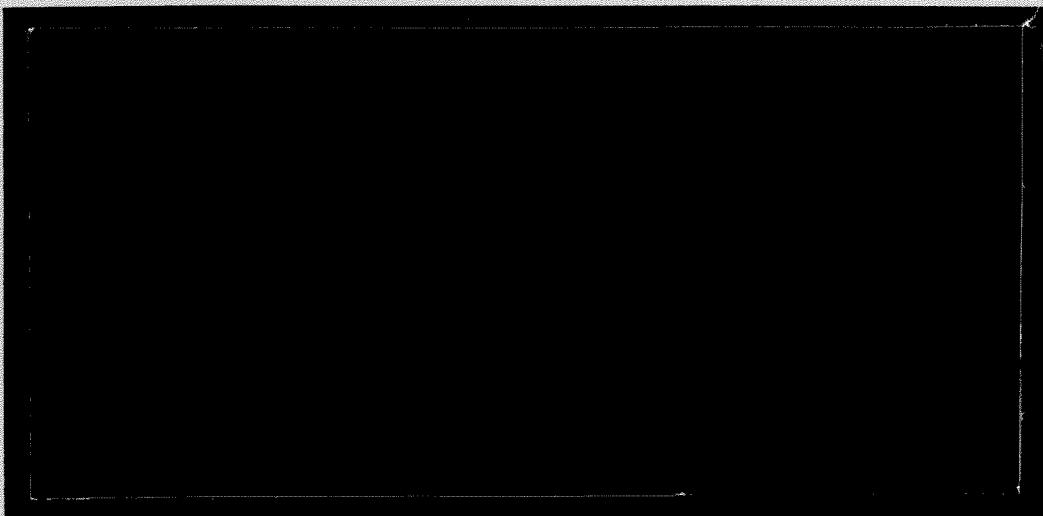


2000 - 181



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY



Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

**FARKLI BİTKİ TRANSFORMASYON VEKTÖRLERİNİN
HAZIRLANMASI VE PROTOPLAST VE *AGROBACTERIUM*
SİSTEMLERİNDE DENENMESİ**

PROJE NO: TBAG-1586 (197TO12)

**PROF. DR. MERAL YÜCEL
PROF. DR. HÜSEYİN AVNİ ÖKTEM
FAHRİYE ERTUĞRUL
FÜSUN İNCİ
MELTEM SALDAMLI**

**MART 2000
ANKARA**

ÖNSÖZ

Sunulan rapor, “Farklı Transformasyon Vektörlerin Hazırlanması ve Protoplast ve *Agrobacterium* Sistemlerinde Denenmesi” başlıklı ve TBAG-1586 Nolu, TÜBİTAK tarafından desteklenen Araştırma Projesi kapsamında yürütülen araştırmaları ve elde edilen sonuçları sunmaktadır. Proje esnasında gerçekleştirilen tüm çalışmalar O.D.T.Ü. Biyoloji Bölümü, Bitki Fizyolojisi Biyokimyası ve Moleküler Biyolojisi Araştırma Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Raporun ilk bölümünde konuya yönelik literatür bilgisi verilmektedir. Raporda ikinci bölüm olan “Materyal ve Metodlar” kısmında proje esnasında yürütülen deneysel çalışmaların yöntemleri sunulmakta ve üçüncü bölümde ise elde edilen sonuçlar sunulmaktadır. Raporun son bölümünde gözlenen sonuçlar tartışılmakta ve ileriye yönelik araştırma önerileri verilmektedir.

TÜBİTAK'a bu araştırmanın gerçekleştirilmesi için sağlamış olduğu destekten dolayı ve proje ekibine göstermiş oldukları özverili çalışmadan dolayı teşekkür ederiz.

Mart 2000

Prof. Dr. Meral Yücel

Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
İÇİNDEKİLER	3
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ	5
ÖZ	6
ABSTRACT.....	7
BÖLÜM I-GİRİŞ	8
BÖLÜM II - MATERİYAL VE YÖNTEMLER.....	12
II.1. Bitki Transformasyon Vektörlerinin (BTV) Eldesinde Kullanılan Yöntemler.....	12
II.1.1. Bakteri Hücrelerinin Bütyütülmesi	12
II.1.2. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu	12
II.1.3. Büyük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Maksi-prep).....	13
II.1.4. Restiriksiyon Enzim (RE) Hidrolizi.....	14
II.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi	15
II.2. Bitki Transformasyon Vektörlerinin Konstrüksiyonu.....	15
II.2.1. pPZP211 ve GUSINT Kombinasyonu	15
II.2.1.1 Fragment İzolasyonu.....	15
II.2.1.1.a. Dializ Yöntemi	16
II.2.1.1.b. Sıvı Azot Kullanarak Fragment İzolasyonu	17
II.2.1.2. Küçük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Mini-prep).....	19
II.2.2. pBCSK +/- ve GUSINT Kombinasyonu.....	20
II.2.3. pPZP211 ve Emu-BAR-Nos Kombinasyonu	22
II.2.4. pBCSK +/- ve Emu-BAR-Nos Kombinasyonu.....	24
II.3. Protoplast Hazırlanmasına Yönelik Çalışmalar.....	25
II.3.1. Protoplast İzolasyonu ve Transformasyonu	25
II.4. Transformantların Seçimi ve Analizi.....	29
II.4.1. Florometrik GUS Analizleri	29
II.4.1.1. Protein Ekstraksiyonu	30
II.4.1.2. Toplam Protein Derişiminin Hesaplanması	31
II.4.1.3. Florometrik Analiz:.....	31
II.4.2. Histokimyasal GUS Analizleri	33
II.5. Agrobacterium Aracılığı ile Transformasyon Çalışmaları	34
II.5.1. Triparental Mating	34
Bakteri Suşları:	35
Triparental Mating Yöntemi:.....	36
II.5.2. Pozitif Kolonilerin Analizi:.....	37
II.5.2.1. Agrobacterium Hücrelerinden Küçük Ölçek Plazmid İzolasyonu	38
II.5.3. Yaprak Diski Transformasyonu	39
Bakteri Kütürleri:	39

Bitki Materyali:	39
Yaprak Diski Transformasyon Yöntemi:.....	40
II.5.4. Regenerasyon Çalışmaları	41
II.5.5. Transgenik Bitkilerin Analizleri	41
II.5.5.1. PCR (Polymerase Chain Reaction) Analizleri	41
II.5.5.1.1. Genomik DNA izolasyonu.....	42
II.5.5.1.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	43
II.5.5.2. Yaprak Boyama (Spreyleme) Analizi	45
II.5.5.3. Histokimyasal GUS Analizi (pPZP211+GUSINT)	45
II.6. Partikül Bombardimanı Çalışmaları.....	45
II.6.1. Tungsten Partiküllerinin DNA ile Kaplanması	45
II.6.2. Dokuların Bombardimanı	46
BÖLÜM III - BULGULAR VE AÇIKLAMALAR.....	47
III.1. Bitki Transformasyon Vectorlerinin Konstrüksyonuna ait Bulgular.....	47
III.2. Protoplast İzolasyonu ve Transformasyonuna ait Bulgular	52
III.2.1. Fluorometrik GUS Analizleri.....	53
III.2.2. Histokimyasal GUS Analizleri	55
III.3. Agrobacterium Aracılığı ile Transformasyon Çalışmaları.....	57
III.3.1. Pozitif Kolonilerin Analizi (Triparental Mating).....	57
III.3.3. Regenerasyon Çalışmaları	60
III.3.4. Transgenik Bitkilerin Analizi	62
III.3.4.1. PCR Analizleri.....	62
III.3.4.2. Yaprak Boyama Analizi	64
III.3.4.3. Transgenik F1 Döllerin Analizi	65
III.4. Partikül Bombardimanı Çalışmaları	66
SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR.....	70
EK-1: ARAŞTIRMADA KULLANILAN PLASMİDLERLE İLGİLİ KULLANIM İZİNLERİ	72
EK-2 PROJE KAPSAMINDA KONSTRÜKSİYONU GERÇEKLEŞTİRİLEN VEKTÖRLERİN HARİTALARI.....	76

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1.1: Maxi-prep sonrası izole edilen plasmidlerin restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi ...	47
Şekil 1.2: pGUSINT'in HindIII ile kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu.....	47
Şekil 1.4: pBCSK + GUSINT kombinasyonun küçük ölçekli plasmid izolasyonu sonrası HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmesinden elde edilen agaroz gel elektroforez sonuçları.....	48
Şekil 1.5: pBCSK + GUSINT kombinasyonun büyük ölçekli izolasyon sonrası kontrolü.....	49
Şekil 1.6: pEmuPat, EcoRI ve HindIII ile kesilmiş farklı zaman aralarında örnek alınmıştır.....	49
Şekil 1.7: Emu-BAR-Nos fragmantının izolasyon sonrası kontrolü.....	50
Şekil 1.8: pPZP211+Emu-BAR-Nos kombinasyonun küçük ölçekli plasmid izolasyonu sonrası Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen agaroz gel elektroforez sonuçları.....	50
Şekil 1.9: pBCSK+Emu-BAR-Nos kombinasyonun küçük ölçekli plasmid izolasyonu sonrası Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen agaroz gel elektroforez sonuçları.....	51
Şekil 1.10: pBCSK+Emu-BAR-Nos ve pPZP211+Emu-BAR-Nos kombinasyonlarının büyük ölçekli izolasyon sonrası Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleriyle kesilip kontrol amaçlı yapılan agaroz jel elektroforez sonuçları. (M) λ-faj HindIII markörü, (1,3) pBCSK+Emu-BAR-Nos ve (2,4) pPZP211+Emu-BAR-Nos	51
Şekil 2.1. Tütün BY2 süspansiyel hücre kültürü.(60X)	52
Şekil 2.2. BY2 süspansiyel hücre kültürlerinden hazırlanan protoplastlar. A:100X, B:200X.....	52
Şekil 2.3. Tütün BY2 süspansiyel hücrelerinden hazırlanan protoplastlar. Hazırlanmayı takiben üçüncü gün. (A- 100X, B-150X).....	53
Şekil 2.4. . BY2 protoplastlarında transformasyondan iki gün sonraki florometrik GUS aktiviteleri.....	53
Şekil 2.5. BY2 protoplastlarında transformasyondan üç gün sonraki florometrik GUS aktiviteleri	54
Şekil 2.7. Transform edilmeyen ve histokimyasal GUS aktivite tayini yapılan protoplastlar.....	55
Şekil 2.8. BY2 kültürlerinden hazırlanan protoplastların pBSEmuPAT plasmidi ile transformasyon sonrası PPT içeren kültür ortamlarında gelişimi.....	56
Şekil 3.2. pPZPEmuPAT ile yürütülen transformasyon çalışması.....	59
Şekil 3.3. pPZPGUSINT ile yürütülen transformasyon çalışması	59
Şekil 3.4. öncül transgenik bitkilerin seçici ortamda kök oluşumu ve gelişmeleri	60
Şekil 3.5. pPZPGUSINT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen öncül transgenik bitkiler.....	61
Şekil 3.5. pPZPGUSINT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen öncül transgenik bitkiler.....	61
Şekil 3.6 Kontrol ve pPZP211+Emu-Bar-Nos vektöryle transform edilen bitkilerin yapraklarından izole edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR analizini gösteren agaroz jel elektroforez sonucu.	62
Şekil 3.7 Kontrol ve pPZPGUSINT vektöryle transform edilen bitkilerin yapraklarından izole edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR analizini gösteren agaroz jel elektroforez sonucu	63
Şekil 3.8. Transgenik (soldaki bitki) ve kontrol (sağdaki) bitkilerin herbisiti muamelesi sonrası gelişimleri. ..	64
Şekil 3.9. Bir önceki şekilde gösterilen bitkilerin bütün görünümü.	64
Şekil 3.10. pPZPGUSINT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen F1 tohumlarda histokimyasal GUS analizi.	65
Şekil 3.11. pPZPEmuPAT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen F1 tohumlarının 10 mg/L PPT içeren ortamlarda çimlenme potansiyelleri.	66
Şekil 3.12. Olgunlaşmamış buğday embriyolarında pBSGUSINT plasmidi ile yürütülen partikül bombardimanı çalışmaları.	67
Şekil 3.13. Olgunlaşmamış mercimek kotiledonlarında pBSGUSINT plasmidi ile yürütülen partikül bombardimanı çalışmaları.	67

ÖZ

Bu projede bitkilerin genetik transformasyonunda kullanılan teknikler arasında, en yaygın olarak uygulananları olan *Agrobacterium* ve direkt gen aktarım sistemlerinde kullanılabilir nitelikli bitki transformasyon vektörlerinin konstrüksiyonu ve oluşturulan vektörlerin işlerlilikleri araştırılmıştır.

Proje kapsamında *Agrobacterium* sisteminde optimizasyon amaçlı çalışmalarında kullanılabilecek nitelikte ve GUS rapörtör geni ve fosfinotrisin (PPT) bazlı total herbisit direnci sağlayan *bar* veya kanamisin direnci sağlayan *npt-II* genlerinin taşıyan farklı ikili vektörler oluşturulmuştur. Buna ek olarak direkt gen aktarım sistemlerinde kullanılabilen GUS raportör genini veya *bar* genini taşıyan transformasyon vektörlerinin de konstrüksiyonuna gidilmiştir. Elde edilen vektörler *Agrobacterium*, protoplast ve partikül bombardımanı sistemlerinde denenmişlerdir. *Agrobacterium* ve protoplast çalışmaları sırası ile tütün yaprak diskleri ve tütün BY2 süspansiyon hücre kültürlerinden elde edilen protoplastlar üzerinde test edilmişlerdir. Partikül bombardıman çalışmalarında ise olgun buğday embriyoları ve olgunlaşmamış mercimek kotiledonları kullanılmıştır.

Agrobacterium sisteminde kullanılabilir nitelikli ikili vektröller sırası ile pGUSINT ve pEmuPAT vektörlerinden çıkartılan CaMV35S-GUSINT-nos ve Emu-*bar*-nos kasetlerinin pPZP211 serisi ikili vektrörlere aktarılması ile oluşturulmuştur. Direkt gen aktarım sistemlerinde kullanılacak vektröller ise yine aynı kasetlerin Progema pBlueScript vektrörlere klonlanmasıyla elde edilmiştir. Oluşturulan tüm vektröller, restriksiyon enzim sindirimini sonrası agaroz jellerde test edilmiş ve istenen kasetleri içerdikleri doğrulanmıştır. Oluşturulan vektröller pZPGUSINT ve pZPEmuPAT (*Agrobacterium*) ve pBSGUSINT ve pBSEmuPAT (direkt) olarak isimlendirilmiştir.

pPZP serisi ikili vektrörlere yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen transgenik bitkilerin genomlarında GUS ve *bar* genlerini içerdikleri PCR deneyleri, aktarılan genlerin fonksyonel olarak ifade ettikleri ise sırası ile histokomyasal GUS ve *in vivo* herbisit uygulaması testleri ile doğrulanmıştır. Buna ek olarak GUS ve *bar* geninin F1一代 transgenik bitkilerde de ifade ettiği gösterilmiştir.

pBS serisi transformasyon vektrölerinin işlerlilikleri tütün BY2 süspansiyon kültürlerinden hazırlanan protoplastlar üzerinde histokomyasal GUS analizleri ile gösterilmiştir. Vektröller, partikül bombardımanı tekniği ile transforme edilen olgun buğday embriyoları ve olgunlaşmamış mercimek kotiledonlarında da olumlu sonuç vermiştir.

Özet olarak, proje kapsamında yürütülen çalışmalar sonucunda *Agrobacterium* ve direkt gen transferi sistemlerinde, özellikle optimizasyon amaçlı transformasyon çalışmalarında kullanılabilen nitelikli dört adet bitki transformasyon vektrünün konstrüksiyonu başarılı olarak gerçekleştirilmiş ve vektröllerin çalışırılıkları ilgili sistemler üzerinde yürütülen transformasyon deneyleri ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak projemiz öngörülen amaç ve kapsam doğrultusunda başarı ile tamamlanmıştır.

Anahtar kelimeler: vektor konstrüksiyonu, *Agrobacterium*, protoplast, partikül bombardımanı, tütün, buğday, mercimek

ABSTRACT

In this project, the construction of plant transformation vectors, that can be used with *Agrobacterium* and direct gene transfer systems, the most widely used techniques in the genetic transformation of plants, are prepared and their functions are researched.

In the project, different binary vectors carrying *GUS* reporter gene and *bar* gene which enables phosphinotrisin (PPT) based total herbisit resisrance or *npt-II* gene which gives kanamycin resistance are produced for the optimization aimed studies in the *Agrobacterium* systems. In addition to this, the construction of transformation vectors carrying *GUS* reporter gene or *bar* gene have been completed. The vectors obtained are tested in *Agrobacterium*, protoplast and particle bombardment systems. *Agrobacterium* and protoplast studies are performed in order on tobacco leaf discs and protoplasts prepared from tobacco BY2 cell suspension culture. Mature wheat embryos and immature lentil cotyledones have been used in particle bombardment studies.

The binary vectors usable in *Agrobacterium* systems are produced by the transfer of cassettes CaMV 35S-GUSINT-35SpolyA isolated from pGUSINT and Emu-bar-Nos isolated from pEmuPAT into pPZP211 binary vector system. The vectors to be used in direct gene transfer are obtained by the cloning of the same cassettes into Progema pBluescript plasmid. All of the vectors produced are tested by the agarose gel electrophoresis following restriction enzyme digestion and confirmed to have included the desired cassettes. The newly constructed vectors are named as pZPGUSINT, pZPEmuPAT (*Agrobacterium*), pBSGUSINT and pBSEmuPAT (direct).

Presence of *GUS* and *bar* genes in the genome of the transgenic plants which are produced after the transformation experiments carried out by pPZP plasmids was confirmed by means of PCR experiments. The function of the transferred genes was shown in order by histochemical GUS staining and *in vivo* herbicide treatment. It was also shown that *GUS* and *bar* genes have been expressed in F1 generation of transgenic plants.

The functionality of pBS series transformation vectors are shown by histochemical GUS analysis on the protoplasts isolated from BY2 cell suspension culture. The vectors have also produced positive results on mature wheat embryos and immature lentil cotyledones that are transformed by particle bombardment technique.

Briefly, as a result of the studies carried out in the project, the construction of four plant transformation vectors that can be used in *Agrobacterium* and direct gene transfer, especially for the optimization aimed studies, is successfully realized and the vectors functionality is confirmed by the transformation experiments carried out on related systems. Finally, our project has been completed successfully in the direction of predetermined objective and context.

BÖLÜM I-GİRİŞ

Moleküler biyoloji alanında yaşanan gelişmeler sayesinde canlı bir organizmadan izole edilen genler diğer bir canlı organizmaya aktarılabilirmektedir. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen canlılar ise “TRANSGENİK” organizmalar olarak adlandırılmaktadır.

Bitkiler üzerinde yapılan genetik transformasyon çalışmaları 1980'li yıllarda başlamış ve günümüzde, tahıl, sebze, meyve ve baklagillerin de dahil olduğu birçok kültür bitkisinde transgenik bitkiler elde edilmiştir (Farley, 1992). Bitkiler üzerinde yapılan genetik transformasyon çalışmalarının nihai hedefleri başlıca üç ana başlık altında özetlenebilir.

i. Direnç Kazandırılmış Bitkilerin Eldesi: Doğal türlere nazaran aktarılan yeni genler ile herbisitlere (ot öldürütüler), hastalıklara (bakteriyel, fungal ve virütik), zararlı böceklerle ve çevresel stres faktörlerine (tuz, soğuk, kuraklık vb.) daha dirençli ve/veya tolere bitki türlerinin geliştirilmesi.

ii. Kalite İyileştirilmesi: Bitkilerden elde edilen ürünlerin daha kaliteli hale getirilmesi. Örneğin uzun raf ömrü, protein, amino asit ve yağ içeriğinin geliştirilmesi, kuru madde arttırımı vb.

iii. Biomolekül Üretimi: Bitkilerin bio-molekül üretiminde “Bioreaktör” olarak kullanılması.Tİpta ve eczacılıkta kullanılan ve tedavi edici özelliği bulunan antikor, enzim gibi proteinlerin üretimi, aşısı üretimi, farklı polimer ve yağların üretimi vb.)

Yukarıdaki örneklerden de anlaşılabileceği gibi transgenik bitkiler tarımsal üretimin ve ürün kalitesinin arttırılmasının yanısıra tıbbi, farmosetik, endüstriyel ve çevresel biyoteknoloji alanlarında uygulama bulabilmektedir (Öktem 1997)

Değişik tür bitkilerde gen transferini gerçekleştirebilmek için çok değişik teknikler geliştirilmiştir (Potrykus, 1990). Her tekniğin kendine has özellikleri ve eksileri bulunmaktadır. Kullanılan bu teknikler içinde sadece bazıları birçok bitki türünde başarıyla uygulanabilmiştir. Bu teknikler ve kısa açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i. Direkt Gen Transferi : Çiplak DNA moleküllerinin protoplastlara polietilen glikol (PGA) veya elektroporasyon yoluyla aktarılması.

ii.Mikro Aşılama : Çiplak DNA moleküllerinin protoplastlara veya doku hücrelerine mekanik olarak aktarılması.

iii.Partikül Bombardımanı: DNA' nın hücrelere veya bitki dokularına, DNA ile kaplanmış partüküllerle bombardıman edilmesi yoluyla aktarılması.

iv.Agrobakterium Kullanımı: DNA' nın bitki hücrelerine veya protoplastlara bir toprak bakterisi olan *Agrobakteri*'nin doğal gen transfer kapasitesini kullanarak aktarılması.

Kullanılan farklı transformasyon yöntemleri genel olarak ele alındığında hem yaygınlığı hem de birçok bitki türünde başarı ile uygulanabilmelerinden dolayı, *Agrobacterium* ve direk gen aktarım sistemleri en yaygın olarak kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Teknik olarak ele alındığında bahsedilen bu yöntemler bitkiye aktarılan genleri taşıyan farklı vektör sistemleri kullanmaktadır.

Agrobacterium tumefaciens, Gram(-) bir bakteri olup toprakta bulunmaktadır. Doğal olarak genetik yapısında Ti plazmid olarak bilinen megaplazmidler (yaklaşık 200 kb) bulundururlar. Bu bakteriler bitkilerin yara almış kısımlarını enfekte edip tumor oluşumuna sebep olmaktadır. Yapılarında bulunan plazmid genel olarak iki kısımdan oluşmaktadır. T-DNA olarak adlandırılan kısım enfeksiyon sonunda bitkinin genomuna transfer edilirken, virülans (*vir*) denilen kısım T-DNA'nın transferinde rol almaktadır. Genel olarak *Agrobacterium* ile yapılan gen transferi T-DNA bölgesine yerleştirilen yabancı genin bitki genomuna taşınması esasına dayanan bir yöntemdir. Günümüzde bu yolla gen transferini kolaylaştırmak amacıyla her türlü gen kombinasyonuna uygulanan binary vektörler üretilmiştir. Bu vektörlere yerleştirilen genler daha sonra raporun ikinci bölümünde açıklanlığı şekilde de bitkiye aktarılmaktadır. *Agrobacterium* suşları doğal vektör sistemleri olarak transgenik bitkilerin elde edilmesinde oldukça etkili bir yöntem olarak sıkça kullanılmaktadır.

