

***Oryctolagus cuniculus* Kimozin Enzimini *Pichia pastoris* Mayasında İfade Edecek Vektörün Dizayn ve Jenerasyonu**

Selin Alihanoglu, Meral Atlı, Hasan Vardin, Mehmet Karaaslan

Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa

Geliş Tarihi: 13.02.2018

Kabul Tarihi: 31.10.2018

Abstract

In this study, design and construction of pPIC9K_Chym vector was projected to construct the recombinant rabbit pro-chymosin gene. For this purpose, bioinformatic analysis was performed to determine the gene sequence of rabbit pro-chymosin. The primer designed for this sequence and the DNA sample taken from the rabbit were confirmed by comparison with PZR. This sequence was cloned to pPIC9K vector after digested with EcoRI and NotI restriction enzymes. After cloning, the vector containing the target gene was transformed into JM109 competent *E. coli* cells by heat shock treatment and selection on media containing ampicillin was performed. Antibiotic resistant single colonies carrying the target gene was verified by the PZR method and plasmid DNA extraction from *E. coli* cells was performed. The obtained plasmids were transferred to *Pichia pastoris* competent yeast cells by electroporation method and the transferred cells were verified to be carrying the target gene by cultivating them in various concentrations of G418 (antibiotic) containing medias.

Keywords: Rabbit; Chymosin, *Pichia pastoris*, Recombinant chymosin, pPIC9K

Öz

Bu çalışmada rekombinant tavşan pro-kimozin genini üretmek amacıyla kullanılacak olan pPIC9K-Chym vektörünün dizayn edilmesi ve çoğaltılması hedeflenmektedir. DNA bilgi bankalarında biyoinformatik analizler yapılarak tavşan pro-kimozin gen dizilimi belirlenmiştir. Elde edilen dizilimlere göre dizayn edilen primerler ile tavşandan genomundan kimozin enzimi izole edilmiştir. Hedef DNA sekansları PIC9K vektörüne EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleriyle üzerinden klonlanmıştır. Klonlama işlemi sonrasında hedef geni içeren vektör, JM109 kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku uygulamasıyla transforme edilmiş ve antibiyotikli besiyerinde seçilimleri gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik pozitif olan tek kolonilerin hedef geni taşıyıp taşımadıkları koloni PZR yöntemiyle doğrulanmış ve *E. coli* hücrelerinden plazmid DNA'lar ekstrakte edilmiştir. Elde edilen plazmid DNA'lar elektroporasyon yöntemi ile *Pichia pastoris* kompetent maya hücrelerine aktarılmış ve aktarılan hücreler çeşitli konsantrasyonlarda antibiyotik içeren besi yerlerine ekilerek hedef geni taşıdıkları doğrulanmıştır.

Anahtar kelimeler: Tavşan; Kimozin; *Pichia pastoris*; Rekombinant kimozin; pPIC9K

1. Giriş

Enzimler, bitki ve hayvan dokularından izole edilebildiği gibi mikroorganizmalar tarafından da üretilebilmektedirler. Uzun yıllardır çok sayıda mikroorganizma fermentasyon ortamında enzim üretimi amacıyla kullanılmışlardır. Fakat günümüzde klasik yöntemlerle enzim üretimi yanı sıra yeni modern yollar da kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile gıda sektöründe kullanılan birçok enzim bu teknoloji ile üretilmeye başlanmış böylelikle düşük maliyet ve yüksek verim ile enzim eldesi mümkün olabilmektedir. Rekombinant enzim üretimine 1988 yılında rekombinant kimozin üretimi ile başlanmıştır [1]. Kimozin (EC 3.4.23.4) sütün pıhtılaşmasını sağlayan genç memelilerin

midelerinin dördüncü bölümünde bulunan, 323 amino asitten oluşan ve 35,6 kDa ağırlığında olan bir aspartik proteazdır. Bu enzim mide mukozası tarafından inaktif prokimozin olarak salgılanır. İnaktif enzim 365 amino asitten oluşur ve 40,8 kDa ağırlığındadır. Asidik koşullarda 42 amino asidin oluşturduğu N terminal ön zincirinin otokatalitik ayrılması ile prokimozin aktif enzim halini alır [2]. İlk olarak *E.coli* de ifade edilen sığır kimozinini zaman içerisinde farklı hayvan kaynakları ve konakçılar da denenerek, tam anlamıyla hayvansal kaynaklı enzimlerin yerini alabilmektedir. Rekombinant kimozin birçok peynir çeşidi üretiminde kullanılmış ve üretilen bu peynirlerin kalitesi ile buzağı renneti ile üretilen peynirlerin kalitelerinin karşılaştırabilir

