BİYOTEKNOLOJİ 2009

BİLDİRİ KİTABI

XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi

www.biyoteknoloji.org.tr



13 - 16 Aralık 2009
ANTALYA

Nanobiyoteknoloji
Tıbbi Biyoteknoloji
Gıda Biyoteknolojisi
Çevre Biyoteknolojisi
Endüstriyel Biyoteknoloji
Biyomühendislik / Biyosensör
Bitki ve Hayvan Biyoteknolojisi

Biyoteknoloji Derneği

BİYOTEK

1986

XVI. ULUSAL BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ 2009
POSTER VE SÖZLÜ BİLDİRİ KİTAPÇIĞI



Katkılarından dolayı tüm sponsorlarımıza teşekkür ederiz.

Ana Sponsor



Diğer Sponsorlar











14 ARALIK - 16 ARALIK 2009
SEA LIFE HOTEL, ANTALYA

XVI. ULUSAL BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ 2009 DÜZENLEME KURULU

Prof. Dr. Hüseyin Avni ÖKTEM (BAŞKAN)
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Doc. Dr. Füsun EYİOĞAN
Dr. Serdar TUNCER
Araş. Gör. Mehmet Cengiz BALOĞLU
Araş. Gör. Oya ERCAN
Araş. Gör. Ebru ÖZER UYAR

BİLİM KURULU

Kazım Abak
Mustafa Akçelik
Şule Arı
Yakup Arıca
Muhammet Arıcı
Fikret Arpacı
Orhan Arslan
Erol Atalay
Haydar Bağış
Ufuk Bakır
Yavuz Beyatlı
Mithat Bozdayı
Hikmet Budak
Cumhur Çökmüş
Levent Dağaşan
Emir Baki Denkbaş
Şebnem Ellialtıoğlu
Altan Erarslan
Arzum Erdem Gürsan
Vehbi Eser
Füsun Eyidoğan
Kayahan Fışkın
Celal Ferdi Gökçay
Nermin Gözükırmızı
Füsun Gümüşel
Ekrem Gürel
İhsan Gürsel
Kadir Halkman
Haluk Hamamcı
Şebnem Harsa
Vasıf Nejat Hasırcı
Nezihi Hekim
İsmail Karaboz
Neşe Kırımer
Semra Mirici
Mehmet Mutlu
Naci Onus
Zümrüt Ögel
Hüseyin Avni Öktem
Numan Özcan
Sebahattin Özcan
Gülay Özcengiz
Can Özen
Murat Özgen
Meral Özgüç
Mehmet Özsöz
Erhan Pişkin
Necdet Sağlam
Cengiz Sancak
Atalay Sökmen
Fikrettin Şahin
Serpil Takaç
Candan Tamerler
Kenan Turgut
İsmail Türkan
Sezai Türkel
Mustafa Türker
Mustafa Yamaç
Özfer Yeşilada
Ülkü Yetiş
Meral Yücel
Nazif Kolonkaya
Emir Cansunar

S-BHB5

NAC69-1 ve *NAM-B2* Genlerinin Buğdaydan İzolasyonu ve Karakterizasyonu

M.C.Baloğlu[1], G.Kalemtaş[1], A.Eroğlu[1], A.Battal[1], F.Aysin[1], C.Kayıhan[1], H.A.Öktem[1], M.Yücel[1]

[1]Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Bitki Biyoteknoloji AR-GE Lab. İnönü Cad, 06530, Ankara.

ÖZET

Bu çalışmada, NAC tipi transkripsiyon faktörlerinden *NAC69-1* ve *NAM-B2* genlerinin buğdaydan izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca bu genlerin buğdayda yüksek düzeyde ifade edilebilmesini sağlamak amacıyla, genler uygun vektörlere klonlanmıştır. *NAC69-1* geni yazlık bir buğday çeşidi *Triticum aestivum* L. cv. (Yüreğir-89)'dan, *NAM-B2* geni ise kışlık bir buğday çeşidi, *Triticum turgidum* spp. durum cv. (Kızıltan-91)'dan izole edilmiştir. Total RNA izolasyonu trizol reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'nın kalite ve miktarı spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. cDNA sentezi için Fermentas'ın RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i kullanılmıştır. PZR sonucunda çıkan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve beklenen büyüklükte görülen bantlar kesilerek jelden ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan bu genler, CloneJET^{TM} PCR Cloning Kit'te verilen protokole uygun olarak pJET1.2 klonlama vektörüne transfer edilmiştir. Bu vektörde bulunan genler çift yönde sekanslamaya gönderilmiştir. Klonlanan *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genleri NCBI'da bulunan sekanslarla %100 benzerlik göstermiştir. Genler monokot bitkiler için kullanılan ekpresyon vektörlerinden Impact Vector 1.1. (Plant Research International, Wageningen University, UR) ve pAHC25'e aktarılımıştır. Impact Vector 1.1'de Rubisco (Ribulose bisphosphate carboxylase) promoter ve terminatör bulunurken, pAHC25'te ise *bar* ve *uidA* (*GUS*) markör genlerini içermektedir ve her ikisi de ayrı ayrı *Ubi1* promotoru ile kontrol edilmektedir. *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerini içeren Impact Vector 1.1 ve pAHC25 vektörleri "Obitek-Biolab Biobalistic Gene Transfer System" partikül bombardımanı aracılığıyla buğdaydan izole edilen olgunlaşmamış başak taslaklarına aktarılmıştır.