Protoplastlar ise, basitçe hücre duvarları uzaklaştırılmış bitki hücreleri olarak tanımlanabilir. Hücre duvarı bitkiye gen transferini engelleyen bir bariyer olduğu için enzimatik yolla uzaklaştırılmaktadır. Raporun ilerki kısımlarında detaylı şekilde açıklanıldığı üzere, ilgilenilen gen güçlü bir promotör altında amaca uygun bir plazmide yerleştirildiğinde protoplastların transformasyonunda kullanılabilmektedir. Kullanılan bu plasmidler

Agrobacterium yönteminde kullanılan plasmidlere nazaran daha küçük ve sade bir yapıya sahiptir.

Projemizde, *Agrobacterium* ve direkt gen transferi sistemlerinde kullanılabilecek nitelikte bitki transformasyon vektörlerinin konstrüksiyonu ve geliştirilen vektörlerin işlerliliğinin protoplast ve *Agrobacterium* sistemleri üzerinde denenmesi **amaçlanmıştır**.

Proje **kapsamı** her iki transformasyon sistemi için, özellikle optimizasyon çalışmalarında en yaygın kullanılan GUS raportör ve *bar* seçici genlerini taşıyan iki farklı vektör sisteminin konstrüksiyonu (toplam dört farklı vektör) ve oluşturulan vektörlerin model olarak kullanılan tütünde denenmesinden oluşmaktadır.

Araştırmalarımız sırasında aşağıda belirtilen vektörler kullanılmıştır. Vektörlerin kullanımına ilişkin izinler Ek-1'de sunulmaktadır.

pGUSINT
pEmuPAT
pBSCK +/-
pPZP211 (binary vektör)

pGUSINT ve pEmuPAT vektörlerinden izole edilen 35S promotör-GUSINT- 35S terminatör ve Emu promotör-Bar-Nos terminatör kasetleri ayrı ayrı pBSCK +/- ve pPZP211 vektörleriyle ligasyon işlemine tabi tutulmuş ve yeni vektör kombinasyonları elde edilmiştir. pBSCK +/-kombinasyonları protoplast sisteminde kullanılırken, pPZP211 kombinasyonları binary vektör olarak *Agrobacterium* yoluyla gen transferinde kullanılmıştır.

Önerilen ve Gerçekleştirilen Çalışmanın Amaç/Kapsam/Yöntem Bakımlarından Karşılaştırılması

Projenin nihai amacı olan vektör konstrüksyon çalışmaları gerçekleştirılmıştır. Elde edilen vektörlerin çalışırlılıkları öngörülen kapsam doğrultusunda yürütülen *Agrobacterium* ve protoplast transformasyon çalışmaları ile doğrulanmıştır. Proje teklifinde yürütülmesi öngörülen yöntemlerin tamamı uygulanmıştır.

Bu çalışmalara ek olarak sonuçların daha iyi irdelenmesini olası kıracak ve proje teklifinde yürütülmesi öngörülmeyen (örneğin transgenik bitkilerin rejenerasyonu ve F1 döl analizleri ve protoplasta ek olarak plasmidlerin başka bir direkt gen aktarım sistemi olan partikül bombardımanı (biolistik) sisteminde denenmesi gibi) bazı ek çalışmalar da proje kapsamında gerçekleştirılmıştır.

Özet olarak projede öngörülen hedeflere yine öngörülen kapsam dahilinde ulaşılmıştır.

BÖLÜM II - MATERİYAL VE YÖNTEMLER

II.1. Bitki Transformasyon Vektörlerinin (BTV) Eldeinde Kullanılan Yöntemler

Proje kapsamındaki çalışmalara aşağıda adı geçen plazmidlerin büyük ölçüklü izolasyonunun yapılmasıyla başlanmıştır. Plasmid haritaları Ek-2'de verilmektedir.

- pBluescript (pBCKS +/-)
- pEmu PAT
- pPZP211
- pGUSINT

Bu amaçla uygulanan yöntemler sırasıyla aşağıda belirtilmiştir.

II.1.1. Bakteri Hücrelerinin Büyütülmesi

Çalışmalarda kullanılan *E.coli* hücreleri Luira Broth (sıvı LB) ortamlarında büyütülmüşlerdir. Gerektiğinde ortamlar %1.5'luk agar ile katılmışlardır (LB-Agar). Ortamlarda kullanılan antibiyotikler 0.2 mikronluk filtrelerden geçirilerek sterilize edildikten sonra otoklavlanmış ortamlara eklenmiştir. *E.coli* hücreleri daha sonra 37°C'de 120-140 rpm'de büyütülmüşlerdir.

II.1.2. Kompetan Hücre Hazırlaması ve Transformasyonu

Kompetan hücre hazırlanması, (Inoue, 1990) göre yapılmıştır. Yötem aşağıda verilmektedir.

- i. Gliserol stoktan alınan hücreler LB-agar petrilere çizilir ve 37 °C de bir gece büyütülür.
- ii. 10-12 tane 2-3 mm büyülükteki koloni 250 ml SOB ortamına transfer edilir.
- iii. Kültür $A_{600}=0.6$ olana kadar 18 °C de büyütülür.
- iv. 10 dak buzda bekletilir.
- v. 2500g'de 10 dakika, 4 °C de sentrifüj edilir.

- vi. Pelet 80 ml soğuk TB tamponunda çözülür.
- vii. Hücreler aynı şartlarda sentrifüj edilir.
- viii. Pelet nazik bir şekilde 20 ml TB de çözülür ve %7 dimetil sülfovksit (DMSO) derişimine getirilir.
- ix. Tüppler 10 dakika buzda bekletildikten sonra 1-2 ml lik bölümler halinde ependorf tüplere bölünür ve sıvı azotta dondurulur.

Bu şekilde hazırlanan kompetan hücreler daha sonra aşağıdaki şekilde transforme edilmişlerdir.

- i. Donmuş kompetan hücreler oda sıcaklığında çözülür.
- ii. 200 μ l hücre süspansiyonu polipropilen tüplere alınır.
- iii. 1-5 μ l plazmid DNA'sı (10-100 pg) tüplere eklenir.
- iv. Tüppler 30 dak buzda bekletilir.
- v. Sallamadan 30 saniye 42 °C de bekletilirler ve tekrar buz banyosuna alınırlar.
- vi. Tüppler 0.8 ml SOC solüsyonu eklenir ve 37 °C da hızlı bir biçimde çalkalanır (180-200 rpm).
- vii. Hücreler 5 ml lik polipropilen veya cam tüplere alınırlar.
- viii. 3 dakika 47 °C da bekletilmiş yumuşak agar eklenir ve seçici antibiyotik içeren LB-agar petrilere dökülür. 37 °C de inkübe edilir.

II.1.3. Büyük Ölçekli Plazmid İzolasyonu (Maksi-prep)

İzolasyon (Birnboim ve Doly, 1979) ve (Ish-Horowicz ve Burke, 1981) de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Yöntem aşağıda verilmektedir.

Seçici LB-agar petrilerinde büyüyen kolonilerden alınan numuneler 200 ml seçici ortamda 37 °C de sallanarak sabaha kadar büyütülür ve plazmid DNA izole edilir. Plazmid izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapılmıştır.

- i. Kültür 250 ml'lik sentrifüj tüpünde 4000 rpm 4 °C'de 10 dakika çevrilir.
- ii. Pelet 20 ml STE tamponunda çözülür.
- iii. Elde edilen çözelti Sorval SS34 rotorunda 7100 rpm, 4 °C'de 5 dakika çevrilir.
- iv. Pelet 4 ml Sol1'de (50 mM glukoz, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) çözülür.
- v. Çözeltinin üstüne 4 ml taze olarak hazırlanmış Sol2 (0.2 N NaOH, %1 SDS) eklenerek iyice karıştırılır. Tüpler 5 dakika buzda tutulur.
- vi. 12 ml soğuk Sol3 (4 hacim 5M potasyum asetat, 1 hacim 10M asetik asit) eklenir ve tüpler başa sağa çevrilerek karıştırılır.
- vii. 15 dakika buzda tutulur ve 10,000 rpm, 4 °C'de 5 dakika çevrilir.
- viii. Süpernatant dört kat sargı bezinden süzülerek temiz sentrifüz tüplerine alınır.
- ix. 0.7 hacim isopropanol yavaşça eklenir ve 15 dakika buzda bekletilir.
- x. Tüpler 10,000 rpm, 4 °C'de 5 dakika çevrilir.
- xi. Süpernatant mümkün olduğunca uzaklaştırılır, pelet %70 etanol ile yıkandır ve vakum altında kurutulur.
- xii. Kuru pelet 1 ml TE tamponunda çözülür. 20 µg/ml RNase eklenir ve 37 °C'de 30 dakika bekletilir.
- xiii. Stok plazmidler -20 °C'de saklanır.

İzolasyon sonrası, plazmidler restriksiyon enzimleriyle kesilip agaroz gel elektroforez yöntemiyle kontrol edilmiştir.

Çalışmalarımızda kullanılan dört plazmidden pEmuPAT yapısında Emu promötör-Bar-Nos terminator ekipresyon kasetini ve pGUSINT, 35S promotörü altında intronlu GUS genini taşımaktadır. Bu ekspresyon kasetleri daha sonra ayrı ayrı pPZP211 ve pBCKS+/- adlı plazmidlere yerleştirilmek suretiyle yeni plasmid kombinasyonlarına imkan vermektedirler.

II.1.4. Restriksiyon Enzim (RE) Hidrolizi

İzole edilen plazmidlerden 20 µl, 25 ünite Pst1 enzimi, 3 µl enzim tamponu ve 4 µl distile su ile karıştırılarak 37 °C 16 saat bekletilir. Hidroliz işlemi reaksiyon ortamı 60 °C 10 dakika tutularak sonuçlandırılır.

II.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Hidroliz edilmiş DNA parçacıkları 1/10 hacim 50% gliserol, 75 mM EDTA 0.2% SDS, 2.07% bromfenol mavisi ve %0.07 zaylon sayanol eklenir. Elektroforez için aksi belirtilmediği takdirde % 0.9 (w/v) Agarose Type I (Sigma) kullanılır, jel kalınlığı 4-5 mm olup 100-120 V sabit voltajda 1-2 saat elektroforez edilir. Elektroforezde tampon sistem olarak TAE kullanılır. Tampon içine 10 mg/ml derişimli etidiyum bromid çözeltisinden 5 µl eklenir.

II.1.6. Jellerin Görüntülenmesi

Jeller UV ışık altında agrandizör sistemi kullanılarak karanlık odada direkt olarak negatif filmlerin üstüne görüntülenir. Elde edilen negatifler tab ettirilerek jellerin fotoğrafları alınır. Daha sonra bu fotoğraflar taranarak bilgisayar ortamında görüntülenir

Deneysel sonucunda elde edilen saf plasmidler ve restriksiyon enzimleri ile hidrolizleri sonucu agaroz jel elektroforez profilleri **Şekil 1.1**'e gösterilmektedir.

II.2. Bitki Transformasyon Vektörlerinin Konstrüksiyonu

II.2.1. pPZP211 ve GUSINT Kombinasyonu

II.2.1.1 Fragment İzolasyonu

İlgili fragmentin izolasyonu için, yukarıda büyük ölçekli plazmid izolasyonu yapılan pGUSINT HindIII restriksiyon enzimi ile kesildi **Şekil 1.2**. Çok miktarda fragment elde etmek amacıyla, kesme reaksiyonunda yine yüksek konsantrasyonda PGUSINT kullanıldı. Reaksiyon,

10 µl pGUSINT (10.53µg/µl)
3 µl endonükleaz enzim tamponu (10X)
14 µl steril distile su
3 µl HindIII (10U/µl)

ile toplam 30 µl içinde ve 37 °C sıcaklığındaki su banyosunda gece boyunca yapıldı. Daha sonra fragmentin izolasyonu yukarıdaki reaksiyonun tamamı kullanılarak agaroz jel elektroforez yardımıyla gerçekleştirildi (0.5X TAE, 1% agaroz). Yürütme işlemi sonunda, jel mümkün olduğunda kısa bir süre UV-ışık altında incelenir ve beklenilen büyüklükte ortaya çıkan bant yine UV-ışık altında jelden kesilerek çıkarılır. Bu işlem sonunda fragmenti iki yolla izole etmek mümkündür.

II.2.1.1.a. Dializ Yöntemi

- i. Kesilen parça içinde 500 µl TE tamponu (pH:8) olan küçük bir dializ torbasına konur ve her iki ucu sıkıca kapatılır.
- ii. Bir sonraki basamak küçük bir elektroforez işlemidir. Burada dializ torbası içinde 0.5X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilir ve yine jeldeki DNA molekülü torba içindeki tampona geçene kadar 50 Volt'lık potansiyel uygulanır (10-15 dakika). İşlemenin tamamlandığını kontrol etmek amacıyla dializ torbası UV-ışığına çok kısa süreli olmak şartıyla kontrol edilir.
- iii. Yürütme işlemi tamamlandığında, torba tanktan çıkarılır ve içindeki tampon temiz bir ependorf tüp içine alınır. Sonra DNA molekülü 0.1 hacim sodium asetat ve 2 hacim %96 etanol eklenerek - 20 °C de bir gece bekletilir.
- iv. Bir sonraki basamakta çökelti maksimum hızda santrifuj edilerek toplanır, üst faz atılır ve pelet %70 etanol ile bir kez yıkandıktan sonra vakum altında kurutulur.

- v. Elde edilen miktara göre çöken DNA daha önce steril edilmiş suda (10-30 µl) çözüлereк -20 °C de saklanır.

II.2.1.1.b. Sıvı Azot Kullanarak Fragment İzolasyonu

Bu yöntemde kesilen parça bir ependorf tüp içine koyularak sıvı azot içinde tamamen dondurulur. Dondurulan parça daha sonra dört kat katlanmış parafilm'in içine tam köşeye yerleştirilir ve baş ve işaret parmaklar arasında sıkılır. Bu arada dışarı sızan sıvı micropipet yardımıyla toplanarak temiz bir ependorf tüp içerisinde alınır. İzole edilen fragment dializ yönteminde anlatıldığı gibi sodium asetat ve etanol kullanılarak çötürülür ve 10-30 µl steril edilmiş distile su içerisinde çözüлereк -20 °C de saklanır

Bu konuda yürütülmüş deneylerden elde edilen örnek bir sonuç **Şekil 2**'de gösterilmektedir. Deneyle ilgili detaylar şekil alt yazısında belirtilmektedir.

Yukarıda izole edilen GUSINT fragmenti 3' ve 5' sonlarında HindIII restriksiyon sekansı taşımaktadır. Bu fragmentin pPZP211'in yapısında yer alması için, bu vektörün çoklu klonlama bölgesinde bulunan aynı restriksiyon yani HindIII ile kesilmesi gereklidir. Fakat, 3' ve 5' sonlarında birbirini tamamlayan sekansları bulunduran linear plazmid DNAsı ligasyon reaksiyonu sırasında ilgili fragmentle yapışmadan tekrar kapanma riskine sahiptir. Bu nedenle defosforilasyon reaksiyonu ile linear DNAnın 5'fosfat grupları bacteriyal alkalin fosfataz (BAP) veya calf intestinal alkaline fosfataz (CIP) enzimleriyle uzaklaştırılır. Böylece rekombinant plasmid elde etme şansı artırılmış olur.

pPZP211'in HindIII ile kesilmesi

3 µl pPZP211 (9.19 µg/µl)

3 µl endonükleazenzim tamponu (10X)

22 µl steril distile su

2 µl HindIII (10U/µl)

ile toplam 30 μ l içinde 37 °C sıcaklıkta gece boyunca yapılmıştır.

Kesim reaksiyonunun tamamlanmasından sonra , ortamdaki enzim ve diğer maddeler fenol:kloroform ile temizlenip etanol yardımıyla linear plasmid DNA'sı çöktürülür ve DNA peleti TE tamponu içinde çözülür.

Yukarıdaki reaksiyonda ;

3 μ l pPZP211 $3 \times 9.19 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 27.57 \mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ yani 0.919 μg pPZ211/ μl veya
919 μg pPZP211/ml

Linear DNAnın içerdeği fosfat miktarı,

$$\text{pmol fosfat} = \frac{[\text{Nükleotid}] \mu\text{g}/\text{ml}}{315} = \frac{919 \mu\text{g}/\text{ml}}{315} \cong 3 \text{ pmol}$$

0.1U fosfataz enzimi, 1 pmol fosfatı uzaklaştırılabilmektedir. Böylece, bu reaksiyon için 0.3 U enzim gerekmektedir. Enzim stogu 1U/ μ l olduğu için 0.3U enzimi almak zor olacağından, kullanılan DNA ve enzim miktarları uygun oranlarda artırılmıştır.

Defosforilasyon reaksiyonu

5.5 μ l HindIII ile kesilmiş pPZP211 (\approx 5000ng)

2 μ l CIP tamponu (10X)

10.5 μ l steril distile su

2 μ l CIP (1U/ μ l)

sırasıyla karıştırılarak 37 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca yapılır. Reaksiyon sonunda CIP enzimi, karışımın 75 °C'de 10 dakika inkübe edilmesi yoluyla inaktive edilir. Enzim ve diğer maddeler daha önce belirtildiği gibi fenol:kloroform kullanılarak ortamdan uzaklaştırılır.

Ligasyon Reaksiyonu

4 µl (50 ng/µl) defosforile pPZP211

1 µl GUSINT fragment (\approx 350 ng/µl)

4 µl steril distile su

1 µl ligaz tamponu (10X)

1 µl ligaz

kariştırılır ve 16 °C'de gece boyunca inkübe edilir. Reaksiyon sonunda enzim inaktivasyonu 65 °C'de 15 dakika boyunca yapılır ve örnek daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanır.

Daha sonraki işleme ligasyon reaksiyonunun bakteriyal transformasyonu ile devam edilmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden rastgele seçiliş sıvı, antibiyotik içeren LB içerisinde büyütülmüş ve büyütülen kültürlerden aşağıdaki yöntemle küçük ölçekli plasmid izolasyonu yapılmıştır.

II.2.1.2. Küçük Ölçekli Plazmid Izolasyonu (Mini-prep)

- i. 2-3 ml bakteri seçici LB ortamında büyütülür.
- ii. Hücreler 5 dak 3000 rpm'de çevrilerek toplanır.
- iii. 0.2 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA solusyonunda çözülür.
- iv. 0.2 ml taze olarak hazırlanmış 0.2 N NaOH, %1 SDS solusyonu eklenir.
- v. Çözelti beraklaşincaya kadar tüpler nazikçe karıştırılır
- vi. 0.2 ml 2.5 M pH:4.8 potasyum asetat çözeltisi eklenir, kariştırılır ve 3 dakika -80 °C bekletilir.
- vii. 0.6 ml fenol:kloroform:izoamil alkol (25:25:1) çözeltisi eklenir, kariştırılır ve 13,000 rpm'de 2 dakika çevrilir.
- viii. Temiz tüplere alınan supernatantlara 0.9 ml izopropanol eklenir ve -80 °C 15 dakika bekletilir.

- ix. 0.2 ml 0.1 M MgCl₂, 100 µg/ml RNase solusyonu eklenir, 37 °C de 15 dakika bekletilir ve 12,000 rpm'de 5 dakika çevrilir.
- x. 0.1 ml 10 M amonyum asetat ve 1.2 ml soğuk etanol eklenir ve buzda 15 dakika bekletilir.
- xi. Tüpler 15 dak 14,000 rpm'de çevrilir
- xii. Oluşan pelet %70 soğuk etanol ile yıkılır ve vakum altında kurutulur.
- xiii. Pelet 20 µl distile suda çözülür.

Elde edilen plasmidler daha sonra HindIII ile kesilip ilgili fragmenti taşıyıp taşımadıkları agaroz gel electroforez yöntemiyle kontrol edilmiştir. Bu çalışmalarдан elde edilen örnek bir sonuç **Şekil 1.3**'de gösterilmektedir.

Elektroforez sonucuna bağlı olarak hangi koloninin rekombinant plasmidi taşıdığını belirlenmesinden sonra bu koloni yeni hazırlanan plasmidin büyük ölçekli izolasyonu için kullanılır.

II.2.2. pBCSK +/- ve GUSINT Kombinasyonu

pBCSK'in Hind III ile kesilmesi

2 µl pBCSK +/- (12.96 µg/µl)

3 µl endonükleaz enzim tamponu (10X)

23 µl steril distile su

2 µl Hind III (10U/µl)

ile toplam 30 µl içinde ve 37 °C'de bir gece boyunca yapılmıştır. Kesim reaksiyonunun tamamlanmasından sonra, ortamdaki enzim ve diğer maddeler fenol:kloroform ile temizlenip etanol yardımıyla linear plazmid DNAsı çöktürülmüş ve TE tamponu içinde çözülmüştür.

Linearize edilmiş DNA'nın fosfataz reaksiyonu için kullanılmadan önce son konsantrasyonunun bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla linearize edilmiş pBCSK'in konsantrasyonu spektrofotometrik yöntem kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

$$A_{260}=0.186$$

$$\begin{aligned} [\text{pBCSK } +/-] &= A_{260} \times \text{DNA faktörü} \times \text{dilüsyon faktörü}/1000 \\ &= 0.186 \times 50 \times 200 /1000 \\ &= 1.86 \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

Defosforilasyon reaksiyonu

10 µg pBCSK +/- (Hind III) alabilmek için; $10/1.86 = 5.5 \mu\text{l}$

5.5 µl Hind III ile kesilmiş pBCSK +/- (≈ 10000 ng)

5 µl CIP tamponu (10X)

37.5 µl steril distile su

2 µl CIP (1U/µl)

sırasıyla karıştırılarak 37 °C sıcaklıkta 30 dakika boyunca yapıldı. Reaksiyon sonunda CIP enzimi karışımın 75 °C'de 10 dakika inkübe edilmesiyle inaktive edildi. Enzim ve diğer maddeler daha önce belirtildiği şekilde fenol:kloroform kullanılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Bu işlem sonunda bir miktar DNA kaybedildiği için son DNA konsantrasyonunun yeniden hesaplanması gerekmektedir. Yukarıda belirtildiği şekilde defosforilasyon sonrasında pBCSK (Hind III, -P) konsantrasyonu 1050 ng/µl olarak bulunmuştur.

Ligasyon reaksiyonu

2 µl (≈ 200 ng) \Rightarrow yukarıda belirtilen konsantrasyon 1/10 oranında azaltılmıştır, yani $1050 \text{ ng}/\mu\text{l}$

1 µl GUSINT fragmantı (350 ng/µl)

1 µl ligaz tamponu (10X)

5 µl steril distile su

1 µl ligaz

sırasıyla karıştırıldı ve 16 °C su banyosunda gece boyunca inkübe edildi. Reaksiyon sonunda enzim inaktivasyonu 65 °C'de 15 dakika boyunca yapılip daha sonra kullanılmak üzere - 20 °C'de saklandı.