olduğu görülmüştür [3, 4, 5, 6, 7]. Son yıllarda yürütülen çalışmalar daha çok maya sistemleri kullanılarak rekombinant kimoziin üretimi üzerine odaklanmış ve bu amaçla daha iyi optimize edilmiş heterolog maya ekspresyon sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Protein mühendisliğinin gıda üretim sistemlerine uygulandığı en önemli alanlardan birisi moleküler kimoziin dizaynidir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda domuz, buzağı, kuzu, keçi ve son olarak deve kimoziinin gen dizilimi ve bu genlerin karakterizasyonu yapılmış ve bunların rekombinant üretimi sağlanmıştır. Ancak kimoziin için yeni kaynak arayışları devam etmektedir. Nüfusun giderek arttığı ve buna bağlı olarak peynir tüketiminin de arttığı günümüzde kimoziin için kaynak arayışları önemini korumaktadır. Tavşan midesinden (abomasum) izole edilen rennetin peynir yapımı için önemli bir kaynak olabileceği ve peynir üretiminde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu öngörülmektedir [8]. Bu çalışmanın amacı biyoinformatik analizler sonucu belirlenen tavşan pro-kimoziin geninin dizayn edilen uygun primerler vasıtasıyla tavşan genomundan izole edilmesi. İzole edilen genin maya transformasyon vektörüne klonlanması. Moleküler analizler vasıtası ile vektörün hedef geni taşıdığına tespit edilmesidir ve mayalardaki varlığının doğrulanmasıdır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hayvan materyali

Bu çalışmada kullanılan *Oryctolagus cuniculus* (tavşan) materyalleri Şanlıurfa piyasasında satılan tavşan derilerinin satın alınıp, uygun koşullarda laboratuvara taşınması ve saklanmasıyla elde edilmiştir.

2.2. Kimyasal maddeler

Araştırmada kullanılan GeneJet #K0721 DNA Saflaştırma kiti, Proteinaz K Thermo scientific firmasından (Amerika); QIAquick DNA saflaştırma kiti Qiagen (Almanya) firmasından; PZR kiti (Magnezyum klorür, dNTP, standart buffer, Taq Polimeraz), Restiraksiyon Endonükleaz enzimleri New England Biolabs (İngiltere) firmasından; primerler Sentegen (Türkiye) firmasından; *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) mayaları, ekspresyon vektörleri, besiyerleri Invitrogen (Kaliforniya) firmasından; JM 109 kompetent hücreleri Promega firmasından

(Amerika); temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasal materyaller analitik saflık düzeyindedirler.

2.3. DNA ekstraksiyonu

GeneJet # K0721 DNA saflaştırma kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

2.4. Primer Tasarımı

Çalışmamızda Tavşan Genomundaki kimoziin geninin yerinin belirlenmesi ve dizayn edilen vektörün hedef geni içerip içermediğini doğrulama amaçları ile çoğaltılmak istenen bölgelere göre farklı primer tasarımları yapılmıştır (Tablo1).

Tablo 1. Kullanılan primer dizilimleri

Primer Adı	Tm°	%GC	Baz dizilimi (5' 3')
ODF1(İleri)	67,4	55	GTTGTTGGCCCTGTCGAAGA
ODR1(Geri)	64,7	50	TCCACATCCAGAGAGCCATT
ODF2(İleri)	68,8	60	TGTCCAGGGTGAAGTCCAG
ODR2(Geri)	59,6	50	TACCTACCTGTTCCCTGTGA
ODF3(İleri)	59,9	50	ATACTGGATGTACAGGGGCT
ODR3(Geri)	64,4	55	AAGCACCAGGTGCGAAGTGA
ODF4(İleri)	66	55	ATCGAGGTGTCGGATAACGG
RCF1(İleri)	59.24	45	GAACATGGTTTGTGGGTGA
RCR1(Geri)	58.34	50	GCAGTAGCCAAACCAATCT

2.5. PZR analizi

PZR analizi temel moleküler biyoloji kurallarına uyularak Tablo 2. 'deki şartlarda yapılmıştır [9].

2.6. DNA saflaştırılması

PZR reaksiyonu ürünlerinden DNA' nın saflaştırılması işlemi GE Healthcare GFX PZR DNA and Gel Band Saflaştırma Kiti kullanılarak yapılmıştır.

2.7. pPICK9K_OC_PROCHY vektörünün elde edilmesi

PZR reaksiyonu ve yapılan biyoinformatik analizler sonucu dizilimi belirlenen tavşan pro-kimoziin geni pPICK9K vektörüne klonlanmış bir şekilde GenScript (Amerika) sentezletirilmiştir. Toplamda 1089 baz dizisinden oluşan hedef genimiz, çoklu klonlanma bölgesinden EcoRI ve NotI kesme enzimleri ile kesilmiş, kodon optimizasyonu yapılarak pPIC9K vektörüne klonlanmış olarak temin edilmiştir.

