef geni taşıdığı düşünülen *E. Coli* JM109 bakterisi ,100 µg/ml. ampisilin içeren 5 ml LB besiyerinde 37°C'de gece boyu büyütüldü. 'High Pure Plasmid Isolation Kit' ile aşağıdaki protokol uygulanarak bakterilerden plazmit elde edildi.

- 3 ml *E.coli* kültürü 30 saniye 9000 rpm'de santrifüj edildi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldı.
- Pellet 250 µl suspensiyon tamponu/RNAaz ile çözüldü.
- 250 µl lizis tamponu eklendi.



- Yavaşça karıştırıldı, 5 dakika buz üstünde inkübe edildi. Maksimum hızda 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Pellet uzaklaştırıldı.
- Supernatant High Pure Filtre tüpüne alındı, maksimum hızda 30-60 sn santrifüj edildi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldı. 500 µl Yıkama Tamponu I eklendi.
- 13,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 700 µl Yıkama Tamponu II eklendi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 13,000 x g'de 1 dakika fazladan santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı.
- 100 µl Elüsyon Tamponu eklendi
- Plazmid DNA elde edilmiş olundu.

### 3.2.5.2. Plazmit DNA'nın Sall kesimi ve KpnI enzimleriyle kesim reaksiyonu

Transformasyon sonrası elde edilen bakteri kolonilerinin DNA düzeyinde kontrolüne yönelik kullanılan metodlardan biri olan koloni PZR yöntemiyle transformasyon sonrası seçici LB/Agar plate üzerinde oluşan kolonilerden, koloni PZR işlemi aşağıdaki deney yöntemiyle gerçekleştirildi.

1) 0,5 ml'lik eppendorf tüpü içerisine 15 µl distile su konuldu.

2) LB/Amp içeren agarlı petri kabında büyüyen kolonilere özenin ucu ile dokunularak bir miktar bakteri hücresi alınır ve 1. aşamada hazırlanan tüpteki su ile karıştırılır.

### 3.2.5.3. Koloni PZR

Tüp, 95°C'ta 3 dakika bekletildikten sonra santrifüjlenerek aşağıdaki şekilde hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonu karışımında kalıp olarak kullanılır

1) 0,5 ml'lik eppendorf tüpü içerisine 15 µl distile su konulur.

2) LB/Amp içeren agarlı petride büyümüş olan kolonilere özenin ucu ile dokunularak bir miktar bakteri hücresi alınır ve 1. aşamada hazırlanan tüpteki su ile karıştırılır.

Tüp, 95°C'ta 3 dakika bekletildikten sonra santrifüjlenerek aşağıdaki şekilde hazırlanan polimeraz zincir reaksiyonu karışımında kalıp olarak kullanılır.

10 X Taq tampon	: 2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	: 1.5 µl
dNTP (10 mM/Herbiri)	: 0.5 µl

5' primer (10 pmol/ $\mu$ l)	: 1 $\mu$ l
3' primer (10 pmol/ $\mu$ l)	: 1 $\mu$ l
DNA kalıbı	: 2 $\mu$ l
Taq polimeraz (1 u/ $\mu$ l)	: 0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	:16 $\mu$ l
Toplam	: 25 $\mu$ l

### 3.2.5.4.DNA Dizileme Çalışması için pQE30 Plazmit PZR Amplifikasyonu

Dizi analizi reaksiyonları GenomeLab™ “Dye Terminator Cycle Sequencing” kiti kullanılarak hazırlanır. Reaksiyon sonuçları CEQ 8800 Dye Terminator cycle sequencing otomatik dizi analiz sistemi ile analiz edilir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. CEQ 8800 Dye Terminator otomatik dizi analiz sistemi

Önkarışımın Hazırlanması	
10X dizileme reaksiyonu tamponu	200 $\mu$ l
dNTP karışımı	100 $\mu$ l
ddUTP boya sonlandırıcı	200 $\mu$ l
ddGTP boya sonlandırıcı	100 $\mu$ l
ddCTP boya sonlandırıcı	200 $\mu$ l
ddATP boya sonlandırıcı	200 $\mu$ l
polimeraz enzimi	100 $\mu$ l

Hazırlanan karışım her bir tüpte 180 µl olacak şekilde PCR tüplerine paylaşılır ve -20 °C'de saklandı.

#### Dizileme Reaksiyonunun Hazırlanması

PCR reaksiyonu 0.2 ml'lik ince cepheli PCR tüpü içinde hazırlandı. Bütün solüsyonlar buz üzerinde tutuldu. Reaksiyon solüsyonu aşağıdaki sıraya göre hazırlandı:

H <sub>2</sub> O	x,x	µl
DNA kalıbı	0.5 - 7.0	µl
(ss DNA için son konsantrasyon 50 fmol)		
-96 Sekanslama primeri	2.0	µl
(1.6 pmol/µl)		
Önkarışım	11.0	µl
Toplam	20.0	µl

Reaksiyon tüpü iyice karıştırıldı, kısa süreli santrifüj edildi. Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleştirilmesi için tüp ısısal döngü (PZR) cihazına yerleştirildi.

#### Dizileme PZR Sıcaklık Döngüsü Programı:

96°C 20 saniye	}	30 döngü
50°C 20 saniye		
60°C 4 dakika		

Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda PZR ürünleri alkol ile çöktürüldü.

#### PZR Reaksiyonlarının Alkol Çöktürmesi:

- Her örnek için 0.5 ml'lik tüp hazırlandı.
- Herbir tüpe taze hazırlanmış durdurma solüsyonu/glikojen karışımından (3M Sodyum Asetat'tan (pH 5.2) 2 µl, 100mM Na<sub>2</sub>-EDTA'dan (pH 8.0) 2 µl ve 20mg/ml Glikojen'den 5 µl eklendi. Dizileme reaksiyonu üzerine eklendi.

- 60 µl soğuk (-20°C) %95'lik etanol eklenir ve karıştırılır. Karışım hemen 14000rpm'de +4C<sup>0</sup>'de 15 dakika santrifüj edilir.
- Üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet iki kez %70'lik soğuk (-20°C) etanol ile yıkandı. Her yıkama için etanol koyulduğu an en az 2 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edildi. Son yıkamada üst sıvı uzaklaştırıldı ve pellet vakumlu 10 dakika kurutmaya alındı.
- Pellet kit içerisinde bulunan 40 µl örnek yükleme solüsyonu ile çözüldü.
- Örnekler CEQ 8800 cihazı için uygun olan ELISA playti kuyularına aktarıldı. Kuyuların üzerine mineral yağ damlatıldı. Playt cihaza yerleştirilir ve CEQ8800 LFRa programı ile analiz yapıldı.

### 3.2.6. Transforme Bakterilerin Uzun Süre Stoklanması

pQE30mCherryLig7 plazmidini içeren *E. Coli* JM109 hücreleri bütün gece LB/amp sıvı besiyerinde büyütüldü. Büyüyen bakterilerin 300 µl'si 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alındı. Üzerlerine 300 µl %60'lık gliserol eklenip homojen olana kadar karıştırıldı ve -80<sup>0</sup>C'de saklandı.

### 3.2.7. mCherry lig7 Geninin Ekspresyonu

Pozitif klonların protein halinde ekspresyonu için bakteriyel vektöre klonlanmış olan hedef genin protein ürününün kimyasal uyarıcı (IPTG) vasıtasıyla ekspresyonu sağlandı. Uygulanan deney yöntemi aşağıda belirtilmiştir.

- 1) Hedef geni taşıyan *E.coli* bakterisi, 100 µg/ml. ampisilin ve %2 glükoz içeren 5 ml 2XTY besiyerinde 30°C'ta gece boyu büyütüldü.
- 2) Gece boyu büyüyen kültürden 1/100 seyrelti olacak şekilde 100 µg/ml ampisilin içeren 5 ml 2XTY besiyerine ekim yapıldı. OD<sub>600</sub> 0,6 oluncaya kadar 37°C'ta çalkalanarak büyütüldü.
- 3) OD<sub>600</sub> nm değeri 0.6'ya ulaşan örnekler, 4000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet, 100 µg/ml ampisilin ve son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG içeren 5 ml 2XTY besiyeriyle çözüldükten sonra 30°C'ta 250 rpm de 4 saat-gece boyu inkübe edildi.
- 4) İndüksiyonun kontrolünün SDS-PAGE poliakrilamit jel elektroforezinde yapılması için indüksiyon kültürünün OD<sub>600</sub> değerine bakıldıktan sonra aşağıdaki hesaba göre alikotlar hazırlandı. Bu alikotlar 5 dakika 4000 rpm'de santrifüjlendikten sonra üst sıvı atıldı ve pelletler -20°C'ta saklandı.

$$\text{Alikot miktarı} = \frac{500 \times 0.3}{\text{OD600 değeri}}$$

5) Geri kalan indüksiyon kültürü 8000 rpm'de 15 dak. boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant ve bakteri pelleti ayrı tüplerde toplandı. Bakteri pelleti, SDS-PAGE analizi ve rekombinant protein saflaştırma işleminde kullanılabileceği kadar -70°C'ta muhafaza edildi.

### 3.2.8. mCherry Lig7 Rekombinant Proteinin Ni-Afinite Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

İlgilenilen rekombinant protein için yüksek miktarda saflaştırmadan önce, çalışılacak uygun durumları belirlemek için deneme miktarı deneyi ( $\leq 1$  mg hedef protein) uygulanmıştı. Aşağıda belirtilen bütün deney adımları oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

1. 50  $\mu$ l HIS-Select Kobalt Afinite Jeli süspansiyonu mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 5,000'g de 30 saniye santrifüj edildi.

2. Üst sıvı dikkatlice alındı ve uzaklaştırıldı.

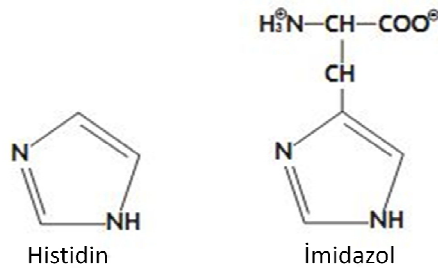
3. 200  $\mu$ l dengeleme tamponu eklendi ve iyice karıştırıldı.

4. 30 saniye 5,000 g hızda santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı.

5. 100  $\mu$ l saf rekombinant protein solüsyonu eklendi ve yavaşça 1 dakika karıştırıldı. Karışım 4. adımdaki gibi santrifüj edildi ve üst sıvı saklandı.

6. Afinite jel 2 kere 500  $\mu$ l yıkama tamponuyla yıkandı. Afinite jel 10 saniye yavaşça karıştırıldı, sonra 30 saniye 5.000 g'de santrifüj edildi. Yıkama tampon solüsyonu analiz etmek için saklandı.

7. Hedef protein 50  $\mu$ l elüsyon tamponunda çözöldü. Tampon afinite jele eklendi ve iyice karıştırıldı.



Şekil 3.4. Histidin ve imidazolün kimyasal yapısı

8. 30 saniye 5.000 g'de santrifüj edildi.

9. Bütün fraksiyonlar SDS-PAGE ve Western Blot analizleri için saklandı.

### 3.2.9. mCherryLig7 füzyon proteininin SDS PAGE Jel Elektroforezi ve Western Blot Analizi

#### 3.2.9.1. mCherryLig7 füzyon proteininin SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi

Rekombinant proteine ait indüksiyon kontrolü için iki katmanlı denatüre poliakrilamit jel elektroforezinden yararlanıldı. Çalışmamız sırasında Mini-PROTEAN (BIO-RAD) elektroforez sisteminde kullandığımız SDS-PAGE jelleri aşağıdaki tablo değerlerine göre hazırlandı.

#### Ayrırma Jeli:

%12'lik Akrilamit jel hazırlanışı:

%30 Akrilamit, %0.8 Bis-Akrilamit	6.0 ml
4X 1.5M Tris-HCl (pH=8.8) ; %0.4 SDS	3.75 ml
dH <sub>2</sub> O	5.25 ml
%10 Ammonium persülfat *	100 µl
TEMED	10 µl

\* % 10 APS =100ml distile suda 10 gr APS çözüldü.