Bir sonraki işleme ligasyon reaksiyonunun bakteriyal transformasyonu ile devam edilmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen koloniler rastgele seçiliip bu kolonilerden küçük ölçekli plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Aynı ayı kolonilerden elde edilen plazmidler daha sonra Hind III ile kesilip ilgili fragmantı taşıyıp taşımadıkları agaroz jel elektroforez yöntemiyle kontrol edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuç **Şekil 1.4**'de gösterilmektedir. İzolasyon sonunda pozitif kolonilerden birini kullanarak rekombinant plazmidin daha sonraki çalışmalarında kullanılmak üzere büyük ölçekli izolasyonu ve agaroz jelde kontrolü yapılmıştır (**Şekil 1.5**).

II.2.3. pPZP211 ve Emu-BAR-Nos Kombinasyonu

Bu bitki transformasyon vektörünün eldesine ilgili fragmantın izolasyonu ile başlanmıştır. Emu-BAR-Nos fragmantı pEmuPAT adlı plazmidin Hind III ve EcoRI arasındaki restriksiyon bölgesinde bulunmaktadır. Bu fragmantı izole edebilmek için, pEmuPAT Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile daha önceki örneklerde gösterildiği gibi kesilmiştir. Fakat, fragmant içinde fazladan bir Hind III kesim bölgesinin bulunması fragmantın bütün olarak eldesini zorlaştırmıştır. Bu amaçla pEmuPAT plazmidi,

3 µl pEmuPAT (12.95 µg/µl)

3 µl endonükleaz enzim tamponu (10X)

22 µl steril distile su

1 µl Hind III (10 U/µl)

1 µl EcoRI (10U/µl)

ile toplam 30 µl içinde 37 °C'de kesilmiş ve reaksiyon boyunca 15, 30, 60, 75, ve 90'ninci dakikalarda örnek alınmıştır. Alınan örnekler daha sonra agaroz jel elektroforez yöntemi ile

kontrol edilmiştir (**Şekil 1.6**). Elde edilen sonuçta, ilk 15 ve 30'uncu dakikalarda ilgili fragmant (2200 bp) beklenilen bölgede görülmüş fakat daha ilerki zamanlarda fragmant iki parçaya bölünmüş şekilde (1375 ve 825 bp) gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, Emu-BAR-Nos fragmantı aşağıda gösterildiği şekilde izole edilmiştir.

25 μ l pEmuPAT (12.95 μ g/ μ l)

4 μ l endonükleaz enzim tamponu (10X)

1 μ l steril distile su

5 μ l Hind III

5 μ l EcoRI

toplam 40 μ l içinde, 37 °C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Reaksiyondaki enzimlerin inaktive edilmesi için reaksiyon karışımı 75 °C'de 10 dakika tutulup daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmaktadır.

Yukarıda verilen reaksiyon karışımının tamamı daha sonra ilgili fragmantın izolasyonu için 0.5X TAE tamponu içinde %1 agaroz olarak hazırlanan jele yüklandı. Yürütme işlemi sonunda beklenilen büyülüklükte ortaya çıkan bant UV-ışık altında jelden kesilerek çıkartıldı. Bu işlem sonunda fragmantı II.2.1.1'de belirtildiği gibi dializ veya sıvı azot kullanılarak izole etmek mümkündür (**Şekil 1.7**).

pPZP211'in Hind III ve EcoRI ile kesilmesi

2 μ l pPZP211 (9.19 μ g/ μ l)

3 μ l endonükleaz enzim tamponu (10X)

21 μ l steril distile su

2 μ l Hind III

2 μ l EcoRI

toplam 30 μ l reaksiyon karışımı içerisinde 37 °C'de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Ligasyon reaksiyonu

Kesim reaksiyonundan,

$$2 \mu\text{l} \text{ pPZP211 (9.19 } \mu\text{g}/\mu\text{l}) \quad 2 \times 9.19 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 18.38 \mu\text{g}/30 \mu\text{l} = 0.61 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 610 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Bu konsantrasyondan 1 μl alıp toplam hacmi su ile 6 μl 'ye çıkarırsak \Rightarrow 610 ng/6 μl
= 100 ng/ μl

2 μl pPZP211 (Hind III - EcoRI)

8 μl Emu-BAR-Nos fragmantı (37.5 ng/ μl)

1.5 μl ligaz tamponu (10X)

2.5 μl steril distile su

1 μl ligaz

toplam 15 μl içinde, 16 °C su banyosunda gece boyunca (16-18 saat) inkübe edildi.

Ligasyon reaksiyonunu daha önceki örneklerde bahsedildiği gibi bakteriyal transformasyon ve küçük ölçekli plazmid izolasyonu takip etmektedir. İzole edilen plazmidler Hind III ve EcoRI ile kesilip agaroz jel üzerinde tespit edildikten sonra (**Şekil 1.8**) pozitif olduğu düşünülen bir koloniden büyük ölçekli plazmid izolasyonu ve bu izolasyona ait agaroz jel kontrolü ile işlem tamamlanmış olur (**Şekil 1.10**).

II.2.4. pBCSK +/- ve Emu-BAR-Nos Kombinasyonu

Bu bitki transformasyon vektorünün hazırlanması için izlenen yol yukarıda pPZP211-Emu-BAR-Nos kombinasyonunda anlatıldığı gibidir. Bu plazmid kombinasyonuna ait küçük ölçekli plazmid izolasyonu sonuçları **Şekil 1.9**'da ve büyük ölçekli plazmid izolasyonuna ait sonuçlar da **Şekil 1.10**'da verilmektedir.

II.3. Protoplast Hazırlanmasına Yönelik Çalışmalar

II.3.1. Protoplast İzolasyonu ve Transformasyonu

Protoplastlar için kısaca hücre duvarları uzaklaştırılmış hücreler diyebiliriz. Bu özelliklerinden dolayı bitki hücresinde yapılması düşünülen manipülasyon ve transgenik bitki hazırlanmasına yönelik çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Protoplastları farklı kaynaklardan üretmek mümkündür, örneğin, süspansiyon hücre kültürlerinden, kallus dokularından veya doğrudan bitkinin yapraklarından. Protoplastların hazırlanmasında çoğunlukla sellulolitik ve pektinolitik enzimler kullanılmaktadır. Mesela, pektinaz enzimi hücre kümelerini parçalayarak tekli hücreler oluşmasını sağlarken, sellülaz enzimi hücre duvarını uzaklaştırır.

Çalışmalarımızda BY2 (Bright Yellow Tobacco) suspansiyon hücre kültürü kullanılmış (**Şekil 2.1**), protoplast izolasyonu (Nagata, T. ve Takebe, I., 1979) ve transformasyonu (O'Neill C. ve ark., 1993), (Negrutiu I. ve ark., 1987) da anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Tütün süspansiyon kültürü BY-2 (Bright Yellow Tobacco) düzenli olarak 0.2 mg/L 2,4-D içeren MS (Murashige ve Skoog) ortamı ile dört gün arayla yenilenmektedir. Bu kültürlerden protoplast hazırlama yöntemi aşağıda verilmektedir.

1. Son yenilemeyi izleyen ikinci günde süspansiyon kültür ile K3 enzim solüsyonu 1 (10 ml) : 1 (10 ml) olacak şekilde steril şartlarda karıştırılmıştır. Karışım daha sonra çok düşük bir hızda sallanırken oda sıcaklığında ve karanlık ortamda yaklaşık 5-7 saat inkübe edilmiştir.
2. Belirtilen süre boyunca hücrelerin durumu ışık mikroskopu altında izlenerek protoplast oluşumu düzgün, tek tek yuvarlak hücreler olarak gözlemlenebilmektedir (**Şekil 2.2**).

3. Parçalanmamış dokular sırasıyla 100 μ m ve 60 μ m'lik filtrelerden geçirilerek uzaklaştırıldı.
4. Filtre edilen kısım daha sonra çok düşük bir hızda (100-300 g)'de 7-10 dakika sentrifüj edilerek protoplastlar çöktürülmüştür.
5. Süpernatantdaki enzim solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra, protoplastlar yaklaşık 10 ml W5 yıkama ortamı ile yıkılmıştır.
6. Yıkama işlemi sonunda protoplastlar yine düşük hızla yapılan sentrifüj işlemi ile çöktürülmüştür.
7. Yıkama ve sentrifüj işlemi yukarıda anlatıldığı şekliyle tekrarlantıktan sonra toplanan protoplastlar 5 ml W5 yıkama solüsyonu içerisinde bırakıldı.
8. Protoplastlar çok yavaş hareketlerle birkaç kez sallandıktan sonra bir hemosaytometre yardımıyla mikroskop altında sayılmıştır. Protoplastların hücre duvarları olmadığı için oldukça kırılgandır. Bu yüzden izolasyon boyunca çok dikkatli ve yavaş davranışması gerekmektedir.
Sayılan protoplast miktarı $\times 10^4$ \times Dilüsyon faktörü = 0.1 ml içinde bulunan protoplast miktarı
0.1 ml içinde bulunan protoplast miktarı $\times 10 \times 5 = 5$ ml içinde bulunan protoplast miktarı
9. Protoplastlar yukarıda anlatıldığı şekilde çöktürüldükten sonra 300 μ l içinde 2,5 milyon protoplast olacak şekilde MaMg transformasyon tamponu içerisinde çözüldü.
10. Yapılacak transformasyon sayısına göre her 10 ml'lik tüpe 300 μ l bu karışımından dağıtilır ve daha önce steril edilmiş pBSK+GUS ve pBSK+Emu-Bar-Nos vektörlerinden ayrı ayrı 25-30 μ l (1 μ g/ μ l stoktan) eklendikten sonra 300 μ l 40% PEG 4000 solüsyonu mümkün olduğunda çabuk fakat birkaç seferde tüp eğik vaziyette tutulup hafif hareketlerle sallanarak eklendi.

11. Bu transformasyon karışımı 15 dakika oda sıcaklığında bekletilirken tüpler 5'er dakika ara ile yavaşça sallanarak karıştırıldı.

12. Bu süre sonunda karışım her iki dakika sonunda 1, 2, 3, 4 ml yani toplam 10 ml W5 solüsyonu eklenerek yıkandı.

13. Yıkanan protoplastlar tekrar sentrifüj edilerek çöktürüldü ve yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırıldıktan sonra hormon ve glükoz içeren 10 ml K3 protoplast kültür ortamı içinde bırakıldı. Protoplastlar 24 saat boyunca karanlıkta inkübe edildikten sonra normal şartlarda 25 C'de 16 saat ışık/8 saat karanlık olarak ayarlanmış inkübatorde hücre duvarı oluşumu, normal bölünme ve diğer yaşamsal aktiviteler için bırakıldılar.

Transformasyonu izleyen 3. veya 4. gün içerisinde hücre duvarı oluşumu ve ilk hücre bölünmesi inverted mikroskop kullanılarak izlenebilmektedir (**Şekil 2.3**).

Soluşyonlar:

E1 enzim solüsyonu

A/2 solüsyonu (100ml)

MES	58.5 mg
NaH ₂ PO ₄	10.0 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	100 mg
Mannitol	6.37 g (0.35 M)
Sorbitol	6.37g (0.35 M)
pH =6.5	

100 ml A/2 Solüsyonu içinde aşağıda verilen enzimler çözüldü.

Cellulase R10 (Yakult Honsha co,Ltd) 2 g

Driselase (Fluka 26.5 u/mg)	0.5 g
Macerozyme (R10 Yakult)	0.5 g
Pectinase (Serva 0.2 u/mg)	1 g
Pectolyase (Sigma 3.2 u/mg)	0.1 g

Çözme işlemi 4°C'de yapıldı ve çözülmeyen kısımlar sentrifuj edilerek çöktürüldü. Berrak olması gereken süpernatant dikkatlice temiz bir tüpe toplanıp pH=5.6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra enzim solusyonu filtrasyon yöntemi ile steril edilerek en fazla 0°C'de saklanmaktadır.

W5 Yıkama Solüsyonu

150 mM NaCl

100 mM CaCl₂.2H₂O

5mM KCl

5mM Glükoz

Hepsi çözülmüş pH=5.6 olarak ayarlandıktan sonra otoklavlanarak steril edilmiştir.

MaMg Transformasyon Solüsyonu (50 ml)

0.5 M Mannitol 4.55 g

15 mm MgCl₂.6H₂O 0.152 g

0.1% MES 0.05 g

İstenilen hacim içinde çözülmüş pH: 5.8 olacak şekilde ayarlandıktan sonra otoklav yapılarak steril edilmiştir.

PEG (PolyEthylene Glycol) 4000 (50 ml)

40% PEG 4000 20 g

0.4 M Mannitol 3.64 g

0.1 M Ca(NO₃)₂ 1.2 g

Hepsi ısıtılarak çözülmüş ve pH: 8-9 olacak şekilde ayarlandıkten sonra otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu solüsyonun pH değerinin 6-7 arasında sabitlenmesi için otoklav sonrasında bir gün süre ile bekletilmesi kaynaklarca önerilmektedir.

K3 Protoplast Kültür Solüsyonu (100 ml)

Stok 1 10 ml

Stok 2 0.5 ml

Stok 3 20 µl

Stok 4 200 µl

Stok 5 200 µl

0.4 M glükoz, 10 µl 2,4-D (1 mg/ml), 20 µl BAP (1mg/ml), 100 µl NAA (1mg/ml).

Hepsi toplam 100 ml içinde çözülmüş, pH: 5.8 olacak şekilde ayarlandıkten sonra filtrasyon yöntemiyle steril edilmiştir.

II.4. Transformantların Seçimi ve Analizi

Protoplastlara pBSK+GUS ve pBSK+Emu-Bar-Nos vektörlerinin kullanılmasıyla yapılan transformasyon işleminin işlerliği reporter olarak kullanılan genin ürünü B-glucuronidase (GUS) enziminin aktivitesinin ölçülmesi esasına bağlı olarak yapılmaktadır (Jefferson R.A., 1987, 1989), (Jefferson R.A ve ark., 1986), (Jenes, B. ve ark., 1991).

Bitkilerde GUS enzim aktivite analizi iki farklı yöntem kullanılarak yapılabilmektedir.

- i. Fluorometrik enzim (GUS) aktivite ölçümü
- ii. Transform edilen hücrelerin Histokimyasal boyanması.

II.4.1. Florometrik GUS Analizleri

Bu analiz yönteminde, fluorometrik substrat 4-methyumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG), GUS enziminin etkisiyle fluorescent bir bileşik olan 4-methyl umbelliferone (MU)'ya çevrilir. Bu bileşik UV-ışığı altında mavi ışık yaymakta olup ışık şiddeti 455 nm'de florometre kullanılarak ölçülebilmektedir.

Bu analiz yöntemi için öncelikle transformasyon sonrası 2 ve 3 günlük protoplast örnekleri alınmıştır. Daha sonra bu örneklerden toplam protein izolasyonu yapılmış, elde edilen proteinler fluorometrik GUS analizi için kullanılmıştır.

II.4.1.1. Protein Ekstraksiyonu

Solüsyonlar:

GUS Ekstraksiyon Tamponu

50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH:7.0)

10 mM Na₂EDTA

10 mM β-Mercaptoethanol

0.1% N-lauroylsarcosine

0.1% TritonX-100

- i. Protoplast örnekleri 10 ml'lik çok temiz (tercihen steril) tüpler içine alınıp 7-10 dakika 100-300g'de sentrifüj edilerek çöktürüldü.
- ii. Toplanan protoplastlar daha önce anlatıldığı şekilde iki kez W5 solüsyonu ile yıkandı.
- iii. Son basamakta protoplastlar 1 ml W5 solüsyonunda bırakılıp ependorf tübüne aktarıldılar ve microsentrifüjün son hızında (13 000 rpm) 30 saniye sentrifüj edilerek çöktürüldüler.
- iv. Yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırıldıktan sonra protoplast peleti üzerine 100 µl GUS ekstraksiyon tamponu eklenip sıvı nitrojen içinde donduruldu. Dondurulan örnek daha sonra vorteks yapılarak çözürüldü. Bu işlem iki kez daha yapılp hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı.
- v. Örnekler tekrar son hızda sentrifüj edildi ve üst faz temiz ependorflara aktarılıp daha sonra kullanılmak üzere 4 veya -70 °C'de saklandı.

II.4.1.2. Toplam Protein Derişiminin Hesaplanması

Toplam protein miktarı Bradford yöntemi (Bradford, 1976) kullanılarak hesaplandı. Öncelikle 1-10, 14, 20 µg BSA (Bovine Serum Albumin) konsantrasyonları kullanılarak bir standard eğrisi hazırlandı.

Standart Blank: 995 µl 1X Bradford solüsyonu + 5 µl distile su

Standartlar: 995 µl 1X Bradford solüsyonu + 5 µl (1-10, 14, 20 µg BSA)

Bu şekilde hazırlanan standartlar 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra absorpsiyon değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Örnek Blank: 995 µl 1X Bradford solüsyonu + 5 µl GUS ekstraksiyon tamponu

Örnekler: 995 µl 1X Bradford solüsyonu + 5 µl protein ekstrakt

Aynı şekilde absorpsiyon değerleri 595 nm dalga boyunda ölçüldükten sonra, örneklerin µg/µl protein miktarları aşağıdaki şekilde belirlendi.

	2 Gün	3 Gün
Kontrol	1.8	1.4
pBSGUSINT	2.6	1.9
pBSEmuPAT	1.8	1.6

II.4.1.3. Florometrik Analiz:

Fluorometrik analiz (R.A. Jefferson, 1987) göre yapıldı. Kullanan solüsyonlar ve yöntem aşağıda verilmektedir.

Solüsyonlar:

Fluorescence assay tamponu: 2 mM 4-methyumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG). 4.4 mg 4-MUG 5 ml ekstraksiyon tamponu içinde çözülürek 4 °C'de karanlıkta saklanır.

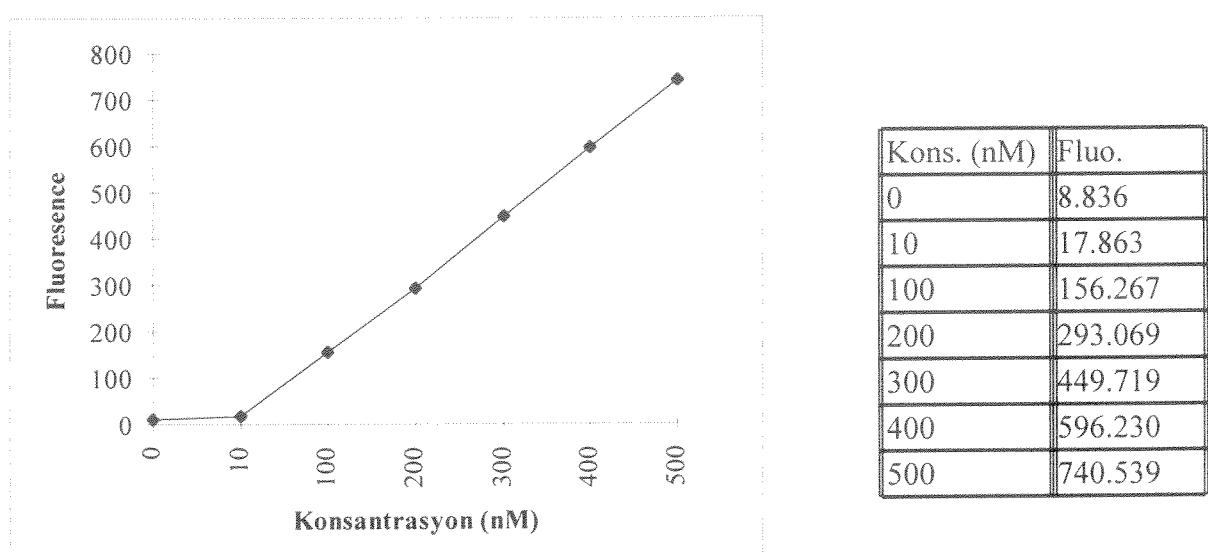
Stop Tamponu: 0.2 M Na₂CO₃

Fluorescence standard Stok: 1 mM 4-methyl-umbelliferone, 9.9 mg 4-MU, 0.5 ml DMSO (DiMethylSulfOxide) içinde çözülkerek son hacmi 50 ml olacak şekilde ayarlanır.

Bu analiz yöntemiyle, transformasyon sonunda GUS enzim aktivite ölçümü, ortaya çıkan fluorescent ürün konsantrasyonuna bağlı olduğundan ilk önce artan 4-MU konsantrasyonları için doğru orantılı artan floresan değerlerini gösteren standart eğrisi hazırlandı.

Standart Blank: Stop tamponu 0.2 M Na₂CO₃

Standartlar: Stop tamponu içinde 100, 200, 300, 400, 500 nm MU olacak şekilde hazırlanıp fluorescence değerleri, Exitation= 365 nm, Emmision= 445 nm dalga boyunda fluorometrede ölçüldü. Elde edilen kalibrasyon doğrusu aşağıda verilmektedir.



Örnekler için, üç farklı zaman aralıklarında (0, 1 saat, 2 saat) GUS analizi yapıldı,. Her analiz için 10 µg protein olacak şekilde her örnek için 30 µg protein kullanıldı. Dolayısıyla bu miktara denk gelen protein isolatları (bakınız Bradford Analizi) hesaplandı.

	µl protein (30 µg)	µl ekstraksiyon tamponu
Kontrol (2 gün)	17	433

pBSGUSINT (2 gün)	12	438
pBSEmuPAT (2 gün)	17	433
Kontrol (3 gün)	22	428
pBSGUSINT (3 gün)	16	434
pBSEmuPAT (3 gün)	17	431

Her örnek için, 450 µl'nin 150 µl'si sıfır zamanı için ayrı ayrı ependorflar içine alındı. Geri kalan 300 µl, 300 µl fluorescence assay tamponu ile karıştırılıp 37 °C ve karanlık ortamda 1 saat beklemeye bırakıldı. Bu arada 0 zaman aralığı için ayrılan 150 µl, 150 µl fluorescence assay tamponu ile karıştırılıp, reaksiyon başlamadan 2.7 ml Stop tamponu ile durduruldu ve sonuçlar florometrede okundu.

1 saat sonunda 37 °C'ye bırakılan örneklerin her birinden 300 µl alınır alınmaz, reaksiyon 2.7 ml stop tamponu ile durduruldu. Geriye kalan kısım 2 saat ölçümü için tekrar 1 saat süreyle 37 °C'ye bırakıldı. 1 saat dataları yukarıda anlatıldığı şekilde florometrede ölçüldü.

2. saat sonunda reaksiyonlar benzer şekilde durdurulup, datalar alındı.

Bulgular bölümünde 0, 1 saat, 2 saat sonunda elde edilen floresans değerleri transformasyonu izleyen ikinci (Şekil 2.4)ve üçüncü gün (Şekil 2.5) sonunda toplu olarak gösterilmektedir.

II.4.2. Histokimyasal GUS Analizleri

Oldukça sık kullanılan GUS enzim analizlerinden biridir. Temelde, GUS aktivitesi ile indoyl grubu ayrılan kromogenik bir substrat olan 5-bromo-4-chloro-3-indoly-B-D-glucuronic asit (X-Gluc)'in oksidatif dimerizasyonu sonucunda belirgin mavi bir rengin ortayamasına dayanmaktadır. Boyama sonunda mavi rengin gözlemlendiği bölgeler enzim aktivitesinin dokuya özel lokalizasyonun olduğu bölgeler olarak açıklanabilir. Deneylerde kullanılan solüsyonlar ve yöntem aşağıda verilmektedir.

