

578.841.11:575.1

K 76 P

MFN: 6086

BİLİMSEL VE

TÜBİTAK

TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

*PSEUDOMONAS sp 19S'den BİR HALOALKAN
DEHALOGENAZ GENİNİN KLONLANMASI*

TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

1997-985

PROJE NO : TBAG- 1198

Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Committee

579.841.11:575.1

K 76 p

**PSEUDOMONAS sp 19S'den BİR HALOALKAN
DEHALOGENAZ GENİNİN KLONLANMASI**

**TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ**

1997-985

PROJE NO : TBAG-1198

**PROF.DR.SEMRA KOCABİYİK
BUĞRAER ASLAN**

ODTÜ
Biyoloji Bl.
S. 33, Ek 2
R-32

**TEMMUZ 1995
ANKARA**

Böş - Ekim 1995

19903

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

"*Pseudomonas* sp. 19S' den bir haloasit dehalogenaz geninin klonlanması" adlı bu proje çerçevesinde, laboratuvarımızda izole edilen *Pseudomonas* sp. 19S suşunun termofilik bir dehalogenaz enzimini kodlayan genin *E.coli*'de klonlanması ve ekspresyonu çalışmaları yürütülmüştür. Dehalogenaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların halojenli hidrokarbonların biyolojik yıkımından sorumlu oldukları ve böylece söz konusu çevre kirleticilerin yok edilmesinde etkin rol oynadıkları bilinmektedir. Bu çalışmada olduğu gibi genetik mühendisliği ile mikroorganizmaların yıkım kapasitelerinin artırılması mümkündür. Biyolojik yıkımdan sorumlu dehalogenaz geninin klonlanması ülkemizde çevre problemlerine moleküler biyoteknoloji yolu ile yaklaşımın ilk örneğidir. Bu dehalogenaz geni bu güne kadar klonlanmış dehalogenaz genlerinin sekizincisidir. Söz konusu genin nükleotid dizilerinin saptanması çalışmalarımız halen laboratuvarımızda devam etmektedir.

Proje çalışmalarımız Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji Bölümü laboratuvarlarının olanaklarından yararlanılarak yürütülmüştür. Proje için maddi destek TÜBİTAK (TBAG 1198, 1993-1995) ile TWAS (Proje No.93,129 RG;BIO;AS, 1994-1995) ve ODTÜ Araştırma Fonu (AFP-93-10-08-04, 1993-1994) tarafından sağlanmıştır. Projenin bu son raporunun yazımındaki katkılarından dolayı Armağan Koçer Sağıroğlu'na teşekkür ederim.

Prof.Dr.Semra Kocabıyık

1. Giriş	12
2. Materyal ve Yöntem	12
2.1. Plazmit DNA'sının İzolasyonu	12
2.2. Kromozomal DNA'nın Hazırlanması	13
2.3. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim	13
2.4. DNA Konsantrasyonunun Determinine Edilmesi	13
2.5. DNA Fragmanlarına Agroz Jelden İstasyonu	13
2.6. Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu	13
2.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	13
2.8. 1. PCR İçin Primerlerin Hazırlanması	13
2.9. 2. PCR Amplifikasyonu	13

İÇİNDEKİLER

ÖZ	1
ABSTRACT	2
1.GİRİŞ	3
1.1.Haloalkanoik Asitlerin Biyolojik Yıkımı	3
1.2.Dehalogenasyonun Enzimatik Mekanizması	4
1.3.Dehalogenazların Genetiği	4
1.4.Mikrobiyal Dehalogenazların Teknolojik Uygulamaları	7
Projenin Kapsamı ve Amacı	9
2.MATERYAL VE METOD	9
2.1.Bakteri Suşları	9
2.2.Plazmitler	9
2.3.Bakteri Kültür Ortamları	9
2.4.Tampon ve Çözeltiler	12
2.5.DNA İzolasyon ve manipülasyon Teknikleri	12
2.5.1.Mini Plazmit Preparasyonu	12
2.5.2.Büyük Ölçekli Plazmit Preparasyonu	12
2.5.3.Plazmit DNA'sının Saflaştırılması	12
2.5.4.Kromozomal DNA'nın Hazırlanması	12
2.5.5.Restriksiyon Enzimleri İle Kesim	12
2.5.6.DNA Konsantrasyonunun Determine Edilmesi	13
2.5.7.DNA Fragmanların Agaroz Jelden İzolasyonu	13
2.6.Kompetan <i>E.coli</i> Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon	13
2.7.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	13
2.7.1.PCR İçin Primerlerin Hazırlanması	13
2.7.2.PCR Amplifikasyonu	13

2.8.Klonlama Stratejileri	15
2.8.1.Shut-Gun Klonlama	15
2.8.2.PCR İle Klonlama	15
2.8.2.1.DNA Problar ve Radyoaktif Olmayan Markalama	15
2.8.2.2.Southern Blot Hibridizasyon	15
2.9.Klonlama Stratejisi	15
2.10.Dehalogenaz Aktivite Testi	16
2.10.1.Hücre Lizatlarının Hazırlanması	16
2.10.2.Dehalogenaz Aktivite Tayini	16
3.SONUÇLAR	16
3.1.Probların Hazırlanması	16
3.2.PCR Amplifikasyonu	18
3.3. Shut-Gun Klonlama	18
3.3.1. <i>Pseudomonas</i> sp 19S Gen Bankasının Hazırlanması	18
3.3.2.Gen Bankasının Tanınması	18
3.4.Southern Hibridizasyon	18
3.5. <i>Pseudomonas</i> sp 19S Geninin Klonlanması	21
3.6.Klonlanmış Dehalogenaz Geninin Karakterizasyonu	21
4.TARTIŞMA	30
5.KAYNAKLAR	31
Şekil 11. <i>Pseudomonas</i> sp 19S kromozomal DNA için proe I, proe II ve proe III kullanılarak Southern Blot ile analiz	34
Şekil 12. <i>Pseudomonas</i> sp 19S kromozomal DNA'nın Southern Blot ile analizi	35
Şekil 13. 5-6 kb büyüklüğündeki Bam HI ile kesilen DNA'nın Southern Blot ile analizi	36
Şekil 14. <i>Pseudomonas</i> sp 19S dehalogenaz geninin pUC19S vektöre klonlanması	37
Şekil 15. Dehalogenaz geninin pUC19S vektöre klonlanması	39