Tablo 2. PZR analiz koşulları

Basamaklar	ODF1-ODR1	ODF2-ODR2	ODF3-ODR3	ODF4-ODR4	RCF1-RCR1	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	94 °C 3 dak	94 °C 3 dak	94 °C 3 dak	94 °C 3 dak	94 °C 30 san	1X
Denatürasyon	94 °C 30 san	94 °C 30 san	94 °C 30 san	94 °C 30 san	94 °C 30 san	
Bağlanma	58 °C 45 san	59°C 45 san	60 °C 45 san	60 °C 45 san	60 °C 45 san	35X
Uzama	72°C 1.30 dak	72°C 1 dak	72°C 1.30 dak	72°C 1.30 dak	72°C 1.30 dak	
Son uzama	72°C 10 dak	72°C 10 dak	72°C 10 dak	72°C 10 dak	72°C 10 dak	1X

2.8. pPIC9K-Chy vektörünün çoğaltılması ve doğrulanması

P. pastoris mayalarına aktarılması amacıyla hedef genimizi taşıyan pPIC9K plazmidini JM109 *Escherichia coli* hücrelerine transforme edilerek vektörümüzün çoğaltılması sağlanmıştır. Transformasyon işlemi üretici firmanın kılavuzunda bulunan protokole bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu metoda göre steril polipropilen tüpler buz üzerinde 5 dakika soğutulduktan sonra içerisine 100 µl -80°C' de saklanan *E. coli* JM 109 kompetent hücreleri çözündürülerek eklenmiştir. Üzerine 1 µl hedef geni taşıyan plazmidimiz eklenmiştir. Polipropilen tüpler hafifçe karıştırılarak buz üzerinde 10 dakika inkübe edildikten hemen sonra 42°C' lik su banyosunda 50 saniye tutulmuştur. Daha sonra tekrar buz üzerine alınarak iki dakika bekletilmiştir. Böylelikle bakteri hücre membranı porları ani ısı değişikliği ile açılıp kapanırken plazmid DNA' nın *E. coli* hücrelerine geçişi sağlanmıştır. Bakteri hücrelerinin üzerine SOC sıvı besiyeri eklenerek çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 225 rpm 'de 60 dakika bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra transforme edilmiş bakteri hücresi 100µg/ml ampisilin içeren LB (Luria Bertani) agara ekilerek 37° C' de tek koloni oluşana kadar inkübe edilmiştir. Antibiyotikte gelişen kolonilerin sahip oldukları antibiyotik direncine bağlı olarak pPIC9K-Chy vektörünü içerdiği düşünülmüştür. Bu kolonilerin pPIC9K-Chy vektörünü içerdiğini doğrulamak için ise elde edilen bir tek koloni ampisilin içeren LB mediyuma aktarılmış 37°C de 225 rpm de bir gece inkübe edildikten sonra yine kullanıcı kitabındaki Alkali Lizis Yöntemi uygulanarak plazmid DNA izolasyonu yapılmış ardından da elde edilen plazmid DNA, PZR yönteminde DNA kaynağı

olarak kullanılarak istenilen hedef genin varlığı doğrulanmıştır.

2.9. Kompetent *Pichia pastoris* maya hücrelerinin hazırlanması

E. coli hücrelerinde çoğaltılmış olan hedef *Oryctolagus cuniculus* pro-kimozin genini içerdikleri doğrulanmış pPICK9K_OC_PROCHY vektörünün elektroporasyon yöntemi ile *P. pastoris* GS115 mayalarına aktarılması amacıyla kullanıcı kitabına bağlı olarak kompetent *P. pastoris* mayaları hazırlanmıştır. Bu amaçla stab GS115 kültürlerinden alınarak YPD agara çizme metodu ile aktarılmış 30°C de tek koloni olana kadar inkübe edilmiştir. Gelişen tek koloniler seçilerek 5 ml YPD besiyerine aktarılmış ve 30°C de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün içerisinde maya hücreleri gelişmiş olan bu besiyerinden 0.4 ml alınıp tekrar 500 ml taze YPD sıvı besiyerine aktarılmış ve OD₆₀₀ değeri 1.3-1.5' e varana kadar gelişimi takip edilmiştir. İstenen yoğunluğa erişmiş besiyerleri kullanıcı kitabında belirtilen protokol doğrultusunda santrifüjleme ve sorbitol ile çözme işlemlerine tabi olduktan sonra elektroporasyon için hazır bir hal almışlardır.

2.10. Hedef geni taşıyan pPICK9K_OC_PROCHY vektörünün elektroporasyon yöntemi ile *Pichia pastoris* kompetent hücrelerine aktarılması ve elektroporasyonun doğrulanması