Solüsyonlar:

Protoplast boyama solüsyonu

0.3 % X-Gluc
30% Ficoll
5 mM K-ferrocyanide
5 mM K-ferricyanide
0.1 M Na-fosfat tamponu (pH: 7.0)
0.005% Triton X-100

Protoplast transformasyonu izleyen üçüncü günde 100 μ l içinde 10^5 protoplast olacak şekilde, 500 μ l protoplast solüsyonu ependorflara alındı. Üzerlerine 100 μ l protoplast boyama solüsyonundan eklenerken çok hafif hareketlerle karıştırıldıktan sonra 37 °C'ye ayarlanmış inkübatorde karanlıkta gece boyu bekletildi (**Şekil 2.6**) ve (**Şekil 2.7**).

II.5. Agrobacterium Aracılığı ile Transformasyon Çalışmaları

Hazırlanan bitki transformasyon vektörlerinden pPZPGUSINT ve pPZPEmuPAT kombinasyonlarının *Agrobacterium* suşlarına transferi “tri-parental mating” yöntemi kullanılarak gerçekleştirılmıştır (Cindy R. ve ark., 1994). Transformasyon çalışmaları ise tütin yaprak diskleri üzerinde gerçekleştirılmıştır (Öktem ve ark. 1994).

II.5.1. Triparental Mating

Bu çalışmada “triparental mating” yöntemi ile binary vectör olarak kullanılacak olan pPZPGUSINT ve pPZPEmuPAT plazmidlerin *Agrobacterium*'a aktarılması ve bunun sonucunda birer ikili sistemin oluşturulması amaçlanmıştır.

Bakteri Suşları:

Agrobacterium: pMP90 adlı, disarmed Ti plazmidi taşıyan *Agrobacterium*, kromozomal DNA üzerinde Rifampicin'e direnç sağlayan geni ve disarmed Ti plazmidin üzerinde Gentamycin'e direnç sağlayan geni taşımaktadır.

pPZPGUSINT: Önceden *E. coli* içine alınmış olan pPZPGUSINT plazmidi, intron eklenmiş olan β -glucuronidase (GUS) genini ve kanamycine direnç sağlayan *nptII* genini taşımaktadır. Ayrıca, triparental mating'de bakteriyel seleksiyonu için kullanılacak olan, streptomycine direnç sağlayan gen (*Strp^r*) de bu plazmid üzerinde bulunmaktadır.

pPZPEmuPAT: Önceden *E. coli* içine alınmış olan pPZPEmuPAT plazmidi, *bar* (PPT'ye direnç sağlayan gen) geni ile *Strp^r* genini taşımaktadır.

pRK2013: Bu plazmidi taşıyan *E.coli*, triparental mating'de vektör plazmidlerinin *Agrobacterium*'a aktarılmasında yardımcı bakteri rölünü üstlenmekte ve üzerinde bakteriyel seleksiyonu için kullanılacak olan, kanamycine direnç sağlayan Kan^r genini taşımaktadır.

Kültür Ortamları:

Bütün bakteriler dirençli oldukları antibiyotikleri içeren sıvı LB'de büyümeye göstereceği ıssıda, aşağıda gösterildiği gibi büyütülmüştür:

pMP90 (*Agrobacterium*): LB (25 g/L), pH 7.4 + Gentamycin (50 µg/ml) + Rifampicin (20 µg/ml), 28°C.

pRK2013 : LB (25 g/L), pH 7.4 + Kanamycin (50 µg/ml), 37°C.

pPZPEmuPAT: LB (25 g/L), pH 7.4 + Streptomycin (100 µg/ml), 37°C.

pPZPGUSINT: LB (25 g/L), pH 7.4 + Streptomycin (100 µg/ml), 37°C.

Triparental mating'den sonraki aşamalarda, bakteri süspansyonları, aşağıda gösterildiği gibi, çeşitli antibiyotiksiz ve antibiyotikli katı LB ortamlarında büyütülür.

Antibiyotiksiz katı LB:

LB (25 g/L), pH 7.4 + Agar (1.5%), 28°C.

Antibiyotikli katı LB'ler:

- LB (25 g/L), pH 7.4 + Agar (1.5%) + Rifampicin (20 µg/ml) + Streptomycin (100 µg/ml), 28°C.

- LB (25 g/L), pH 7.4 + Agar (1.5%) + Rifampicin (20 µg/ml) + Streptomycin (100 µg/ml) + Gentamycin (50 µg/ml), 28°C

Antibiyotikli sıvı LB:

LB (25 g/L), pH 7.4 + Rifampicin (20 µg/ml) + Streptomycin (100 µg/ml) + Gentamycin (50 µg/ml), 28°C

Triparental Mating Yöntemi:

1. Mating: Aşağıda gösterildiği gibi, gece boyu büyütülen bakteri kültürlerinden, mating ve kontrol olarak 2 set oluşturacak şekilde, steril tüplere birer ml konulur.

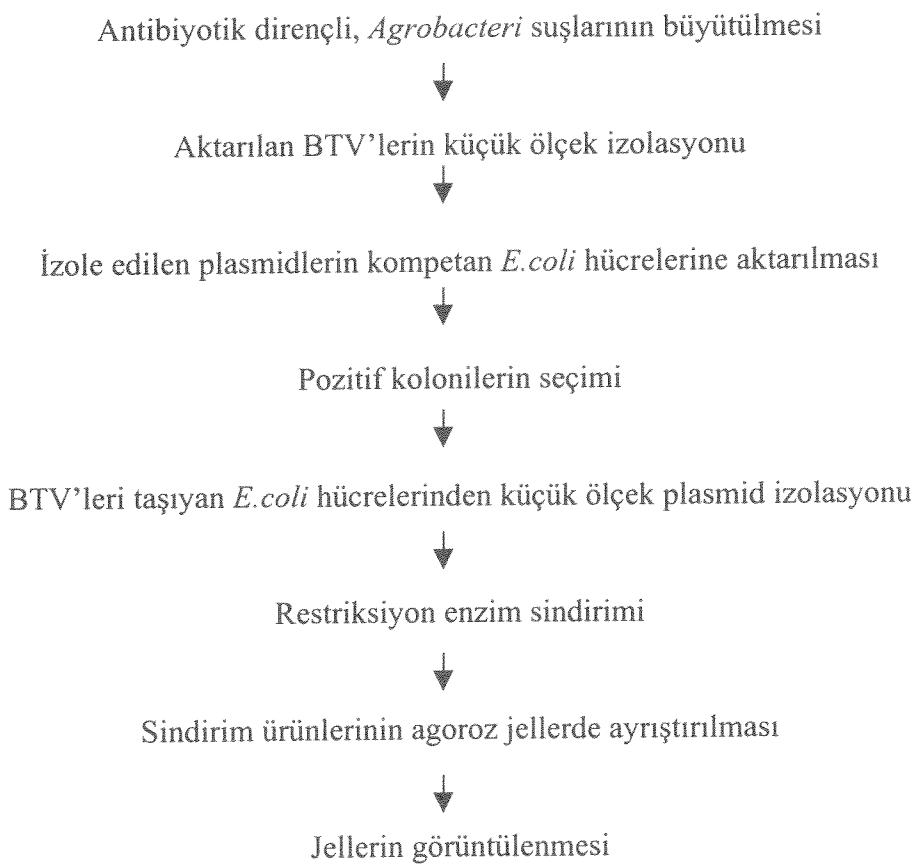
Mating Seti	Kontrol Seti
1ml pMP90 + 1ml pRK2013 + 1ml pZPEmuPAT	1ml pMP90 + 1ml pRK2013
1ml pMP90 + 1ml pRK2013 + 1ml pZPGUSINT	1ml pMP90 + 1ml pRK2013

2. Mating ve Kontrol tüpleri 3000 rpm'de 5 dakika sentrifürlenir.
3. Pelet Süspansyonu: Tüplerdeki üst sıvı atılır ve dipteki peletler 200 µl 10 mM MgSO₄ de çözültür.
4. Bakteri çözeltileri (200 µl) antibiyotiksiz katı LB ortamlarında yayılırlar, ve petriler 28°C 'de gece boyu bekletilir.
5. Gece boyu üretilmiş olan bakteri tabakaları steril öze yardımıyla katı LB yüzeyinden kazılır ve 500 µl 10 mM MgSO₄ içinde çözülür.

6. Her bir bakteri süspansyonundan, 200 µl alınıp Rifampicin ve Streptomycin içeren LB petrilere yayılır, ve petriler 28°C ‘de gece boyu bekletilir.
7. 5. ve 6. aşamalar tekrarlanır.
8. 5. aşama tekrarlanır.
9. Her bir bakteri süspansyonundan, 200 µl alınıp Rifampicin, Gentamycin ve Streptomycin içeren LB petrilere yayılır, ve petriler 28°C ‘de gece boyu bekletilir.
10. 5. ve 9. aşamalar tekrarlanır.
11. 5. ve 9. aşamalar tekrarlanır.
12. 5. aşama tekrarlanır ve bakteri süspansyonundan öze ile inökulum alınır ve Rifampicin (20 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml) ve Streptomycin (100 µg/ml) içeren sıvı LB’ lerde gece boyu 28°C’de bekletilir.
13. Gece boyu büyümüş olan bakteri kültürlerinden örnek alınır ve Rifampicin (20 µg/ml), Gentamycin (50 µg/ml) ve Streptomycin (100 µg/ml) içeren katı LB petrilere çizildikten sonra gece boyu 28°C’de bekletilir.
14. Tek koloniler halinde üremiş olan bakteri kültürleri 4°C’ de muhafaza edilir.
15. Elde edilen tek koloniler aşama 13 de belirtilen antibiyotiklerin varlığında büyütüllererek gerekli analizler (plasmid izolasyonu) yürütülür.

II.5.2. Pozitif Kolonilerin Analizi:

Triparental mating yöntemi sonucunda elde edilen pozitif kolonilerin (antibiyotik direnci gösteren) aktarılan BTV’leri taşıdıkları plasmid izolasyonu ve RE sindirimini ile test edilmiştir. Bu amaçla izlenen strateji şematik olarak aşağıda gösterilmektedir.



Yürüttülen bu çalışmalarda *Agrobacteri* hücrelerinden küçük ölçek plasmid izolasyonu dışındaki tüm deneysel yöntemler daha önceki ara raporlarda verildiğinden burada tekrar edilmemektedir.

Agrobacteri hücrelerinden yapılan plasmid izolasyonu yöntemi ise aşağıdaki gibidir.

II.5.2.1. *Agrobacterium* Hücrelerinden Küçük Ölçek Plasmid İzolasyonu

1. Bakteri 28°C de geceboyu 100mg/ml Streptomycin içeren YEB ortamında büyütülür.
2. 1 dakika 12000 rpm'de santrifuj yapılır(4°C).
3. Pellet'e 1ml yıkama solusyonu (Sol 0: 0.5M NaCl, 0.1% Sarcosyl in TE)) eklenir.
4. Pellet iyice çözülür.
5. 1 dakika 12000 rpm'de santrifuj yapılır.(4°C)

6. Pellet'e 100 μ l Solusyon I (50mM Glukoz, 25mM TrisCl (pH: 8.0), 10mMEDTA (pH:8.0)eklenir. İyice çözülür.
7. 200 μ l Solusyon II (0.2%NaOH, 1% SDS) eklenir.Yavaşça karıştırılır.
8. 5 dakika 50-60°C sıcaklığındaki su banyosunda bekletilir
9. 150 μ l Solusyon III (5M Potasyumasetat,Asetik asid, dH₂O solusyonu) eklenir. Karıştırılıp 10 dakika buzda bekletilir.
10. 12000 rpm de 5 dakika santrifuj edilir.
11. Supernatant eşit hacimde Fenol-Kloroform-Izoamilalkol ile karıştırılır.Vortekslenir.
12. Üst faz yeni bir ependorf tübüne alınır.
13. 2 katı hacimli 96% etanol eklenir. 20 dakika -20°C de bekletilir.
14. Supernatant dökülür. 70% etanol pellete eklenir. 2 dakika 12000 rpm de çevrilir.
15. Supernatant atılır.Pellete 30 μ l TE ve RNase (20mg/ml) eklenir. -20°C de saklanır.
16. Elde edilen plazmidler RE sindirimini sonrası agaroz jellerde ayırtılırlar (Şekil 3.1).

II.5.3. Yaprak Diski Transformasyonu

(Horsch, 1985) ve (Öktem, 1994) anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

Bakteri Kültürleri:

Triparental mating sonucunda elde edilmiş olan *Agrobacterium* kolonileri antibiyotikli (Bk. Triparental mating, aşama 12) sıvı LB'de gece boyu 28°C'de 140-160 rpm'de büyütülmüştür.

Bitki Materyali:

Deneylede, steril MS ortamında (Murashige ve Skoog, 1962) ekilmiş ve büyütülmüş olan 1-2 aylık tütün bitkilerin yaprakları.

Bitki Kültür Ortamları: Deneylerde farklı ortamlar kullanılmış olup, içerikleri aşağıda verilmektedir.

Sıvı MS: MS (M0404) (4.33 g/L) + 3% Sükroz, pH 5.7.

MSA: MS (M9274: agarlı ve sükrozlu MS karışımı) (42.43 g/L), pH 5.7 + NAA (0.1 mg/L) + BA (1 mg/L).

- MSB:**
1. pZPEmuPAT ile transformasyona tabi tutulmuş bitkiler ve onların kontrol seti için: MS (M9274) (42.43 g/L), pH 5.7 + NAA (0.1 mg/L) + BA (1 mg/L) + PPT (5 mg/L) + Sefotaksim (100 mg/L).
 2. pZPGUSINT ile transformasyona tabi tutulmuş bitkiler ve onların kontrol seti için: MS (M9274) (42.43 g/L), pH 5.7 + NAA (0.1 mg/L) + BA (1 mg/L) + Kanamisin (75 mg/L) + Sefotaksim (100 mg/L).

Yaprak Diski Transformasyon Yöntemi:

1. Steril kabin içinde, steril tütün yaprakları, yaklaşık 0.5 x 0.5 cm'lik parçalara gelecek şeklinde kesilir.
2. Yaprak parçaları, gece boyu üremiş olan *Agrobacterium* kültürlerinin $OD_{600} = 0.5$ 'e gelene kadar sıvı MS solüsyonuyla seyreltilmiş karışımının içine alınır ve altı dakika boyunca bu karışımın içinde çalkalanılır (100-120 rpm).
3. Kontrol set olarak, aynı sayıdaki yaprak parçaları sıvı MS ortamında altı dakika çalkalanılır.
4. Kontrol ve bakteri ile muamele edilen yaprak parçaları (Tr) bulundukları ortamlardan alınır ve ayrı steril filtre kağıtlarının üzerinde kurutulur.
5. Kontrol ve Tr yaprak parçaları ayrı MSA petrilerinin içinde yaprağın tersi üsté gelecek şekilde konulduktan sonra, 25°C 'de 3 gün bekletilir.
6. MSA ortamındaki yaprak parçaları, MSB ortamlarına aktarılır ve 25°C 'de gelişmeye bırakılır. Örmeklerin ortamları ikişer hafta aralıklarla değiştirilmelidir (**Tablo 3.1** ve **Şekiller 3.2-3.3**)

II.5.4. Regenerasyon Çalışmaları

MSB ortamında beklenen kallus ve ilk yaprak oluşumu sonrasında yaprakçıklar kalluslara bağlandıkları bölgelerden kesilip alınarak daha rahat gelişebilecekleri ve içlerinde kök oluşumunu sağlayan MSC ortamı (hormon içermeyen MSB ortamı) bulunan kavanozlara aktarıldılar (**Şekil 3.4**). (Kontrol bitkileri için MSA kullanılmaktadır).

Kök uzunluğu 5-6 cm uzunluğa ulaştığında,, bitkiler kavanozlardan alınıp toprağa transfer edildiler. Bitkilerin toprakta inkübasyonu sırasında dehidrasyonu engellemek amacıyla saksılar streç film ile kaplanıp bitkiler ortama uyum sağladıklarında streç film üzerinde ufak delikler açıldı. Bu şekilde bitki yaklaşık 2 hafta büyümeye odasında tutulduktan sonra sera ortamında büyümeye bırakıldılar (**Şekil 3.5**).

Benzer methodlar kullanılarak pPZP211+GUSINT vektörünün *Agrobacterium* aracılığıyla tütün bitkisine aktarılması gerçekleştirilmiştir. Diğer vektörden farklı olarak, pPZP211+GUSINT kombinasyonunda *bar* geni gibi seçici bir markörün olmaması nedeniyle transgenik bitkilerin analizi ana vektör pPZP211'in içinde bulunan Kanamisiné karşı yapılmıştır. Bu sebeple bitkiler transformasyon sonrasında kanamisin içeren ortamlarda büyütülmüşlerdir.

II.5.5. Transgenik Bitkilerin Analizleri

Deneylerden elde edilen transgenik bitkiler farklı yöntemlerle analiz edilmişlerdir. Bu yöntemler ve uygulanışları aşağıda verilmektedir.

II.5.5.1. PCR (Polymerase Chain Reaction) Analizleri

PCR analizleri *Agrobacterium* metodıyla tütün bitkisine aktarılan genlerin transgenik olduğu düşünülen bitkilerin genomuna transfer edilip edilmediğini anlamak amacıyla yapılmıştır. Bu nedenle ilk olarak, transgenik olduğu yukarıda anlatıldığı şekilde yapılan analizler sonucu positif olan bitkilerin yapraklarından genomik DNA izolasyonu yapılmıştır.

Daha sonra bu DNA'lar kullanılarak PCR analizleri *bar* ve *gus* genlerinin tanınması amacıyla dizayn edilen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

II.5.5.1.1. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonunda Doyle & Doyle (1990) metodu kullanılmıştır.

- i. 0.5 to 1.0 g taze yaprak dokusu daha önce soğutulmuş porselen havan içerisinde sıvı azot kullanılarak çok ince toz haline gelene kadar öğütülür.
- ii. Öğütülen doku daha önce 65 C'ye ısitılmış 6-7 ml CTAB izolasyon tamponu (2% (w/v) CTAB, 1.4M NaCl, 0.2% (v/v) 2-merkaptoetanol, 20mM EDTA, 100 mm Tris-HCl pH 8.0) içerisinde 65 C'de 30 dakika boyunca inkübe edilir.
- iii. Solüsyon daha sonra soğutulup birkez kloroform:izoamilalkol (24:1 (v/v) ile yavaşça karıştırılıp ekstrakt edilir.
- iv. İnkübasyon işleminden sonra solüsyon 15 dakika 9000 rpm'de sentrifüj edilir.
- v. Berrak olan üst faz temiz bir tüp içine geniş ağızlı pipet yardımıyla (genomik DNA'nın kırılmasını önlemek amacıyla) toplanır ve üzerine 2/3 oranında soğuk izopropanol eklenip dikkatlice karıştırılır.
- vi. Bu sırada genomik DNA belirgin bir şekilde ipliği bir yapı halinde gözlemlenebilir. Cam çengeller kullanarak toplanan DNA ependorf tüpler içeresine alınarak yıkama tamponu (76% etanol (v/v), 10 mM amonyumasetat) ile yıkanır.
- vii. 20 dakikalık yıkama işlemi sonunda genomik DNA daha beyaz olarak elde edilir. Maksimum hızda yapılan mikrofuj sonrasında DNA çöktürülür yıkama tamponu uzaklaştırılarak DNA son konsantrasyonu 10 µg/ml RNase içeren TE tamponu içerisinde çözülür.
- viii. 37 C'de 30 dakika yapılan inkübasyon sonrasında solüsyon 2 hacim TE tamponuyla seyreltilip son konsantrasyonu 2.5M olacak şekilde eklenen amonyumasetat ve 2.5 hacim soğuk etanol kullanılarak tekrar çöktürülür.
- ix. Maksimum hızda yapılan mikrofuj ile toplanan pelet oda ısısında kurutulup uygun miktarda TE tamponu içerisinde çözülür. DNA konsantrasyonu spektrofotometre kullanılarak 260 nm'de tayin edilebilir.

II.5.5.1.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR reaksiyonu her iki gen için, *gus* ve *bar*, ayrı ayrı aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

II.5.5.1.2.a. *bar* PCR

Genomik DNA	1 µl (1/100 dilüsyon)
Primer (ileri) (20 pM)	1 µl
Primer (geri) (20 pM)	1 µl
10X PCR tamponu	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Taq polymeraz	0.3 µl
dH ₂ O (steril)	21.2 µl
Toplam:	30 µl

Yukarıda verilen karışım, bar geni içerdığı düşünülen genomik DNA, kontrol bitkisinden izole edilen genomik DNA (- kontrol) ve içinde bar geni taşıyan pPZP211+Emu-Bar-Nos plazmidi (+ kontrol) için ayrı tüplerde aşağıda verilen aynı reaksiyon koşullarında yapılmıştır.

94 °C	4 dak.
94 °C	1 dak.
55 °C	45 saniye
72 °C	30 saniye
72 °C	5 dak.

Burada 94 °C'de DNA sarmalı birbirinden ayrılırken, 55°C'de dizayn edilen primerler için yapışma ısısı olarak saptanmıştır. 72°C Taq polymeraz için optimum ısi olarak bilinmektedir. Bu sıcaklıklarda ve belirtilen zaman aralıklarında reaksiyon 30 kez tekrarlanmıştır.

Primer (ileri) 5' AAGCACGGTCAACTTCCGTA 3'

Primer (geri) 5' GAAGTCCAGCTGCCAGAAC 3'

PCR reaksiyonu daha sonra agaroz gel üzerinde yürütülmüştür (**Şekil 3.6**)

II.5.5.1.2.b *gus* PCR

Genomik DNA	1 µl (1/10 ve 1/100 dilüsyon)
Primer (ileri) (100 pM)	0.5 µl
Primer (geri) (100 pM)	0.5 µl
10X PCR tamponu	3 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Taq polymeraz	0.3 µl
dH ₂ O (steril)	22.2 µl
Toplam:	30 µl

Benzer şekilde yukarıdaki reaksiyon *gus* geni içerdiği düşünülen genomik DNA 1/10 ve 1/100 dilüsyonlarında, kontrol bitkisinden izole edilen genomik DNA (-kontrol) ve transformasyon sırasında kullanılan pPZP211-GUSINT plazmidi (+ kontrol) için aynı reaksiyon koşullarında yapılmıştır.

94 °C	5 dak.
94 °C	1 dak.
60 °C	1 dak.
72 °C	30 saniye
72 °C	5 dak.

30X

Reaksiyon koşulları yukarıda belirtildiği gibi ayarlanmıştır. 60 °C primerlerin DNA'ya yapışma ısısı olarak saptanmış ve reaksiyon 30 kez olacak şekilde set edilmiştir.

PCR reaksiyonun agaroz gel üzerinde görüntülenmesi **Şekil 3.7**'da gösterilmiştir

II.5.5.2. Yaprak Boyama (Spreyleme) Analizi

Bu analizin amacı trangenik olduğu düşünülen bitkilerin herbisit uygulamasına gösterdikleri reaksiyonun incelenmesidir. Bu nedenle transgenik ve kontrol bitkilerinin yaprakları 0.25% BASTA solüsyonu kullanılarak boyanmıştır. Benzer analiz aynı herbisitle spreyleme yöntemiyle de yapılabilmektedir.

Bu analizlere yönelik sonuçlar III. bölümde bulgular kısmında sunulmaktadır (**Şekil 3.8, 3.9**).