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

Tablo 1	28
Şekil 1. Haloalkanoik asit dehalogenazlar için önerilen reaksiyon mekanizmaları	5
Şekil 2. Altı homolog dehalogenaz enzimlerinin 3 korunmuş amino asit motifleri	8
Şekil 3. pUC 18 klonlama vektörünün yapısal haritası	10
Şekil 4. pBluescript SK(+) fazmitinin yapısal haritası ve MCS'deki restriksiyon enzim bölgeleri	11
Şekil 5. PCR amplifikasyonunda kullanılan primerler	14
Şekil 6. Prob I ve prob II'nin hazırlanması	17
Şekil 7. pUKS 107 'nin yapısal haritası	19
Şekil 8. PCR fragmanı içeren pBlu Amp 19S'in yapısal haritası	20
Şekil 9. <i>Pseudomonas</i> sp 19S'in haloasit dehalogenaz geninin PCR amplifikasyonu	22
Şekil 10. <i>Pseudomonas</i> sp 19S kromozomal DNA'sında haloasit dehalogenaz geninin pozisyonunun Southern Blot analizi ile saptanması	23
Şekil 11. <i>Pseudomonas</i> sp 19S kromozomal DNA'sının prob I, prob II ve prob III kullanılarak Southern Blot ile analizi	24
Şekil 12. <i>Pseudomonas</i> sp 19S kromozomal DNA'sının Southern Blot ile analizi	25
Şekil 13. 5-6 kb büyüklüğündeki Bam HI fragmentlerinin agaroz jelden izolasyonu	26
Şekil 14. <i>Pseudomonas</i> sp 19S dehalogenaz geninin pUC 18S vektöre klonlanması	27
Şekil 15. Dehalogenaz geninin (<i>deh</i> 5. SB) pUC 18.5 SB plazmitte gözlenmesi	29

KISALTMALAR

Öz

Amp; Ampicillin

2-CPA; 2-chloropropionic acid

2-MCPA; 2-monochloropropionic acid

IPTG; Isopropyl- β -D-galactopyranoside

LB; Luria-Bertani

MCA; Monochloro acetic acid

MCS; Multiple Cloning Site

NBT; Nitroblue tetrazolium

PCR; Polymerase Chain Reaction

X-Gal; 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside

X-phosphate; 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate

Klonlanmış *dek C1* ve *dek CII* yapımı genlerinden hazırlanmış DNA probolar, kullanılan deney koşullarında, *Pseudomonas* sp. 19S genini saptayamazlardır. Southern Blot hibridizasyonda, markalama ve analiz olgununda radyoaktif olmayan "biyotin" sistemi kullanılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas*, dehalogenaz, PCR, klonlama, biyodegradasyon

ÖZ

ABSTRACT

Bu çalışmada *Pseudomonas* sp suşu 19S'in çeşitli haloalkanoik asitlerin kullanımından sorumlu bir dehalogenaz enziminin geni *E.coli*'ye klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Klonlamada izlenen strateji " Polimeraz Zincir Reaksiyonu" (PCR) kullanılarak, *Pseudomonas* dehalogenaz genine homolog bir fragmanın spesifik olarak amplifikasyonuna dayanmaktadır. Elde edilen PCR amplikon prob olarak kullanıldığında, Bam HI ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sında Southern Blot yöntemi ile dehalogenaz geninin pozisyonunun saptanmasında başarılı olmuştur. Bu pozisyona karşılık gelen fragmanlar, pUC 18 vektöre bağlanıp *E.coli* MV1190 suşunda klonlanmışlardır. Dehalogenaz aktivitesi oldukça yüksek (%70) bir klon 5.5 kb'lık bir fragman taşıyan bir plazmite (pUC 18.5 SB) sahiptir. Rekombinant bakterinin hücre özütünde, orijinal bakterininkinden daha yüksek dehalogenaz aktivitesi bulunmuştur. Klonlanan dehalogenaz geni, Southern Blot hibridizasyonunda, PCR amplikon prob olarak kullanıldığında rekombinant plazmit DNA'sında gözlenmiştir.

Klonlanmış *deh* CI ve *deh* CII yapısal genlerinden hazırlanmış DNA proplar, kullanılan deney koşullarında, *Pseudomonas* sp 19S genini saptayamamışlardır. Southern Blot hibridizasyonda, markalama ve sinyal oluşumunda radyoaktif olmayan "biyotin" sistemi kullanılmıştır.

In Southern Blot Hybridization, for both labeling and signal generation, nonradioactive Biotin system was used.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas*, dehalogenaz, PCR, klonlama, biyodegradasyon.

Key words: *Pseudomonas*, dehalogenase, PCR, cloning, biodegradation

ABSTRACT

In this study, a dehaloenase gene specifying the utilization of a variety of haloalcanoic acids by *Pseudomonas* sp strain 19S has been cloned and expressed in *E.coli*. The cloning strategy employed specific amplification of a fragment homologous to *Pseudomonas* dehalogenase gene by "Polymerase Chain Reaction" (PCR). The PCR primers were designed considering the highly conserved two amino acid motifs of dehalogenases described, so far. The PCR amplicon produced successfully acted as probe to detect the dehalogenase gene in the Southern Blot of the Bam HI digested *Pseudomonas* sp. 19S total DNA. Corresponding fragments were cloned into pUC 18 vector and amplified in *E.coli* MV1190. One clon with a substantial dehalogenation activity carried a recombinant plasmid (pUC 18.5 SB) containing a 5.5 kb insert. Higher levels of dehalogenase activity was detected in the cell free extracts of the recombinant bacteria than the wilde-type. Cloned dehalogenase gene was detected in the recombinant plasmid DNA by Southern hybridization, using PCR amplicon as the probe.

DNA probes prepared from the cloned *deh* CI and *deh* CII sturctural genes did not detect the *Pseudomonas* sp. 19S dehalogenase gene, under the experimental conditions.

In Southern Blot Hybridization, for both labeling and signal generation, nonradioactive Biotin system was used.

Key words: *Pseudomonas*, dehalogenase, PCR, cloning, biodegradation.