1) %12'lik ayırma jeli hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına, üstten 0.5 cm. boşluk kalacak şekilde doldurulduktan sonra üzeri hava ile temasını kesmek için N-bütanol ile kapatıldı.

2) Jel polimerize olduktan sonra N-bütanol uzaklaştırılarak jelin üst tabakası distile su ile yıkandı.

#### Konsantrasyon Jeli:

%4'lük Akrilamit jel hazırlanışı

%30 Akrilamit, %0.8 Bis-Akrilamit	670 µl
4X 0.5M Tris-HCl pH=6.8/ % 0.4 SDS	1225 µl
dH <sub>2</sub> O	3076 µl
%10 Ammonium persülfat	40 µl
TEMED	4 µl

1) Yukarıdaki şekilde hazırlanan %4'lük konsantrasyon jeli (stacking gel) cam levhaların üzerinde kalan boşluğa doldurulduktan sonra kuyuların oluşumunu sağlamak üzere tarak yerleştirildi.

2) 1 saat süre ile jelin polimerizasyonunun tamamlaması beklenildi.

3) Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartılarak, jelleri taşıyan parça elektroforez tankına yerleştirildi ve tank SDS-PAGE elektroforez tamponu ile dolduruldu.

4) Hedef gen ürününün indüksiyonunun kontrolü için hazırlanmış olan bakteri pelletleri 30 µl yükleme tamponu ile çözüldü, 95°C'ta 3 dakika bekletilerek proteinlerin denatürlenmesi sağlandıktan sonra kısa süreli bir santrifüj yapıldı ve 6 µl'si kuyuya yüklendi. Ayrıca, gece boyu indüksiyon kültürüne ait üst sıvı örneğinden 26 µl alınıp 6µl yükleme tamponu ilave edilerek karıştırıldı. 95°C'ta 3 dakika bekletilerek proteinlerin denatürlenmesi sağlandıktan sonra kısa süreli bir santrifüj yapıldı ve 12 µl'si kuyuya yüklendi.

5) Sisteme sabit olarak 100 Volt verilerek elektroforez işlemi başlatıldı. 10 dakika sonra voltaj 120 Volta çıkarıldı ve elektroforez 50 dakika boyunca sürdürüldü.

#### Coomassie Blue ile Proteinlerin Boyanması

Coomassie Brilliant Blue ile boyamada proteinler glasiyel asetik asit ile jele fikse edilerek boyandı ve boyama işleminden sonra jeldeki fazla boya arıtma solüsyonu ile uzaklaştırıldı

#### Semidry Transfer:

Elektroforez işlemi bittiğinde hedef bantların immunblot işleminde kullanılabilmesi için SDS-PAGE jelinde yer alan protein bantların bir membrana aktarıldı. Aşağıdaki deney yöntemi uygulandı.

1) Transferde kullanılacak olan membran ve 4 adet 3MM kağıdı transfer tamponuyla ıslatıldı.

2) 2 adet 3MM filtre kağıdı üzerine membran yerleştirildi.

3) Membranın üzerine poliakrilamit jel konularak, diğer iki 3 MM membran ile jel kaplandı.

4) Bu aşamalar gerçekleştirilirken yuvarlak cam cubuklar vasıtasıyla bastırılarak, her adımda hava kabarcıklarının uzaklaştırılması sağlandı.

5) Kapaklar kapatıldıktan sonra 10 V' ta 50 dakika, transfer gerçekleştirildi.

### 3.2.9.2. mCherryLig7 füzyon proteininin Western Blot Analizi

Bir protein karışımı içerisinde bulunan belirli bir proteinin varlığının ve moleküler ağırlığının kontrolü için gerçekleştirilen bu çalışmada örnekler, proteinlerin boylarına göre ayrılması için poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) yürütüldükten sonra ayrılmış olan proteinler elektrik akımı ile nitroselüloz membrana aktarıldı. Bu aşamadan sonra immün blotlama aşağıda belirtilmiş deney yöntemine göre uygulandı.

1. Transfer sonrası proteinlerin bağlı bulunduğu nitroselüloz membran 1.5 saat %4'lük süt tozu ve %0.1'lik Tween-20 içeren PBS çözeltisi (bloklama çözeltisi) içerisinde çalkalanmaya bırakıldı.
2. Bu süre sonunda membran 3 kez, %0.1 Tween-20 içeren PBS ile 5 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkandı.
3. Membran, bloklama çözeltisi ile seyreltilmiş olan anti HIS tag fare monoklonal antikor (birincil antikor) solüsyonu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı.
4. Bu süre sonunda membran 3 kez, %0.1 Tween 20 içeren PBS ile 5 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkandı.
5. Bu süre sonunda membran 3 kere, %0.1 Tween 20 içeren PBS ile 1 kere de sadece PBS ile 5 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkandı.
6. Yıkama işleminden sonra membran 4-C-1-N substrat solüsyonu içine yerleştirildi ve mavi renk oluşuncaya kadar beklendi.
7. Renk oluşuktan sonra membran dH<sub>2</sub>O ile çalkalandı ve reaksiyon durduruldu.

### 3.2.10. ELISA

Bir protein karışımı içerisinde bulunan belirli bir proteinin varlığının kalitatif ve kantitatif kontrolü için gerçekleştirilen bir çalışmadır.

1. ELISA kuyucuklarına 100 µl HBsAg içeren kaplama tamponu ile gece boyu +4°C de kaplanmaya bırakıldı. Ertesi gün ELISA plate kuyucukları 3 kere 200 µl TPBS ile yıkandı. Yıkanan kuyulara 200 µl bloklama tamponu konularak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
2. Kuyucuklar 3 kere TPBS ile yıkandıktan sonra her örnek için duplike çalışılarak kuyulara 100 µl BSA, mCherry, mCherry lig7 ve pozitif kontrol lig7 ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.



3. Kuyucuklar 6 kere TPBS ile yıkandıktan sonra 100 µl bloklama tamponu içerisinde seyreltilmiş ekspresyon ürününe karşı geliştirilmiş fare monoklonal antikor solüsyonu ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
4. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyondan sonra kuyular 6 kez TPBS ile yıkandı.
5. Yıkanan her bir kuyuya ikincil antikor solüsyonu (bloklama çözeltisi ile seyreltilmiş (1:1000) olan anti-fare antikor /HRP konjüгатı) ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
6. Kuyucuklar 6 kere TPBS ile yıkandıktan sonra renk reaksiyonunun oluşması için herbir kuyuya 100 µl ABTS substrat solüsyonu ilave edildi. Bir saat oda ısısında inkübe edildikten sonra ELISA okuyucusunda (Bio-Tech EIA Reader) OD: 405 nm değerleri tespit edildi.

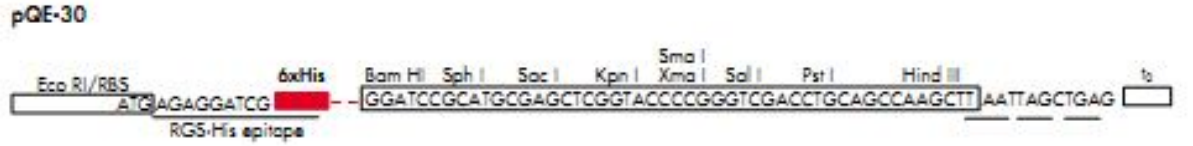
## 4. BULGULAR

### 4.1. Klonlama Stratejisi

*E.coli*'de pQE vektörleri kullanılarak 6XHis-tag proteinlerinin yüksek miktarda ekspresyonu T5 promotor transkripsiyon-translasyon sistemine dayanır. pQE plazmidleri pDS plazmit ailesine aittir (Bujard, 1997). pDS56/RBSII ve pDS781/RBSII-DHFRS plazmidlerinden türemiştir (Stüber, 1990).

Bu tez çalışmasında ekspresyon vektörü olarak 6x His-tag dizisi ve mCherry floresan protein geni içeren içeren pQE30 plazmidi kullanılmıştır. pQE30mCherry olarak adlandırılmıştır.

pQE30 vektörünün klonlama bölgesi şekil 4.1'de gösterildiği gibidir. Çalışmamızda kullanacağımız pQE30 vektöründen geliştirilmiş pQE30mCherry plazmidinin klonlama bölgesi Şekil 4.2. 'de gösterilmiştir.



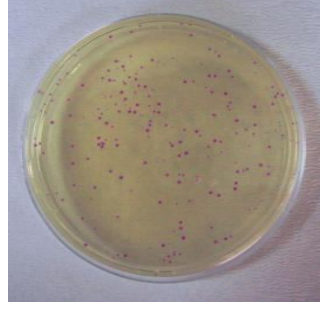
Şekil 4.1. pQE-30 vektörünün klonlama bölgesi



Şekil 4.2. pQE30mCherry vektörünün klonlama bölgesi

### 4.2. pQE30-mCherry Ekspresyon Vektörünü Çoğaltmak Amacıyla Yapılan Transformasyon Sonuçları

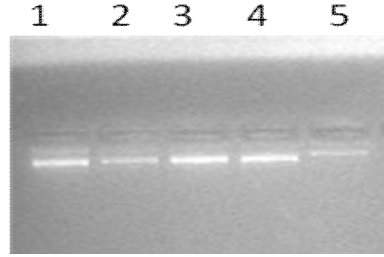
Yüksek miktarda plazmit elde etmek için pQE30-mCherry plazmidi JM109 bakteri soyuna transformasyon yapılmıştır. PQE30mCherry vektörünün transformasyonu sonucunda bakteriler büyümüş ve pembe renkte koloniler elde edilmiştir (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Transformasyon sonrası bakteri kolonileri

#### **4.2.1. *E.coli* JM109 Bakteri Sıvı Kültüründen Plazmit İzolasyonu Sonuçları**

LB/amp sıvı besiyerinde gece boyu büyütülen pQE30-mCherry ekspresyon vektörü ‘High Pure Plasmid Isolation Kit’(11 754 777 001) ile izole edilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen plazmitler agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Transformasyon sonrası bakteri kültüründen izole elden pQE30mCherry ‘nin %1’lik agaroz jelde görüntüsü. **1,2,3,4,5:** pQE30mCherry vektörü

#### **4.3. Çalışmada Kullanılacak Restriksiyon Endonukleaz Enzimlerinin Seçimi ve Primer Dizaynı**

Çalışmamızda pQE30mCherry vektörü kullanılmıştır. pQE30 mCherry vektörü ile lig7 scFv ligasyonu için ekspresyon vektörünün çoklu kesim bölgesinde yer alan enzimlerden lig7’nin baz dizilimi içinde kesim bölgesi olmayan enzimler sekansları SDSC Biology Workbench web sitesinde ( <http://workbench.sdsc.edu>) kullanılarak seçilmiştir.