II.5.5.3. Histokimyasal GUS Analizi (pPZP211+GUSINT)

Transformasyon sonrası elde edilen bitkilerin tohumları 1 hafta boyunca MS ortamında büyütülüp histokimyasal GUS boyama solüsyonu içerisinde 37 °C'de karalıkta gece boyu inkube edilmiştir. Mavi renk oluşumunun daha rahat gözlemlenmesi amacıyla 96% etanol ile klorofiller uzaklaştırılmıştır. (**Şekil 3.10**)

pZPEmuPat plasmidi ile yürütlen transformasyon deneyleri sonrası geliştirilen transgenik bitkilerden elde edilen tohumlar ise lethal dozda seçici ajan varlığında yapılan çimlendirme deneyleri ile analiz edilmişlerdir. Tohumlar yüzeyel sterilizasyon sonrası 10 mg/L PPT içeren MS ortamlarında çimlenmeye alınmıştır. Deneylerde *bar* geni aktarılmamış tütün tohumları kontrol olarak kullanılmıştır. (**Şekil 3.11**)

II.6. Partikül Bombardimanı Çalışmaları

Bu çalışmalarda direk gen aktarım sisteminde kullanılabilcek nitelikte olan pBSGUSINT plasmidinin farklı bitki dokularındaki uygulanabilirliği araştırılmıştır. Deneylerde olgun buğday embriyoları ve olgunlaşmamış mercimek kotiledonları kullanılmıştır.

II.6.1. Tungsten Partiküllerinin DNA ile Kaplanması

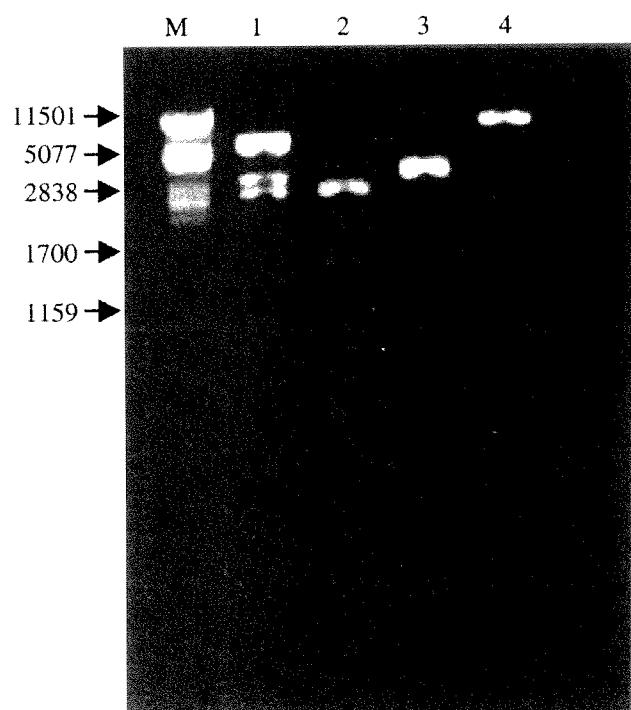
Deneylerde mikrotaşıcı olarak 2 mikronluk tungsten partikülleri kullanılmıştır. Partiküller %70 etanol ile steril edilmiş ve 60 mg/ml olacak şekilde su içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltiden 20 μ l, 5 μ l pBSGUSINT (5 μ g/ μ l) ve 25 μ l 1 M kalsyum nitrat solusyonu ile karıştırılmış ve 10 dakika buzda bekletilmiştir. Partiküllerin çökmesini takiben 36 μ l süpernatant uzaklaştırılmış, kalan kısım ise iki kez 5 μ l şeklinde dokuların bombardımanında kullanılmıştır.

II.6.2. Dokuların Bombardımanı

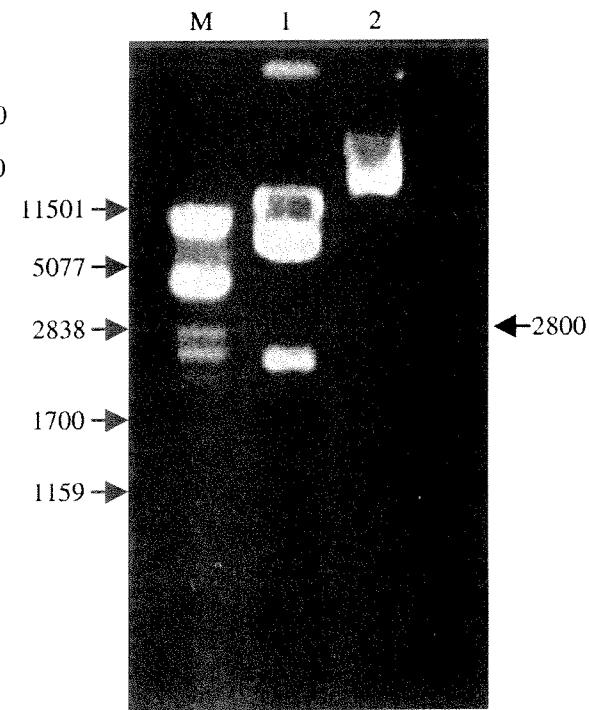
Izole edilen hedef dokular, GENEBOOSTER partikül bombardımanı cihazı ile vurulmuştur. Makrotaşıcılar nitrojen gaz basıncı ile hızlandırılmıştır. Deneylerde farklı bombardıman parametreleri (gaz basıncı, hazne vakumu gibi) kullanılmıştır. Bombardıman sonrası dokular 48 saat karanlıkta bekletildikten sonra histokimyasal GUS analizine tabi tutulmuşlardır. Deney sonuçları şekil 3.12 ve 3.13 de gösterilmektedir.

BÖLÜM III - BULGULAR VE AÇIKLAMALAR

III.1. Bitki Transformasyon Vectorlerinin Konstrüksiyonuna ait Bulgular



Şekil 1.1



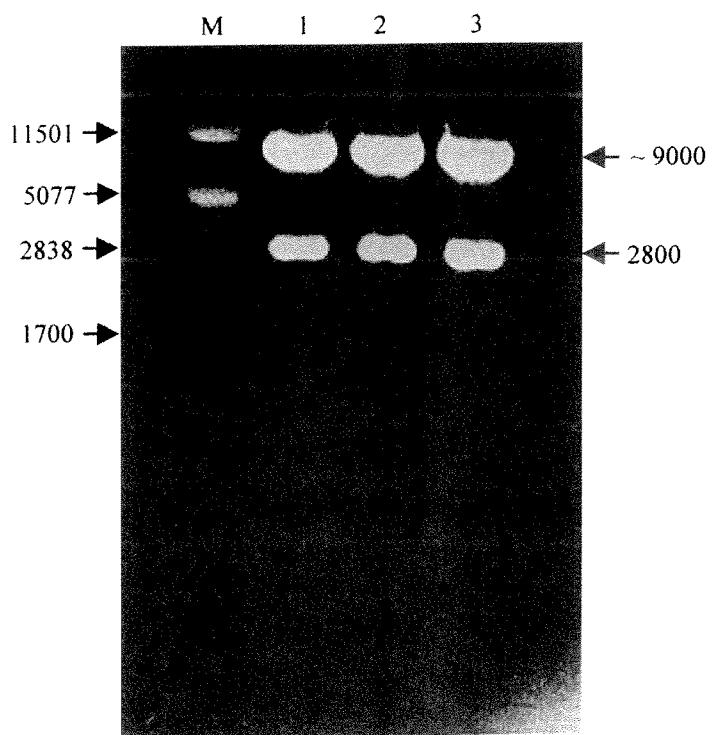
Şekil 1.2

Şekil 1.1: Maxi-prep sonrası izole edilen plasmidlerin restriksiyon enzimleriyle kesilerek kontrol edilmesi

Burada “M” λ-faja ait DNA markörü (Pst I ile kesilmiş), 1’de EcoRI ile kesilmiş, 2’de Hind III ve EcoRI ile kesilmiş pEmuPAT gösterilmiştir. 3. sırada 3000 bp ölçüsündeki band Hind III kesilmiş pBSCK +/-’i ve 4. sıradaki 9000 bp civarında belirtilen band ise PstI ile kesilmiş p PZP211’i ifade etmektedir.

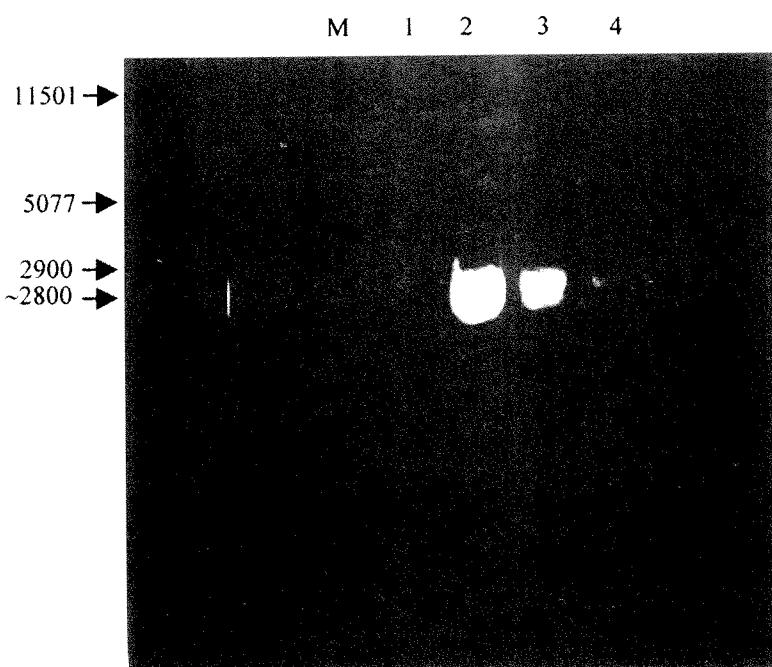
Şekil 1.2: pGUSINT’ın HindIII ile kesilmesi sonucu elde edilen agaroz jel electroforez sonucu.

Burada “M” λ-faja ait DNA markörü (Pst I ile kesilmiş). 1’de HindIII ile kesilmiş pGUSINT plazmidi ve 2. sırada kesilmemiş pGUSINT gösterilmiştir.



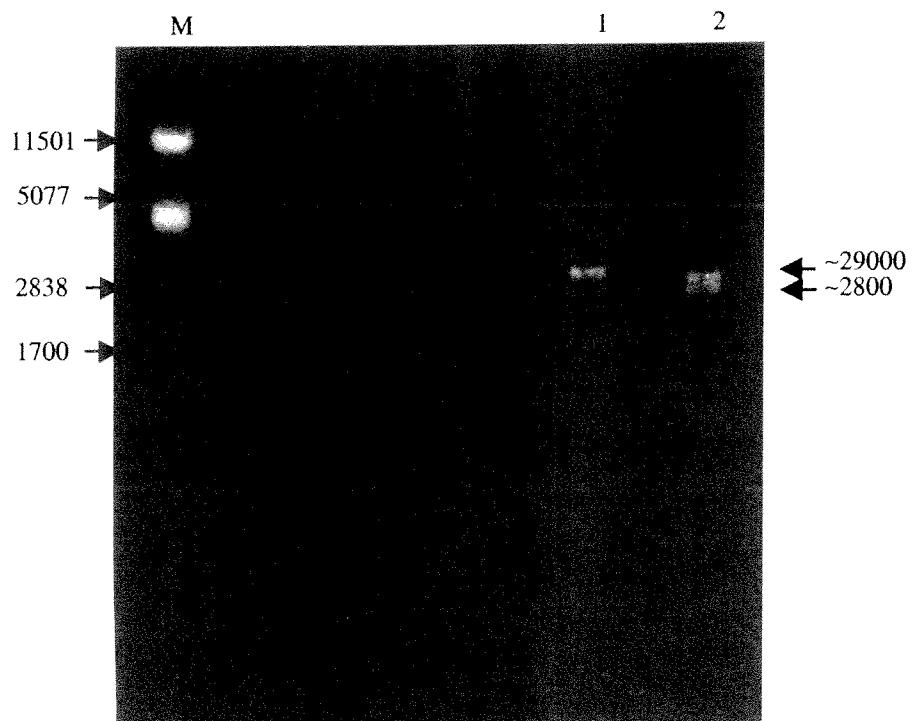
Şekil 1.3: Mini-prep sonrası pPZP211-GUSINT kombinasyonunun Hind III ile kesilmesinden elde edilen agaroz jel elektroforez sonucu.

Burada 'M' (λ -DNA Pst I markörü), 1-3'e kadar olan sıralarda, 9000 bp ölçüsündeki dand pPZP211'i ve alttaki 2800 bp büyüklüğündeki band ise GUSINT fragmantını ifade etmektedir.



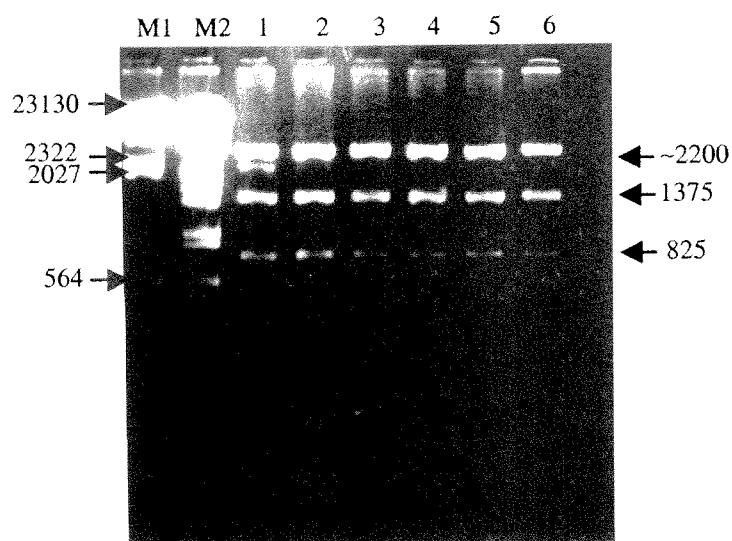
Şekil 1.4: pBCSK + GUSINT kombinasyonunun küçük ölçekli plazmid izolasyonu sonrası HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmesinden elde edilen agaroz gel elektroforez sonuçları.

M- λ -faj PstI markörü, (3) pBCSK (2.9 kb) ve GUSINT fragmantı (~2.8 kb), (4) pBSCK HindIII restriksiyon enzimi ile kesilmiş (2.9 kb).



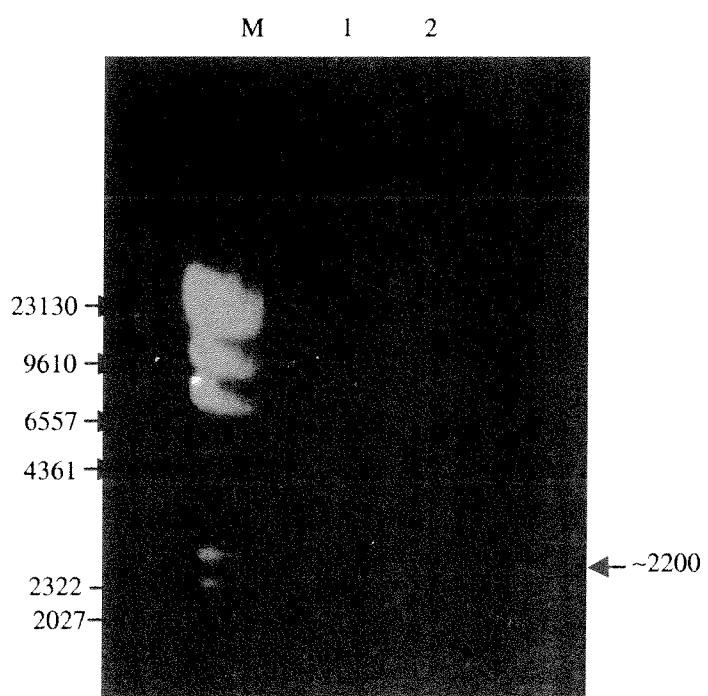
Şekil 1.5: pBCSK + GUSINT kombinasyonunun büyük ölçekli izolasyon sonrası kontrolü.

(M) λ-faj PstI markörü, (1) pBCSK HindIII ile, (2) pBCSK +GUSINT kombinasyonu HindIII ile kesilmiş.

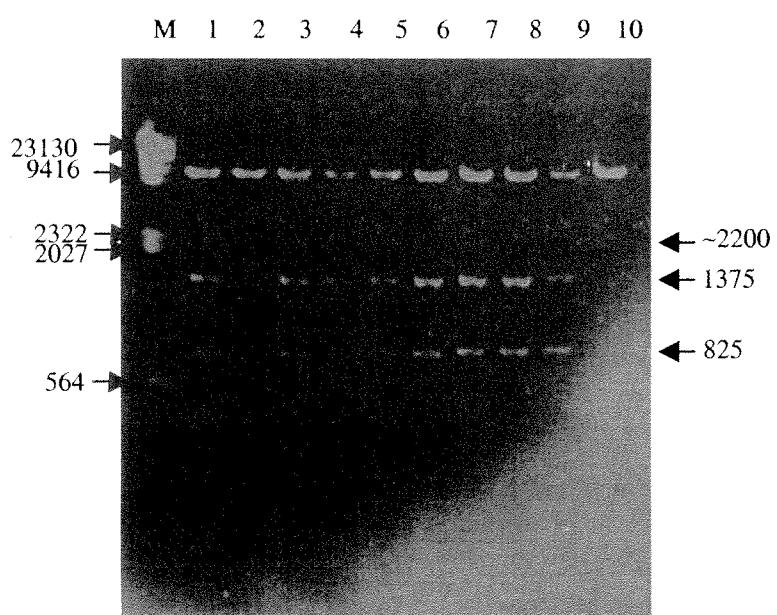


Şekil 1.6: pEmuPAT, EcoRI ve HindIII ile kesilmiş farklı zaman aralıklarında örnek alınmıştır.

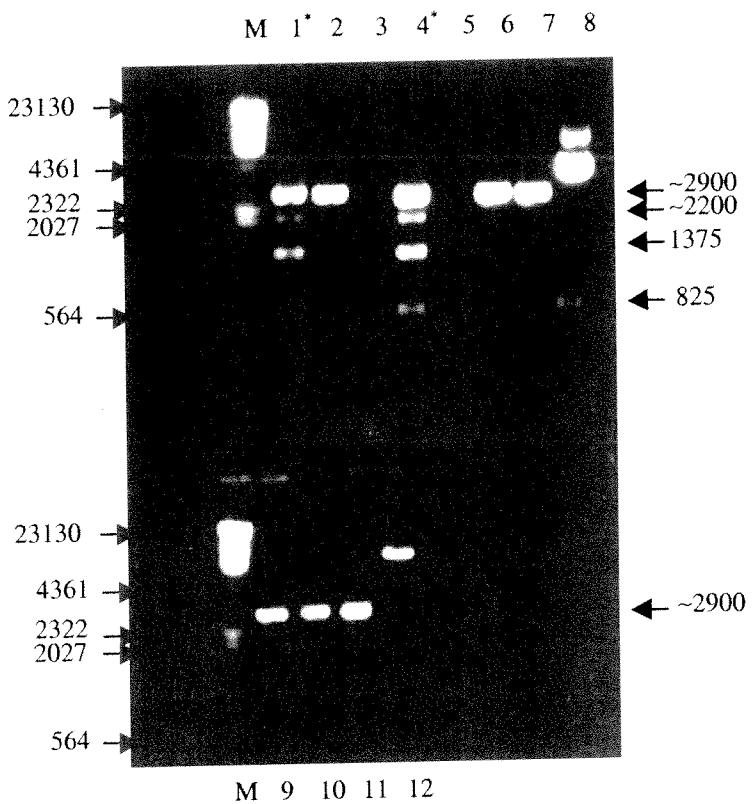
(M1) λ-faj HindIII markörü, (M2) λ-faj PstI markörü, (1) 15 dak., (2) 30 dak., (3) 60 dak., (4) 75 dak., (5) 90 dak., (6) 120 dak.



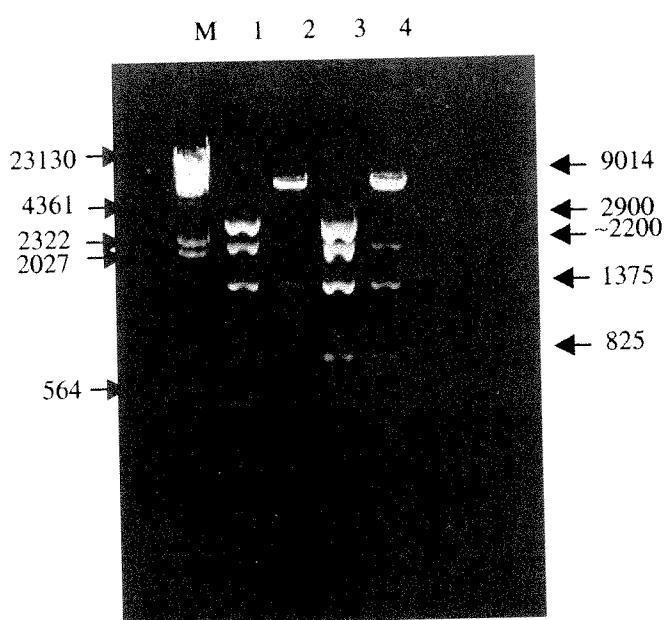
Şekil 1.7: Emu-BAR-Nos fragmantının izolasyon sonrası kontrolü
(M) λ-faj Hind III markörü, (1) ve (2) Emu-Bar-Nos fragmantı (~ 2200 bp)



Şekil 1.8: pPZP211+Emu-BAR-Nos kombinasyonunun küçük ölçekli plasmid izolasyonu sonrası Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen agaroz gel elektroforez sonuçları.
(M) λ-faj Hind III markörü, örnekler (1-10).



Şekil 1.9: pBCSK+Emu-BAR-Nos kombinasyonunun küçük ölçekli plazmid izolasyonu sonrası Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmesinden elde edilen agaroz gel elektroforez sonuçları.
(M) λ-faj HindIII markörü, pozitif sonuç veren örnekler işaretlenmiştir (*).