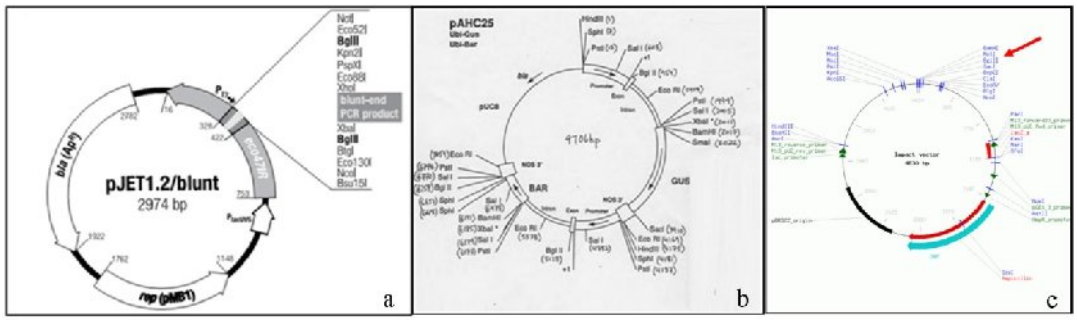
GİRİŞ

Buğday tüm dünyada yetiştirilen ve insanların temel besin ihtiyacını karşılamak amacıyla en fazla ekimi yapılan tahıldır. Ekmeklik ve makarnalık un üretiminde kullanılan buğdayın kalitesini ve verimini azaltan biyotik ve abiyotik faktörler bulunmaktadır. Bunların en önemlileri; tuzluluk, kuraklık, don, çeşitli hastalıklar ve böcekler şeklinde sıralanabilir. NAC ismi daha önce tanımlanmış olan *NAM* (no apical meristem), *ATAF1-2* ve *CUC2* (cup-shaped cotyledon2) genlerinden gelmektedir. NAC proteinleri bitkiye özel transkripsiyon faktörlerinin en geniş ailelerinden birini oluşturur. Bu ailede yer alan proteinler gelişim, savunma ve abiyotik stres tepkileri gibi çok çeşitli süreçlerle ilişkilidir [1]. Bazı NAC proteinlerinin biyolojik öneme sahip diğer bazı proteinlerle etkileşime girdiği bilinmektedir. Patates, *Phytophthora infestans* ile enfekte olduğunda *StNAC* geninin aktive olduğu görülmüştür. Bu durum, NAC proteinlerinin biyolojik streslere tepkide rol oynadığını ortaya koymuştur. Bazı *NAC* genlerinin yaralanma, soğuk stresi ve su kaybı gibi abiyotik streslerle de aktive olduğu görülmüştür [2]. *ANAC019*, *ANAC055* ve *ANAC072* gibi *NAC* genleri ile transforme edilen bitkilerin kuraklığa karşı dayanıklılık gösterdiği bulunmuştur. *ANAC072* (*RD26*)'nin yeni bir ABA bağımlı stres-sinyal yolunda rol oynadığı görülmüştür. *ANAC* genleri yaralanma ile aktive olan *ATAF1* ve *ATAF2*'nin de dâhil olduğu bir alt gruba aittir. Bu grup genler dehidrasyon, yüksek tuz ve ABA konsantrasyonları ile aktive olmaktadır [3].

YÖNTEM

Her iki buğday çeşidinde, *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerinin ekspresyon seviyelerini artırmak için bitkiçikler 150 mM tuz stresine maruz bırakılmıştır. Total RNA izolasyonu trizol reaktifi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'nın kalite ve miktarı spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. RNA örneklerinden cDNA sentezi için Fermentas'ın RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit'i kullanılmıştır. Genler cDNA kullanılarak farklı reaksiyon koşullarında PZR'de klonlanmış ve çıkan ürünler %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve beklenen büyüklükte görülen bantlar kesilerek jelden ayrıştırılmıştır. Ayrıştırılan bu genler, CloneJET^{TM} PCR Cloning Kit'te verilen protokole uygun olarak

pJET1.2 klonlama vektörüne transfer edilmiştir (Şekil 1). Genlerin vektöre entegrasyonunu kanıtlamak için gen aktarımı yapılmış vektör, kompetant *E. coli* hücrelerine ısı şokuyla aktarılmıştır. Aktarımın gerçekleşmiş olduğu kolonilerde amfisiline karşı direnç olması beklenmektedir. Bu koloniler kullanılarak *NAC69-1* ve *NAMB2* genlerine özgü primerlerle, koloni PZR yapılmıştır. Beklenen büyüklükte bant elde edilen kolonilerden plazmid izolasyonu yapılarak çift yönde sekanslamaya gönderilmiştir. Bu işlemler sonucunda pJET1.2 klonlama vektörüne aktarılmış olan *NAC69-1* ve *NAMB2* genleri, ekspresyon vektörüne aktarılmaya hazır hale getirilmiştir.



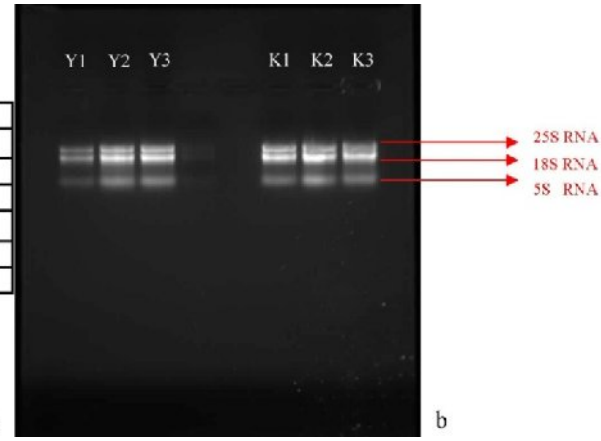
Şekil 1. a) pJET1.2/blunt klonlama **b)** pACH25 **c)** Impact Vector 1.1 vektörünün haritası

Genler monokot bitkiler için kullanılan ekpresyon vektörlerinden Impact Vector 1.1 ve pAHC25'e aktarılımıştır (Şekil 1.1). Genleri taşıyan plazmidler ve klonlamanın yapılacağı Impact Vector 1.1 öncelikle *Bgl*II kesim enzimi ile kesilmiş ve T4 DNA ligaz enzimi ile ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon ürünleri kompetant *E. coli* hücrelerine ısı şokuyla aktarılmış ve seçici katı LB besiyerinde *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerini taşıyan Impact Vector'ler şeçilerek koloni PZR ile genlerin varlığı doğrulanmıştır. Monokot bitkiler için kullanılan diğer bir ekpresyon vektörü de pAHC25'tir. Bu vektör *bar* ve *uidA* (*GUS*) markör genlerini içermektedir. pAHC25 vektöründen *GUS* geni plazmitten uzaklaştırılmış ve onun yerine *TaNAC69-1* veya *TtNAM-B2* genleri eklenmiştir. *GUS* genini vektörden uzaklaştırmak için, *Sma*I ve *Sac*I kesim enzimleri kullanılmıştır. Genlerin vektöre entegrasyonunu kanıtlamak için gen aktarımı yapılmış vektör, kompetant *E. coli* hücrelerine ısı şokla aktarılmıştır. Pozitif koloniler amfisilin içeren seçici LB besiyerinde büyütülmüş ve doğrulama için koloni PZR yapılmıştır. Yüreğir-89 ve Kızıltan-91 çesitlerine ait olgunlaşmamış başak taslakları iki ya da üç parçaya ayrılarak 2 mg/l 2-4-D içeren MS besiyerine [4] konularak 2 hafta karanlıkta 25°C'de inkübe edilmişlerdir. İki haftalık kalluslar gen transferinden 4 saat önce mannitol içeren besiyerine alınmışlardır [5]. Gen transferi "Obitek-Biolab Biobalistic Gene Transfer System" partikül bombardıman aleti kullanılarak 1000 psi basınç ile 8 cm mesafeden kallusların üzerine DNA kaplanmış tungusten parçacıkları ile yapılmıştır. Bombardımandan 16 saat sonra kalluslar mannitol içeren MS besiyerinden alınarak 150 mM NaCl içeren MS besiyerine alınmıştır.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