1.GİRİŞ

Kimyasal kirleticiler, çevreye çeşitli insan aktiviteleri yolu ile yayılan ve canlılara zararlı etkileri olan maddelerdir. Bunlar içerisinde halojenli bileşikler günlük hayatımızda önemli bir yer tutarlar. Çeşitli halojenli organik maddeler herbisit, pestisit, plastikler, solventler, yangın söndürücüler v.s. gibi kullanılmakta olup, çeşitli endüstriyel ve tarımsal kaynaklı atıklar olarak çevre kirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Doğada uzun süre (15 yıl kadar) parçalanmadan kalabilmeleri yada daha toksik metabolitlere dönüşebilmeleri dolayısıyla insan sağlığını tehdit edici problemlere yol açabilmektedirler. Halojenli bileşiklerin bazıları karsinojen (örneğin, vinyl chloride) (Malaveille *et al.*, 1975) özellikte olup, diğer bir grubu da biyolojik yada kimyasal yollarla mutajenik ürünlere dönüşebilmektedir (Motosugi and Soda, 1983).

Halojenli bileşiklerin doğada yıkımından fiziksel ve kimyasal faktörler kadar biyolojik faktörler de sorumludur. Hidrolitik dehalojenasyon mekanizmalarına sahip olan toprak bakterileri, karbon-halojen bağlarını kırmak suretiyle bu bileşikleri detoksifiye edebilmektedirler (Hardman, 1991). Mikroorganizmalarca parçalanmış organohalojenler genel olarak 2 grupta toplanırlar: (1) haloalifatikler, (2) haloaromatikler.

Halojenli alifatik bileşiklerden haloasitler ve haloalkanlar yer altı sularında yaygın olan kirleticilerden olup, toksik atıkların (xenobiotikler, solventler gibi) da başlıca bileşiklerindendirler. Ayrıca klorlu hidrokarbonların oluşması, kullanma sularının klorlanması ile de yakından ilintilidir. Sonuç olarak, bu bileşiklerin biyolojik yıkımı çok önemlidir.

Kloroalkanoik asitler grubu, mikroorganizmalar tarafından oldukça kolay parçalanmaktadırlar. Kloroasetat ile kloropropiyonat ve diklorlu analoglarının parçalanmasında rol oynayan birçok mikroorganizma toprak ve sudan izole edilmiştir (Hardman and Slater, 1981; Allison *et al.*, 1983, Hardman *et al.*, 1986).

1.1. Haloalkanoik Asitlerin Biyolojik Yıkımı:

Biyolojik yıkım, haloalkanoik asitlerin α pozisyonundaki halojenin hidroksil grubu ile yer değiştirmesiyle başlar. Karbon-halojen bağının biyolojik katalizinden sorumlu olan spesifik enzimler "dehalojenazlar" (Jensen, 1960) olarak adlandırılırlar. Böylece haloalkanoik asitlerin yıkımında ilk aşama, dehalojenasyondur. Halojen iyonu uzaklaştırıldıktan sonra, alkanoik asitler organizmanın ana metabolik mekanizmaları ile kolayca parçalanırlar. Dehalojenazlar karbon-halojen bağlarını hidrolitik olarak kırarak, monohalojenli bileşiklerden hidroksi alkanoik asitlerin, dihalojenli bileşiklerden oxoalkanoik asitlerin oluşmasına neden olurlar (Fay, 1975).

1.2. Dehalajenasyonun Enzimatik Mekanizması :

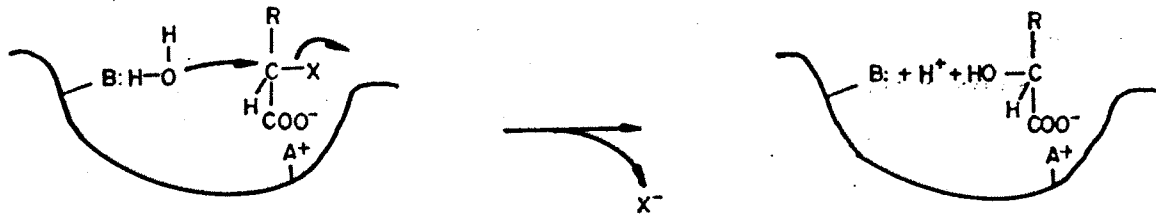
Halojenli hidrokarbonların mikrobiyal yıkımında karbon-halojen bağının kırılması kritik bir aşamadır. Bunun için çeşitli reaksiyon mekanizmaları önerilmiştir: Little and Williams'ın (1971) önerdiği mekanizmada, enzimin bir elektron verici grup ile (His) aktive edilen suyun nükleofil olarak yer aldığı bir baz kataliz reaksiyonu söz kanusudur (Şekil 1). Bu sistem konfigürasyon çevirimine yol açmakta ve SH-grubunu bloke edici ajanlardan etkilenmemektedir. Konfigürasyon çevirimi Boldman *et al.*, (1968) tarafından da farklı bir mekanizma ile açıklanmaktadır. Bu sistemde, halojenin uzaklaştırılması için bir karboksilat anyonu ile nükleofilik yer değiştirmeden ve daha sonra, oluşan ester hidrolizinden söz etmektedirler. Bu mekanizma, *Xanthobacter autotrophicus* GT10 (Franken *et al.*, 1991)'un haloalkan dehalojenaz enziminin X-ray kristalografik yapısı ile de uyusmaktadır. Katalitik grupların bir iç oyukta lokalize olan Asp-124, His-289 ve Asp-260 olduğu saptanmıştır. Reaksiyonun Asp-124'ün karboksilat anyonunun katılımı ile gerçekleşen bir nükleofilik yer değiştirme şeklinde olduğu, bir kovalent bağlı ester oluştuğu ve bunun, His-289 ' un aktive ettiği bir su molekülü tarafından hidrolize edildiği bulunmuştur (Verschuere *et al.*, 1993 a,b).