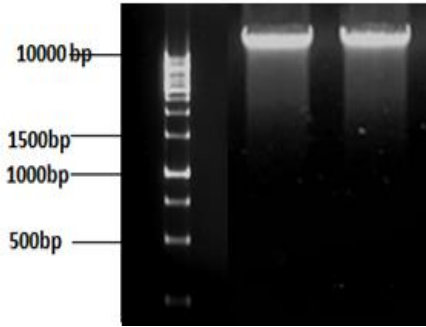
Hedef geni taşıyan pPICK9K_OC_PROCHY vektörü *Pichia pastoris* kompetent hücrelerine aktarılmadan önce *SacI* enzimi ile 37 °C'de gece boyunca bekletilerek doğrusal hale getirilmiştir. Daha sonra üretici firmanın kullanıcı kitabındaki protokol uygulanarak *S. Cerevisiae* ya göre ayarlanmış elektroporasyon cihazı ile doğrusal hale getirilmiş DNA kompetent maya hücrelerine aktarılmıştır. Daha sonra elektropore olmuş hücreler yayma

metodu ile MD (Minimal Dekstroz) katı besiyerine ekilmiş ve koloni oluşumu gözlenene kadar 30°C'de inkübe edilmiştir. Elektroporasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını doğrulamak için MD katı besiyerinde gelişen tek koloniler farklı konsantrasyonlarda (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml) Geneticin G418 antibiyotiği içeren YPD (Yeast Peptone Dextrose) besiyerine aktarılmış burada da direnç gösteren kolonilerin hedef geni taşıdığı doğrulanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Tavşan kimozi geninin PZR vasıtası ile çoğaltılması, saflaştırılması ve doğrulanması

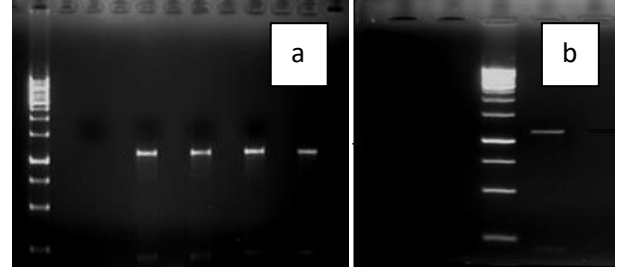
Tavşan derisinden yapılan DNA ekstraksiyonu sonucunda elde edilen DNA'nın moleküler çalışmalarda kullanılacak nitelikte olup olmadıkları jel elektroforezi ile teyit edilmiştir. Tavşan kimozi genine ait DNA'ların % 1.2 lik agaroz jel görüntüsü Şekil 1.'de verilmiştir.



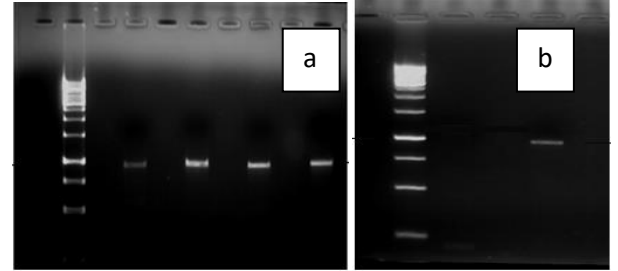
Şekil 1. Tavşan DNA 'sı jel görüntüsü 1. Kuyucuk DNA markörü, 2. ve 3. Kuyucuklar tavşan genine ait cDNA'ların % 1.2 lik agaroz jel görüntüsü.

Tavşandan kimozi geninin tavşan genomu üzerindeki yeri başka canlılarda bulunan kimozi gen bölgeleri ile tahmini tavşan kimozi geninin (NCBI erişim no: **XM_002715787.2**) karşılaştırılması sureti ile yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Kimozi geninin tavşanın 143.360.832 bazdan oluşan 13. kromozomu üzerinde 53.709.000 ile 53.717.500 bazları arasında kalan 8500 bazlık kısımda bulunduğu biyoinformatik analizler sonucunda belirlenmiştir. Gen üzerinde bulunan exon ve intron bölgeleri de belirlendikten sonra bu DNA parçaları PZR yöntemi ile çoğaltacak primerler tasarlanmıştır. Tablo1'de verilen primerler kullanılarak yapılan PZR analizleri sonucunda elde edilen DNA bantlarının dizimleri belirlenerek tavşan kimozi geninin nükleik asit sekansına

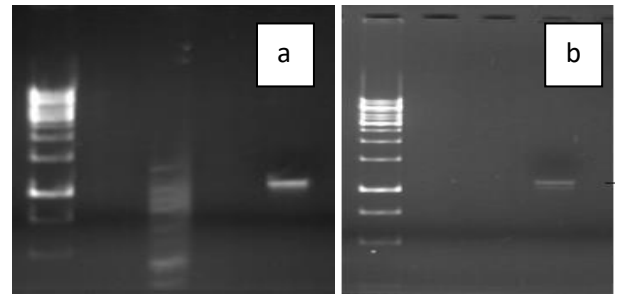
ulaşmıştır (Şekil 2, 3, 4, 5) ve belirlenen dizilime bağlı kalınarak vektöre aktarılacak hedef genin eldesinde kullanılmıştır. Ayrıca PZR sonucu elde edilen ürünler saflaştırılarak dizilemeye gönderilmiş ve gelen dizilim ile tavşan genomunda kimozi olarak tahmin edilen bölge karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre bu belirlenen bölgeler tavşan kimozi genini olarak tahmin edilen bölgelerdeki dizimler ile % 100 benzerlik göstermiştir. Bu verilere dayanarak sentezlenen tavşan kimozi geni pPICK9K vektörü içerisine NotI ve EcoRI klonlama bölgeleri üzerinden aktarılmıştır. Rekombinant kimozi ekspresyonu için kodon optimizasyonu yapılmış ve optimize edilmiş bölgeyi çoğaltmak için RCF1, RCR1 primerleri tasarlanmıştır (Tablo 2.) ve bu primerler kullanılarak hedef genin vektöre uygun ve doğru yönde aktarıldığı analiz edilmiştir.