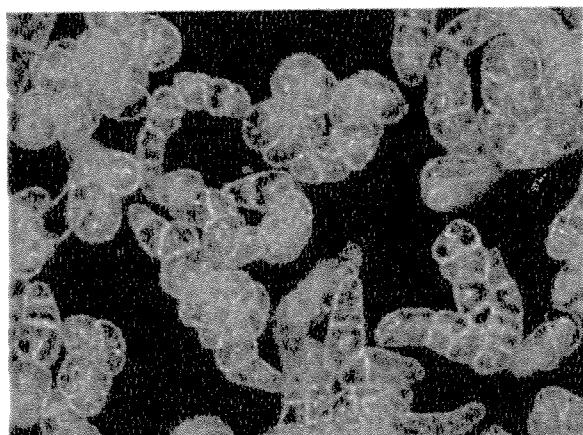


Şekil 1.10: pBCSK+Emu-BAR-Nos ve pPZP211+Emu-BAR-Nos kombinasyonlarının büyük ölçekli izolasyon sonrası Hind III ve EcoRI restriksiyon enzimleriyle kesilip kontrol amaçlı yapılan agaroz jel elektroforez sonuçları. (M) λ-faj HindIII markörü, (1,3) pBCSK+Emu-BAR-Nos ve (2,4) pPZP211+Emu-BAR-Nos

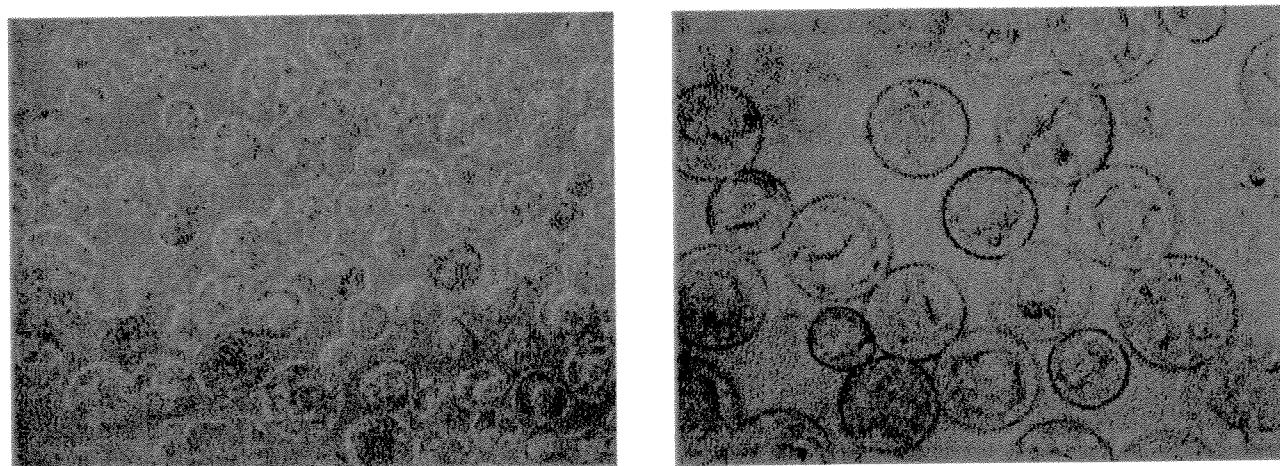
Agaroz jel elektroforez sonuçlarından da anlaşılacığı üzere, Bitki Transformasyon Vektörlerinin (BTV) hazırlanması planlandığı şekilde başarılı olmuştur. Bundan sonraki aşamalarda bu vektörlerin işlerliği, uygun transformasyon teknikleriyle bitki genomuna aktarılması ve trangenik olduğu düşünülen bitkilerin analizi yönünden araştırılmıştır.

III:2. Protoplast İzolasyonu ve Transformasyonuna ait Bulgular

Projede kullanılan protoplastlar, tütün BY2 süspansiyon hücre kültürlerinden hazırlanmıştır. Kültürlerin protoplast hazırlanmadan önceki gelişmeleri **Şekil 2.1**'de, hazırlana protoplastlar ise **Şekil 2.2**'de gösterilmektedir.

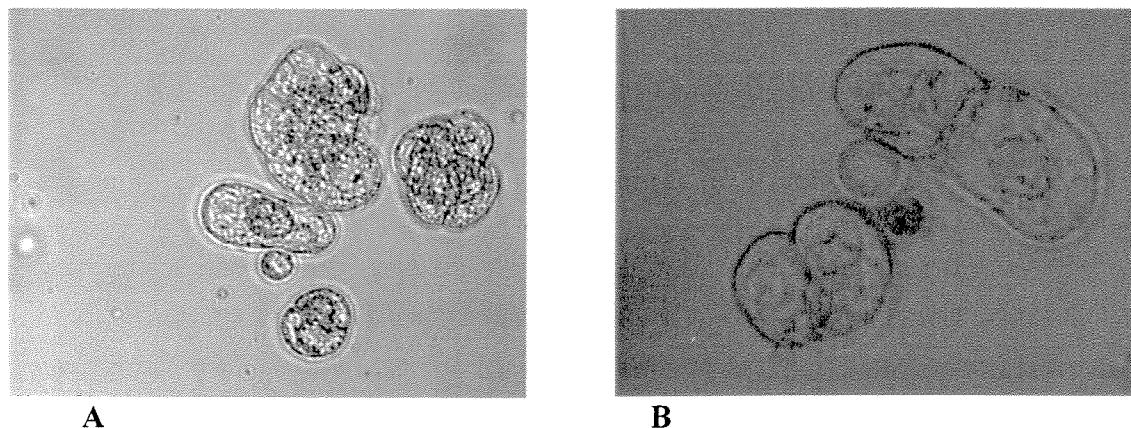


Şekil 2.1. Tütün BY2 süspansiyon hücre kültürü.(60X)



Şekil 2.2. BY2 süspansiyon hücre kültürlerinden hazırlanan protoplastlar. A:100X, B:200X.
Fotoğraflar OLYMPUS-T70 Inverted florasan mikroskopta alınmıştır.

Hazırlanan protoplastlar uygun koşullarda gelişimlerini devam ettirebilmekte ve bölünebilmektedirler (Şekil 2.3)

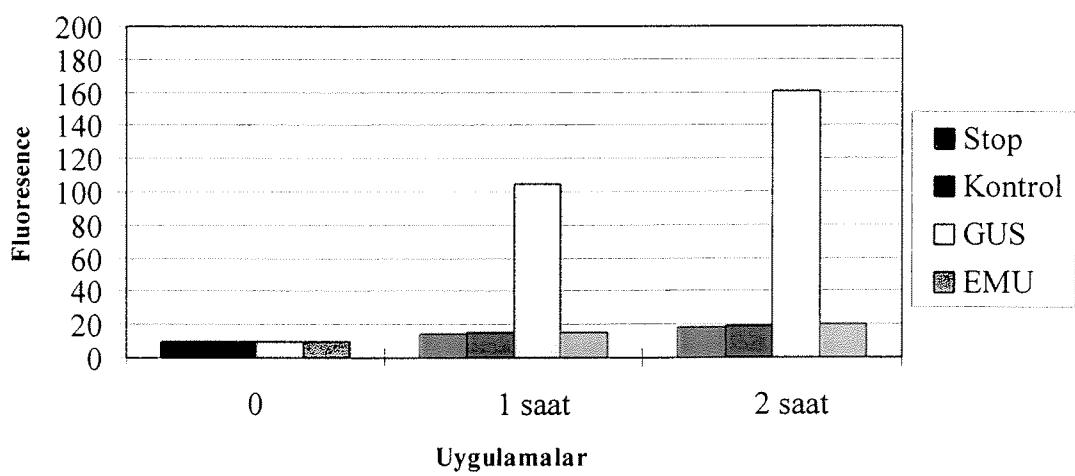


Şekil 2.3. Tütün BY2 süspansiyon hücrelerinden hazırlanan protoplastlar. Hazırlanmayı takiben üçüncü gün.
(A-100X, B-150X)

III.2.1. Fluorometrik GUS Analizleri

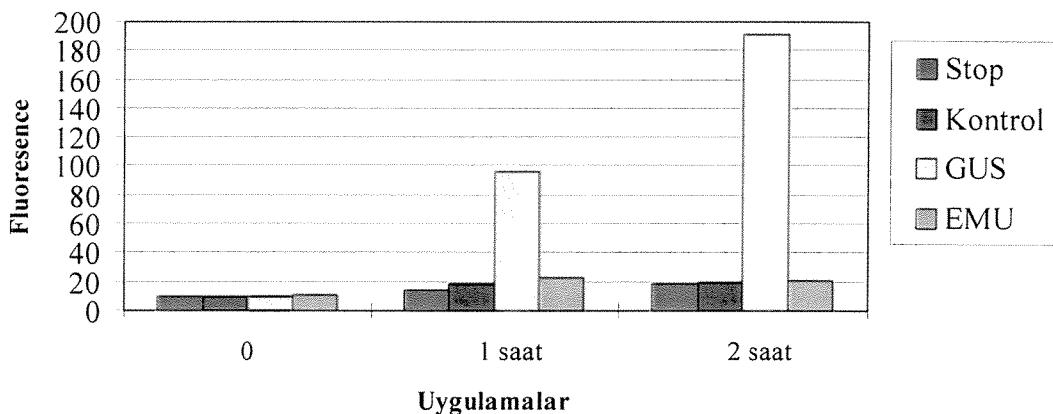
Protoplastlar kullanılarak yapılan transformasyon çalışmaları sonrası deneylerin başarısı fluorometrik GUS analizleri ile saptanmıştır. Deney sonuçları **Şekil 2.4** ve **2.5**'de gösterilmektedir.

2. Gün GUS Analizi



Şekil 2.4. BY2 protoplastlarında transformasyondan iki gün sonraki fluorometrik GUS aktiviteleri

3. Gün GUS Analizi



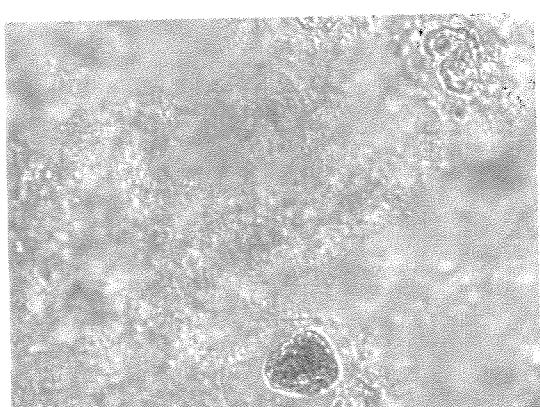
Şekil 2.5. BY2 protoplastlarında transformasyondan üç gün sonraki florometrik GUS aktiviteleri

Yukarıdaki grafiklerden de anlaşılacağı gibi, sadece pBSGUSINT vektörüyle transform edilen protoplastlarda GUS enzim aktivitesine rastlanırken; pBSEmuPAT ve kontrol (DNA eklenmeyen) numunelerinden hemen hemen aynı ve GUS'a göre çok düşük floresan değerleri elde edilmiştir. Ayrıca kontrol örneğinin yanısıra stop tamponunun da benzer işlemlere tabi tutularak floresan ölçümünün alınması, elde edilen değerlerinin doğrudan örneklerden geldiği yolunda da bir fikir vermektedir.

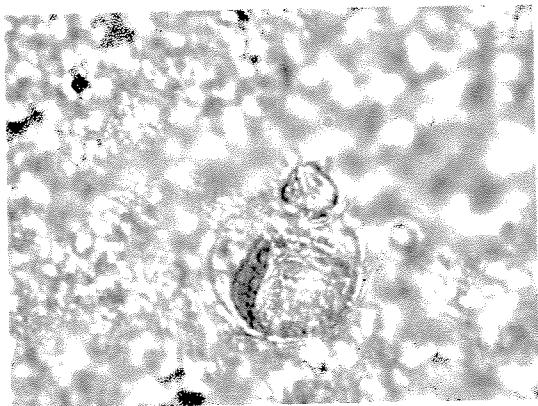
Sonuçlar proje kapsamında konstrüksiyonu gerçekleştirilen pBSGUSINT vektörünün protoplast sistemindeki işlerliğinin doğrulamaktadır.

III.2.2. Histokimyasal GUS Analizleri

Protoplastlarla yapılan transformasyon deneyleri nin sonuçları floresan ölçümlere ek olarak histoikimyasal GUS analizleri ile de doğrulanmıştır. Deneylerden elde edilen sonuçlar **Şekil 2.6 ve 2.7'de** verilmektedir.

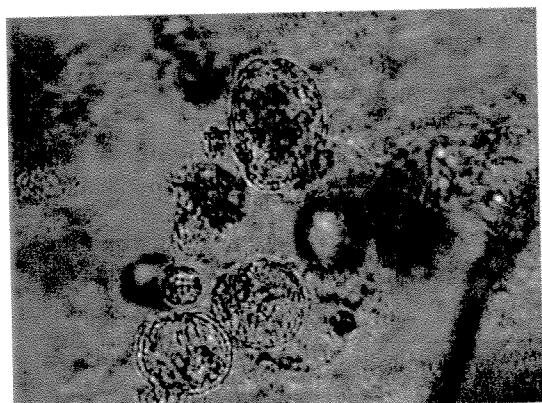


A

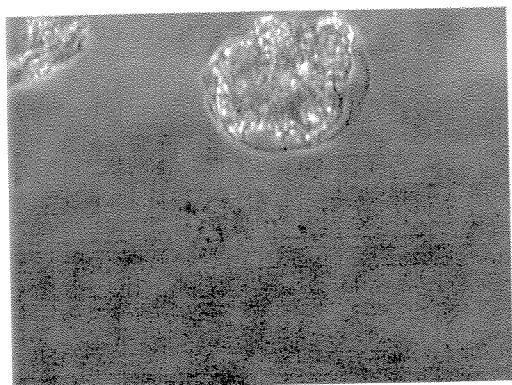


B

Şekil 2.6. pBSGUSINT palsmidi ile transform edilen ve histokimyasal GUS analizine tabi tutulan protoplastlar. Protoplastlar transformasyon sonrası üçüncü günde histokimyasal GUS analizine tabii tutulmuşlardır.(A-100X, B-150X)



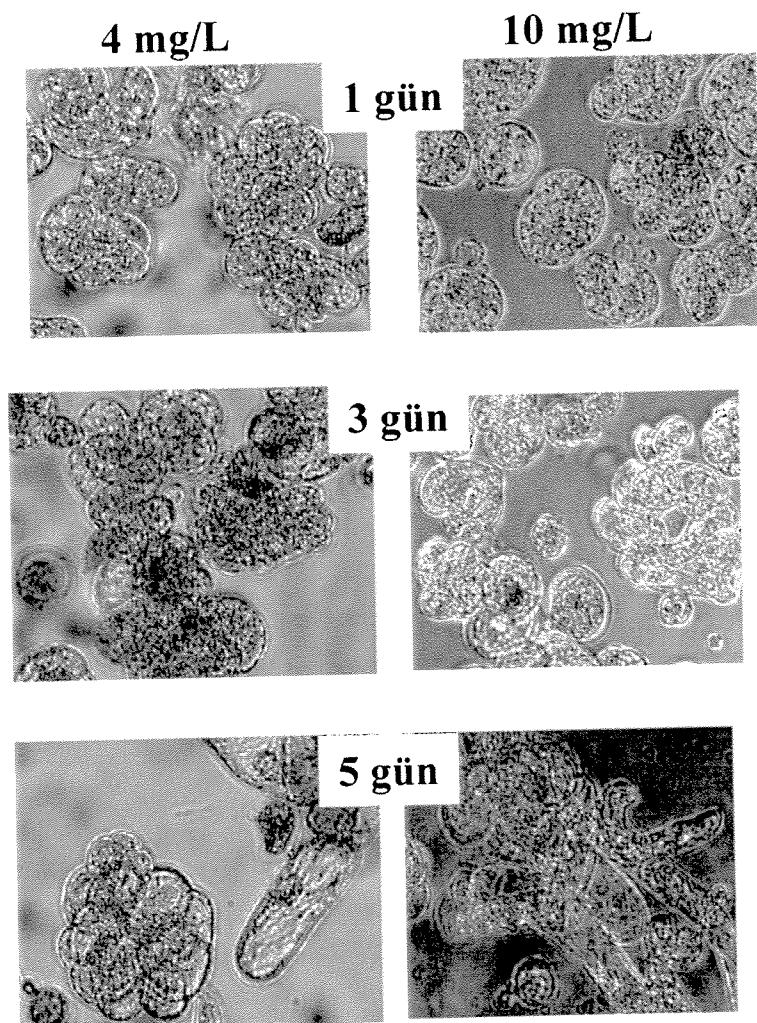
A



B

Şekil 2.7. Transform edilmeyen ve histokimyasal GUS aktivite tayini yapılan protoplastlar. (A-100X, B-150X). kullanılan protoplaslar plasmid eklenmesi dışında transform edilen protoplaslarla aynı şartlara maruz bırakılmışlardır

pBSEmuPat plazmid ile yürütülen transformasyon deneylerinden de başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu plazmid ile transforme edilen protoplastlar 4 ve 10 mg/L PPT varlığında gelişimlerinin sürdürübilmektedirler. (Şekil 2.8)



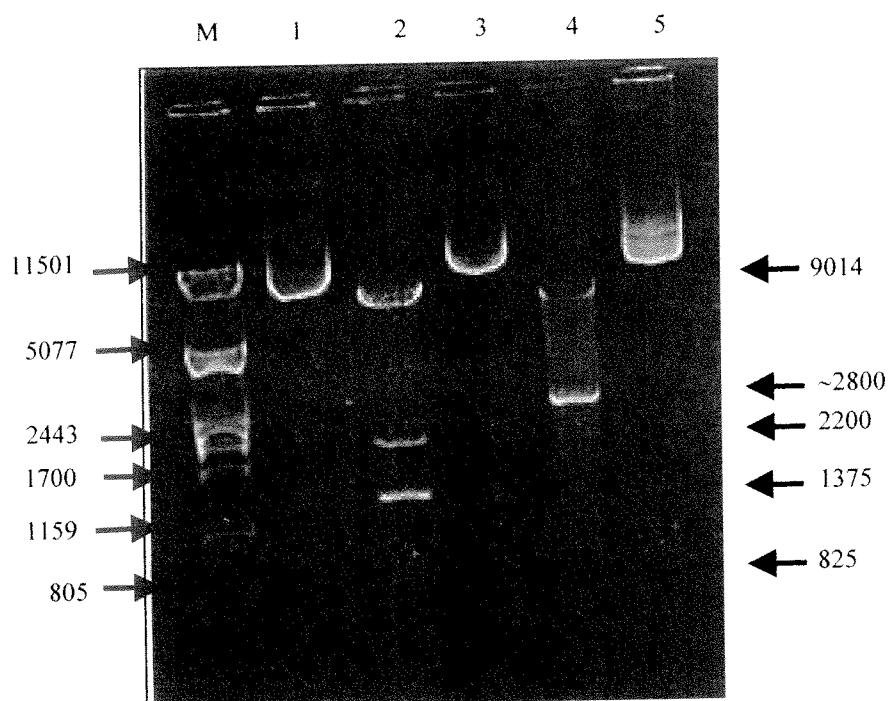
Şekil 2.8. BY2 kültürlerinden hazırlanan protoplastların pBSEmuPAT plazmid ile transformasyonu sonrası PPT içeren kültür ortamlarında gelişimi.

III.3. *Agrobacterium* Aracılığı ile Transformasyon Çalışmaları

III.3.1. Pozitif Kolonilerin Analizi (Triparental Mating)

Mating setindeki bakteri kültürleri uygulanan antibiyotik seleksiyonlarına karşı dirençli olup üreme gösterirken, kontrol setteki bakteri kültürlerinin aynı antibiyotikli ortamlarda üreyemedikleri gözlenmiştir.

Seçilen pozitif kolonilerde yürütülen plazmid izolasyonu ve RE sindirimini sonuçları ise, her iki BTV'nin *Agrobacterium* hücrelerine başarılı olarak aktarıldığını doğrulamaktadır (Şekil 3.1).



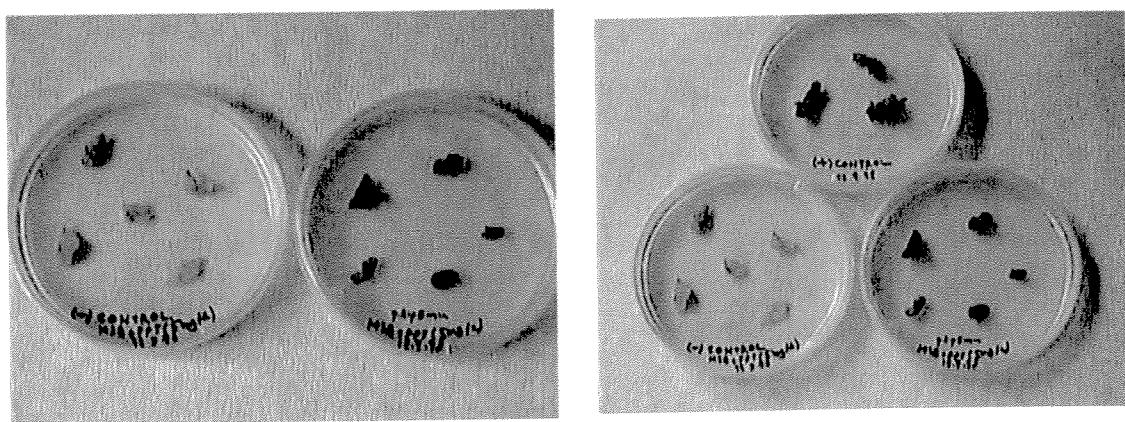
Şekil 3.1 : *Agrobakterium* sistemine aktarılan pZP211+Emu-Bar-Nos ve pZP211+GUSINT vektörlerinin mini-prep plazmid izolasyonu sonrasında kontrolünü gösteren agaroz jel elektroforez sonuçları. M- λ -PstI Markörü, 1. Kesilmemiş pZPEmuPAT, 2. HindIII ve EcoRI ile kesilmiş pZPEmuPAT, 3. Kesilmemiş pZPGUSINT, 4. HindIII ile kesilmiş pZPGUSINT, 5. pZP211

III.3.2. Yaprak Diski Transformasyonu

Deneysel proje kapsamında konstrüksiyonları gerçekleştirilen pPZPGUSINT ve pPZPEmuPAT plazmidleri ile yürütülmüştür. Yürüttülen transformasyon deneylerinden elde edilen ilk bulgular Tablo 3.1 ve Şekil 3.2 ve 3.3 gösterilmektedir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, yapılan transfromasyon çalışmalarında başarı sağlandığı gözlenmektedir.

Tablo 1. Transformasyon deneylerinin ikinci hafta sonuçları.

Bitki Örneği	Yaprak parçalarının MSB ortamına aktarıldıkten sonraki görünümü	
	1.hafta	2.hafta
Tr- pPZPEmuPAT	Yeşil ve kabarmış	Yeşil , kabarmış ve callus başlangıcı
Kontrol-pPZPEmuPAT	Sararmanın başlangıcı	Sararmış
Tr- pPZPGUSINT	Yeşil ve kabarmış	Yeşil , kabarmış ve callus başlangıcı
Kontrol- pZPGUSINT	Sararmanın başlangıcı	Sararmış
+ Kontrol (MSA)	Yeşil , kabarmış ve callus başlangıcı	Kallus gelişmesi



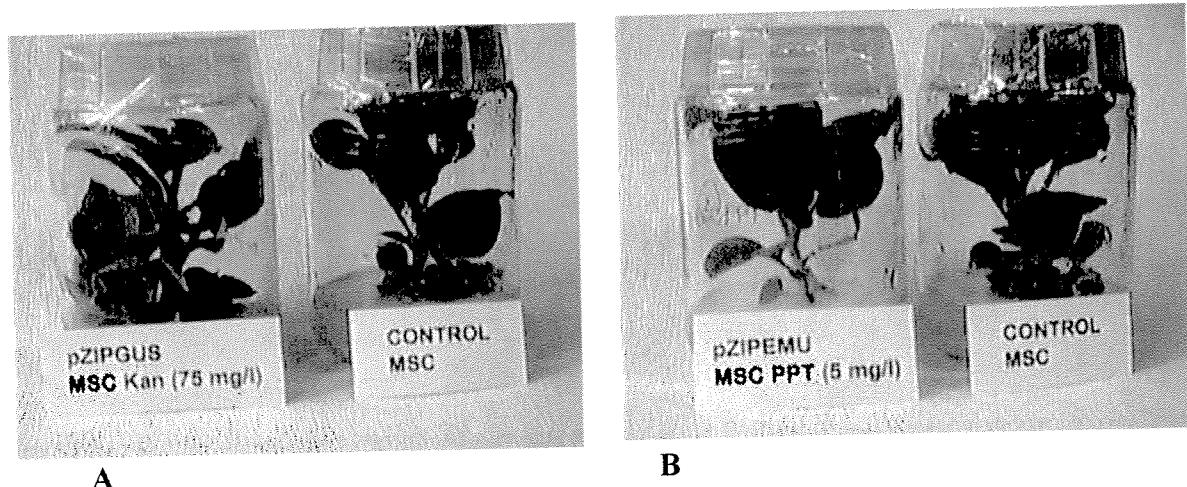
Şekil 3.2. pZPEmuPAT ile yürütülen transformasyon çalışması.