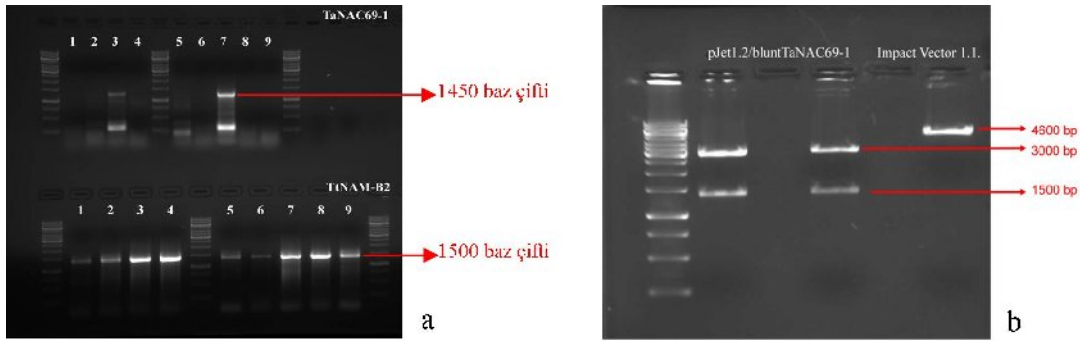
RNA izolasyonu trizol reaktifi kullanılarak yapılmıştır. Bu RNAların miktar ve saflığı Şekil 2'de görülmektedir. RNA örneklerinin saflığı 25S ve 18S bantların jelde görülmesi ile kanıtlamıştır. Agaroz jel elektroforezinden elde edilen sonuçlar spektrofotometrik sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Çeşit	Örnek no	A_{260}	$A_{260/280}$	ng/µL
Kızıltan-91	**K1**	**18.90**	**1.9**	**755.9**
	K2	20	1.85	803.7
	K3	19.12	1.9	764.13
Yüreğir-89	**Y1**	**11.54**	**2.08**	**461.5**
	Y2	19.48	1.81	779
	Y3	18.66	1.84	746.4



Şekil 2. Kızıltan-91 (K1, K2, K3) ve Yüreğir-89 (Y1, Y2, Y3) çeşitlerinden izole edilen total RNA örneklerinin **a)** spektrofotometrik ve **b)** jel elektroforez sonuçları.

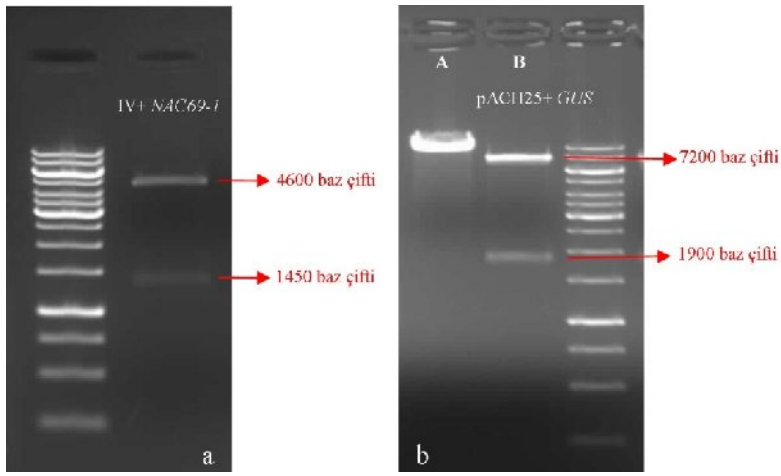
RNA örnekleri, primerler reaksiyon karışımına eklenerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genleri için optimum PZR koşullarını belirlemek için, 9 farklı reaksiyon tüpünde farklı koşullarda PZR yapılmıştır. 9 reaksiyonun hepsi *TtNAM-B2* geni için beklenen bant büyüklüğünü verirken, *TaNAC69-1* için sadece 3. ve 7. reaksiyonda beklenen büyüklükte bant görülmüştür. PZR amplifikasyonundan elde edilen sonuçlar Şekil 1.3'de görülmektedir. *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genleri istenen büyüklükte elde edildikten sonra jelden ayrıştırılmış ve Fermentas'ın pJET1.2/blunt Cloning Vector isimli vektörüne klonlanmştır. Klonlamanın gerçekleştirildiğini göstermek amacıyla önce koloni PZR yapılmış, daha sonra vektör *Bgl*II kesim enzimiyle kesilmiştir (Şekil 3). *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerini içeren plazmidlerin sekans analizleri yaptırılmıştır. Sekanslar NCBI web sayfasında (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) bulunan BLAST programı aracılığıyla veri tabanında kayıtlı bulunan diğer sekanslarla karşılaştırılmıştır. Sekans sonuçlarına göre, klonlanan *TaNAC69-1* genin sekansı, *NAC69-1* geninin sekansıyla (Gen bankası erişim no: AY625682) %99 ve *TtNAM-B2* geninin sekansı ise *NAM-B2* geninin sekansıyla (Gen bankası erişim no: DQ869676) %100 benzerlik göstermiştir



Şekil 3. a) *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerinin PZR amplifikasyonu. **b)** *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerini taşıyan plazmidlerin ve Impact Vector 1.1.'in *Bgl*II kesim enzimiyle kesilmesi sonuçu oluşan bantlar.

Genler ilk olarak monokot ekpresyon vektörlerinden Impact Vector 1.1 aktarılmıştır. Klonlama vektöründen *Bgl*II kesim enzimi ile kesilerek uzaklaştırılan genler, Impact Vector'e ligasyonu yapılarak, ligasyon ürünleri kompetant *E. coli* hücrelerine ısı şokuyla aktarılmıştır. Klonlamanın gerçekleştirildiğini göstermek amacıyla, *TaNAC69-1* genini içeren Impact Vector 1.1 *Bgl*II kesim enzimiyle kesilerek, *TaNAC69-1* genine ait 1450 bazçifti büyüklüğündeki bant jelde görüntülenmiştir (Şekil 1.4). Böylece *TaNAC69-1* geninin Impact Vector'deki varlığı doğrulanmış oldu. Genler ayırca diğer monokot

ekpresyon vektörü olan pAHC25'e aktarılmıştır. Bu vektöründeki *GUS* geni, *Sma*I ve *Sac*I kesim enzimleri kullanılarak plazmitten uzaklaştırılmış ve onun yerine *TaNAC69-1* veya *TtNAM-B2* genleri eklenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. a) Impact Vector 1.1'in *Bgl*II kesimi sonuçu elde edilen 1450 bç büyüklüğündeki *TaNAC69-1* geni. **b)** pAHC25'teki *GUS* geni, *Sma*I ve *Sac*I kesim enzimleri kullanılarak plazmitten uzaklaştırılmıştır.