Şekil 4.1’de gösterilmiş olan pQE30mCherry ekspresyon vektöründe enzim kesim bölgeleri bulunan restriksiyon enzimlerinden sadece PstI enziminin kesim bölgesinin lig7 sekansında bulunduğu görülmüştür. BamHI enzim kesimiyle mCherry sekansı kaybedileceği için pQE30 mCherry plazmitinde kesim yerleri bulunan diğer restriksiyon enzimleri arasından KpnI ve Sall enzimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. (Şekil 4.5) Sall enzimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

PstI

\

1 atggcccaggtgcagctgcaggagtcagggggagccttagtgaagcctggagggtccctg  
60  
taccgggtccacgtcgacgtcctcagtcctcccccctcggaatcacttcggacctcccaggac  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 M A Q V Q L Q E S G G A L V K P G G S L  
2 W P R C S C R S Q G E P \* \* S L E G P \*  
3 G P G A A A G V R G S L S E A W R V P E  
4 H G L H L Q L L \* P S G \* H L R S P G Q  
5 I A W T C S C S D P P A K T F G P P D R  
6 S P G P A A A P T L P L R L S A Q L T G

61 aaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtaactatgccatgtcttgggttcgc  
120  
tttgagaggacacgtcggagacctaagtgaaagtcattgatcggtagacaaccaagcg  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 K L S C A A S G F T F S N Y A M S W V R  
2 N S P V Q P L D S L S V T M P C L G F A  
3 T L L C S L W I H F Q \* L C H V L G S P  
4 F E G T C G R S E S E T V I G H R P N A  
5 F S E Q A A E P N V K L L \* A M D Q T R  
6 S V R R H L R Q I \* K \* Y S H W T K P E

121 cagactccagagaagaggctggagtggtcgcagccattaataataatgggtgtagtacc  
180  
gtctgaggtctcttctccgacctcaccagcgtcggtaattattattaccaccatcatgg  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 Q T P E K R L E W V A A I N N N G G S T  
2 R L Q R R G W S G S Q P L I I M V V V P  
3 D S R E E A G V G R S H \* \* \* W W \* Y L  
4 L S W L L P Q L P D C G N I I I T T T G  
5 W V G S F L S S H T A A M L L L P P L V  
6 G S E L S S A P T P R L W \* Y Y H H Y Y

181 tactatccagacactgtgaaggaccgattcaccatctccagagacaatgtcaagaacacc  
240  
atgataggctctgtgacacttcctggctaagtggtagaggtctctgttacagttcttggg  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 Y Y P D T V K D R F T I S R D N V K N T  
2 T I Q T L \* R T D S P S P E T M S R T P  
3 L S R H C E G P I H H L Q R Q C Q E H P  
4 V I W V S H L V S E G D G S V I D L V G  
5 \* \* G S V T F S R N V M E L S L T L F V  
6 R S D L C Q S P G I \* W R W L C H \* S C

241 ctatatctgcaaatgaggagtctgaggctctgaggacacagccgtgtattattgtgtaaga  
300 gatatagacgtttactcctcagactccagactcctgtgtcggcacataataacacattct  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 L Y L Q M R S L R S E D T A V Y Y C V R  
2 Y I C K \* G V \* G L R T Q P C I I V \* D  
3 I S A N E E S E V \* G H S R V L L C K T  
4 \* I Q L H P T Q P R L V C G H I I T Y S  
5 R Y R C I L L R L D S S V A T Y \* Q T L  
6 G I D A F S S D S T Q P C L R T N N H L

301 cagtggagctgggctgactactggggccaaggcaccacggtcaccgtctcctcaggtgga  
360 gtcacctcgacccgactgatgaccccggttcctgtggcagtgccagaggagtccacct  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 Q W S W A D Y W G Q G T T V T V S S G G  
2 S G A G L T T G A K A P R S P S P Q V E  
3 V E L G \* L L G P R H H G H R L L R W R  
4 L P A P S V V P A L A G R D G D G \* T S  
5 C H L Q A S \* Q P W P V V T V T E E P P  
6 V T S S P Q S S P G L C W P \* R R R L H

361 ggccggttcaggcggaggtggctctggcgggtggcggatcggacatcgagctcactcagtct  
420 ccgccaagtccgcctccaccgagaccgccaccgcctagcctgtagctcgagtgagtcaga  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 G G S G G G S G G G G S D I E L T Q S  
2 A V Q A E V A L A V A D R T S S S L S L  
3 R F R R R W L W R W R I G H R A H S V S  
4 A T \* A S T A R A T A S R V D L E S L R  
5 P P E P P P P E P P P P D S M S S V \* D  
6 L R N L R L H S Q R H R I P C R A \* E T

421 ccagcctccctatctgtctctgtgggagagactgtcaccatcacatgtcgagcaagtgaa  
480 ggtcggagggatagacagagacaccctctctgacagtggtagtgtacagctcgttcactt  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E  
2 Q P P Y L S L W E R L S P S H V E Q V K  
3 S L P I C L C G R D C H H H M S S K \* K  
4 W G G \* R D R H S L S D G D C T S C T F  
5 G A E R D T E T P S V T V M V H R A L S  
6 E L R G I Q R Q P L S Q \* W \* M D L L H

481 aatattttccgtagtttagcatggtatcagcagaaacagggaaaatctcctcaactcctg  
540 ttataaaaggcatcaaactgtagctgctctttgtcccttttagaggagttgaggac  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 N I F R S L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L  
2 I F S V V \* H G I S R N R E N L L N S W  
3 Y F P \* F S M V S A E T G K I S S T P G  
4 I N E T T \* C P I L L F L S F R R L E Q  
5 F I K R L K A H Y \* C F C P F D G \* S R  
6 F Y K G Y N L M T D A S V P F I E E V G

541 gtctacgatgcaacaaacttagcagatggtgtgtcatcaaggttcagtgaggatgatca  
600 cagatgctacggttgaatcgtctaccacacagtagttccaagtcaccgacacctagt  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 V Y D A T N L A D G V S S R F S G S G S  
2 S T M Q Q T \* Q M V C H Q G S V A V D Q  
3 L R C N K L S R W C V I K V Q W Q W I R  
4 D V I C C V \* C I T H \* \* P E T A T S \*  
5 T \* S A V F K A S P T D D L N L P L P D  
6 P R R H L L S L L H H T M L T \* H C H I

PstI  
\

601 ggacacagttttccctcaagatccacagcctgagctctggagattttgggacttattac  
660 ccggtgtgtcaaaagggagttctaggtgtcggacgtcagacctctaaaaccctgaataatg  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 G T Q F S L K I H S L Q S G D F G T Y Y  
2 A H S F P S R S T A C S L E I L G L I T  
3 H T V F P Q D P Q P A V W R F W D L L L  
4 A C L K G E L D V A Q L R S I K P S I V  
5 P V C N E R L I W L R C D P S K P V \* \*  
6 L C V T K G \* S G C G A T Q L N Q S K N

661 tgtcaacatttttgggtactccgtggacgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaa  
720 acagttgtaaaaaccccatgaggcactgcaagccacctccgtggttcgaccttttagttt  
^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 C Q H F W G T P W T F G G G T K L E I K  
2 V N I F G V L R G R S V E A P S W K S N  
3 S T F L G Y S V D V R W R H Q A G N Q T  
4 T L M K P T S R P R E T S A G L Q F D F  
5 Q \* C K Q P V G H V N P P P V L S S I L  
6 S D V N K P Y E T S T R H L C W A P F \*

721 cgg  
780 gcc ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \* ^ \*  
1 R  
2 G  
3 D  
4 P  
5 R  
6 V

**Şekil 4.5.** Lig7 scFv'nin baz dizisinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerin kesim bölgeleri kırmızıyla gösterilmiştir.

Lig7 (Anti-HBsAg) geninin pQE30mCherry vektörü ile moleküler klonlama çalışması için uygun primerler, seçilen enzimler doğrultusunda sekansları SDSC Biology Workbench web sitesi (<http://workbench.sdsc.edu>) kullanılarak dizayn edilmiştir. Bu ön ve ters primerler FLig7KpnI ve RLig7Sall olarak isimlendirilmişlerdir. 6X His-Tag baz dizilimi vektörde yukarıda bulunduğu için primer dizaynında kullanılmamıştır. mCherry floresan proteini kodlayan bölgeyi içeren pQE30 vektörü bitirme kodonu sekansı içerdiği için dizayn edilen primerde bitiş kodunu yer almamaktadır (Şekil 4.6).

**1- FLig7KpnI : 5'-ATT ACT GGT ACC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG- 3'**

1 2 3 4

**2- RLig7Sall: 5'-ATA ACA GTC GAC CCG TTT TGA TTT CCA GCT GGT GCC-3'**

1 2 3

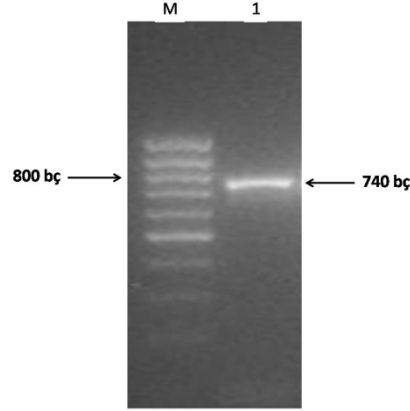
**Şekil 4.6.** Çalışmamızda kullanılan restriksiyon enzim kesim yerlerini içeren oligonükleotit primerler.

**4.6.1 : FLig7KpnI** Başarılı enzim kesimi için 6 bç uzunluğundaki kuyruk bölgesi, 2: KpnI kesim bölgesi, 3: Başlangıç kodonu, 4: Devamındaki baz dizilimi lig7 geninin başlangıcı ile uyumludur.

**4.6.2 : RLig7Sall** Başarılı enzim kesimi için 6 bç uzunluğundaki kuyruk bölgesi 2: Sall enzim kesim bölgesi, 3: 6XHis-Tag kodlama bölgesi, 4: Geri kalan baz dizilimi lig7 geninin sonundaki baz sırası ile uyumludur.

#### 4.4. Lig7 scFv Geninin PZR ile çoğaltılması

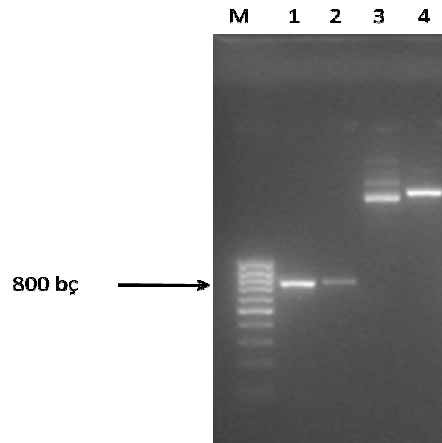
Lig7 rekombinant antikoru spesifik olarak dizayn edilen primerler ile PZR çalışmasıyla çoğaltıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Beklenen 740 b byklğindeki bant agaroz jelde görüntülendi.



Şekil 4.7. PZR ile oğaltılmış olan lig7 scFv geninin % 1.2’lik agaroz jel görüntüsü M.Markır (Fermentas #SM0383),1. Lig7 scFv geni

#### 4.5. pQE30mCherry Ekspresyon Vektrnnn ve Lig7 scFv’nin Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi

FLig7KpnI ve RLig7Sall primerleriyle amplifiye edilen PZR fragmenti ve pQE30mCherry vektörü KpnI ve Sall enzimleri ile kesim reaksiyonuna alınmıştır. Enzim kesimi sonuçları %1.2’lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. PZR fragmenti ve 6XHis-tag ekspresyon vektrnnn KpnI ve Sall kesim sonuçlarının % 1.2’lik agaroz jelde görüntüsü. 1: Markır (Fermentas #SM0383)2: PZR fragmenti kontrol 3: PZR fragmenti restriksiyon enzim kesimi sonrası 4: Restriksiyon enzim reaksiyonuna girmemiş yabanıl pQE30mCherry vektörü



Restriksiyon enzim kesimi sonrası Lig7 PZR ürünü Şekil 4.9’da gösterilmiştir. Restriksiyon enzim kesimi sonrası pQE30mCherry vektörü pQE30mCherry vektörü ve lig7 rekombinant antikoru geni Sall enzimi ile kesim reaksiyonu sonunda alkol çöktürmesiyle saflaştırılmışlardır. Saflaştırılan bu örneklerin OD<sub>260</sub> değerleri nanodropta ölçülmüştür. Ayrıca örneklerin protein kontaminasyonunu gösteren 260/280 oranı ve organik kimyasal kontaminasyonunu gösteren 260/230 oranı değerleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Çizelge 4.1.).

**Çizelge 4.1.** Örneklerin kesim reaksiyonu sonrası nanodrop ölçüm değerleri

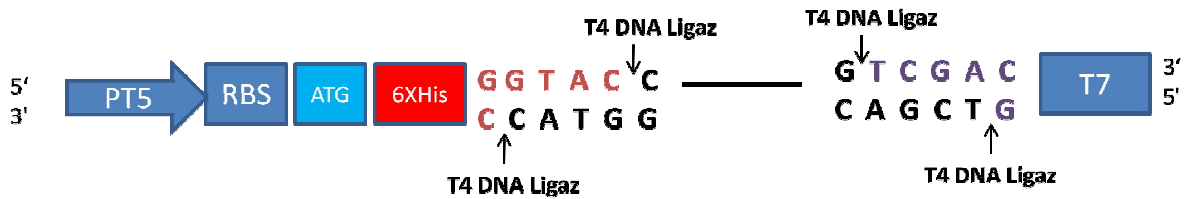
Örnekler	260/280	260/230	Miktar(ng/µl)
pQE30 mCherry kesim	1.55	1.17	16.1
Lig7 KpnI Sall kesim	0.60	0.23	4.2



**Şekil 4.9.** Restriksiyon kesimi sonrası lig7 PZR ürünü

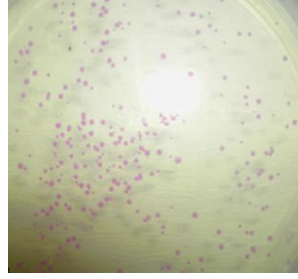
#### 4.6. Moleküler Klonlama (Ligasyon ) ve Transformasyon Sonucu Transforme Olmuş Bakterilerin Seçimi

KpnI ve Sall enzimleriyle kesilen pQE30mCherry vektörü ile FLig7KpnI ve RLig7Sall primer çifti kullanılarak amplifiye olmuş PZR fragmenti, T4 DNA ligaz enzimiyle ligasyon reaksiyonuna girmiştir.