1.3. Dehalogenazların Genetiği

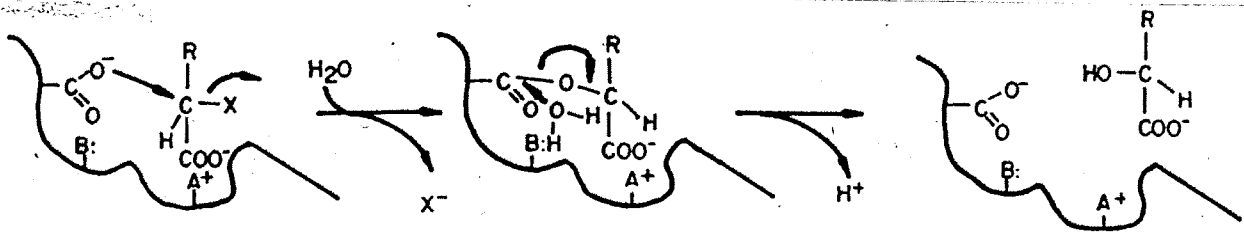
Halojenli alifatik hidrokarbonları kullanan mikroorganizmaların genetiğinin anlaşılması ve muhtemel manipülasyonları için, yıkımdan sorumlu enzimleri kodlayan genlerin klonlanması, nükleik asit dizilerinin saptanması ve çeşitli ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Her ne kadar bu güne dek birçok haloalkanoik asit dehalogenazlar bulunmuş ve karakterize edilmişse de, bunlardan sadece 7 tanesini kodlayan gen klonlanmış ve nükleik asit dizileri saptanmıştır.

Pseudomonas sp.CBS3'den iki 2-haloalkanoik asit dehalogenaz geni geniş konakçı spektrumu olan pMMB 33 kozmit vektörde klonlanmışlardır (Müller and Weightman, 1992). Orjinal olarak bu iki enzim monokloroasetat (MCA) ve 2-monokloropropionat'ın hidrolitik dehalogenasyonunu katalize etmektedir (Klages *et al.*, 1983). Her iki enzim de α -2-monokloropropionat'ı D-laktat'a çevirebildikleri halde, her ikisinin de D-2-monokloropropionat'a etkileri yoktur. Bu genlerin 1.1 kb (deh cl)

Mekanizma a:



Mekanizma b:



Şekil 1. Haloalkanoik asit dehalogenazlar için önerilen reaksiyon mekanizmaları.

ve 1 kb'lik (*deh cII*) fragmanlar olarak alt klonları pUC 18 plazmit vektörde oluşturulmuştur (Schneider *et al.*, 1991). Bu klonlarda, dehalogenazların ekspresyonu konstitütiftir. Her iki enzimin de genlerinin nükleotid dizileri saptanmıştır.

Barth *et al.*, (1992) *P.putida* AJ1'den 2 stereospesifik haloalkanoat dehalogenazı kodlayan DNA fregmentlerini (13 kb kadar) klonlamışlardır. Bu enzimler D (had D) ve L (had L) substratlara son derece spesifiktirler. Bu genler izole edilmiş ve *E.coli* ve *P.putida* da ayrı ayrı eksprese edilmişlerdir. Genler bir operon sistemi oluşturmaktadırlar ve indüklenebilirler. Had D 300 amino asitlik (MW 33,601), Had L ise 227 amino asitlik (MW 25,687) proteinleri kodlamaktadır.

P.putida No.109'un 2-haloacid dehalogenaz geni 74 kb'lik bir konjugatif plazmit üzerinde yer almaktadır. Bu plazmitin 2.8 kb'lik bir Eco RI fragmanı klonlanmış ve nükleik asit dizileri saptanmıştır (Kawasaki *et al.*, 1994). Bu dehalogenaz geni (*deh H 109*) 224 amino asitlik bir proteini (MW 25,231) kodlamaktadır.

1,2-dikloroetan'ın yıkımından sorumlu bir bakteri olarak tanımlanan *Xanthobacter autotrophicus* 1,2-dikloroetan'ı glikolata kadar parçalamaktadır (Keuning *et al.*, 1985). Bu olayda iki farklı dehalogenaz enzimi rol almaktadır. *Xanthobacter autotrophicus* GJ10'un geniş konakçı spektrumlu bir kozmit vektörde (pL AFRI) gen bankası hazırlanmış ve 1,2-dikloroetan metabolizmasından sorumlu birçok gen 10-12 kb'lik fragmanlar olarak izole edilmişlerdir (Janssen *et al.*, 1989). Bu genlerden haloalkan dehalogenaz geni (*dhl A*) 3 kb'lik bir fragman olarak elde edilmiş ve kendi promotörünün kontrolü altında *E.coli* , *Xanthobacter* sp.ve *Pseudomonas* sp.'de ekspres edilmiştir. Diğer bir gen (*dhl B*), 6.5 kb fragman üzerinde yer almakta ve bir haloasit dehalogenaz enzimini kodlamaktadır. Söz konusu enzim *deh cI* ve *deh cII* enzimlerine sırası ile %60.5 ve %61 oranında homoloji göstermekte olup *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (*dhl A*) enzimine homolog değildir.

Kawasaki *et al.*, (1992) bir *Moraxella* sp.plazmitinden iki haloasit dahalogenaz genini (*deh H1* ve *deh H2*) klonlamıştır. *deh H1* enzimi flor-karbon bağını kırma özelliğine sahiptir, fakat *deh H2* enziminin böyle bir özelliği yoktur. İki enzim amino asit düzeyinde homoloji göstermemektedir. *deh H2* enzimi, diğer L-spesifik haloasit dehalogenazlara benzer olduğu halde, *deh H1* enziminin amino asit dizileri onlardan farklıdır.

Altı homolog dehalogenaz enziminin amino asit dizilerinin özellikle 3 bölgede son derece korunmuş olduğu bulunmuştur (Şekil 2). Bunlardan L - spesifik dehalogenazlar (*deh H 109*, *deh cI*, *deh cII*, *dhl B*, *had L*, ve *deh H-2* haloasit dehalogenazlar) arasında benzerlik çok fazladır. Bu nedenle, her ne kadar bu

deh H109	8:	V	F	D	L	Y	G	T	L	Y	D	V	H	S	V	V	40:	W	R	Q	K	Q	L	E	Y	T	W	L	S	S	L	M	G	R	Y
had L	8:	40:
dhl B	8:	.	.	.	A	F	.	Q	.	.	.	A	40:	S	.	.	.	R	A
deh C1	8:	L	.	T	A	.	.	.	40:	.	.	.	R	.	.	.	S	.	T
deh C2	8:	C	A	40:	S	.	.	.	R	Q
deh H2	8:	.	.	.	M	40:	A	.	.	R	C	Q	

deh H109	173:	L	F	V	S	S	N	S	W	D	A	T	G	A	R	H	F	G
had L	173:	A	.	.	.	S	A	.	S	N	.	.	
dhl B	171:	G	F	.	V	G	.	.	K	N	.	.	
deh C1	173:	C	A	.	.	I	G	.	.	G	A	.	.	
deh C2	173:	A	.	.	S	
deh H2	173:	P	.	.	V	S	.	.	K	A	.	.	