Impact Vector 1.1 ve pAHC25'te bulunan *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genleri "Obitek-Biolab Biobalistic Gene Transfer System" partikül bombardıman aleti kullanılarak olgunlaşmamış başak taslaklarına transfer edilmiş ve kalluslar seçici besiyerinde seçilmiştir.

Teşekkür
Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından 108O786 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] A.N Olsen, H.A. Ernst, L.L. Leggio, K. and Skriver, "NAC Transcription Factors: Structurally Distinct Functionally Diverse", Trends in Plant Sci, Vol. 10(2), pp.79-87, 2005.
[2] M. Collinge, and T. Boller, "Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by Phytophthora infestans and to wounding", Plant Mol. Biol., Vol. 46, pp.521–529, 2001.
[3] M. Fujita, Y. Fujita, K. Maruyama, M. Seki, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, L.S.P. Tran K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, "A dehydration-induced NAC protein, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway ", Plant J., Vol. 39,pp. 863–876, 2004.
[4] T. Murashige, and F. Skoog , "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", Physiol. Plant. Vol. 15, pp. 473-497, 1962.
[5] P. Vain, M.D. McMullen, J.J. Finer, "Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize", P.C.R. Vol. 11 ,pp. 323-328, 1993.

S-BHB6

NAC69-1 ve *NAM-B2* Genlerinin İkili Dikot Vektöre Klonlanması ve *Agrobacterium*'a Aktarılması

M.C.Baloğlu[1], G.Kalemtaş[1], A.Eroğlu[1], A.Battal[1], H.A.Öktem[1], M.Yücel[1]

[1]Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Bitki Biyoteknoloji AR-GE Lab. İnönü Cad, 06530, Ankara.

ÖZET

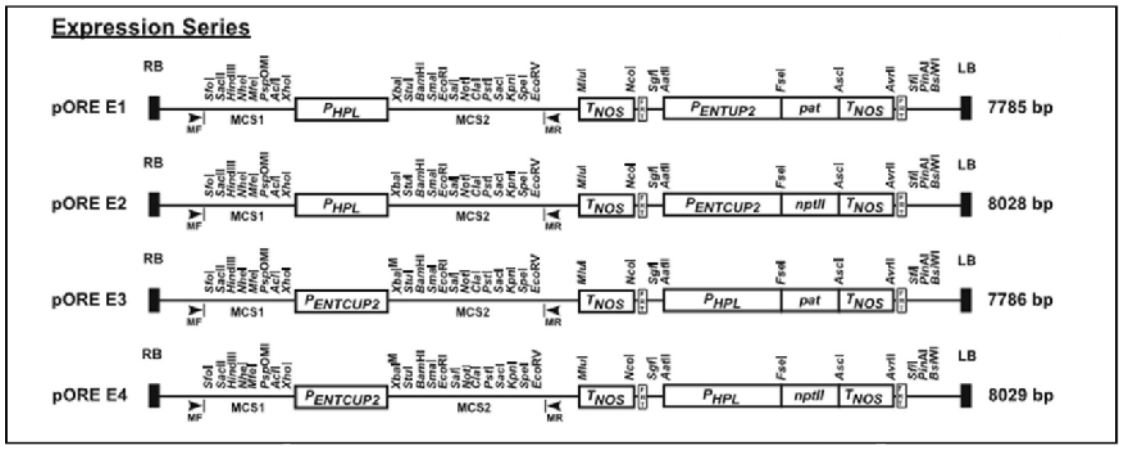
Bu çalışmada, önceden buğdaydan izole edilmiş *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerinin tütün bitkisinde yüksek düzeyde ifade edilebilmesini sağlamak amacıyla, genler ikili pORE-E3 vektörüne klonlanmıştır. *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerini pJET1.2 klonlama vektöründen, ikili pORE-E3 vektörüne transfer etmek için her iki vektör de *Cla*I ve *Not*I enzimleri ile kesilmiştir. Böylece, *Cla*I ve *Not*I kesim bölgelerini içeren yapışkan uçlar elde edilmiştir. pORE-E3 ikili vektörü tek bir bölgeden kesilerek düz hale gelmiştir. pJET1.2 vektörü ise *NAC69-1* ve *NAM-B2* genlerinin başlangıç ve bitiş noktalarından olmak üzere kesilmiş ve iki ayrı parça oluşmuştur. Böylece *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genleri uçlarında *Cla*I ve *Not*I enzim kesim bölgelerini taşımaktadır. Bu genler, aynı kesim bölgelerini uçlarında taşıyan pORE-E3 vektörüne, T4 DNA ligaz enzimi ile bağlanmıştır. Elde edilen vektör ısıl şokla boş *E.coli* DH5α suşuna ve daha sonra elektroporasyon yöntemiyle *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 suşuna transfer edilmiştir. *TaNAC69-1* genini içeren ikili pORE-E3 vektörünün *A. tumefaciens* EHA 105 suşuna transfer edilip edilmediğini kanıtlamak için koloni PZR metodu kullanılmıştır. Koloni PZR ile 10 bakteri kolonisinden 2 tanesinde *TaNAC69-1* genini içeren ikili pORE-E3 vektörünün bulunduğu gösterilmiştir. Böylece elde edilen *TaNAC69-1* genini içeren ikili pORE-E3 vektörü tütün bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferinde kullanılabilecek hale getirilmiştir.