**Şekil 4.10.** pQE30mCherrylig7 oluşumu için moleküler klonlama stratejisi

Ligasyon ürünü *E.Coli* JM109 bakteri hücrelerine transforme edilmiştir ve pembe renkte koloniler görülmüştür (Şekil 4.11.).

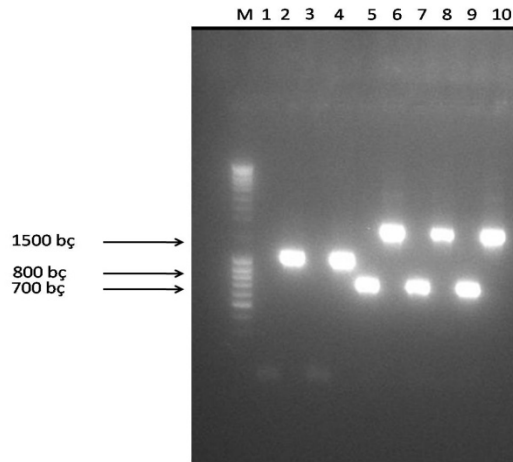


Şekil 4.11. Transformasyon sonrası elde edilen bakteri kolonilerinin görünümü.

#### 4.7. Lig7 geninin pQE30mCherry vektörüne klonlandığının doğrulanması

##### 4.7.1. Koloni PZR

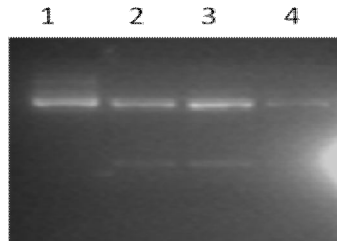
Transformasyondan sonra elde edilen pozitif koloniler arasından seçilen 5 tane koloniye koloni PZR çalışması yapılmıştır. %1.2'lik agaroz jelde lig7 kodlayan genin vektör içine insersiyonu görülmüştür. (Şekil 4.12)



Şekil 4.12. FKpnI ve RSaII primerleri ile pQE30 vektör primerleri ön ve ters vektör primerleri ile koloni PZR agaroz jel görüntüsü; **M**, DNA moleküler ağırlık markırı, **1, 2, 3,4**, pQE30 mCherry lig7 rekombinant antikoru içermeyen koloniler, **5,6** pQE30 mCherry lig7 içeren 1. koloninin sırasıyla spesifik olarak dizayn edilmiş lig7 primerleri ve pQE30 vektör primerleriyle yapılan PZR sonucu. **7,8**, pQE30mCherry lig7 içeren 2. koloninin sırasıyla spesifik olarak dizayn edilmiş lig7 primerleri ve pQE30 vektör primerleriyle yapılan PZR sonucu. **9,10**, pQE30 mCherry lig7 içeren 3. koloninin sırasıyla spesifik olarak dizayn edilmiş lig7 primerleri ve pQE30 vektör primerleriyle yapılan PZR sonucu

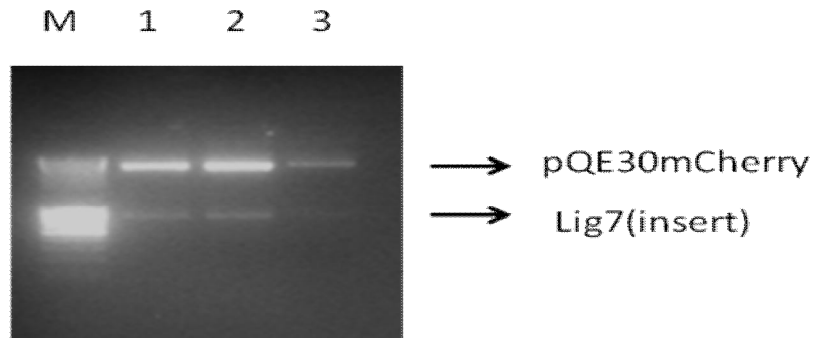
#### 4.7.2. Koloni PZR ve Geriye Dönük Restriksiyon Enzim Kesimi ile Moleküler Klonlamanın Doğrulanması

Koloni PZR sonuçları ile doğruladığımız lig7 genini içeren 3,4,5 numaralı bakteri kolonileri ampisilin içeren LB sıvı besi ortamında gece boyu büyütülmüştür. Bu sıvı kültürden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Her üç kolonide elde edilen plazmit DNA moleküler klonlama öncesi yapılan restriksiyon enzim kesimi reaksiyonuna alınmıştır. Bu üç koloninin ilk olarak Sall enzim kesimi yapılmıştır. Sonuç %1.2'lik agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** 3.4.5 numaralı bakteri kolonilerine ait plazmit DNA'nın Sall kesim sonucu **1.** pQE30mCherry plazmidi,**2.** 3 no'lu plazmit DNA'sının Sall restriksiyon enzimi ile kesimi, **3.** 4 no'lu plazmit DNA'sının Sall restriksiyon enzimi ile kesimi, **4.** 5 no'lu plazmit DNA'sının Sall restriksiyon enzimi ile kesimi

Üç pozitif bakteri koloni plazmit DNA'sı Sall restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonundan sonra KpnI restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonuna alınmıştır. Enzim kesimi sonuçları %1.2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. (Şekil 4.14)



**Şekil 4.14.** Moleküler klonlama doğrulanması amacıyla üç pozitif koloniye ait plazmit DNA'nın iki restriksiyon enzim ile kesimi sonucu: **M**:(Fermentas #S0403),**1:** 3 no'lu plazmit DNA Sall ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu,**2:** 4 no'lu plazmit DNA Sall ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu,**3:** 5. Koloni Sall ve KpnI restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu

Koloni PZR ve moleküler klonlama öncesi reaksiyona aldığımız restriksiyon enzimleriyle kesim sonuçlarında elde ettiğimiz fragmentler moleküler klonlamayı doğrulayan ilk sonuçları göstermiş. Bu sonuçlar doğrultusunda DNA dizi analizine gidilmiştir.

## 4.8. DNA Dizi Analizi Bulguları

### 4.8.1. Geliştirilmek istenilen füzyon proteine ait beklenen aminoasit dizilimi ve DNA sekansı.

Şekil 4.15.'te mCherry'ye ait aminoasit dizisi kırmızı, lig7 scFv'ye ait aminoasitler dizisi mavi, pQE30 plazmitine ait aminoasit dizisi yeşil ile gösterilmiştir

```
1 M R G S H H H H H H G S M V S K G E E D 60
atgagaggatcgcacatcaccatcaccatcacggatccatggtagcaagggcgaggaggat
61 N M A I I K E F M R F K V H M E G S V N 120
aacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtagcagatggaggggtccgtgaac
121 G H E F E I E G E G E G R P Y E G T Q T 180
ggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggcgccctacgagggcaccagacc
181 A K L K V T K G G P L P F A W D I L S P 240
gccaagtggaagtgaccaagggtagcccttcgctgggacatcctgtccct
241 Q F M Y G S K A Y V K H P A D I P D Y L 300
cagttcatgtacggctccaaggctacgtgaagcaccgcccgcacatccccgactacttg
301 K L S F P E G F K W E R V M N F E D G G 360
aagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggggc
361 V V T V T Q D S S L Q D G E F I Y K V K 420
gtggtagccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtagg
421 L R G T N F P S D G P V M Q K K T M G W 480
ctgcgaggcaccacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgg
481 E A S S E R M Y P E D G A L K G E I K Q 540
gaggcctcctccgagcggatgtaccccaggacggcgcctgaagggcgagatcaagcag
541 R L K L K D G G H Y D A E V K T T Y K A 600
aggctgaagctgaaggacggcggcactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggcc
601 K K P V Q L P G A Y N V N I K L D I T S 660
aagaagcccgtgcagctgcccggcgctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcc
661 H N E D Y T I V E Q Y E R A E G R H S T 720
cacaacgaggactacaccatcgtggaacagtagcgaacgcgcccagggccgcccactccacc
721 G G M D E L Y K E L G T M A Q V Q L Q E 780
ggggcattggacgagctgtacaaggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagc
781 S G G A L V K P G G S L K L S C A A S G 840
tcagggggagccttagtgaagcctggagggctccctgaaactcctcctgtgcagcctctgga
841 F T F S N Y A M S W V R Q T P E K R L E 900
ttcactttcagtaactatgccatgtccttgggttcgccagactccagagaagaggctggag
901 W V A A I N N N G G S T Y Y P D T V K D 960
tgggtcgcagccattaataataatggtagtagtacctactatccagacactgtgaaggac
961 R F T I S R D N V K N T L Y L Q M R S L 1020
cgattcaccatctccagagacaatgtcaagaacaccctatatctgcaaatgaggagtctg
1021 R S E D T A V Y Y C V R Q W S W A D Y W 1080
aggtctgaggacacagccgtgtattattgtgtaagacagtgaggctgggctgactactgg
1081 G Q G T T V T V S S G G G G S G G G S 1140
ggccaaggcaccacggtcaccgtctcctcaggtggagggcgggttcaggcggaggtggctct
1141 G G G G S D I E L T Q S P A S L S V S V 1200
ggcggtagggcggatcggacatcgagctcactcagtcctccagcctccctatctgtctctgtg
1201 G E T V T I T C R A S E N I F R S L A W 1260
ggagagactgtcaccatcaccatgtcagagcaagtgaaaatattttccgtagtttagcatgg
1261 Y Q Q Q K Q K S P Q A L L V Y D A T N L A 1320
tatcagcagaaaacagggaaaatctcctcaactcctgggtctacgatgcaaaaacttagca
1321 D G V S S R F S G S G S G T Q F S L K I 1380
gatggtagtgcacatcaaggttcagtgagcagtgatcaggcacacagtttccctcaagatc
1381 H S L Q S G D F G T Y Y C Q H F W G T P 1440
cacagcctgcagctcggagattttgggacttattactgtcaacatttttgggtagtccg
1441 W T F G G G T K L E I K R V D L Q Q P S 1500
tggacgttcggtaggagcaccacagctggaatcaaagcggtagcagcagccaagc
L I S
```

1501 ttaattagctg 1511

**Şekil 4.15.** Çalışmamız sonucunda geliştirilmek istenilen füzyon proteinine ait beklenen aminoasit dizilimi ve gen sekansı

#### 4.8.2. Beklenen mCherry-Lig7 DNA sekansının, Elde Edilen DNA Dizi analizi sonucuyla karşılaştırılması

mCherryLig7'nin beklenen sekansı ile klon sekansının karşılaştırılması aşağıda karşılaştırılmıştır (Şekil 4.16)

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig          ATGAGAGGATCGCA
mcherry_lig7_sekanslama
ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGAGAGGATCGCA
*****
```

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
TCACCATCACCATCACGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA
mcherry_lig7_sekanslama
TCACCATCACCATCACGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACA
*****
```

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
TGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCC
mcherry_lig7_sekanslama
TGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCC
*****
```

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
GTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTA
mcherry_lig7_sekanslama
GTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTA
*****
```

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
CGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGC
mcherry_lig7_sekanslama
CGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGC
*****
```

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
CCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCC
mcherry_lig7_sekanslama
CCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCC
*****
```

```
mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
TACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCC
mcherry_lig7_sekanslama
TACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCC
*****
```