Şekil 3.3. pZPGUSINT ile yürütülen transformasyon çalışması.

III.3.3. Regenerasyon Çalışmaları

Yapılan transformasyon çalışmaları sonrası seçici ortamda oluşan gövdecikler kök oluşumu için MSC ortamlarına alınmıştır. Deneylerden elde edilen örnek sonuçlar 3.4'de verilmektedir.

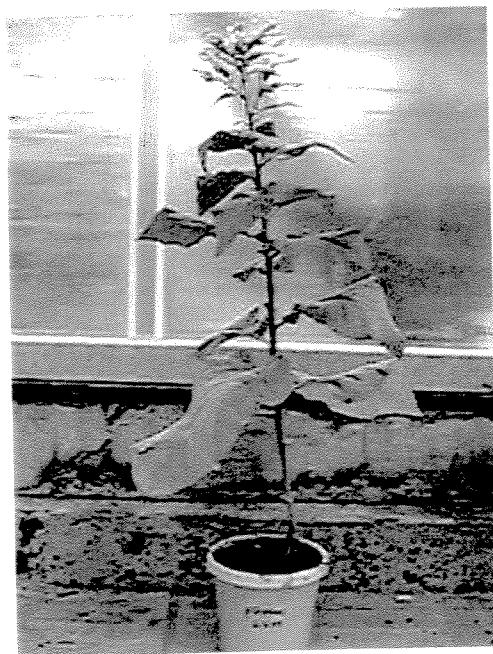


Şekil 3.4. öncül transgenik bitkilerin seçici ortamda kök oluşumu ve gelişmeleri.
A: pZIPGUSINT; B: pZIPEmuPAT plazmid ile gerçekleştirilen deneylerden kaynaklanan bitkicikler. Fotoğraf transformasyon işlenini izleyen 100.günde alınmıştır.

Kültür ortamlarında geliştirilen öncül transgenik bitkilere, daha sonra toprağa alınarak tohum eldesine gidilmiştir. Her iki plazmid kullanılarak yapılan deneyler sonucunda geliştirilen öncül (Fo) transgenik bitkilerden bitkilerden F1 dölleri elde edilmiştir. Deneylerin bu aşamasından elde edilen sonuçlar 3.5 ve 3.6'da verilmektedir.



A



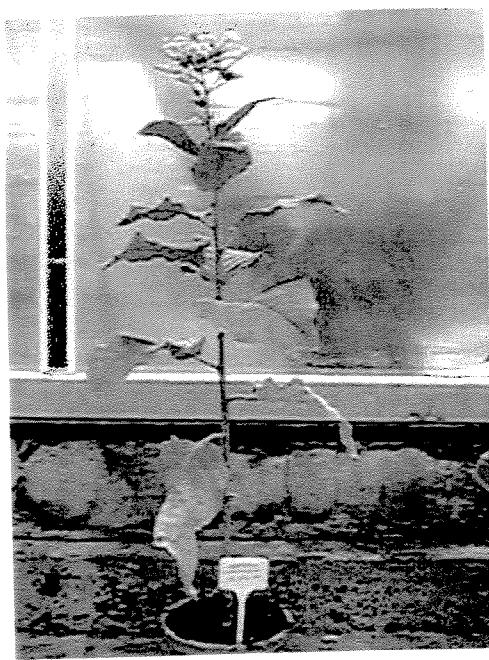
B

Şekil 3.5. pPZPGUSINT plazmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen öncül transgenik bitkiler.

A: Toprağa alındıktan iki ay sonra; B: Çiçeklenme aşaması, toprağa alındıktan yaklaşık 4 ay sonra



A



B

Şekil 3.5. pPZPGUSINT plazmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen öncül transgenik bitkiler.

A: Toprağa alındıktan 2.5 ay sonra; B: Çiçeklenme aşaması, toprağa alındıktan yaklaşık 4 ay sonra

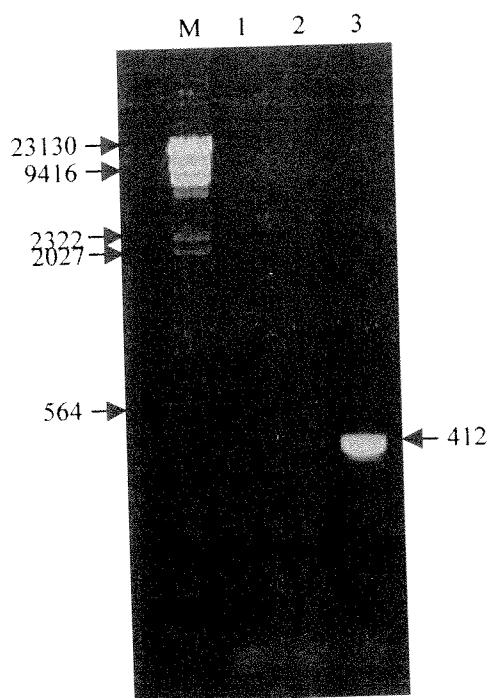
III.3.4. Transgenik Bitkilerin Analizi

Deneylede elde edilen transgenik bitkilerin analizleri farklı yöntemlerle gerçekleştirılmıştır. İlk aşamada aktarılan genlerin bitki genomundaki varlıkları GUS ve *bar* genlerine özgün primerler kullanılarak PCR yöntemi ile test edilmiştir.

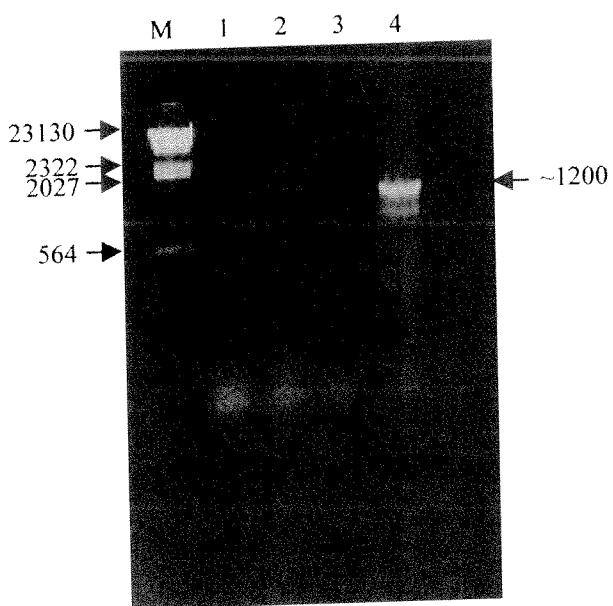
Daha sonraki aşamalarda ise aktarılan genlerin fonksyonel olarak ifade edilip edilmediğinin test edilmesi amacı ile bitkiler aktarılan direnç karakteri (herbisit direnci) yönü ile analize alınmışlardır.

Son aşamada ise öncül transgenik bitkilerden elde edilen F1 tohumlarında aktarılan genlerin varlığı histokimyasal GUS ve çimlenme deneyleri ile izlenmiştir. Deneylede elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmaktadır.

III.3.4.1. PCR Analizleri



Şekil 3.6 Kontrol ve pPZP211+Emu-Bar-Nos vektörüyle transform edilen bitkilerin yapraklarından izole edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR analizini gösteren agaroz jel elektroforez sonucu.
M. λ -Hind III markörü, 1. Kontrol bitkisi (- Kontrol), 2. pPZPEmu-Bar-Nos transgenik bitkisi, 3. pPZPEmuPAT (+Kontrol)

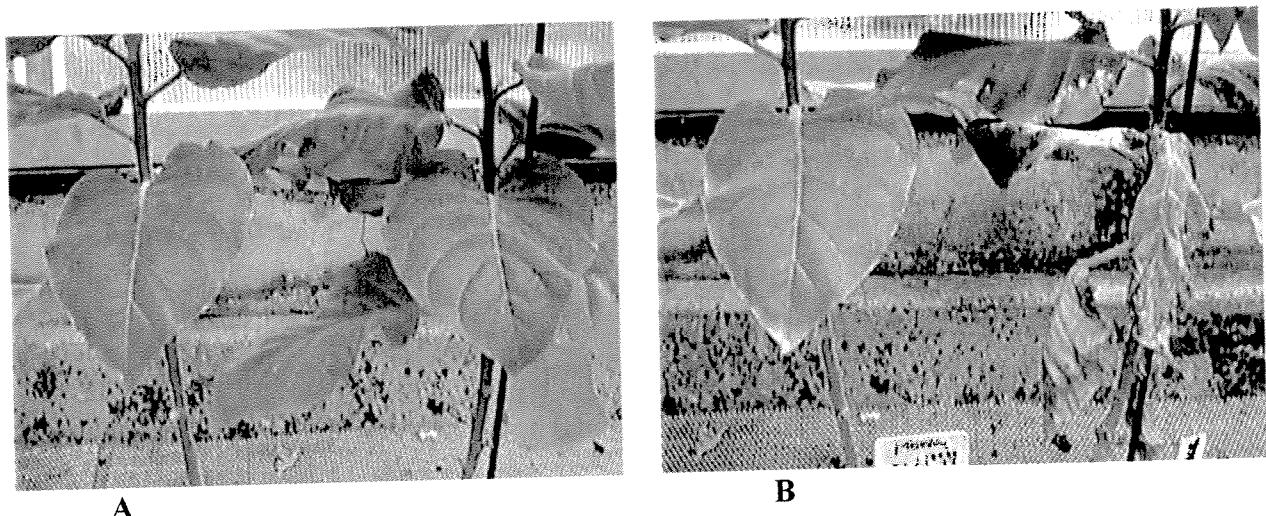


Şekil 3.7 Kontrol ve pZPGUSINT vektörüyle transform edilen bitkilerin yapraklarından izole edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR analizini gösteren agaroz jel elektroforez sonucu
M. λ -Hind III markörü, 1. Kontrol bitkisi (- Kontrol), 2. pZPGUSINT transgenik bitkisi (1/10 dilüsyon), 3. 1/100 dilüsyon, 4. pZPGUSINT (+Kontrol)

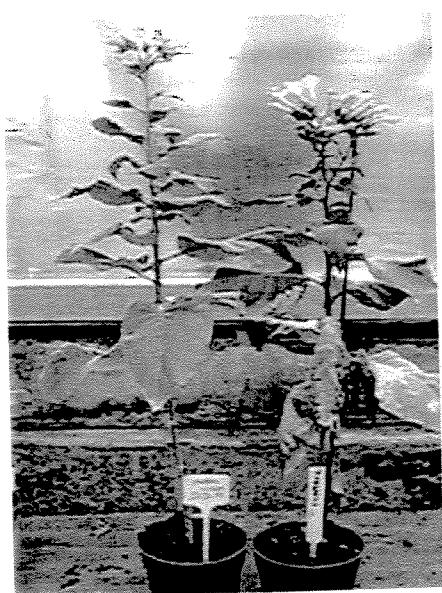
PCR analizleri sonunda her iki genin (*bar* ve *gus*) bitki genomuna aktarılması işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Agaroz jel elektroforez sonuçlarında kontrol bitkilerinde ilgili bandlara rastlanmazken, transgenik bitkilerde ilgili bandın beklenen büyüklükte belirdiği gözlemlenmiştir.

III.3.4.2. Yaprak Boyama Analizi

pZPEmuPAT plasmidi ile yürütülen deneyler sonucunda elde edilen transgenik bitkiler aktarılan herbisit direnci karakterini kazanıp kazanmadıkları yönünden analize alınmışlardır. Bu amaçla kontrol ve transgenik bitkilere total bir herbisit olan BASTA (glufosinat amonyum) muamelesi yapılmıştır (Şekil 3.8). Sonuçlar aktarılan *bar* geninin elde edilen transgeniklerde fonksyonel olarak ifade ettiğini doğrulamaktadır.



Şekil 3.8. Transgenik (soldaki bitki) ve kontrol (sağdaki) bitkilerin herbisiti muamelesi sonrası gelişimleri. Fotoğrafta gösterilen yapraklara 0.25% (v/v) BASTA muamelesi yapılmıştır. Muamele sonrası A: Birinci; B: Onbeşinci gün.

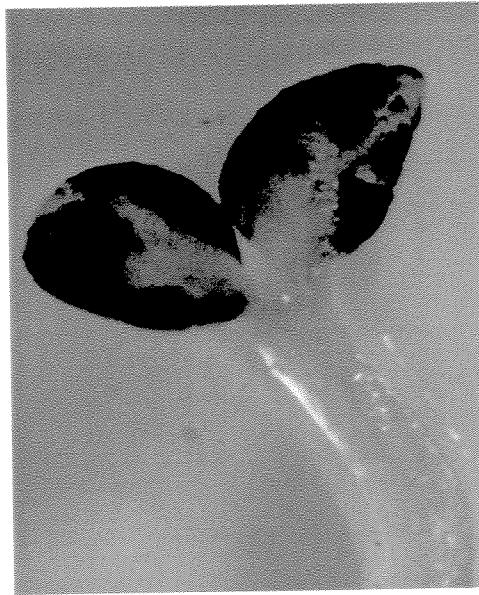


Şekil 3.9. Bir önceki şekilde gösterilen bitkilerin bütün görünümü. BASTA muamelesinden 15 gün sonra

III.3.4.3. Transgenik F1 Döllerin Analizi

Proje kapsamında bulunmamasına rağmen, her iki plasmid ile yapılan transformasyon deneyleri sonucunda geliştirilen transgenik bitkilerden F1 döller elde edilmiş ve elde edilen tohumlarda aktarılan genlerin varlığı analiz edilmiştir.

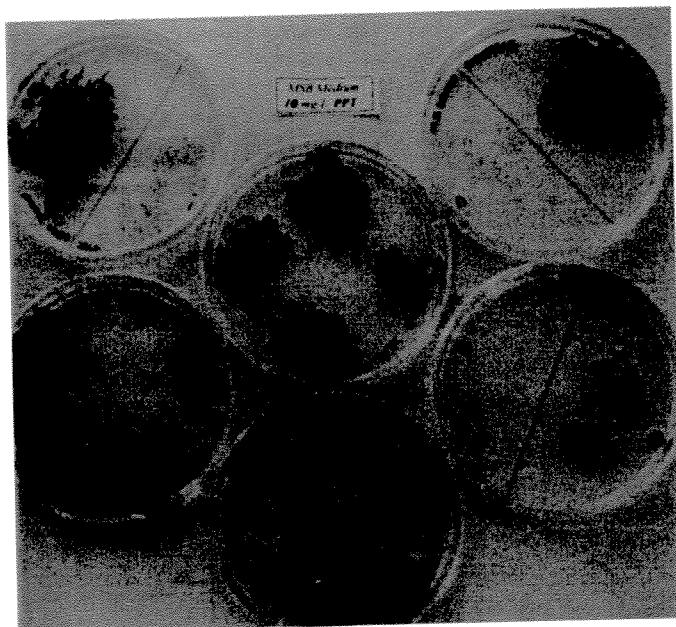
pZPGUSINT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen F1 tohumlar, çimlendirilmiş ve bitkiciklerde histokimyasal GUS analizleri yapılmıştır. Örnek sonuçlar Şekil 3.10'da verilmektedir.



Şekil 3.10. pZPGUSINT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen F1 tohumlarda histokimyasal GUS analizi.
Deneylerde Şekil 3.5.B'de gösterilen transgenik bitkiden elde edilen F1 tohumlar kullanılmıştır.

Sonuçlar deneylerden elde edilen F1 döllerde GUS geninin fonksyonel olarak ifade edildiğini doğrulamaktadır.

pPZPEmuPAT blasmidi ile yürütülen deneyler sonucunda geliştirilen transgenik bitkilerden elde edilen F1 tohumlarının analizi ise, ölümcül dozda (10 mg/L) herbisit aktif maddesi (PPT) içeren ortamlarda çimlendirilerek yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 3.11'de gösterilmektedir.



Şekil 3.11. pPZPEmuPAT plasmidi ile yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen F1 tohumlarının 10 mg/L PPT içeren ortamlarda çimlenme potansiyelleri.
Ölümcül dozda PPT içeren petrilerin yarısına transgenik diğer yarısına ise kontrol (gen aktarılmamış) bitkilerden elde edilen tohumlar konulmuştur. Bu sayede transgenik ve kontrol tohumların tepkileri aynı anda gözlemlenebilmiştir. Merkezdeki petride seçici olmayan ortamda çimlendirilen kontrol tohumlar gösterilmektedir.

Deney sonucunda aktarılan herbisit direnci karakterinin F1 döllerine de taşındığı doğrulanmıştır.

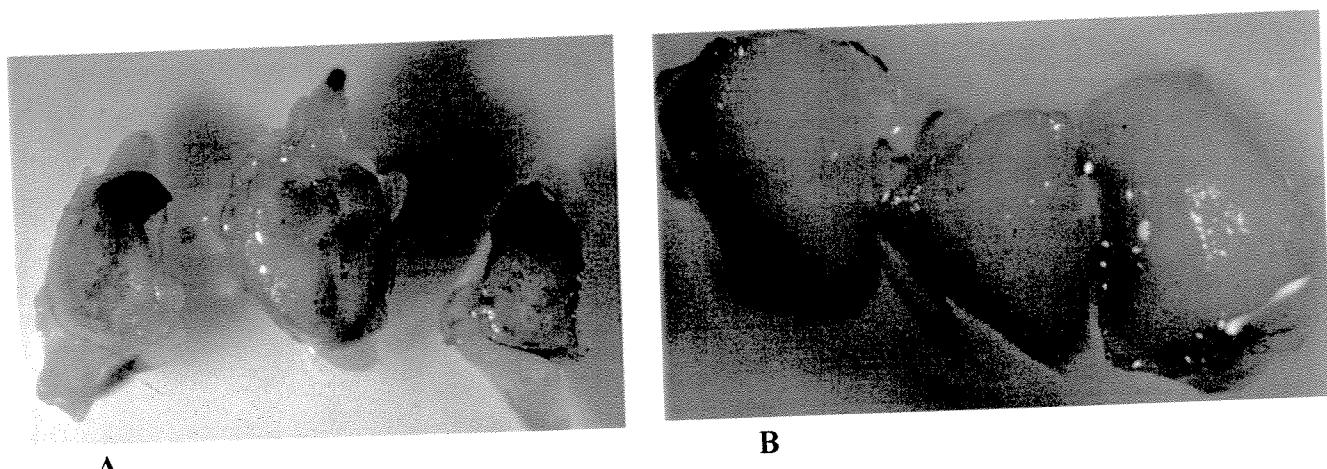
III.4. Partikül Bombardımanı Çalışmaları

Proje kapsamında önerilmememesine rağmen, direk gen transferi sistemi için geliştirilen pBSGUSINT plasmidi yaygın olarak kullanılan bir diğer direk gen aktarım yöntemi olan partikül bombardımanı sisteminde de denenmiştir.

Bu deneylerde bitki materyali olarak olgunlaşmamış buğday embriyoları ve mercimekten izole edilen olgunlaşmamış kotiledon dokuları kullanılmıştır.

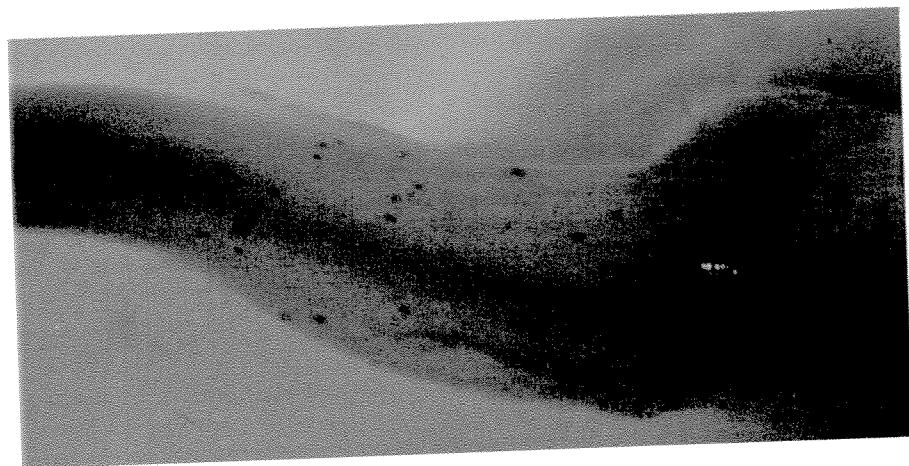
Partikül bombardımanı çalışmaları GENEBOOSTER partikül bombardıman sistemi kullanılarak yürütülmüş ve deneylerde mikro taşıyıcı olarak tungsten parçacıkları kullanılmıştır.

Deney sonuçları, bombardıman edilen dokularda yapılan histokimyasal GUS aktivite tayini çalışmaları ile izlenmiştir. Sonuçlar Şekil 3.12 ve 3.13'de verilmektedir.



Şekil 3.12. Olgunlaşmamış buğday embriolarında pBSGUSINT plasmidi ile yürütülen partikül bombardımanı çalışmaları.
A: Plasmid kaplı tungsten ile vurulan embriolar; B: Çiplak tungsten ile vurulan embriolar.

GUS aktivitesi bombardımandan 48 saat sonra yapılmıştır.



Şekil 3.13. Olgunlaşmamış mercimek kotiledonlarında pBSGUSINT plasmidi ile yürütülen partikül bombardımanı çalışmaları.

Sonuçlar pBSGUSINT plasmidinin tütin protoplast sisteminin yanısıra diğer direk gen aktarım sistemlerinde ve bitki türlerinde de çalıştığını göstermesi açısından önemlidir.

SONUÇ

Projemiz öngörülen amaç ve kapsam dahilinde başarı ile sonuçlanmıştır.

Yürüttülen çalışmalar sonucunda *Agrobacterium* ve direk gen aktarım sistemlerinde kullanılabilecek nitelikte toplam dört farklı vektör konstrüksiyonu gerçekleştirılmıştır. Plasmid haritaları Ek-2'de verilmektedir.

Agrobacterium sistemi için geliştirilen vektörlerden **pPZPGUSINT**, seçici gen olarak kanamisin antibiyotiğine direnç sağlayan npt-II genini, işaret gen olarak ise *uid-a* (GUS) genini taşımaktadır. Vektör özellikle farklı bitkilerde yürütülecek optimizasyon amaçlı transformasyon çalışmalarında kullanılabilecek niteliktedir. *Agrobacterium* sistemi için geliştirilen diğer vektör olan **pPZPEmuPAT**, seçici gen olarak npt-II geninin yanısıra, fosfinotrisin (glufosinat amonyum) bazlı total herbisitlere direnç sağlayan *bar* genini taşımaktadır.