GİRİŞ

NAC69-1 ve *NAM-B2* genleri NAC tipi bitkiye özel transkripsiyon faktörlerinden olup bitkilerde en geniş protein ailelerinden birini oluşturmaktadır. Bu ailede yer alan proteinler gelişim, savunma ve abiyotik stres tepkileri gibi çok çeşitli süreçlerle ilişkilidir [1]. İkili vektör serisi yeni nesil vektörlerdir ve birçok önemli özelliklere sahiptirler. pORE serisi 3 temel gruptan oluşmaktadır; genel bitki transformasyonu için kullanılan 'open' serisi, promotor analizi için kullanılan 'reporter' serisi ve transgenlerin sürekli ifadesi için 'ekspresyon' serisi (Şekil 1). Bu serilerde kullanılan promotorlar; PHPL: *Arabidopsis thaliana* hydroperoksid liyaz promotoru, PENDCUP2: Tobacco cryptic konstutitiv promotoru ve PTAPADH: *Triticum aestivum* lipid transfer protein promotoru. Seçici markör genleri *nptII* ve *pat* genleri olup kanamisin antibiyotiğine ve PPT herbisitine dirençi sağlamaktadır. Haberci (reporter) genler ise *uidA* ve *smgfp* genleridir [2]. Bu çalışmada, önceden buğdaydan izole edilmiş *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerinin [3] tütün bitkisinde yüksek düzeyde ifade edilebilmesini sağlamak amacıyla, genlerin ikili pORE-E3 vektörüne akratılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM

TaNAC69-1 ve *TtNAM-B2* genlerini pJET1.2/blunt klonlama vektöründen, ikili pORE-E3 vektörüne transfer etmek için her iki vektör de aynı kesim enzimleriyle kesilmiştir. Bunun için her iki vektör *Cla*I ve *Not*I enzimleri ile kesilerek, bu enzimlere ait yapışkan uçlar elde edilmiştir. *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genleri, aynı kesim bölgelerini uçlarında taşıyan pORE-E3 vektörüne, T4 DNA ligaz enzimi ile bağlanmıştır. Elde edilen vektör ısıl şokla boş *E.coli* DH5α suşuna aktarılmıştır. Pozitif koloniler kanamisin içeren seçici katı LB besiyerinde büyütülmüş ve doğrulama için koloni PZR yapılmıştır.

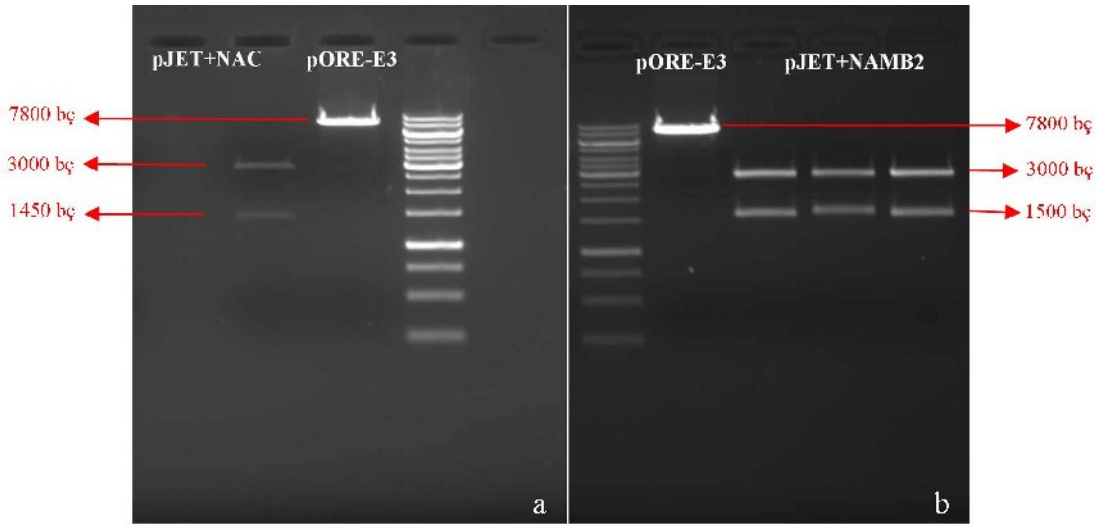


Şekil 1. pORE ikili vektör serilerinden ekspresyon serisinin haritası.

Pozitif kolonilerden *TaNAC69-1* genini içeren pORE-E3 plazmidi izole edilerek, Bio-Rad elektroporasyon aleti kullanılarak *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 suşuna transfer edilmiştir. *TaNAC69-1* genini içeren ikili pORE-E3 vektörünün *A. tumefaciens* EHA 105 suşuna transfer edilip edilmediğini kanıtlamak için koloni PZR metodu kullanılmıştır.

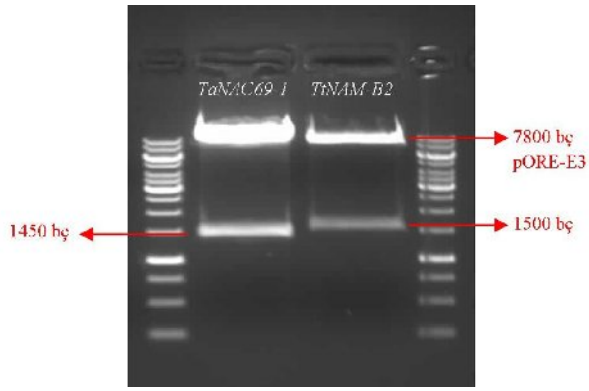
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

*Cla*I ve *Not*I enzimleri ile kesilerek elde edilen yapışkan uçların ligasyonundan sonra (Şekil 2), pozitif koloniler kanamisin içeren seçici besiyerinde büyütülmüş ve doğrulama için koloni PZR ve pORE-E3 vektörünün kesim enzimleri ile kesimi yapılmıştır.



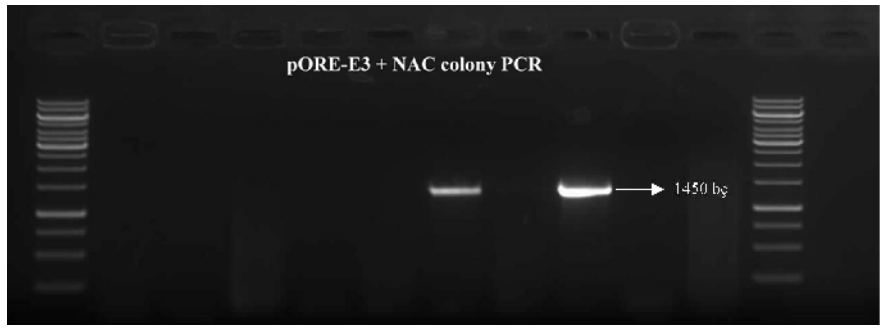
Şekil 2. pJET1.2 ve pORE-E3 vektörlerinin *Cla*I ve *Not*I enzimleri ile kesilmesiyle elde edilen ürünler. pJET1.2'den *Cla*I ve *Not*I enzimleriyle ayrılan **a)** 1450 baz çifti uzunluğundaki *TaNAC69-1* geni ve **b)** 1500 baz çifti uzunluğundaki *TtNAM-B2* geni.

pORE-E3 vektöründe bulunan *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerinin varlığını doğrulamak için, pORE-E3 vektörü *Cla*I ve *Not*I kesim enzimleri ile kesilerek, *TaNAC69*-1 geni için 1450 bazçifti büyüklüğünde *TtNAM-B2* geni için ise 1500 bazçifti büyüklüğünde bantlar jelde görüntülenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. pORE-E3 vektörünün *Cla*I ve *Not*I enzimleri ile kesilmesiyle *TaNAC69-1* ve *TtNAM-B2* genlerine ait bantlar.