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
CGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
CGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
TGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
TGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
GTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAA  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
GTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAA  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
GAAGACCATGGGCTGGGAGGCCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
GAAGACCATGGGCTGGGAGGCCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
GCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGC  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
GCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGC  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
CACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCA  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
CACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCA  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
GCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACA  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
GCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACA  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
ACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCAC  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
ACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCAC  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
TCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAGCTCGGTACCATGGCCCA  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
TCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAGCTCGGTACCATGGCCCA  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
GGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCC  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
GGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGGAGCCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCC  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
TGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAAGTATGCCATG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
TGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAAGTATGCCATG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
TCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCCAGCCAT  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
TCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCCAGCCAT  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
TAATAATAATGGTGGTAGTACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGACCGAT  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
TAATAATAATGGTGGTAGTACCTACTATCCAGACACTGTGAAGGACCGAT  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
TCACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAAATGAGG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
TCACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTATATCTGCAAATGAGG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
AGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCGTGTATTATTGTGTAAGACAGTGGAG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
AGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCGTGTATTATTGTGTAAGACAGTGGAG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
CTGGGCTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
CTGGGCTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
GAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAG  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
GAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAG  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
CTCACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTCTCTGTGGGAGAGACTGTCAC  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
CTCACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTCTCTGTGGGAGAGACTGTCAC  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
CATCACATGTCGAGCAAGTGAAAATATTTTCCGTAGTTTAGCATGGTATC  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
CATCACATGTCGAGCAAGTGAAAATATTTTCCGTAGTTTAGCATGGTATC  
\*\*\*\*\*

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig  
AGCAGAAAACAGGGAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTACGATGCAACAAAC  
mcherry\_lig7\_sekanslama  
AGCAGAAAACAGGGAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTACGATGCAACAAAC  
\*\*\*\*\*

```

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
TTAGCAGATGGTGTGTCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACA
mcherry_lig7_sekanslama
TTAGCAGATGGTGTGTCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACA
*****

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
GTTTTCCCTCAAGATCCACAGCCTGCAGTCTGGAGATTTTGGGACTTATT
mcherry_lig7_sekanslama
GTTTTCCCTCAAGATCCACAGCCTGCAGTCTGGAGATTTTGGGACTTATT
*****

mCherry-kpnsalIkesimyeri-lig
ACTGTCAACATTTTTGGGGTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAG
mcherry_lig7_sekanslama
ACTGTCAACATTTTTGGGGTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAG
*****

CTGGAATCAAACGGGTCGACTCTGCAGCAGCCAAGCTTAATTAGCTG
mcherry_lig7_sekanslama
CTGGAATCAAACGGGTCGACTCTG-----
*****

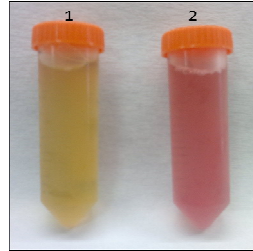
```

**Şekil 4.16.** mCherrylig7'nin beklenen sekansı ile klon sekansının karşılaştırılması

#### 4.9. mCherry-Lig7 Geninin *E.Coli* JM109 Hücrelerinde Ekspresyonu

Bu çalışmada mCherryLig7 geninin ekspresyonu için *E.coli* JM109 hücreleri kullanılmıştır. IPTG varlığında rekombinant mCherryLig7 rekombinant antikorunun ekspresyonu *E.coli* JM109 hücrelerinde indüklenmiştir.

Kontrol olarak JM109 hücrelerine lig7 içermeyen pQE30-mCherry plazmiti transforme edilmiştir. Şekil 4.17'de IPTG ile indüksiyon sonrası besiyerleri görülmektedir.

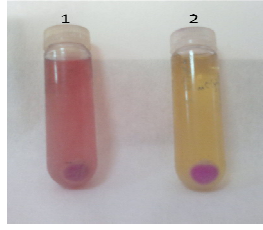


**Şekil 4.17.** IPTG ile indüksiyon sonra besiyerlerinin görünümü

**Şekil 4.17. 1 numaralı falkon:** IPTG ile gece boyu indüksiyon sonrası pQE-30mCherrylig7 plazmitini içeren *E.coli* JM109 kültürünün besiyeri görünümü., **2 numaralı falkon:** IPTG ile gece boyu indüksiyon sonrası pQE-30mCherry plazmitini içeren *E.coli* JM109 kültürünün besiyeri görünümü.

IPTG ile indüklenmiş bakteri hücreleri lizis öncesi santrifüj edilmiştir, bakteri pelletinin rengi (mCherry) göze çarpmaktadır (**Şekil 4.18.**)

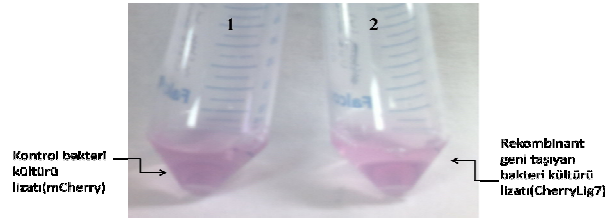




**Şekil 4.18.** IPTG ile indüksiyon sonrası bakteri pelletlerinin görünümü

**1 numaralı falkon:** IPTG ile gece boyu indüklenen pQE-30mCherryLig7 içeren *E.coli* JM109 kültürünün santrifüj sonrası görünümü, **2 numaralı falkon:** IPTG ile gece boyu indüklenen pQE-30mCherry içeren *E.coli* JM109 kültürünün santrifüj sonrası görünümü

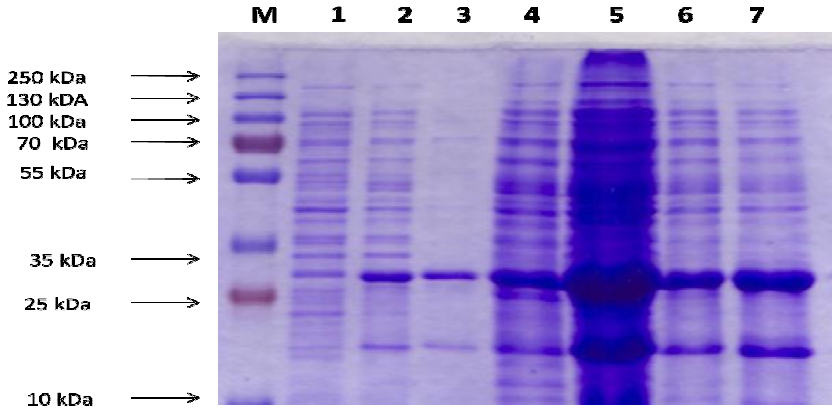
Rekombinant proteini, protein saflaştırma ve SDS PAGE ile görüntüleme çalışmaları için indüksiyondan sonra sonikasyonla lizis işlemi yapılmıştır (Şekil 4.19)



**Şekil 4.19.** Sonikasyon ile lizis sonrası lizat görüntüsü

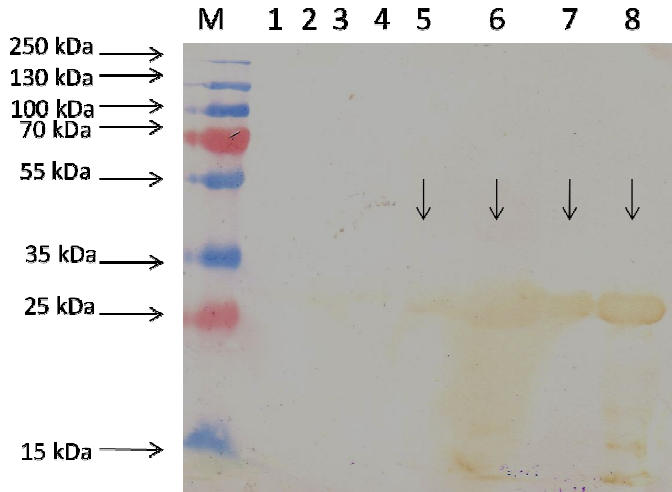
#### 4.10. Ni-Affinite Kolon Kromatografisi

pQE-30mCherryLig7 rekombinant molekülü C-terminal ucunda 6 histidin rezidü içerdiği için Ni Affinite kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. mCherry-lig7 (floresan işaretli rekombinant antikor), pQE30mCherry vektörünü taşıyan *E.Coli* JM109 hücrelerinde izole edilmiştir. Başlangıçta 50 ml sıvı bakteri kültürü IPTG ile indüklendi. İndüksiyona başlamadan hemen önce  $T_0$ , 4 saat sonra  $T_4$  adıyla SDS-PAGE jeline yüklemek için alikotlar hazırlanmıştır. Ni-afinite kolon sonrası mCherry ve mCherry-lig7 proteinlerinin elüsyon sonuçlarına SDS-PAGE ile bakıldı (Şekil 4.20,4.22,4.24). Saflaştırılmış proteinler Şekil 4.21,4.23,4.25’da gösterilmiştir.



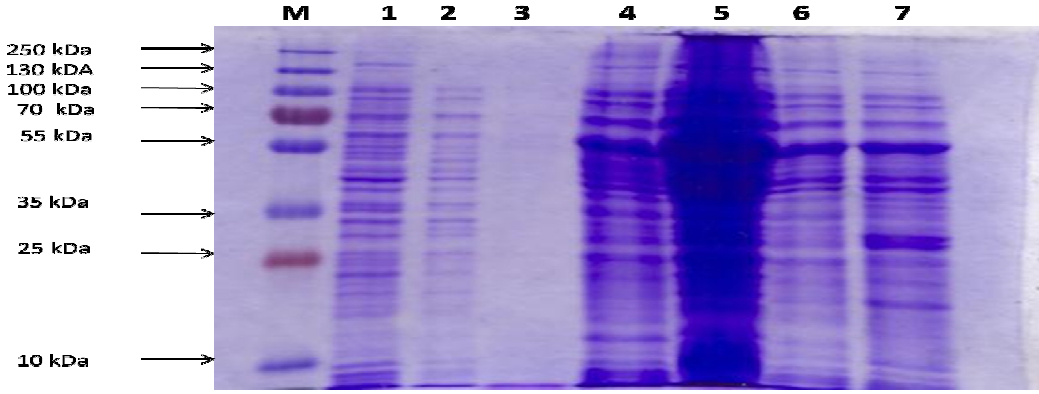
**Şekil 4.20.** pQE30mCherry ekspresyon çalışması sonuçlar

**M,** Markır (ThermoScientific#26619), **1.**pQE30mCherryT<sub>0</sub>, **2.**pQE30mCherryT<sub>4</sub>, **3.**Besiyeri, **4.**Lizis, **5.**Kolona bağlanmayan, **6.**Yıkama sonrası, **7.** Saflaştırılmış pQE30mCherry

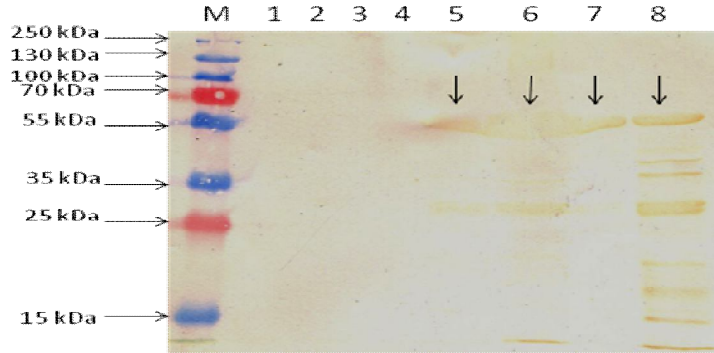


**Şekil 4.21.** pQE30 mCherry

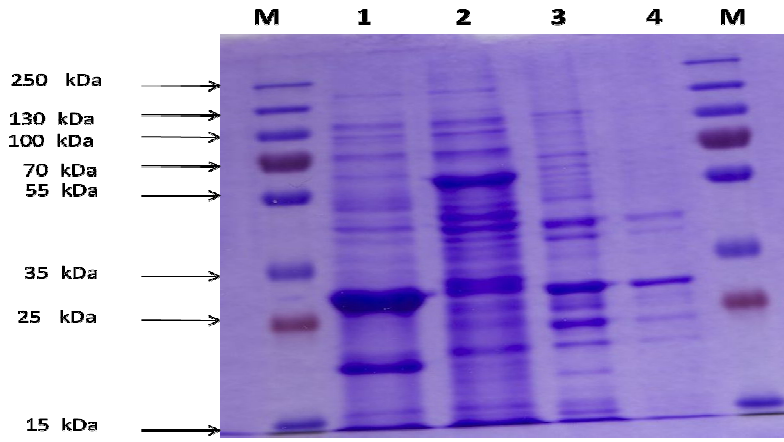
**M,**Markır(Thermo Scientific #26619) **1.**mCherryT<sub>0</sub>,**2.** T<sub>4</sub>,**3.**Besiyeri.,**4.** Lizis,**5.**, Kolona bağlanmayan.,**6.**,Yıkama sonrası. **7.**,Saf mCherry **8.**Pellet.