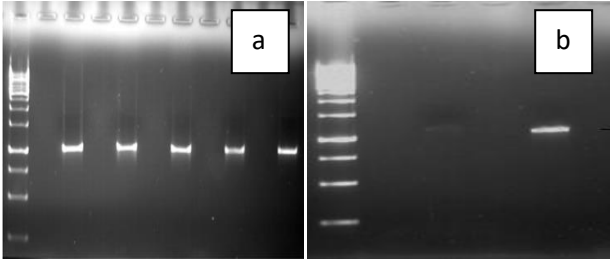
Şekil 2. a) ODF1-ODR1 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü **b)** Saflaştırma işleminin kontrolü



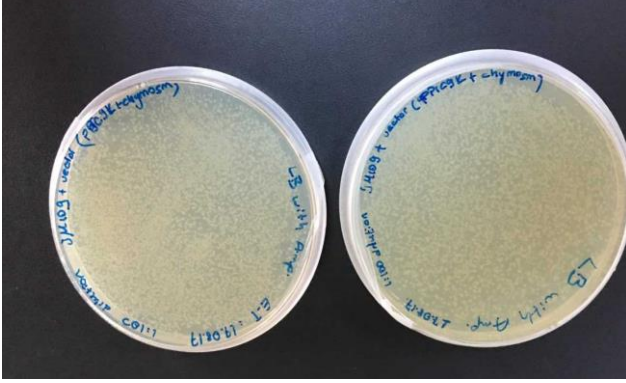
Şekil 3. a) ODF2-ODR2 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü **b)** Saflaştırma işleminin kontrolü



Şekil 4. a) ODF3-ODR3 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü **b)** Saflaştırma işleminin kontrolü

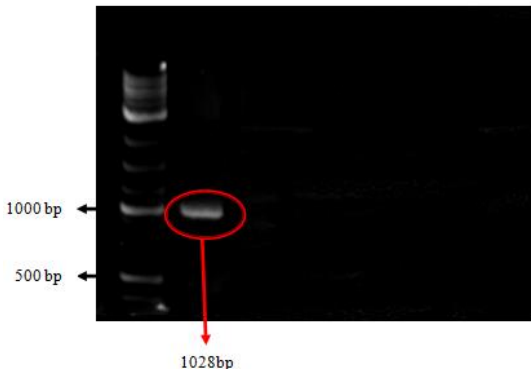


Şekil 5. a) ODF4-ODR4 primer çiftleri ile yapılan PZR analizi sonucu jel görüntüsü b) Saflaştırma işleminin kontrolü



Şekil 6. 100µl/ml ampisilin içeren Luria Bertani katı besi erinde geliştirilen pPICK9K_OC_PROCHY plazmidini içeren JM109 kompetent *E. coli* hücreleri

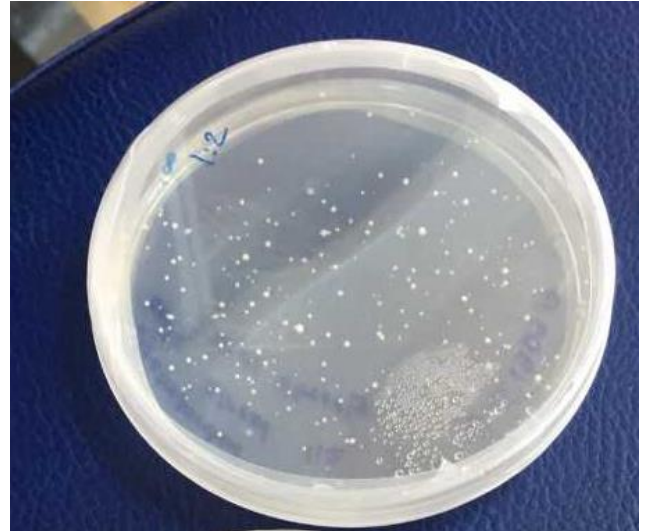
PZR sonucunda elde edilen reaksiyon ürünlerinin değerlendirmesinde agaroz jel analizi kullanılmış ve boyut doğrulaması yapıldıktan sonra ikinci bir konformasyon yöntemi olarak DNA dizilemesi yapılarak sekans bilgisi elde edilmiştir. Hedef gen bölgesinin amplifikasyonu sonucunda elde edilen DNA bantları istenilen boyutta olduğu için PZR ürünleri saflaştırılmış ve sekans bilgileri tespit edilerek dizilimler belirlenmiştir. Elde edilen dizilimler ve pPICK9K vektörüne göre optimizasyonu yapılmış *Oryctolagus cuniculus* kimozin geninin dizilimlerinin %100 oranında benzerlik gösterdikleri tespit edilmiş (Şekil 8) ve kesin olarak pPICK9K_OC_PROCHY plazmid vektörünün doğru bir şekilde inşa edildiği doğrulanmıştır.