Boş halde bulunan *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 suşuna elektroporasyon yöntemiyle *TaNAC69-1*genini içeren pORE-E3 vektörü transfer edilmiştir. Vektörün EHA 105 suşuna transfer edilip edilmediğini kanıtlamak için koloni PZR metodu kullanılmıştır. Koloni PZR ile taranan kolonilerden 2 tanesinde *TaNAC69-1* genini içeren pORE-E3 vektörünün bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 4). Elde edilen *TaNAC69-1* genini içeren ikili pORE-E3 vektörü tütün bitkisinde *Agrobacterium* aracılığıyla gen transferinde kullanılabilecek hale getirilmiştir.



Şekil 4. *A. tumefaciens* EHA105 suşundaki *TaNAC69-1* genine ait koloni PZR sonuçları.

Teşerkkür
Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından 108O786 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

[1] A.N Olsen, H.A. Ernst, L.L. Leggio, K. and Skriver, "NAC Transcription Factors: Structurally Distinct Functionally Diverse", Trends in Plant S., Vol. 10(2), pp.79-87, 2005.
[2] C. Coutu, J. Brandle, D. Brown, K. Brown, B. Miki, J. Simmonds, D.D. Hegedus, "pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation", Transgenic Res, Vol. 16, pp. 771–781, 2007.
[3] M.C.Baloğlu, G.Kalemtaş, A.Eroğlu, A.Battal, F.Ayşin, C.Kayıhan, H.A.Öktem, M.Yücel, "NAC69-1 ve NAM-B2 Genlerinin Buğdaydan İzolasyonu ve Partikül Bombardıman Yöntemiyle Buğdaya Aktarılması", 16. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 2009.

S-GB7

Farklı Sıcaklık Stresleri Altında Ekmek Mayasında (*Saccharomyces cerevisiae*) Gen İfade Profillerinin Mikroarray Yöntemi ile İncelenmesi

R. Yılmaz[1], M.C. Baloğlu[2], O. Ercan[2], H. A. Öktem[1,2], M. Yücel[1,2]

[1]Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi, 06531, Ankara.
[2]Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, Bitki Biyoteknoloji AR-GE Lab. 06531, Ankara.

ÖZET

Mikroarray tekniği, belirli bir stresle karşılaşan organizmaların bütün genomuna ait gen ifade seviyelerinin niceliksel analizlerinin incelenmesine ve bu genlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin saptanmasına olanak sağlamaktadır. Bu çalışmada, farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakılmış maya hücrelerinin (*Saccharomyces cerevisiae*) gen ifade seviyelerinin kantitatif analizleri ve moleküler tepkileri Yeast Genome 2.0 GeneChip kullanılarak Affymetrix mikroarray platformunda incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bağlı olarak, maya hücrelerinde ısı şok ve sıcaklık değişim stresleri sonucunda genel gen ifade profili belirlenmiş, ayrıca anlamlı farklılık gösteren prob setlerinin karşılık geldiği gen listeleri üzerinden ısı şok proteinlerini (HSP), ifade eden genlerin değişim düzeyleri gösterilmiştir.

GİRİŞ

Genombilim hızla artan genom dizi bilgileri sayesinde yeni bir alan olan fonksiyonel genombilime doğru kaymaktadır. Son yıllarda mikroarray yöntemi fonksiyonel genomiks ve transkriptomiksin en çok kullanılan araçlarından biri haline gelmiştir. Yüksek yoğunluk ve işlem hacimli DNA mikroarrayleri, aynı anda binlerce gen, gen ürünü, bunların ifade seviyeleri ve gen ağlarının nicel analizine izin vermektedir [1].

Ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae*'nin endüstriyel uygulamalar sırasında meydana gelen farklı streslere karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir [2]. Örneğin üretiminde *Saccharomyces cerevisiae*'nin kullanıldığı hamurun fermentasyonu, dondurulması, dondurularak saklanması ve çözülmesi gibi bu maya için optimum olmayan çevre koşullarında canlı hücre sayısının ve hamurun mayalanma kapasitesinin azaldığı bildirilmektedir [3,4]. Bunun gibi sıcaklık değişimlerine bağlı etkiler sonucu oluşan, hücresel yanıtların endüstride önemli teknolojik ve ekonomik sorunlara neden olduğu görülmektedir. Bu durumda *Saccharomyces cerevisiae*'nin ısı stres toleransının belirlenmesi ve geliştirilmesi gıda sanyiinde ekonomik açıdan da önem taşıdığı söylenebilir. Daha önce de pek çok araştırmanın konusu olan farklı ısı stresleri altında ekmek mayasında (*Saccharomyces cerevisiae*) oluşan değişimler Gerçek Zamanlı PZR tekniği kullanılarak moleküler düzeyde incelenmiş olup bu çalışmada mikroarray tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu teknik, belirli bir stresle karşılaşan *Saccharomyces cerevisiae*'nin de bütün genomuna ait gen ifade seviyelerinin niceliksel nalizlerinin incelenmesine ve bu genlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin saptanmasına olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmada, farklı sıcaklık koşullarına maruz bırakılmış maya hücrelerinin (*Saccharomyces cerevisiae*) gen ifade sevilerinin kantitatif analizleri, Yeast Genome 2.0 GeneChip kullanılarak Affymetrix mikroarray platformunda incelenmiştir. Isı şok ve sıcaklık değişim stresleri altında *Sacchromyces cerevisiae* genomunun genel gen ifade profilinin belirlenmesinin yanı sıra anlamlı farklılık gösteren gen listeleri üzerinden ısı şok proteinlerini (HSP) ifade eden genlerin değişim düzeyleri incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