Şekil 2. Altı homolog dehalogenaz enzimlerinin 3 korunmuş amino asit motifleri.

dehalogenazlar substrat spesifiteleri açısından farklılık gösterebilir, aralarında evrimsel bir ilişki söz konusu olabilir. Bu enzimler orijin olarak aynı bir enzimden kaynaklanmaktadır.; ve aynı bir enzim ailesi içerisinde gruplandırılabilirler. Diğer taraftan, *P.putida* AJ1 ve *dhl A* haloalkan dehalogenaz genleri, diğer dehalogenazlarla benzerlik göstermedikleri için, C-F bağı kırabilen bu gruptaki dehalogenazların farklı bir enzim ailesine bağlı olmaları olasılığı fazladır.

1.4. Mikrobiyal Dehalogenazların Teknolojik Uygulamaları:

Halojenli organik bileşiklerin mikrobiyal transformasyonunun gelecekte teknolojiye özellikle iki alanda uygulaması önemli olabilir:

1. Dehalogenazlar endüstride sentetik proseslerde yada yeni halojenli bileşiklerin sentezinde kullanılabilirler (Dahod and Mangan, 1986).

2. Dehalogenazlar çevre biyoteknolojisinde, kirletici organik bileşiklerin detoksifikasyonunda yada parçalanmasında etkin olabilirler. Bu amaçla başlıca üç yöntem kullanılmaktadır:

2.1. toprağın yada suyun doğal mikrobiyal florasının besin kompozisyonunu ayarlayarak zenginleştirmek,

2.2. kontamine bölgeden mikroorganizmaların izolasyonu, laboratuvarda seçimi, çoğaltılması ve daha sonra kontamine bölgeye verilmeleri,

2.3. genetik mühendisliği ile manüpile edilmiş mikroorganizmaların kullanılması.

Bu yöntemlerden ilk ikisi Avrupa ve Amerika'da toksik atıkların deontaminasyonunda başarı ile kullanılmaktadır (Burton and Crawford, 1988; St. Jone and Sikes, 1988).

2.2. Plazmidler

Klonlama çalışmalarında kopya sayıları yüksek olan pUC 18 plazmini ve pBluescript SK⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) plazmini kullanılmıştır. Bu vektörlerin yapısal haritaları Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmektedir.

2.3. Bakteri Kültür Ortamları

Ortamların tanımları Ek. 1'de verilmiştir.

PROJENİN KAPSAMI VE AMACI:

Kocacı ve Türkoğlu (1989) tarafından ilk defa tanımlanan *Pseudomonas* sp 19S'den izole edilen termostabil bir dehalogenaz enzimi çeşitli halojenli organik asitlerin dehalogenasyonunu kataliz etmektedir. Bu enzim en yüksek aktiviteyi monokloro asetat substrat olarak kullanıldığında göstermektedir ve diğer haloalkanoik asit dehalogenazların aksine aktivite için optimum sıcaklık 60 °C'dir. Enzim aktivite ya da stabilite için 2 değerlikli iyonlara gereksinim duymamaktadır ve indüklenebilir özelliktedir.

Bu çalışmada *Pseudomonas* sp 19S'den bu yeni haloasit dehalogenaz geni *E.coli*'de klonlanmış ve eksprese edilmiştir. Klonlama stratejisinin ilk aşamasında dehalogenaz geninin bir kısmı PCR ile çoğaltılmıştır. Primerler bu güne kadar tanımlanmış haloalkanoik asit dehalogenazların korunmuş amino asit motifleri dikkate alınarak hazırlanmıştır. Bu şekilde elde edilen PCR ampikon *Pseudomonas* sp 19S'in total DNA'sının membran blotlarında dehalogenaz geninin pozisyonunu saptamak için kullanılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD:

2.1.Bakteri Suşları

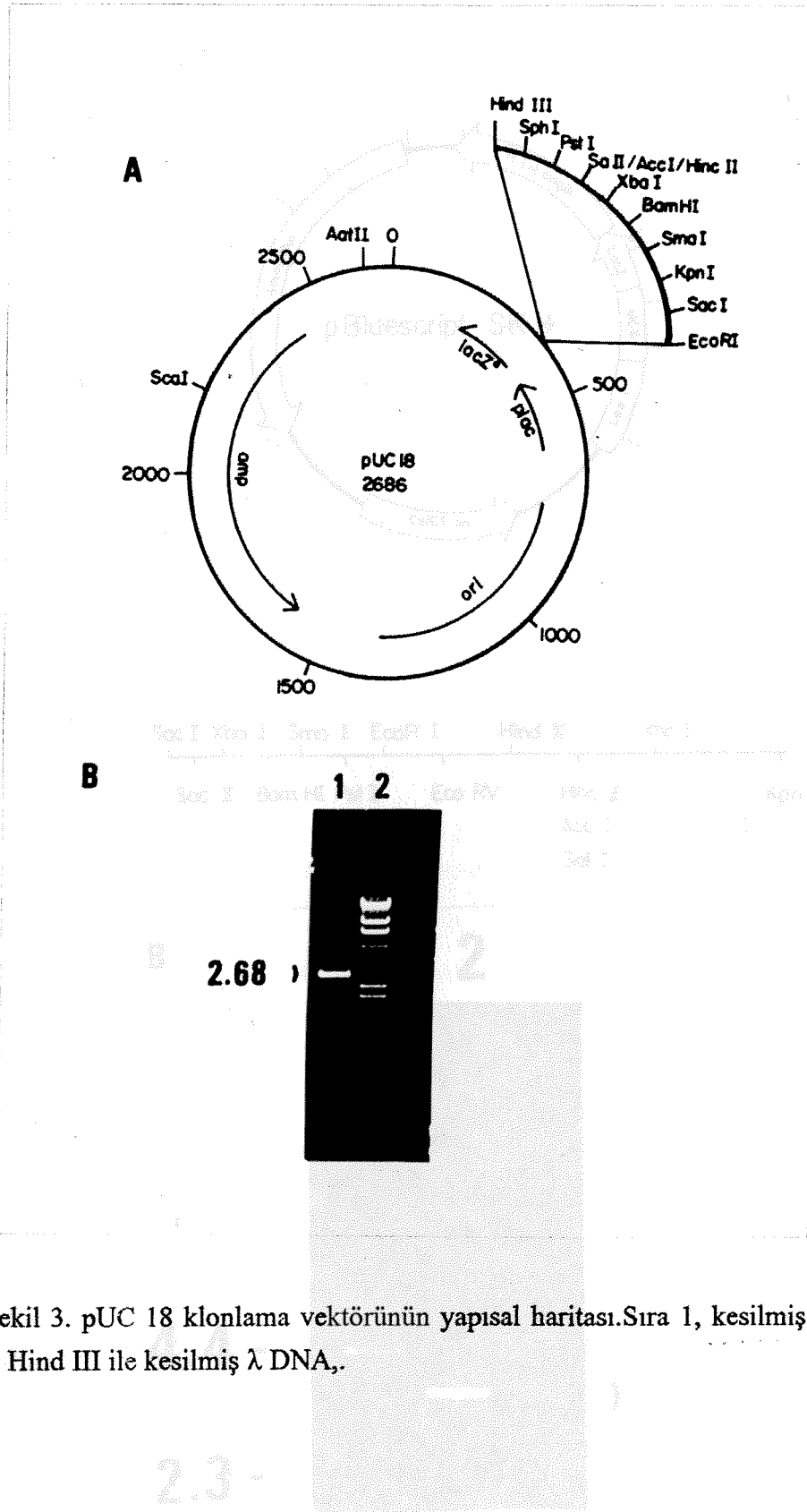
Transformasyon ve ekspresyon çalışmalarında laboratuvarımız koleksiyonunda bulunan *E.coli* MV1190 ile *E.coli* JM101 suşları kullanılmıştır. Klonlanmış *deh cI* ve *deh cII* genlerini taşıyan pUKS 202 ve pUKS 107 plazmitleri Prof.Dr.R.Müller'den sağlanmıştır. *Pseudomonas* sp 19S suşu ise laboratuvarımızda izole edilmiş olup bakteri koleksiyonumuzda yer almaktadır.