Şekil 7. *Oryctolagus cuniculus* kimozin geninin OCF1-OCR1 primer çifti kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılması sonucu elde edilen %1.2 lik agaroz jel görüntüsü

3.3. Hedef geni taşıyan pPICK9K-Chy vektörünün elektroporasyon yöntemi ile *Pichia pastoris* kompetent hücrelerine aktarılması ve elektroporasyonun doğrulanması

P. pastoris mayaları gelişebilmek için buldukları besiyeri ortamında histidin amino asidi bulunmasına ihtiyaç duyarlar ya da histidin bulunmadığı durumlarda metabolik olarak bu amino asidi üretebilme yeteneğinde olmaları gerekir ancak *P. pastoris* GS115 suşunun histidin üretme yeteneği bulunmamaktadır. Yapılan dizayna göre *P. pastoris* mayalarının genomuna rekombine olma yeteneğinde bulunan pPIC9K vektörü yapısında hedef genin yanı sıra histidin üretimini katalizleyen HIS4 genini ve antibiyotik dirençlilik genlerini bulundurmaktadırlar Dolayısıyla ancak genomuna pPIC9K vektörünün (Şekil 9) yerleştiği *Pichia pastoris* mayalarının histidin bulunmayan selektif besiyerinde koloni oluşturma yeteneğine sahip olabilecekleri düşünülerek ilk seçim bu prensiple yapılmıştır ve içerdiği vektör sayesinde histidin bulunmayan selektif besiyerinde gelişme yeteneğini gösteren maya hücreleri His⁺ olarak adlandırılmışlardır (Şekil10).