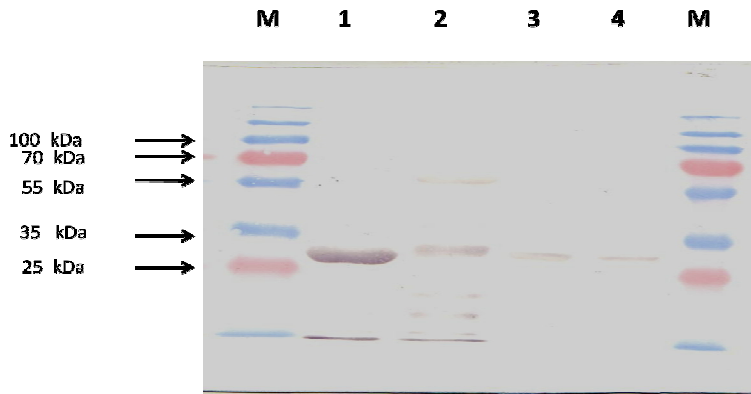
**Şekil 4.22.** pQE30mCherry-Lig7 ekspresyon çalışması sonuçları  
**M**,Markır(Thermo Scientific #26619),**1.** mCherryLig7 T<sub>0</sub>,**2.**mCherryLig7 T<sub>4</sub>,**3.**Besiyeri,**4.**Lizis,**5.**Kolona bağlanmayan,**6.**Yıkama sonrası,**7.** Saflaştırılmış mCherryLig7



**Şekil 4.23.** pQE30mCherry –Lig7  
**M**,Markır(Thermo Scientific #26619) **1.**mCherryLig7T<sub>0</sub>, **2.** T<sub>4</sub>, **3.**Besiyeri., **4.** Lizis, **5.**, Kolona bağlanmayan.,**6.**,Yıkama sonrası.**7.**,Saf mCherry-Lig7.**8.**Pellet.



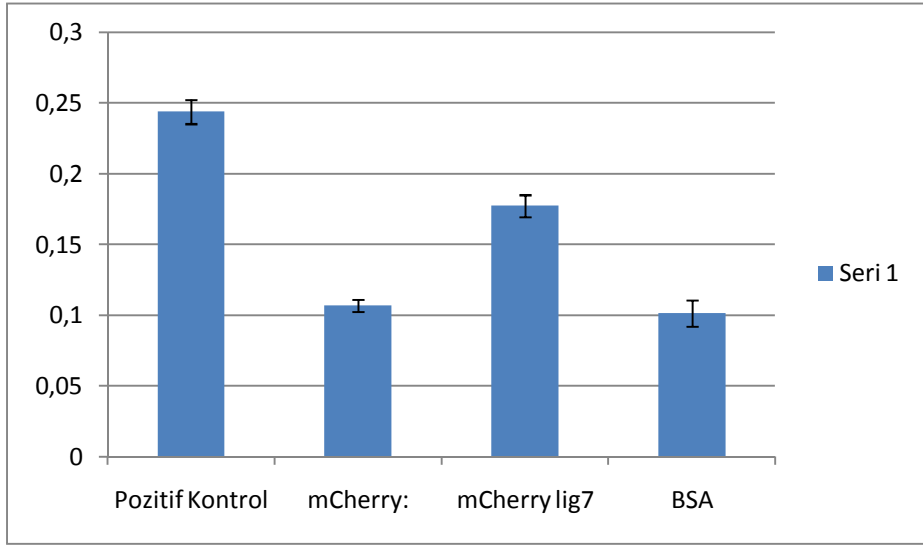
**Şekil 4.24.** Saflaştırılmış pQE30mCherry ve Pqe30mCherryLig7  
**M**,Markır(Thermo Scientific #26619), **1.** Saf pQE30mCherry,**2.**Saf mCherryLig7 T<sub>4</sub>,  
**3.**Lig7 (Kontrol 1),**4.**Lig7 (Kontrol 2),**5.** Markır(Thermo Scientific #26619)



**Şekil 4.25.** pQE30mCherry ve pQE30mCherry-Lig7  
**M**,Markır (Thermo Scientific #26619),**1.**pQE30mCherry,**2.**pQE30mCherrylig7  
**3,**lig7kontroll,**4.**lig7 kontrol2, **M.** Markır (Thermo Scientific #26619)

#### 4.11. ELISA Sonuçları

mCherry ve BSA'nın OD<sub>405</sub> ELISA değerlerine göre lig7mCherry HBsAg'ye zayıf bir bağlanma göstermiştir. Ek olarak direk lig7 1/5 seyreltilip kullanıldığından dolayı bağlanmanın çok yüksek olmadığı ( OD<sub>405</sub>: 0.250) görülmüştür (Şekil 4.27).



**Şekil 4.26.** ELİSA sonuçları (OD<sub>405</sub> )

## 5.TARTIŞMA

Biyoteknoloji ve proteomiks alanında tanı ve protein-protein etkileşimi gibi uygulamalar için genetik olarak kodlanan floresan antikorlara gereksinim duyulmaktadır. Hepatit B tanısına yönelik floresan ELISA sisteminde kullanılacak floresan işaretli antikor geliştirmek amacıyla anti-HBsAg scFv (single chain variable fragment ) *mCherry* kırmızı floresan genini içeren pQE30 plazmitine klonlanmıştır. Diğer kırmızı floresan proteinlere göre yüksek fotostabilite ve parlaklık gösteren mCherry floresan proteini, son zamanlarda yapılan pek çok çalışmada floresan belirteç olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda floresan işaretli rekombinant antikor üretimi için bakteriyel ekspresyon sistemi geliştirilmiştir. Protein saflaştırmalarına kolaylık sağlamak amacıyla, küçük boyu sayesinde protein fonksiyonunu nadiren etkileyen, N terminal Histidin kuyruğu içeren pQE30 vektörü kullanılmıştır. Çalışmamızda mCherry-lig7 füzyon proteininin ekspresyonu için The QIAexpressionist™ kitinin önerdiği üzere pQE30 vektörünü klonlama ve ekspresyon çalışmaları için *E.coli* JM109 bakteri soyunu kullanılmıştır

GFP veya DsRed floresan proteinleri bakteri sistemlerinde eksprese edilebilmektedir (Griep, 1999, Schwalbach, 2000, Morino, 2001). Fakat bu proteinlerin bakteriyel ekspresyonu zor olmaktadır. Bunun başlıca nedenlerinden biri scFv yapılarındaki molekül içi disülfid bağlarıdır. scFv'lerin düzgün bir şekilde katlanıp fonksiyonel hale gelebilmeleri için scFv'ler yükseltgen bir çevreye ihtiyaç duymaktadırlar. Bu nedenle sitoplazma gibi indirgeyici ortamlarda üretilen scFv'lerin fonksiyonel olarak geri kazanımları düşük olmaktadır. Fakat bakterilerin periplazmik bölgeleri veya ökaryotik hücrelerde ortamın yükseltgen olması nedeniyle scFv'ler düzgün bir şekilde üretilmektedirler (Frenken, 2000, Pluckthun 1989). Buna karşın floresan proteinler ise *E.coli* periplazmasında değil de sitozolde düzgün bir şekilde katlanmaktadır (Feilmeier, 2000). Floresan proteinlerin ve scFv'lerin doğru katlanması için gerekli koşulların farklı olmasından dolayı bu füzyon yapıları, *E.coli*'de, düşük miktarlarda aktif olarak üretilmiştir (Casey, 2000). Peipp ve arkadaşları yeşil floresan proteinini GFP'yi ve kırmızı floresan protein DsRed 'i scFv ile birleştirmiş ve bu füzyon proteinleri böcek ve memeli hücrelerinde verimli bir şekilde üreterek bu sorunu çözmüşlerdir (Peipp, 2004). Çalışmamızda füzyon proteinin bakteri hücrelerinde eksprese edilmiştir. İleriki çalışmalarda füzyon proteini memeli hücrelerinde üreterek, daha fazla aktif protein elde edilmesi düşünülmektedir. Ancak, *E.coli* hücresinde fonksiyonel floresan protein-scFv füzyon yapılarının üretilmesi zor olsa da Olichon

arkadaşları rekombinant antikorların doğru katlanmaları için füzyon proteinlerini bir şaperon ile koeksprese etmişlerdir (Olichon, 2007).

Schwalbach ve arkadaşları ise *E.coli*'den şaperon kullanmadan yüksek miktarda füzyon protein elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada füzyon proteinleri inklüzyon badilerden denatüre edilerek saflaştırılıp daha sonra denatüre füzyon yapılarının tekrardan katlanmasını sağlayarak (refolding) fonksiyonel floresan scFv yapıları elde edilmiştir. Bu çalışma sonunda elde edilen floresan rekombinant antikor ELISA çalışmalarında düşük bağlanma göstermiştir. İleriki çalışmalarda füzyon proteinin farklı koşullarda “refolding” çalışmaları yapılmalıdır.

Fakat refolding çalışmaları ile aktif protein elde edilebilse de floresan proteinin scFv'nin C-terminal veya N-terminal ucuna bağlanması dahi füzyon proteinin katlanmasını etkilemektedir. Füzyon protein yapıları üzerine, Sakamoto ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada plumbagine karşı scFv ile *Aequorea coerulescens* 'den elde edilen yeşil floresan proteinin füzyon formu (AcGFP) oluşturmuş ve *E. coli*'de eksprese etmişlerdir. Bu çalışmada iki farklı floresan protein geliştirilmiştir. Bunların ilkinde esnek bir bağlaç aracılığı ile ((Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>2</sub>) AcGFP geni, scFv'nin N-terminal ucuna diğerinde ise scFv'nin C-terminal ucuna genetik füzyon ile bağlanmıştır (Oelschlaeger, 2002).

Bu iki floresan füzyon yapının antijene bağlanma ve floresan özelliği FLISA ile incelenmiştir. Sakamoto ve arkadaşları çalışmalarının sonucunda scFv'nin C-terminal ucunda bulunan GFP füzyon yapısının, N-terminal füzyon yapısına göre, antijene dört kat daha güçlü bağlandığı ve floresan ışımının on sekiz kat fazla olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda floresan protein, Lig7 scFv'nin C terminal ucu ile birleştirilmiştir. İleriki çalışmalarda N terminal füzyon yapısı oluşturulması için çalışılarak daha yüksek ELISA değerleri beklenilmektedir (Sakamoto, 2010).

Sakamoto ve arkadaşları füzyon çalışmalarında proteinlerin katlanmasının ve konformasyonunun ayrıca sterik etkinin fonksiyonel floresan bir rekombinant protein elde edilmesi için ne kadar önemli olduğu konusunda güzel bir örnek sunmuşlardır (Sakamoto, 2010).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında mCherry floresan genini içermekte olan pQE30 ekspresyon vektörüne klonlanan ve *E.coli* JM109 hücrelerinde ekspresyonu sağlanan floresan rekombinant antikor füzyon yapısını ELISA çalışmalarında düşük bağlanma göstermiştir. Bunun nedeninin füzyon yapının sterik etki nedeniyle, doğru katlanmamış olmasından kaynaklanma ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle ileriki çalışmalarda öncelikle farklı koşullarda “refolding” çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmaların yetersiz kalması durumunda ise Lig7 ve mCherry arasına bir bağlaç yerleştirilmesi sterik etkiyi azaltıp bu iki yapının düzgün katlanmasını kolaylaştırabilecektir. Ayrıca mCherry'nin Lig7 scFv'sinin C-terminal ucu ile birleştirilmesi daha aktif bir füzyon yapının elde edilmesini sağlayabilecektir.