2.2.Plazmitler

Klonlama çalışmalarında kopye sayıları yüksek olan pUC 18 plazmiti ile pBluescript SK⁺ (Staratagene, La Jolla, CA) plazmiti kullanılmıştır. Bu vektörlerin yapısal haritaları Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmektedir.

2.3.Bakteri Kültür Ortamları

Ortamların tanımları Ek 1.'de verilmiştir.



Şekil 3. pUC 18 klonlama vektörünün yapısal haritası. Sıra 1, kesilmiş pUC 18; Sıra 2, Hind III ile kesilmiş λ DNA.

Şekil 4. pBluescript vektörünün yapısal haritası. Sıra 1, kesilmiş pBluescript; Sıra 2, kesilmiş λ DNA.

2.4. Tampon ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilerin tanımı Ek 2.'de verilmiştir.

2.5. DNA İzolasyon ve Manipülasyon Teknikleri

2.5.1. Mini Plazmit Preparasyonu:

E.coli'nin 5 ml LB kültüründen plazmit izolasyonu "Alkaline Lysis" yöntemine göre yapılmıştır (Sambrook *et al.*, 1989). 25 ml steril distile suda çözülen DNA örnekleri -20 °C'de saklanmışlardır.

2.5.2. Büyük Ölçekli Plazmit Preparasyonu:

"Alkaline Lysis" yönteminde ölçekler, tüm hacimler 10 kat arttırılmak suretiyle büyütülmüştür. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de saklanmışlardır.

2.5.3. Plazmit DNA'sının Saflaştırılması:

Yukarıdaki yöntemlerle izole edilen plazmit DNA örnekleri Lityum klorür ile muamele edilerek (Sambrook *et al.*, 1989) RNA ve ssDNA'lar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, yüksek düzeyde saflaştırma bir Circle Prep Kit (Bio 101, Inc., La Jolla, CA) kullanılarak sağlanmıştır.

2.5.4. Kromozomal DNA'nın Hazırlanması:

Pseudomonas sp 19S'in kromozomal DNA'sı modifiye edilmiş bir alkaline lysis yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Sambrook *et al.*, 1989). Hücreler lize edildikten sonra 5M NaClO₄ ilave edilmiş, ve DNA ekstrasyonu 1vol. kloroform:izoamilalkol (24:1, v/v) ile yapılmıştır. Faz ayrımından sonra su fazı ayrılmış ve etanol eklendikten sonra ara fazda beliren DNA iplikçikleri bir cam çubuk yardımı ile toplanmıştır. TE tamponda çözülen DNA örnekleri sezyum klorür-Etidyum bromür Gradient Santrifüj ile temizlenmiştir (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.5. Restirksiyon Enzimleri İle Kesim:

Deneylerde Bam HI, Eco RI, Eco V, Pst I ve Sst I restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. DNA örnekleri, üretici firmanın önerdiği şekilde 1 mg DNA için 1 U enzim kullanılmak suretiyle kesilmişler ve %0.8'lik agaroz jelde elektroforez yöntemi ile gözlenmişlerdir.

2.5.6.DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Nükleik asit konsantrasyonu ve saflık derecesi 260 nm ve 280 nm’de aborbanslar ölçülerek Sambrook *et al.*,(1989)’a göre tahmin edilmiştir.

2.5.7.DNA Fragmanların Agaroz Jelden İzolasyonu:

Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA fragmanları % 1’lik “low melting” agaroz jelde elektroforez ile ayırımından sonra Gene Clean Kit (Bio 101, Inc., La Jolla, CA) kullanılarak izole edilmiş ve temizlenmişlerdir.

2.6.Kompetan *E.coli* Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyon

Kompetan *E.coli* hücrelerinin hazırlanması ve transformasyon Chung *et al.*, (1989)’a göre yapılmıştır.

2.7.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2.7.1.PCR İçin Primerlerin Hazırlanması:

PCR için primerler, *deh cI*, *deh cII*, ve *Had L* enzimlerinin amino asit dizileri (Schneider *et al.*,1991; Jones *et al.*,1992) dikkate alınarak tasarlanmışlardır (Şekil 5). Bu oligonükleotidler National Biosciences (Hamel, MN, USA) tarafından sentezlenmişlerdir.