Direk gen aktarım sistemlerinde kullanılabilecek vektörler olan **pBSCGUSINT** ve **pBSEmuPAT**, yaygın olarak kullanılan bir klonlama vektörü olan “blue script” plazmidine sırası ile *uid-a* ve *bar* genlerinin ilgili promötör ve terminatör sekanslarının kontrolu altında transferi ile gerçekleştirılmıştır. Bu vektörlerlede optimizasyon amçalı yürütülecek transformasyon çalışmalarında kullanılabilecek niteliktedir.

Konstrüksiyonu gerçekleştirilen tüm vektörler ilgili transformasyon yöntemlerinde denenmişlerdir. *Agrobacterium'a* dayalı transformasyon yöntemi tütün yaprak disklerinde denenmiş ve her iki vektör kullanılarak yürütülen deneylerde transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bir diğer önemli husus aktarılan genlerin bir sonraki generasyonda da ifade edilebildiğinin gösterilmesidir. Sonuçta vektörlerin bahsi geçen transformasyon yöntemlerinde uygulanabilirliği doğrulanmaktadır.

Direk gen aktarım sistemi için geliştirilen vektörlerin denenmesi ise öncelikle tütün protoplast sisteminde denemiş ve vektörlerin bu sistemde çalıştığı doğrulanmıştır. Proje kapsamında bulunmamasına rağmen vektörlerin çalışabilirliği, yaygın olarak olarak kullanılan bir diğer direk gen transferi yöntemi olan partikül bombardımanı (biolistik) sisteminde de farklı bitkiler kullanılarak denenmiştir.

Bu çalışmalarında iki önemli sonuca varılmıştır. Bunlardan birincisi, vektörlerin protoplast sistemi dışında diğer gen aktarım sistemlerinde de başarılı olarak kullanılabileceği, ikinci olarak ise, vektörlerin farklı bitkilerde yürütülecek gen transferi çalışmalarında da kullanılabileceğidir.

Sonuç olarak projemizde önerilen farklı sistemlerde kullanılabilecek nitelikli bitki transformasyon vektörlerinin konstüksiyonu ve denenmesi başarılı olarak gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Birboim, H.C. and Doly, J., 1979. "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucleic Acids Res.* 7:1513.
2. Bradford M.M., 1976. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.*, 72: 248-254
3. Carmel O., Gabor H., Eva H., Philip D. and Peter M., 1993. "Chloroplast transformation in plants: Polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems". *The Plant Journal*, 3(5):729-738.
4. Doyle J.J. and Doyle J.L., 1990. "Isolation of plant DNA from fresh tissue". *Focus*, 12:13-15
5. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eicholtz D., Rogers G.S., Farley R.T., 1985. "A simple and general method for transferring genes into plants". *Science*, 227:1227-1232
6. I. Negruțiu, R. Shillito, I. Potrykus, G. Biasini and F. Sala., 1987. "Hybrid genes in the analysis of transformation conditions". *Plant Mol. Biol.*, 8:363-373
7. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H., 1990. "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *Gene*, Vol. 96, 23-28.
8. Ish-Horowicz, D. and Burke, J.F., 1982. "Rapid and efficient cosmid cloning". *Nucleic Acids Res.* 9:2989
9. Jefferson R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D., 1986. "β-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8447-8451
10. Jefferson, R. A., 1987. "Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system". *Plant Molec. Biol. Rep.* 5:387-405
11. Jefferson, R. A., 1989. "The GUS reporter system". *Nature*, Vol. 342, pp 837-838.
12. Jenes, B., Moore, H., Cao, J., Zhang, W. and Wu, R. 1991. "Techniques for Gene Transfer" In: Transgenic Plants, (Kung, S.-D. and Wu, R. eds.), Academic Press, Inc, San Diego, CA, 125-146.
13. Murashige T., Skoog F., 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture". *Physiol. Plant*, 15:473-497
14. Nagata, T. and Ishii, S., 1979. "A rapid method for isolation of mesophyll protoplasts". *Can. J. Bot.*, 57: 1820-1823.
15. Öktem H.A., Özkan F., Özalp V.C., Yücel M., 1994. "Agrobacterium-mediated gene transfer in tobacco". *Doğa Botanik Dergisi*, 18:397-405
16. Öktem H.A.: "Transgenic Plants and Their Applications in Biotechnology" I. Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, Mayıs 1997, Bildiri Kitabı, s.11-24.

17. Potryku,I., Gene Transfer to Crop Plants, Bio/technology, Vol.8, s.535-542, 1990.
18. Walkerpeach C.R. and Velten J., 1994. "Agrobacterium-mediated gene transfer to plants: cointegrate and binary vector systems". *Plant Molecular Biology Manual* B1: 1-19

EK-1: Araştırmada kullanılan plasmidlerle ilgili kullanım izinleri

THE STATE UNIVERSITY OF NEW JERSEY

RUTGERS

Prof. Pal Maliga

Waksman Institute • P.O. Box 759 • Piscataway • New Jersey 08855-0759
Phone: (908)445-5329 • Fax: (908)445-5735 • E-mail: maliga@mbcl.rutgers.edu

March 12, 1996

Dr. Huseyin Avni Oktem
Department of Biology
Middle East Technical University
06531 Ankara
Turkey

Dear Dr. Oktem:

Enclosed are the requested samples of the pPZP *Agrobacterium* binary plasmids described in the paper "The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation" by Peter Hajdukiewicz, Zora Svab and Pal Maliga in Plant Molecular Biology (25:989-994, 1994). By accepting these plasmids you agree that your laboratory will abide by the NIH and other Federal, State and Institutional guidelines for Recombinant DNA Research.

The tubes contain ~ 1 µg vacuum-dried miniprep DNA of the following plasmid:

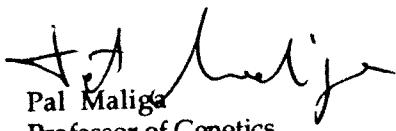
pPZP100; pPZP101; pPZP102; pPZP111; pPZP112; pPZP121; pPZP122
pPZP200; pPZP201; pPZP202; pPZP211; pPZP212; pPZP221; pPZP222

The pPZP plasmids are made available to you free of charge. However, we suggest that your Institution makes a \$ 100 voluntary contribution in the form of an unrestricted gift as a way to compensate for the preparation of the plasmids and mailing. The suggested donation to companies is \$ 1,000. Please, make the check payable to Rutgers University.

Note, that the promoter of the selectable marker contains the 35S enhancer. John Tonkyn in Dan Klessig's laboratory found that the expression of test promoters which are cloned divergently is influenced by this enhancer. Therefore, if tissue specific expression of the passenger gene is important for you, clone the test gene in tandem with the marker gene. Note also, that we have in part used published information when assembling the sequence files. We have been told that the 35S promoter region contains 2 unpredicted *Xba*I sites.

A step-by-step protocol on the use of these vectors is described by Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1995) Generation of transgenic tobacco plants by cocultivation of leaf disks with pPZP *Agrobacterium* binary vectors. In "Methods in Plant Molecular Biology - A Laboratory Manual", P. Maliga, D. Klessig, A. Cashmore, W. Gruissem and J. Varner, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 55-77

Sincerely yours,



Pal Maliga
Professor of Genetics



PLANT
INDUSTRY

Institute of Plant Production and Processing

Postal Address:
GPO Box 1600
CANBERRA ACT 2601
Australia

Cnr Clunies Ross Street and Barry Drive
Black Mountain, Canberra, ACT
Tel: (06) 246 4911 Int: +61 6 246 4911
Fax: (06) 246 5000 Int: +61 6 246 5000

PW:CW

13 May 1996

Ref: MM99

Dr Huseyin Auni Oktem
Department of Biological Sciences
Middle East Technical University
06531 Ankara
TURKEY

Dear Dr Oktem

Please find enclosed copy of a Biological Material Transfer Agreement which we request you to sign. On receipt of the signed Agreement we will send you the plasmid pEmu PAT you have requested.

Yours sincerely

P J Walsh
Business Manager

Per: *P J Walsh*

Enc

Institut
für Genbiologische
Forschung
Berlin GmbH

Institut für Genbiologische Forschung Berlin GmbH
Innestr. 63, 14195 Berlin

Dr. Huseyin Avni Oktem
Dept. of Biology
Middle East Technical University
06531 Ankara
Turkei

Telefax (030) 83 00 07 - 36
Telefon (030) 83 00 07 - 0
Sekretärin (030) 83 00 07 - 60

Bearbeiter Wi/kr

Berlin, den 24.08.1994

Dear Dr. Öktem,

with respect to your recent letter we send you enclosed the 35S-GUS-INT gene with following restriction sites in the surroundings:

HindIII - sphI - PstI - HincII - 35S promoter - XbaI - BamHI - SmaI - GUS- gene -

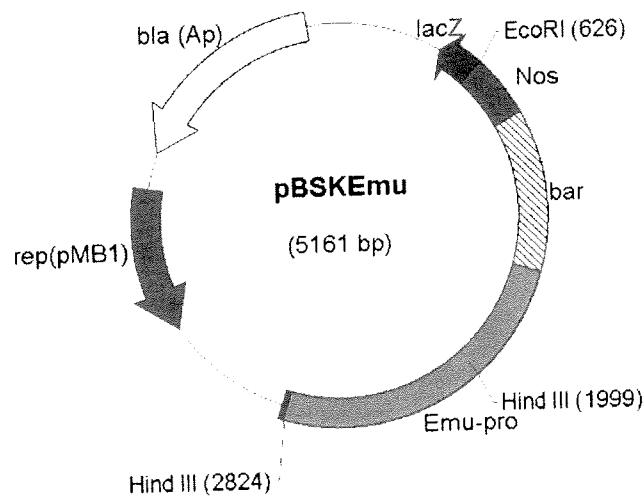
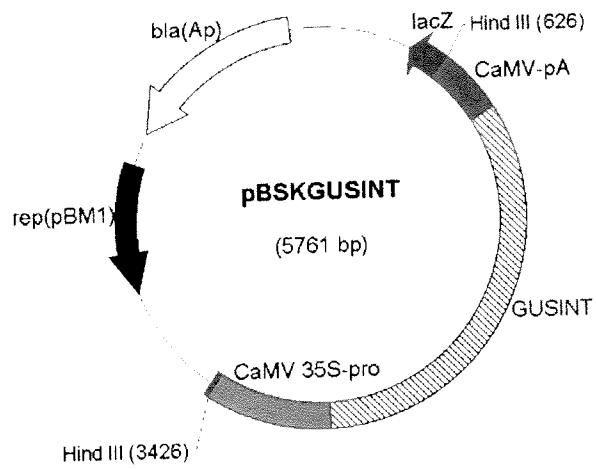
SstI - KpnI - 35S-3'-end - sphI - PstI - HindIII.

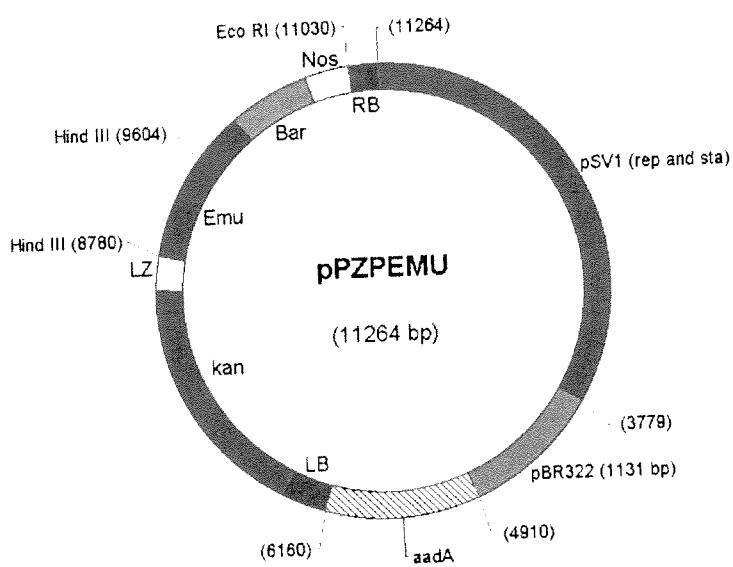
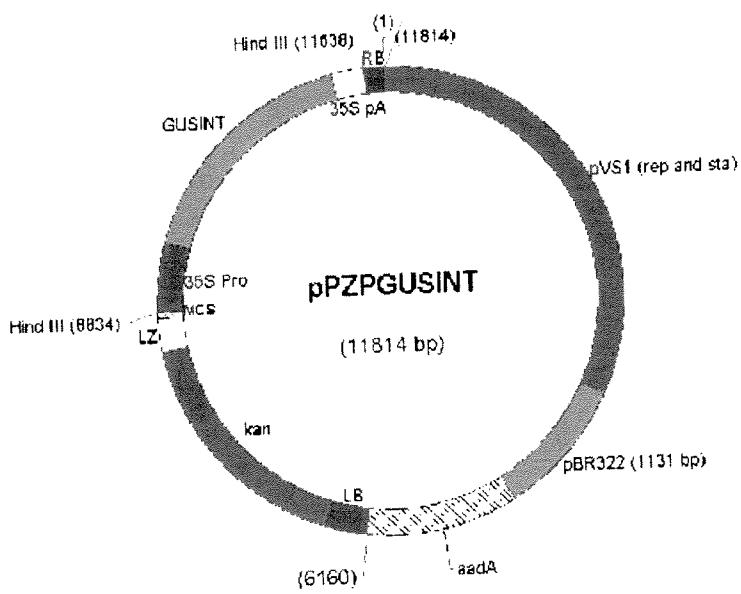
Good luck!

Yours sincerely,

Prof. Dr. L. Willmitzer

EK-2 Proje kapsamında konstrüksiyonu gerçekleştirilen vektörlerin haritaları.





BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1-Proje No: TBAG-1586

2. İlgili Araştırma Grubu: TBAG

3-Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 3/3/1997 - 3/9/1999

4-Projenin Adı:

FARKLI BİTKİ TRANSFORMASYON VEKTÖRLERİNİN HAZIRLANMASI VE PROTOPLAST VE AGROBACTERİUM SİSTEMLERİNDE DENENMESİ

5- Proje Yürüttüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Meral Yücel, Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem, Fahriye Ertuğrul, Füsün İnci, Meltem Saldamlı

6- Projenin Yürüttüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyoloji Bölümü 06531 ANKARA

7- Destekleyen Kuruluş(lar) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Atatürk Bulvarı No: 221, 06100 Kavaklıdere, Ankara

8- Özет (Abstract)

Bu projede bitkilerin genetik transformasyonunda kullanılan teknikler arasında, en yaygın olarak uygulananları olan *Agrobacterium* ve direkt gen aktarım sistemlerinde kullanılabilir nitelikli bitki transformasyon vektörlerinin konstrüksiyonu ve oluşturulan vektörlerin işlerlilikleri araştırılmıştır.

Proje kapsamında *Agrobacterium* sisteminde optimizasyon amaçlı çalışmalarında kullanılabilecek nitelikte ve GUS rapörtör geni ve fosfinotrisin (PPT) bazlı total herbisit direnci sağlayan *bar* veya kanamisin direnci sağlayan *npt-II* genlerinin taşıyan farklı ikili vektörler oluşturulmuştur. Buna ek olarak direkt gen aktarım sistemlerinde kullanılabilecek ve GUS raportör genini veya *bar* genini taşıyan transformasyon vektörlerinin de konstrüksiyonuna gidilmiştir. Elde edilen vektörler *Agrobacterium*, protoplast ve partikül bombardımanı sistemlerinde denenmişlerdir. *Agrobacterium* ve protoplast çalışmaları sırası ile tütün yaprak diskleri ve tütün BY2 süspansiyon hücre kültürlerinden elde edilen protoplastlar üzerinde test edilmişlerdir. Partikül bombardıman çalışmalarında ise olgun buğday embriyoları ve olgunlaşmamış mercimek kotiledonları kullanılmıştır.

Agrobacterium sisteminde kullanılabilir nitelikli ikili vektörler sırası ile pGUSINT ve pEmuPAT vektörlerinden çıkartılan CaMV35S-GUSINT-nos ve Emu-*bar*-nos kasetlerinin pPZP211 serisi ikili vektörlere aktarılması ile oluşturulmuştur. Direkt gen aktarım sistemlerinde kullanılacak vektörler ise yine aynı kasetlerin Progema pBlueScript vektörlerine klonlanmasıyla elde edilmiştir. Oluşturulan tüm vektörler, restriksiyon enzim sindirimini sonrası agaroz jellerde test edilmiş ve istenen kasetleri içerdikleri doğrulanmıştır. Oluşturulan vektörler pZPGUSINT ve pZPEmuPAT (*Agrobacterium*) ve pBSGUSINT ve pBSEmuPAT (direkt) olarak isimlendirilmiştir.

pPZP serisi ikili vektörlerle yürütülen transformasyon deneyleri sonucunda elde edilen transgenik bitkilerin genomlarında GUS ve *bar* genlerini içerdikleri PCR deneyleri, aktarılan genlerin fonksiyonel olarak ifade ettikleri ise sırası ile histokimyasal GUS ve *in vivo* herbisit uygulaması testleri ile doğrulanmıştır. Buna ek olarak GUS ve *bar* geninin F1一代 transgenik bitkilerde ifade ettiği gösterilmiştir.

pBS serisi transformasyon vektörlerinin işlerlilikleri tütün BY2 süspansiyon kültürlerinden hazırlanan protoplastlar üzerinde histokimyasal GUS analizleri ile gösterilmiştir. Vektörler, partikül bombardımanı tekniği ile transforme edilen olgun buğday embriyoları ve olgunlaşmamış mercimek kotiledonlarında da olumlu sonuç vermiştir.

Özet olarak, proje kapsamında yürütülen çalışmalar sonucunda *Agrobacterium* ve direkt gen transferi sistemlerinde, özellikle optimizasyon amaçlı transformasyon çalışmalarında kullanılabilecek nitelikli dört adet bitki transformasyon vektörünün konstrüksiyonu başarılı olarak gerçekleştirilmiş ve vektörlerin çalışırlılıkları ilgili sistemler üzerinde yürütülen transformasyon deneyleri ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak projemiz öngörülen amaç ve kapsam doğrultusunda başarı ile tamamlanmıştır.

9- Anahtar kelimeler: vektör konstrüksiyonu, *Agrobacterium*, protoplast, partikül bombardımanı, tütün, buğday, mercimek

10- Projeye Çalışmalarının Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ)

Hüseyin Avni Öktem, Barnabas Jenes, Füsün (İnci) Eyidoğan, Fahriye (Setenci) Ertuğrul, Ottó Toldi, Meral Yücel. "Marker Gene Delivery To Mature Wheat Embryos Via Particle Bombardment", *Türk Botanik Dergisi*, 23, 303-308, 1999.

H.A.Öktem, M. Mahmoudian, F. Eyidoğan (İnci), M. Yücel. "Gus Gene Delivery And Expression In Lentil Cotyledonary Nodes Using Particle Bombardment" *LENS Newsletter*, Vol 26, s3-6, 1999.

11- Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu: Gizli

Gizli Değil

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU

1-Proje No: TBAG-1586

2. İlgili Araştırma Grubu: TBAG

3-Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 3/3/1997 - 3/9/1999

4-Projenin Adı:

CONSTRUCTION OF PLANT TRANSFORMATION VECTORS AND THEIR USE IN AGROBACTERIUM AND PROTOPLAST SYSTEMS

5- Proje Yürüttürücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Meral Yücel, Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem, Fahriye Ertuğrul, Füsün İnci, Meltem Saldamlı

6- Projenin Yürüttüyü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Biyoloji Bölümü 06531 ANKARA

7- Destekleyen Kuruluş(lar) Adı ve Adresi: TÜBİTAK, Atatürk Bulvarı No: 221, 06100 Kavaklıdere, Ankara

8- Özeti (Abstract)

In this project, the construction of plant transformation vectors, that can be used with *Agrobacterium* and direct gene transfer systems, the most widely used techniques in the genetic transformation of plants, are prepared and their functions are researched.

In the project, different binary vectors carrying *GUS* reporter gene and *bar* gene which enables phosphinotrisin (PPT) based total herbicide resistance or *npt-II* gene which gives kanamycin resistance are produced for the optimization aimed studies in the *Agrobacterium* systems. In addition to this, the construction of transformation vectors carrying *GUS* reporter gene or *bar* gene have been completed. The vectors obtained are tested in *Agrobacterium*, protoplast and particle bombardment systems. *Agrobacterium* and protoplast studies are performed in order on tobacco leaf discs and protoplasts prepared from tobacco BY2 cell suspension culture. Mature wheat embryos and immature lentil cotyledones have been used in particle bombardment studies.

The binary vectors usable in *Agrobacterium* systems are produced by the transfer of cassettes CaMV 35S-GUSINT-35SpolyA isolated from pGUSINT and Emu-bar-Nos isolated from pEmuPAT into pPZP211 binary vector system. The vectors to be used in direct gene transfer are obtained by the cloning of the same cassettes into Progema pBluescript plasmid. All of the vectors produced are tested by agarose gel electrophoresis following restriction enzyme digestion and confirmed to have included the desired cassettes. The newly constructed vectors are named as pPZPGUSINT, pPZPEmuPAT (*Agrobacterium*), pBSGUSINT and pBSEmuPAT (direct).

Presence of *GUS* and *bar* genes in the genome of the transgenic plants which are produced after the transformation experiments carried out by pPZP plasmids was confirmed by means of PCR experiments. The function of the transferred genes was shown in order by histochemical GUS staining and *in vivo* herbicide treatment. It was also shown that *GUS* and *bar* genes have been expressed in F1 generation of transgenic plants.

The functionality of pBS series transformation vectors are shown by histochemical GUS analysis on the protoplasts isolated from BY2 cell suspension culture. The vectors have also produced positive results on mature wheat embryos and immature lentil cotyledones that are transformed by particle bombardment technique.

Briefly, as a result of the studies carried out in the project, the construction of four plant transformation vectors that can be used in *Agrobacterium* and direct gene transfer, especially for the optimization aimed studies, is successfully realized and the vectors functionality is confirmed by the transformation experiments carried out on related systems. Finally, our project has been completed successfully in the direction of predetermined objective and context.

9- Key words: vector construction, *Agrobacterium*, protoplast, particle bombardment, tobacco, wheat, lentil

10- Proje Çalışmalarının Sonuçları ile İlgili Yayınlar (makale, tebliğ)

Hüseyin Avni Öktem, Barnabas Jenes, Füsün (İnci) Eyidoğan,, Fahriye (Setenci) Ertuğrul, Ottó Toldi, Meral Yücel. "Marker Gene Delivery To Mature Wheat Embryos Via Particle Bombardment", Türk Botanik Dergisi, 23, 303-308, 1999.

H.A.Öktem, M. Mahmoudian, F. Eyidoğan (İnci), M. Yücel. "Gus Gene Delivery And Expression In Lentil Cotyledonary Nodes Using Particle Bombardment" LENS Newsletter, Vol 26, s3-6, 1999.

11- Proje Sonuçlarının Gizlilik Durumu:

Gizli

Gizli Değil