Şekil. 10. Elektroporasyon sonrası MD katı besiyerinde His⁺ gelişen koloniler

```

Query 1      GAACATGGTTTGGTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGA 60
          |||
Sbjct 58      GAACATGGTTTGGTGGGTGACTTTTTGAAGAAGCACCAAGTTGAATTGTCCAGAAAAAGA 117

Query 61     TCCCATTCTGGTGTGTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTC 120
          |||
Sbjct 118     TCCCATTCTGGTGTGTGCTAACGAGGCTTTGACTAACTACTTGGATGTTCAATACTTC 177

Query 121    GGTA AAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCT 180
          |||
Sbjct 178    GGTA AAAATCCAAATCGGTACTCCACCTCAAGAGTTTACTGTTGTTTTCGATACTGGTTCT 237

Query 181    TCTGATTTGTGGGTTCCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGA 240
          |||
Sbjct 238    TCTGATTTGTGGGTTCCCTTCTATCTACTGTAAGAACAAGGCTTGTAAGATTCACAGAAGA 297

Query 241    TTCGATCCAAC TAAATCTTCTACTTTCCAACACATGCACAAGCCTTTGTACATTCAATAT 300
          |||
Sbjct 298    TTCGATCCAAC TAAATCTTCTACTTTCCAACACATGCACAAGCCTTTGTACATTCAATAT 357

Query 301    GGTACTGGTTCTATGCAAGGTGTTTTGGGTTATGATACTGTTACTGTTGCTGGTATTGTT 360
          |||
Sbjct 358    GGTACTGGTTCTATGCAAGGTGTTTTGGGTTATGATACTGTTACTGTTGCTGGTATTGTT 417

Query 361    GATACTCACCAA CTGTTGGTTTGTCTACTAAAGAACCAGGAGATGTTTTGTTTACTCT 420
          |||
Sbjct 418    GATACTCACCAA CTGTTGGTTTGTCTACTAAAGAACCAGGAGATGTTTTGTTTACTCT 477

Query 421    GAGTTCGATGGTATTTTGGGTATGGGTTATCCTAACATTGCTTTTCCACATTCTGTTCCCT 480
          |||
Sbjct 478    GAGTTCGATGGTATTTTGGGTATGGGTTATCCTAACATTGCTTTTCCACATTCTGTTCCCT 537

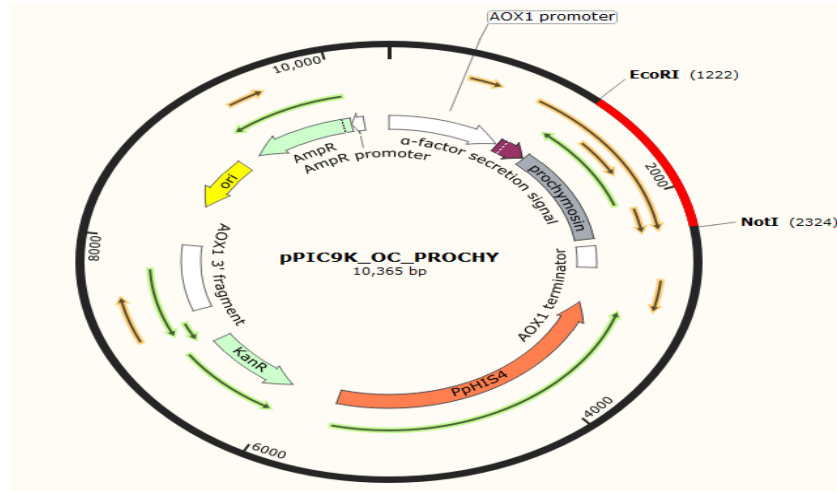
Query 481    GTTTTCGATAATATGATGCATAAGCACTTGTTGCTCAAGATTTGTTTTCTGTTTACATG 540
          |||
Sbjct 538    GTTTTCGATAATATGATGCATAAGCACTTGTTGCTCAAGATTTGTTTTCTGTTTACATG 597

Query 541    TCCAGATCCGGTGAAGGTTCTATGTTGACTTTGGGTGGTATTGATTCTCAATACCATACT 600
          |||
Sbjct 598    TCCAGATCCGGTGAAGGTTCTATGTTGACTTTGGGTGGTATTGATTCTCAATACCATACT 657

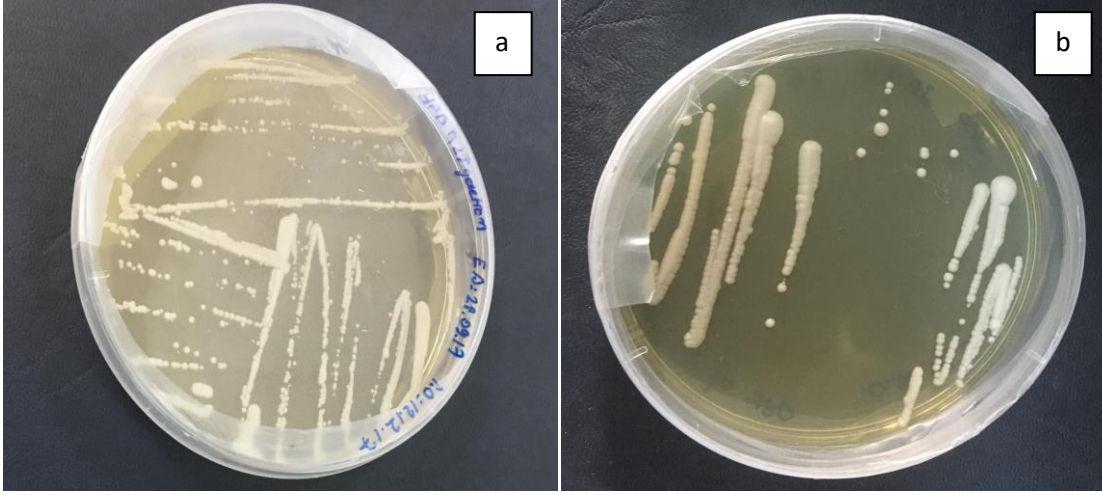
Query 601    GGAGATTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAAGGTTATTGGCAATTCAC TTTGGATAGA 660
          |||
Sbjct 658    GGAGATTTGCACTGGGTTCCAGTTACTGTTCAAGGTTATTGGCAATTCAC TTTGGATAGA 717
    
```

Query	661	GTTACTGTTGATGGTAAAGTTGTTGCTTGTGAGAGAGGTTGTCAAGCTATTTTGGATACT	720
Sbjct	718	GTTACTGTTGATGGTAAAGTTGTTGCTTGTGAGAGAGGTTGTCAAGCTATTTTGGATACT	777
Query	721	GGTACTTCTTTGTTGATTGGTCCAGATTCTGAGATTTTGCATATTCAAAGAGCTATTGGT	780
Sbjct	778	GGTACTTCTTTGTTGATTGGTCCAGATTCTGAGATTTTGCATATTCAAAGAGCTATTGGT	837
Query	781	GCTTCTGAAGGAGAGTATGGTGAATTTGGTTTCTCTTGTAAAGTCTTTGTCCTCTAAACCT	840
Sbjct	838	GCTTCTGAAGGAGAGTATGGTGAATTTGGTTTCTCTTGTAAAGTCTTTGTCCTCTAAACCT	897
Query	841	GCTGTTGTTTTTGTAGATTAACGGTAGAAAGTTCCCATTTGTCTCCTTCTGCTTACACTAAT	900
Sbjct	898	GCTGTTGTTTTTGTAGATTAACGGTAGAAAGTTCCCATTTGTCTCCTTCTGCTTACACTAAT	957
Query	901	AAGGATAAGGGTTTGTGTTACTCTGGTTTTGAAGGTGGTTCTCAATTGTGGATTTTGGGA	960
Sbjct	958	AAGGATAAGGGTTTGTGTTACTCTGGTTTTGAAGGTGGTTCTCAATTGTGGATTTTGGGA	1017
Query	961	GATGTTTTTATTAGAGCTTACTACTCTGTTTTTCGATAGAGCTAACCAATAGATTGGGTTTG	1020
Sbjct	1018	GATGTTTTTATTAGAGCTTACTACTCTGTTTTTCGATAGAGCTAACCAATAGATTGGGTTTG	1077
Query	1021	GCTACTGC	1028
Sbjct	1078	GCTACTGC	1085