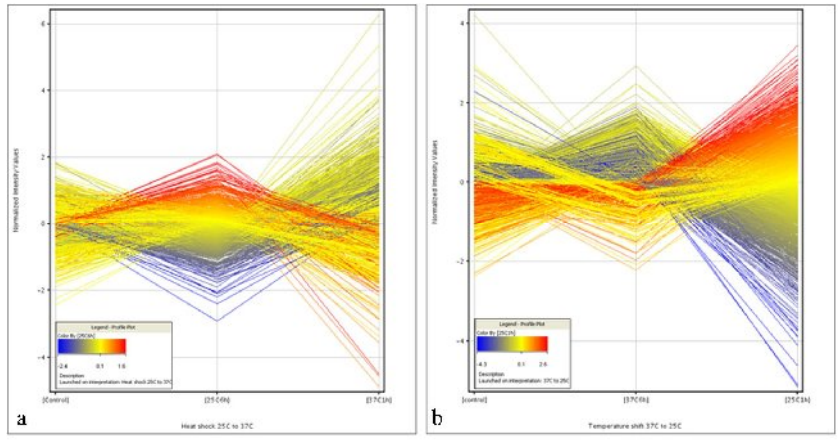
Bu çalışmada, Pakmaya tarafından üretilen ve ticari olarak satılan yaş maya kültürü materyal olarak kullanılmıştır. Maya hücreleri YPD sıvı besiyerinde (1% yeast extract, 2% pepton, 2% glukoz, pH: 5.3) 30°C'de, 130 rpm'de OD_{600}= 0.5 (~ 1.5 x 10^7 hücre/mL) ulaşıncaya dek büyütülmüştür. Başlangıç kültürünü oluşturmak için, bu hücrelerden 1 ml alınıp 40 ml taze YPD sıvı besiyerine ilave edilerek 30°C'de, 130 rpm'de 20 saat süre ile inkübe edilmiştir. Isı şok ve sıcaklık değişim stresleri için, kültüre edilen bu hücreler santrifüjden sonra sırası ile 30°C'de, 25°C'de ve 37°C'de önceden bekletilen YPD sıvı

besiyerlerine ilave edilerek 6 saat süreyle inkübe edilmiştir. Isı şok stresi için, 25°C'de 6 saat boyunca bekletilen hücreler santrifüjden sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sıcaklık değişim stresi için ise, 37°C'de 6 saat boyunca bekletilen hücreler santrifüjden sonra 25°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Farklı sıcaklık stresleri altındaki gen ifade seviyelerinin belirlenmesi için, 30°C'de elde edilen kültür örnekleri kontrol olarak kullanılmıştır.

Maya hücrelerinin RNA'ları uygulanan ön işlemler açısndan modifiye edilen TRIzol yöntemiyle izole edilmiştir [5]. RNA'ların bütünlük ve derişimi agaroz jel elektroforez yöntemi ve spektrofotometre ile belirlenmiştir. 10 µg RNA kullanılarak başlanan cDNA ve cRNA sentezi, biyotin ile işaretleme, hibridizasyon, yıkama ve tarama işlemleri Affymetrix GeneChip Ekspresyon Anlizleri Teknik Klavuzunda belirtilen yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. Data analizleri GCOS 1.4 (Affymetrix) ve GeneSpring GX 10 (Agilent) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [6]. Analizlerin tamamı ODTÜ Merkezi Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır.

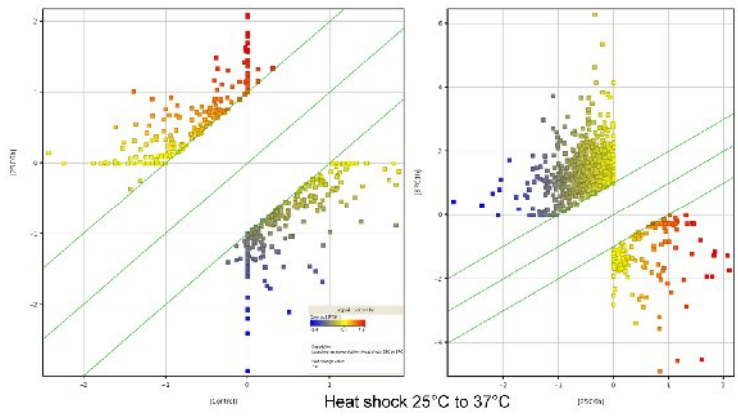
BULGULAR ve TARTIŞMA

Yeast Genome 2.0 GeneChip üzerinde, *Saccharomyces cerevisiae*'e ait 5841 transkript ve *Schizosaccharomyces pombe*'e ait 5031 transkript bulunmaktadır. Herbiri bir prob seti temsil eden bu transkriptlerden toplam 10715'i en az bir hibridizasyonda, tüm sinyal değerlerinin %20'lik en düşük diliminden daha yüksek sinyal vermiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında, ısı şok uygulaması altında 1244 prob setinin ifade seviyelerinde en az 2 kat artış ya da azalış; sıcaklık değişim uygulamasında ise, 1317 prob setinin ifade seviyelerinde en az 2 kat farklılığın oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 1).



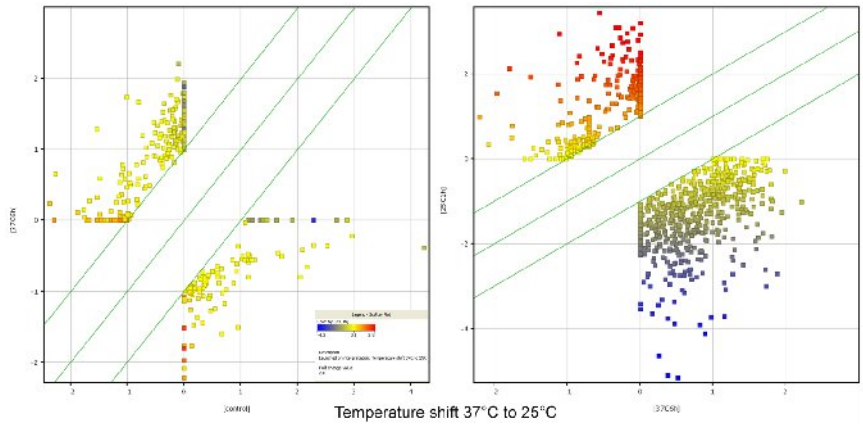
Şekil 1(a). Isı şok uygulaması sonucu, 37°C'de 1 saat inkube edilen hücrelerin kontrole (30°C) karşı ifade profilleri ($P < 0.05$). **(b)** Sıcaklık değişim uygulaması sonucu 37°C'de 6 saat, 25°C'de 1 saat inkube edilen hücrelerin kontrole karşı ifade profilleri ($P < 0.05$).