2.7.2.PCR:

Toplam 100 µl’lik PCR karışımı, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM deoksiniükleotid trifosfatın her birisi (dNTP), 1 mM primer (A ve B) ve 500 ng kalıp DNA’dan oluşmuştur. Reaksiyon 0.5 µl 2U Ampli Taq DNA polimerase (Perkin-Elmer Cetus) ilave edilerek başlatılmıştır. PCR amplifikasyonu, her bir döngü 94°C’de 1 dak. denatürasyon, 50°C’de 1 dak. primer bağlanması ve 72°C’de 1 dak. polimerizasyon olmak üzere 30 defa tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünü, jel elektroforez ile bir 123 bp’lik “ladder DNA” moleküler marker olarak kullanılarak analiz edilmiş, ve 1.4 kb’lik bir fragman olarak bulunmuştur. Bu fragmanın uçları doldurulduktan sonra pBluescript SK(+) vektöre Eco V bölgesinde bağlanmıştır. Rekombinant plazmitler *E.coli* JM101 suşunda çoğaltılmışlardır.

WRQRQ L E Y S W TRTLMG (40-55)
 leu glu tyr ser trp
 Primer A 5' CTX GAA TAT ACX TGG 3'
 T G C TG
 ser asn ala trp
 Primer B 3' AGX TTA CGT ACC CT 5'
 TC G A
 C
 G
 FVSSN S N A W D ..GA..FGF(173-189)
 X: Inosine

Şekil 5. PCR da kullanılan primerler.

2.8.Klonlama Stratejileri

2.8.1."Shut-gun" Klonlama:

Pseudomonas sp 19S'in 10 µl (5µg) kromozomal DNA'sı Eco RI ve Pst I restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesildikten sonra, her birisi pBluescript SK⁽⁺⁾ fazmite aynı restriksiyon bölgesinde bağlanmışlardır. Rekombinant moleküller *E.coli* JM101 kompetan hücrelerine transformasyonla aktarılmışlar ve transformantlar IPTG, X-Gal ve Amp içeren LB-agar ortamında seçilmişlerdir. Seçilen beyaz koloniler dehalogenaz enzim aktivitesi için test edilmişlerdir.

2.8.2.PCR İle Klonlama:

2.8.2.1.DNA Problar ve Radyoaktif Olmayan Markalama

Souther Blot Hibridizasyon'da kullanılan 3 DNA probu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

1.Prob, *deh cI* geni olup, pUKS 202 plazmitinden, Sma I ve Sst I restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra Gene Clean Kit kullanılarak izole edilmiştir.

2. Prob, *deh cII* geni olup, pUKS 107 plazmitinden Bam HI restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra Gene Clean Kit kullanılarak elde edilmiştir.

3.Prob, 1.4 kb'lik PCR ampikon olup, klonlandığı pBluescript rekombinant plazmitinden Eco V restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra yine Gene Clean Kit kullanılarak izole edilmiştir.

Her 3 DNA prob Bio Nick Labelling System (GIBCO, BRL) kullanılarak biotin ile markalanmışlardır.

2.8.2.2."Southern Blot " Hibridizasyon

Agaroz jelden DNA fragmanları Zeta Porb membrana, kapiler transfer yöntemi ile aktarılmışlardır (Bio-Rad Laboratories Protocol, Richmond, CA). Hibridizasyon ve yıkamalar da Zeta Prob Blotting Membranes Instruction Manual'a göre yapılmıştır. Biotin ile markalanmış problar hibridizasyondan sonra Biotin Detection Kit (GIBCO, BRL) kullanılarak immünolojik olarak, enzimatik renk reaksiyonu ile X-phosphate ve NBT kullanılarak gözlenmişlerdir.

2.9.Klonlama Stratejisi

Pseudomonas sp 19S'in kromozomal DNA'sı Bam HI ile kesildikten sonra Hind III ile kesilmiş λ DNA'sı ile birlikte %0.65'lik agaroz jelde yürütüldü. Biotin ile markalanmış PCR fragman prob olarak kullanıldığında, membran blotta hibridizasyondan sonra 5.5 kb pozisyonunda tek bir bant gözlemlendi. Daha sonra 5-6

kb'lik BamH I fragmentleri jelden izole edildi ve pUC 18 plazmite BamH I bölgesinde bağlandı. Rekombinant moleküller kompetan *E.coli* MV 1190 hücrelerine transfer edildiler, ve rekombinant moleküller X-gal , IPTG ve ampisilin içeren LB agar ortamında seçildiler.

Pozitif koloniler, 2-CPA + pürivat içeren minimal ortamın bulunduğu "micro titer plate" kuyucuklarına aşılandılar. 37°C'de inkübasyondan sonra klor çıkışı AgNO₃ ilavesi ile saptandı. Rekombinant olması muhtemel kolonilerin daha sonra, dehalogenaz enzim aktivitesi test edildi.

2.10. Dehalogenaz Aktivite Testi

2.10.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması:

Logaritmik fazda gelişen bakteri hücreleri 6,000 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek çöktürüldü ve pelet 10 mM Tris/SO₄; 30 mM (NH₄)₂SO₄, pH 7.8 içerisinde çözüldü. Hücreler aynı tampon içerisinde iki defa yıkandıktan sonra 1 mg/ml lizozim içeren az bir miktar tampon içerisinde çözülüp oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Hücreler tamamen lize olduktan sonra 13,000 rpm'de , 4°C'de santrifüj edildiler. Süpernatant enzim kaynağı olarak -20°C'de saklandı.

2.10.2. Dehalogenaz Aktivite Tayini:

Dehalogenaz aktivite tayini halojenli alkanolik asitlerden (MCA yada 2-CPA) halojen iyonlarının çıkışını saptama esasına dayanmaktadır. Bu testler için enzim kaynağı olarak hücre lizatları kullanılmıştır. Serbest halojen iyon çıkışı Iwasaki *et al.*, (1956)'un önerdiği şekilde yapılmıştır.