Şekil 8. RCF1-RCR1 spesifik primerleri kullanılarak çoğaltılan gen bölgesi ve pPICK9K_OC_PROCHY plazmidinde bulunan pPICK9K vektörüne göre optimize edilmiş *Oryctolagus cuniculus* kimozin genine ait dizilimin karşılaştırılması.



Şekil 9. pPICK9K vektörüne EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleri ile kesilerek yerleştirilen tavşan pro-kimozin geninin şematik gösterimi



Şekil 11. a) 0,25 mg/mL G418 antibiyotik içeren YPD agarda gelişmiş koloniler b) 2mg/mL G418 antibiyotik içeren YPD agarda gelişmiş koloniler.

Elektroporasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını doğrulamak için ikinci adım olarak ta MD katı besiyerinde gelişen tek koloniler farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren besiyerine aktarılmış burada da direnç gösteren koloniler gözlenmiştir (Şekil11). *Pichia pastoris* maya hücreleri genomlarında antibiyotiğe direnç gösterebilen herhangi bir gen dizilimine sahip olmadıklarından antibiyotikli besiyerinde koloni oluşması transformasyon işleminin başarı ile yapıldığının kanıtıdır.

4. Sonuç:

Hayvansal kaynakların sınırlı olması, yüksek maliyet ve artan enzim ihtiyacının karşılanamaması gibi sorunlardan dolayı rekombinant kimozin üretim çalışmaları uzun yıllardır yapılmaktadır. Rekombinant kimozin üretiminde *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* gibi değişik mikrobiyal ifade sistemleri kullanılmaktadır fakat farklı ekspresyon sistemlerinin bu amaçla kullanılabilme araştırmaları da devam etmektedir. Metiltrofik bir maya olan *Pichia pastoris* aktif heterolog proteinlerin üretimi için önemli bir ekspresyon (ifade) sistemi haline gelmiştir. Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada farklı orjindeki proteinler başarılı bir şekilde bu organizmada klonlanmış ve ifade edilmiştir.

Bu çalışmada biyoinformatik analizler sonucu belirlenen tavşan kimozin geni pPIC9K vektörüne başarılı bir şekilde klonlanmış ve elektroporasyon yöntemi ile *Pichia pastoris* ekspresyon sistemine transforme edilmiştir. Elektroporasyon sonrası elde edilen hücreler farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren besiyerlerine ekilmiş ve bu besiyerlerinde gelişim gösteren hücrelerin hedef geni taşıdığı kanıtlanmıştır. Tavşan pro-kimozin genini içeren rekombinant vektör ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere inşa edilmiştir.

Kaynaklar:

- [1]. Flamm, E.L., "How FDA approved chymosin: A case history", **Nature Biotechnology**, 9: 349–351, 1991.
- [2]. Foltmann, B., Pedersen V. B., Jacobsen M., Auffman, D., Wijbrandt G., "The complete amino acid sequence of prochymosin", **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 74: 2321–4, 1977.
- [3]. Houen, G., Madsen, M.T., Harlow, K.W., Lønblad, P., Foltmann, B., "The primary structure and enzymic properties of porcine prochymosin and chymosin" **Int J Biochem Cell Biology**. 28(6):667-675, 1996.
- [4]. Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Kaushik, J. K., Grover, S., and Batish, V. K.,

- "Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*)", **Journal of Dairy Research**, 70(01): 37-43, 2003.
- [5]. Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., and Punglerčar, J., "Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production", **Journal of dairy science**, 84(5): 1020-1026, 2001.
- [6]. Vega-Hernández, M. C., Gómez-Coello, A., Villar, J., and Claverie-Martín, F., "Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin", **Journal of biotechnology**, 114(1): 69-79, 2004.
- [7]. Kappeler, S. R., Van Den Brink, H. J., Rahbek-Nielsen, M., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E., Johansen, E., "Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk", **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 342: 647-654, 2006.
- [8]. Rao, S., Dutta, S.M., "Extraction of rennet from abomasum of suckling buffalo calves", **Ind J Dairy Sci**, 34 (2): 235-237, 1981.
- [9]. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J., "Molecular cloning". **A laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory**, New York. 545, 1982.