## KAYNAKLAR

- Abbott.i-STAT(R) precision (2008), <http://www.abbottpointofcare.com/istat/www/products/index.htm>
- Atwell, J.L., Breheny, K.A., Lawrence, L.J., McCoy A.J., Kortt, A.A., Hudson, P.J. (1999) scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng*, 12(7):597–604.
- Azzazy, H.M, Highsmith, Jr.W.E. (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem*, 35(6):425–45.
- Barbas, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A., Benkovic, S.J. (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(18):7978–82.
- Beards, G, Graham C, Pillay D. (1998) Investigation of vesicular rashes for HSV and VZV by PCR. *Journal of Medical Virology*, 54(3), 155-57.
- Berglund, L., Björling, E., Oksvold, P., Fagerberg, L., Asplund, A., Szigartyo, C.A., Persson, A., Ottosson, J., Wernérus, H., Nilsson, P., Lundberg, E., Sivertsson, A., Navani, S., Wester, K., Kampf, C., Hober, S., Pontén, F., Uhlén, M.A. (2008) Genecentric Human Protein Atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol. Cell. Proteomics*, 7:2019-2027.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M, Lee, T., Pope, S.H., Riordan, S.H, Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877):423–6.
- Bittner, M., Kupferer, P., Morris, C.F. (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem*, 102:459-471.
- Björling, E., Uhlén, M. (2008) Antibodypedia, a portal for sharing antibody and antigen validation data. *Mol. Cell. Proteomics*, 7:2028-2037.
- Boder, E.T., Wittrup, K.D. (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*, 15(6):553–7.
- Bonner, W.A., Hulett, H.R., Sweet, R.G., Herzenberg, L.A. (1972) Fluorescence activated cell sorting. *Rev. Sci. Instrum.*, 43:404-409.
- Brasier, A.R., Tate, J.E., Habener, J.F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques*, 7:1116-1122.
- Buckler, D.R., Park, A., Viswanathan, M., Hoet, R.M., Ladner, R.C. (2008) Screening isolates from antibody phage-display libraries. *Drug Discov. Today*, 13:318-324.
- Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Mudrik, N.N., Lukyanov, K.A. (2002) Interconversion of Anthozoa GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis. *BMC Biochem*, 24: 3-7.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci*, 99(12):7877–7882.
- Cao, M., Cao, P., Yan, H, Ren, F., Lu, W., Hu, Y., Zhang, S. (2008) Construction and characterization of an enhanced GFP-tagged anti-BAFF scFv antibody. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79:423–431.
- Carman, B. (2001) Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Medical Virology*, 11(6):347–49.

- Carter, R.W., Schmale, M.C., Gibbs, P.D. (2004) Cloning of anthozoan fluorescent protein genes. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 138:259–270.
- Casadaban, M. J., Chou, J., Cohen, S. N. (1980) In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol*, 143:971-980.
- Casey, J.L., Coley, A.M., Tilley, L.M., Foley, M. (2000) Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools. *Protein Eng*, 13:445–452.
- Casey, J.L., Coley, A.M., Tilley, L.M., Foley, M. (2000) Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools. *Protein Eng*. 13(6):445-52.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263:802-805.
- Conjeevaram, H.S., Anna S., Lok, A.S. (2003) Management of chronic Hepatitis B. *J Hepatology*, **38(6):87**.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Sot. Exp. Biol. Med*, 47:200-202.
- de Wet, J.R., Wood, K. V., Helinski, D. R., De Luca, M. (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:7870-7873.
- Dorai, H., McCartney, J.E., Hudziak, R.M., Tai, M.S., Laminet, A.A., Houston, L.L., Huston J.S., Oppermann, H. (1994) Mammalian cell expression of single-chain Fv (sFv) antibody proteins and their C-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. *Biotechnology (NY)*, 12(9):890–7.
- Dorai, H., McCartney, J.E., Hudziak, R.M., Tai, M.S., Laminet, A.A., Houston, L.L., Houston, J., Oppermann, H. (1994) Mammalian cell expression of single-chain Fv (sFv) antibody proteins and their C-terminal fusions with interleukin-2 and other effector domains. *Biotechnology (NY)*, 12(9):890–7.
- EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. (2003) *Hepatology* 39(1):3–25.
- Edelman, L., Margaritte, C., Chaabihi, H., Monchatre, E., Blanchard, D., Cardona, A., Morin, F., Dumas, G., Petres, S., Kaczorek, M. (1997) Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression system. *Immunology*, 91(1):13–9.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8:871-874.
- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., Phillips, G.J. (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 182(14):4068-76.
- Figini, M., Obici, L., Mezzanzanica, D., Griffiths, A., Colnaghi, M.I., Winter, G. (1998) Panning phage antibody libraries on cells: isolation of human Fab fragments against ovarian carcinoma using guided selection. *Cancer Res*, 58(5):991–6.
- Frenken, L.G., van der Linden, R.H., Hermans, P.W., Bos, J.W., Ruuls, R.C., de Geus, B., Verrips, C.T. (2000) Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.*, 78(1):11-21.
- Ganem, D., Prince, A.M. (2004) Hepatitis B infection – natural history and clinical consequences. *N Engl J Med*, 350:1118–29.

- Ghim, C., Lee, S.K., Takayama, S., Mitchell, R.J. (2009) The art of reporter proteins in science: past, present and future. BMD Reports
- Ghim, C., Lee, S.K., Takayama, S., Mitchell, R. (2010) The art of reporter proteins in science: past, present and future applications, BMB reports.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I., Plückthun, A. (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry*, 29(6):1362–7.
- Griep, R.A., van Twisk, C., van der Wolf, J.M., Schots, A. (1999) Fluobodies: green fluorescent single-chain Fv fusion proteins. *J Immunol Methods*, 230(1-2):121-30
- Hanes, J., Plückthun, A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci*, 94(10):4937–42.
- Hanes, J., Plückthun, A. (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(10):4937–42.
- Harlow E, Lane D. (1999) Using antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harrison, P.M., Kumar, A., Lang, N., Snyder, M., Gerstein, M. (2002) A question of size: the eukaryotic proteome and the problems in defining it. *Nucleic Acids Res.*, 30:1083-1090.
- He, M., Taussig, M.J. (2008) Selection of recombinant antibodies by eukaryotic ribosome display. *Methods Mol. Biol.*, 484:193-205.
- Hermanson, G.T. (1996) Bioconjugate techniques. Academic, pp 297–364.
- Hillson, N.J., Hu, P., Anderson, G.L., Shapiro, L. (2007) *Caulobacter crescentus* as a whole-cell uranium biosensor *Appl Environ Microb*, 73:7615-7621.
- Hoogenboom, H.R., Lutgerink, J.T., Pelsers, M.M., Rousch, M.J., Coote, J., Van-Neer, N., De Bruine, A., Niuwenhoven, F.A., Glatz, J.F., Arenz, J.W. (1999) Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library. *Eur J Biochem*, 260(3):774–84.
- www.clontech.com.
- Huse WD, Sastry L, Iverson S.A, Kang A.S, Altling-Mees, M, Burton, D.R, Benkovic, S.J., Lerner, R.A. (1989) Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 246(4935):1275–81.
- Hust, M., Dübel, S. (2004) Mating antibody phage display with proteomics. *Trends Biotechnol.*, 22:8-14.
- Hust, M., Meyer, T., Voedisch, B., Rülker, T., Thie, H., El-Ghezal, A., Kirsch, M.I., Schütte, M., Helmsing, S., Meier, D., Schirrmann, T., Dübel, S.A. (2011) Human scFv antibody generation pipeline for proteome research. *J. Biotechnol.*, In Press.
- Katranidis, A., Atta, D., Schlesinger, R., Nierhaus, K. H, Choli-Papadopoulou, T., Gregor, I., Gerrits, M., Büldt, G., Fitter, J. (2009) Fast biosynthesis of GFP molecules: a single-molecule fluorescence study. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 48:1758-1761.
- Kendall, L.V., Howard, G.C., Kaser, M.R., (2007) Production of polyclonal antibodies. Making and using antibodies: a laboratory manual, p 41–72
- Kohler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–7.
- Labas, Y.A., Gurskaya, N.G., Yanushevich, Y.G., Fradkov, A.F., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., Matz, M.V. (2002) *Proc Natl Acad Sci*, 99:4256–4261.

- Lathrop, A.A., Jaradat, Z.W., Haley, T, Bhunia, A.K. (2003) Characterization and application of a *Listeria monocytogenes* reactivemonoclonal antibody C11E9 in a resonant mirror biosensor. *J Immunol Meth*, 281(1–2):119–28
- Levskaia, A., Weiner, O.D., Lim, W.A., Voigt C.A. (2009) Spatiotemporal control of cell signaling using a light-switchable protein interaction. *Nature*, 461:997- 1001.
- Levy, S., Sutton, G., Ng, P.C., Feuk, L., Halpern, A.L., Walenz, B.P., Axelrod, N., Huang, J., Kirkness, E.F., Denisov, G., Lin, Y., MacDonald, J.R., Pang, A.W.C., Shago, M., Stockwell, T.B., Tsiamouri, A., Bafna, V., Bansal, V., Kravitz, S.A., Busam, D.A., Beeson, K.Y., McIntosh, T.C., Remington, K.A., Abril, J.F., Gill, J., Borman, J., Rogers, Y., Frazier, M.E., Scherer, S.W., Strausberg, R.L, Venter, J.C. (2007) The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol.*, 5:254
- Lewenza, S., Mhlnaga, M.M., Pugsley, A.P. (2008) Novel inner membrane retention signals in *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins. *J. Bacteriol*, 190:6119-6125.
- Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., Honegger, A., Klinger, B., Mocikat, R., Plückthun, A. (1997) Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv- phosphatase or scFv-phage fusions. *Biotechniques*, 22(1):140–9.
- Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., Kenworthy, A. (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2:444-456.
- Lis, J. T., Simon, J. A., Sutton, C. A. (1983) New heat shock puffs and  $\beta$ -galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an hsp70-lacZ hybrid gene. *Cell*, 35:403-410.
- Lok, A.S. (2002) Chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 346:1682–3.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. (2001) Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, 314(1–2):1–26.
- Malmberg, A.C., Duenas, M., Ohlin, M., Soderlind, E., Borrebaeck, C.A. (1996) Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. *J Immunol Meth*, 198(1):51–7.
- Malone, C.L., Boles, B.R., Lauderdale, K.J., Thoendel, M., Kavanaugh, J.S., Horschwill, A.R. (2009) Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Meth*, 77: 251-260.
- Mangia, A., Antonucci, F., Brunetto, M., Capobianchi, M., Faggioli, S., Guido, M., Farci, P., Lampertico, P., Marzano, A., Niro, G., Pisani, G., Prati, D., Puoti, M., Raimondo, G., Santantonio, T., Smedile, A., Lauria, F. (2008) The use of molecular assays in the management of viral hepatitis. *Italian Association for the Study of the Liver (AISF)*, 40(6):395-404.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348 (6301):552–4.
- Mersmann, M., Meier, D., Mersmann, J., Helmsing, S., Nilsson, P. Gräslund, S., Structural Genomics Consortium, Colwill, K., Hust, M., Dübel, S. (2010) Towards proteome scale antibody selections using phage display. *New Biotechnol.*, 27:118-128.
- Meyer, T., Stratmann-Selke, J., Meens, J., Schirrmann, T., Gerlach, G.F., Frank, R., Dübel, S., Strutzberg-Minder, K., Hust, M. (2011) Isolation of scFv fragments specific to OmpD of *Salmonella Typhimurium*. *Vet. Microbiol.*, 147:162-169.
- Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D., Palleschi, G. (2005) An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes. *Biosens Bioelectron*, 21(4):588–96.