Isı şok uygulamasında, kontrol (30°C) ile 25°C'de 6 saat inkube edilen hücrelerin ifade profilleri karşılaştırıldığında, 186 transkriptin anlamlı ($P < 0.05$) farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu 186 transkriptin 74 adedinin ifade seviyelerinde artış, 112 adedinde ise ifade seviyelerinde düşüş olduğu gözlenmiştir. Buna karşın, 25°C'de 6 saat inkübasyonun hemen ardından, 37°C' de 1 saat inkube edilen hücrelerin ifade seviyeleri karşılaştıldığında, anlamlı ($P < 0.05$) farklılık gösteren transkript sayısının 902'ye çıktığı gözlenmiştir (Şekil 2). Bu transkriptlerden, 185 adedinde ifade düzeylerinin arttığı, 717 adedinde ise ifade seviyelerinin azaldığı saptanmıştır.



Şekil 2 (a) 25°C'de 6 saat ve **(b)** 37°C'de 1 saat inkübasyon sonunda kontrole (30°C) göre en az iki kat farklılık gösteren transkriptler.

Sıcaklık değişim uygulamasında ise, 37°C'de 6 saat inkübe edilen hücrelerin ifade profilleri kontrol hücre grubu ile karşılaştırıldığında, 409 transkriptin anlamlı ($P < 0.05$) artış ya da azalış saptanmıştır. Bunlardan 125 adedinin ifade seviyelerinin arttığı, buna karşın 284 adedinin ise ifade seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. Aynı hücrelerin 25°C'de 1 saat inkübasyon sonucunda ise oluşan ifade seviyeleri incelendiğinde, anlamlı ($P < 0.05$) farklılık gösteren transkript sayısının 990'a çıktığı ve bunlardan 555 adedinin ifade seviyelerinde artış, 435 adedinde ise ifade seviyelerinde azalış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3 (a). 37°C'de 6 saat ve **(b)** 25°C'de 1 saat inkübasyon sonunda kontrole (30°C) göre en az iki kat farklılık gösteren transkriptler.

Bu çalışmada ısı şok ve sıcaklık değişim stresleri altında *Sacchromyces cerevisiae* genomunun genel gen ifade profilinin belirlenmesinin yanı sıra anlamlı farklılık gösteren prob setlerinin karşılık geldiği gen listeleri üzerinden ısı şok proteinlerini (HSP) kodlayan genlerin değişim düzeyleri ayrıca incelenmiştir. Isı şoku stresi sonucunda HSP26 genini tanımlayan probun dışında HSP10, HSP30, HSP42, HSP78, HSP82 ve HSP104 genlerini tanımlayan problardan alınan sinyal değerleri açısından ısı şoku öncesinde azalış gözlenirken ısı şoku sonrasında belirgin bir artış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.)
Sıcaklık değişim stresi sonuçları incelendiğinde ise HSP12 genini tanımlayan probun dışında HSP26, HSP31, HSP32/HSP33, HSP60 ve HSP82 genlerini tanımlayan problardan alınan sinyal değerleri açısından sıcaklık değişim stresi öncesinde artış gözlenirken sıcaklık değişim stresi sonrasında belirgin bir azalış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.)

Prob setleri	Gen sembolü	Isı şoku öncesi (K / 25°C'de 6 s)	Isı şoku sonrası (25°C'de 6 s / 37°C'de 1 s)
1772658_at	HSP10	1.07 ↓	2.82 ↑
1777569_at	HSP26	1.06 ↑	4.41 ↑
1775364_at	HSP30	1.64 ↓	2.53 ↑
1776550_at	HSP42	2.15 ↓	2.94 ↑
1778899_at	HSP78	1.98 ↓	2.48 ↑
1773612_at	HSP82	1.93 ↓	4.91 ↑
1774564_at	HSP104	3.25 ↓	2.30 ↑
		Sıcaklık değişim stresi öncesi (K / 37°C'de 6 s)	**Sıcaklık değişim stresi sonrası (37°C'de 6 s / 25°C'de 1 s)**
1779754_at	HSP12	1.37 ↓	4.07 ↓
1777569_at	HSP26	1.65 ↑	3.48 ↓
1774696_at	HSP31	1.39 ↑	5.11 ↓
1770073_s_at	HSP32 /HSP33	1.18 ↑	10.31 ↓
1772196_at	HSP60	1.38 ↑	2.66 ↓
1773612_at	HSP82	3.13 ↑	2.35 ↓

Şekil 4. Isı şok proteinlerini (HSP) kodlayan genlerin değişim düzeyleri.

SONUÇ

Bu çalışmada farklı ısı streslerinin *Saccharomyces cerevisiae* genomunda yer alan transkriptlerin ifade seviyelerinde değişikliğe neden olduğunu genel gen ifade analiz sonuçları itibari ile söylemek mümkündür. Bunun yanı sıra özellikle incelenen HSP transkriptlerinde ısı stresine karşı oluşan davranışların beklenildiği gibi gerçekleştiği saptanmıştır. Elde edilen veriler üzerinde ileri veri analizleri devam etmekte olup genel gen ifade profilini oluşturan transkriptlerin sınıflandırılması ve anlamlı farklılık gösteren gen listeleri üzerinden ısı şok proteinlerinin yanı sıra moleküler şaperonlar ve hücre içi sinyal sistemini ifade eden genlerin değişim düzeyleri incelenecektir. Ayrıca bu sistemlerde yer alan ve ifade düzeyleri anlamlı şekilde değişen genlerin rol aldığı önemli metabolik yollar belirlenecektir.

KAYNAKLAR

[1] M.T. Öz, R. Yılmaz, F. Eyidoğan, L. De Graaff, M.Yücel, H.A. Öktem "Bor Toksisitesine Karşı Arpanın Gen İfade Seviyelerinin Mikroarray Yöntemi İle Belirlenmesi", 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 2007.

[2] P.V. Attfield, "Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast". Nat. Biotechnol., 15: 1351-1357, 1997.

[3] P.Gélinas, M. Lagimonière, and C. Dubord, "Baker's yeast sampling and frozen dough stability", Cereal Chem., 70: 219-225, 1993.

[4] S.Hatano, M. Udou, N. Koga, K. Honjoh, and T. Miyamoto, "Impairment of the glycolytic system and actin in baker's yeast during frozen storage", Biosci. Biotechnol. Biochem., 60: 61-64. 1996.

[5] R. Yılmaz, O. Ercan, M.C. Baloğlu, H.A. Öktem, M.Yücel "Optimisation of Yeast RNA Isolation Method for LightCycler qPCR and Affymetrix GeneChip Analysis", International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends, METU, Turkey, 2009.

[6] GeneChip Expression Analysis Technical Manual, 2004.