- Mikhail V. Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky A.P., Zraisky A.G., Mikhail L. Markelov, M.L., Lukyanov, S.A., (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 17(12):969-973.
- Morin, J.G., Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell Physiol*, 77:305-312.
- Morino, K., Katsumi, H., Akahori, Y., Iba, Y., Shinohara, M., Ukai, Y., Kohara, Y., Kurosawa, Y. (2001) Antibody fusions with fluorescent proteins: a versatile reagent for profiling protein expression. *J Immunol Methods.*, 257(1-2):175-84.
- Mousli, M., Turki, I., Kharmachi, H., Saadi, M., Dellagi, K. (2007) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: a novel in vitro tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. *J Virol Meth*, 146(1-2):246-56.
- Mousli, M., Turki, I., Kharmachi, H., Saadi, M., Dellagi, K. (2007) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: a novel in vitro tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture. *J Virol Meth*, 146(1-2):246-56.
- Muller, B.H., Chevrier, D., Boulain, J.C., Guesdon, J.L. (1999) Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization. *J Immunol Meth*, 227(1-2):177-85.
- Mutuberria, R., Hoogenboom, HR., van der Linden, E., de Bruine, A.P., Roovers, R.C. (1999) Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens. *J Immunol Meth*, 231(1-2): 65-81.
- Nagumo, Y., Oguri, H., Tsumoto, K., Shindo, Y., Hiram, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Tomioka, Y., Mizugaki, M., Kumagai, I. (2004) Phage-display selection of antibodies to the left end of CTX3C using synthetic fragments. *J Immunol Meth*, 289(1-2):137-46
- Naumann, J.M., Kuttner, G., Bureik, M. (2011) Expression and secretion of a CB4-1 scFv-GFP fusion protein by Fission Yeast. *Appl Biochem Biotechnol*, 163:80-89.
- Oelschlaeger, P., Srikant-Iyer, S., Lange, S., Schmitt, J., Schmid, R.D. (2002) Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. *Anal Biochem*, 309:27-34.
- Ogilvie, M. (2001) Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Medical Virology*, 11(6):351-54.
- Ow, D.W., de Wet, J. R., Helinski, D.R., Howell, S.H., Wood, K.V., Deluca, M. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science*, 234:856-859.
- Paschke, M. (2006) Phage display systems and their applications. *Appl Microbio Biotechnol*, 70(1):2-11.
- Patel, P. (2002) (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trend Anal Chem*, 21(2):96-115.
- Peipp, M., Saul, D., Barbin, K., Bruenke, J., Zunino, S.J., Niederweis, M., Fey, G.H. (2004) Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications. *J Immunol Methods.*, 285(2):265-80.
- Pershad, K., Pavlovic, J.D., Gräslund, S., Nilsson, P., Colwill, K., Karatt-Vellatt, A., Schofield, D.J., Dyson, M.R., Pawson, T., Kay, B.K., McCafferty, J. (2010) Generating a panel of highly specific antibodies to 20 human SH2 domains by phage display. *Protein Eng. Des. Sel.*, 23:279-288.
- Plückthun, A, Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Meth Enzymol*, 178:497-515.

- Porter, R.R., Press, E.M. (1962) Immunochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 31:625-652.
- Poylard, T., (2005) *Hepatitis C and B: Management and Treatment*, Taylor Francis.
- Racher, A.J., Moreira, J.L., Alves, P.M., Wirth, M., Weidle, U.H., Hauser, H., Carrondo, J.T., Griffiths, J.B. (1994) Expression of recombinant antibody and secreted alkaline phosphatase in mammalian cells. Influence of cell line and culture system upon production kinetics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 40(6):851-6.
- Reavy B, Ziegler A, Diplexcito J, Macintosh SM, Torrance L, Mayo M. (2000) Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expr Purif*, 18(2):221-8.
- Reavy B, Ziegler A, Diplexcito J, Macintosh SM, Torrance L, Mayo M. Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Protein Expr Purif* 2000;18(2):221-8.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 76:3116-3120.
- Robinson, W.S., Greenman, R.L. (1974) DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 13:1231-6.
- Roche. Cardiac proBNP assay. (2008) <http://www.roche.com/>.
- Sakamoto, S., Taura, F., Pongkitwitoon, B., Putalun, W., Tsuchihashi R., Kinjo, J., Tanaka, H., Morimoto, S. (2010) Development of sensitivity-improved fluorescence-linked immunosorbent assay using a fluorescent single-domain antibody against the bioactive naphthoquinone, plumbagin. *Anal Bioanal Chem*, 396:2955-2963.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K.W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R.S., Weiner, L.M., Marks, C., Marks, J.D. (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J Mol Biol*, 263(4):551-67
- Schirrmann, T., Meyer, T., Schütte, M., Frenzel, A., Hust, M. (2011) Phage Display for the Generation of Antibodies for Proteome Research, Diagnostics and Therapy. *Molecules*, 16:412-426.
- Schütte, M., Thullier, P., Pelat, T., Wezler, X., Rosenstock, P., Hinz, D., Kirsch, M.I., Hasenberg, M., Frank, R., Schirrmann, T., Gunzer, M., Hust, M., Dübel, S. (2009) Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PloS One*, 4:6625.
- Seefeldt B., Kasper R, Seidel, T., Tinnefeld P, Dietz, K, Heilemann, M, Sauer, M. (2008) Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications *J. Biophoton.*, 1:74 – 82.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E., Tsien, R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein *Nat Biotechnol.*, 22(12):1567-72.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R. Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2,905-909.
- Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc*, 217:1-15.
- Silzel, J.W., Cercek, B., Dodson, C., Tsay, T., Obremski, R.J. (1998) Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection. *Clin. Chem.*, 44:2036-2043.
- Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.*, 275:2677-2683.

Skerra, A., Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science*, 240(4855):1038–41

Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228(4705):1315–7.

Steiner, D., Forrer, P., Plückthun, A. (2008) Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J. Mol. Biol.*, 382:1211-1227.

Stoevesandt, O., Taussig, M.J., He, M. (2009) Protein microarrays: high-throughput tools for proteomics. *Expert Rev. Proteomics*, 6:145-157.

Schwalbach, G., Sibler, A.P., Choulier L, Deryckère, F., Weiss, E. (2000) Production of fluorescent single-chain antibody fragments in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.*, 18(2):121-32.

Tang, D.P., Ren, J.J. (2005) Direct and rapid detection of diphtherotoxin via potentiometric immunosensor based on nanoparticles mixture and polyvinyl butyral as matrixes. *Electroanalysis*, 17(24):2208–16.

Tang, Y., Jiang, N., Parakh, C., Hilvert, D. (1996) Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *J Biol Chem*, 271(26):15682–6.

Thomas, H.C., (2008) *Viral Hepatitis*, John Wiley and Sons.

Townsend, S., Finlay, W.J., Hearty, S., O’Kennedy, R. (2006) Optimizing recombinant antibody function in SPR immunosensing. The influence of antibody structural format and chip surface chemistry on assay sensitivity. *Biosens Bioelectron*, 22(2):268–74

Tsien, R.Y. (2005). Building and breeding molecules to spy on cells and tumors. *FEBS Lett.*, 579: 927-932.

Tsien, R.Y. (2008) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Bio. Chem.*, 67:509-44.

Verma, R., Boleti, E., George, A.J. (1998) Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Meth*, 216(1–2):165–81.

Wang, H., Nakata, E., Hamachi I. (2009) Recent Progress in Strategies for the Creation of Protein-Based Fluorescent ChemBioChem, 10:2560 – 2577.

Wang, L., Jackson, W.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y. (2004) Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci*, 101:16745–16749.

Wassaf D, Kuang G, Kopacz K, Wu QL, Nguyen Q, Toews M, Cosic, J., Jacques, J., Wiltshire, S., Lambert, J., Pazmany, C.C., Hogan, S.S., Ladner, R., Nixon, A.E., Sexton, D. (2006) High-throughput affinity ranking of antibodies using surface plasmon resonance microarrays. *Anal Biochem*, 351(2):241–53.

Whitelam, G.C., Cockburn, W., Owen, M.R. (1994) Antibody production in transgenic plants. *Biochem Soc Trans*, 22(4):940–4.

WHO weekly epidemiology record (2002), 77:41–48.

Wingren, C., James, P., Borrebaeck, C.A.K. (2009) Strategy for surveying the proteome using affinity proteomics and mass spectrometry. *Proteomics*, 9:1511-1517.

Winter, G., Milstein, C. (1991) Man-made antibodies. *Nature*, 349(6307):293–9.

Wood, K. V. (1995) Marker proteins for gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6:50- 58.

[www.antibodypedia.org](http://www.antibodypedia.org)

[www.clontech.com](http://www.clontech.com)

[www.landesbioscience.com/journals/mabs/about](http://www.landesbioscience.com/journals/mabs/about)

[www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)

[www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)

[www.protocol-online.org/prot/Immunology/Immunofluorescence](http://www.protocol-online.org/prot/Immunology/Immunofluorescence)

www.clontech.com.

Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R.G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A.C., Liu, H., Lohse, P.A., Sun, L., Weng, S., Wagner, R.W., Lipovsek, D. (2002) Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chem Biol*, 9(8): 933–42.

Yang, H., Chen Y., Gao, Z., Tang, J. (2001) Preparation of a bio-immunoreagent between ZZ affibody and enhanced green fluorescent protein for immunofluorescence applications *World J Microbiol Biotechnology*, DOI 10.1007/s11274-011-0761-z.

Zuckerman A.J. (2009) *Principles and practice of clinical virology*. John Wiley and Sons



## ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Öznur Özlem İbrahimoglu
- Doğum yeri ve tarihi: İstanbul, 15.01.1983
- Uyuşu: T.C.
- Medeni Durumu: Bekar
- İletişim Bilgileri: Yeşilkent mah. Ada:1 Blok:1 No:13 Bahçecik İzmit-KOCAELİ  
Tel no: 0 (537) 7850202

### 2. Eğitim Bilgileri

- 2009-2011 : Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı
- 2008-2009 : İstanbul Üniversitesi DETAE Genetik Yüksek lisans Programı
- 2004-2008 : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- 2001-2004 : Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Astronomi ve Uzay Bilimleri Bölümü
- 1993-2000 : Kocaeli Anadolu Lisesi

### 3. Stajlar ve Katıldığı Kurslar

- **Teorik Kurs**, 2011 (4 gün ), ICGEB, Trieste , İtalya  
**Konu:** Fare Genetiği: İnsan Hastalıkları Modellemesi
- **Laboratuvar Asistanı**, 2010 (2 ay), KABI-Proteomiks Bölümü, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli, Türkiye  
**Konu:** Proteomiks Temelleri
- **Workshop**, 2009 (5 gün ), Genetik Bölümü, Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi ,İstanbul, Türkiye  
**Konu:** miRNA: Gen regülasyonundaki rolü
- **Laboratuvar Asistanı**, 2008 (3 ay), Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü, Genetik Bölümü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

## **Konu:** Sinyal Yolakları, Kanser Genetiği

- **Workshop**, 2007 (3 gün), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye  
**Konu :** Deney Hayvanları ile Çalışma Kursu
- **Laboratuvar Asistanı**, 2007 (2 ay), 2006 (2 ay), 2005 (2 ay), Gayrettepe Metropolitan Flourance Nightingale Hastanesi, Genetik Tanı Merkezi, İstanbul, Türkiye  
**Konu:** Postnatal ve prenatal sitogenetik, Tek Gen Hastalıkları, Kanser ve Mikrodelesyon Sendromları

## **4. Yabancı Dil**

- İngilizce

## **5. Ünvanlar**

2008- : Biyolog

## **6. Ödüller**

- Yüksek Şeref Öğrencisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2007-2008 Güz, 2006-2007 Bahar & Güz
- Şeref Öğrencisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2007-2008 Bahar, 2006-2007 Bahar, 2004-2005 Bahar& Bahar
- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölüm Birinciliği, 2008
- Poster Sunum Birincilik Ödülü, 27-30 Ekim 2011, 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi Antalya, Türkiye.

## **7. Bilimsel Etkinlikler**

Öznur Özlem İbrahimoglu, Koray Bertan Balcioğlu, Aylin Özdemir Bahadır, Berrin Erdağ “Genetik Füzyon Yoluyla Floresan İşaretli Rekombinant Antikorların Tanıya Yönelik Geliştirilmesi” 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2011 Antalya, Türkiye.