3. SONUÇLAR

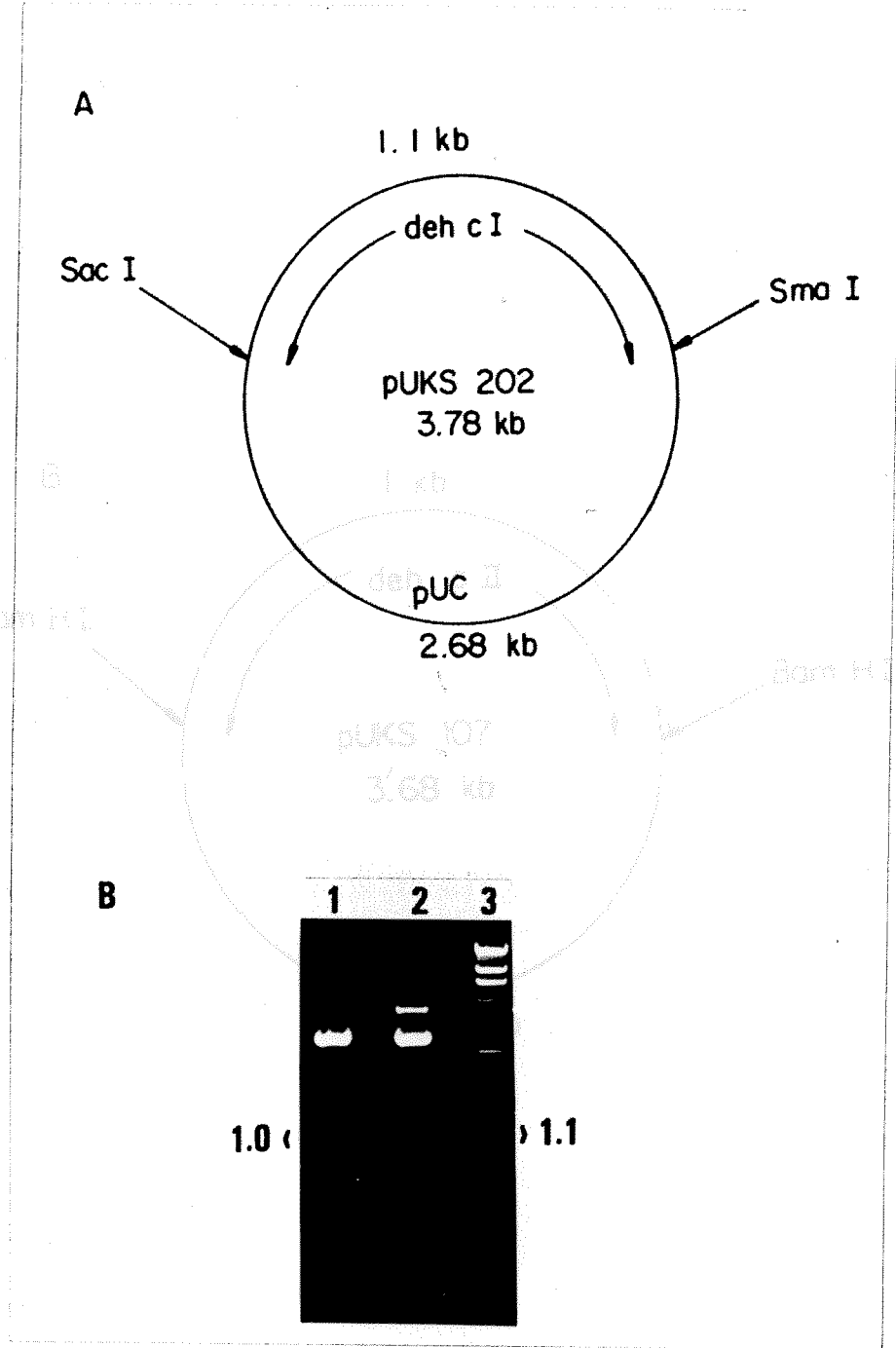
3.1. Probların Hazırlanması

Prob I olarak adlandırılan klonlanmış *deh cI* geni (~1.1 kb), pUKS 202 plazmitini Sma I ve Sst I enzimleri ile keserek elde edilmiştir (Şekil 6 A ve B).

ProbII olarak adlandırılan klonlanmış *deh cII* geni (~1.0 kb), pUKS 107 plazmitini BamH I restriksiyon enzimi ile kesmek suretiyle elde edilmiştir. (Şekil 6 B ve Şekil 7)

ProbIII olarak adlandırılan PCR amplikon ise rekombinant pBlu.Amp 19S plazmitini Eco V enzimi ile kesmek suretiyle elde edilmiştir. (Şekil 8)

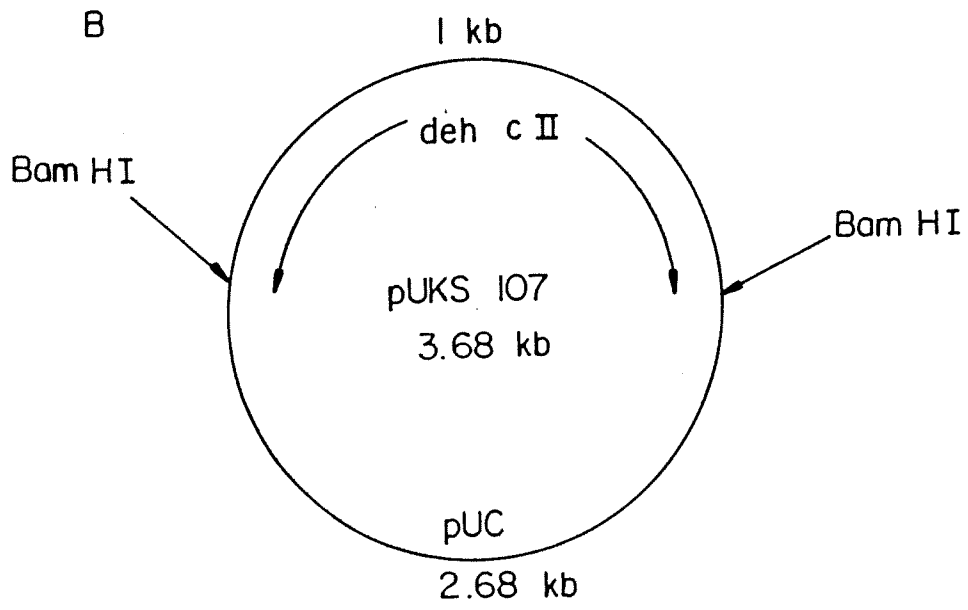
Söz konusu fragmentler jelden izole edildikten sonra markalanmadan önce agaroz jelde tek bant olarak gözlenmişlerdir.



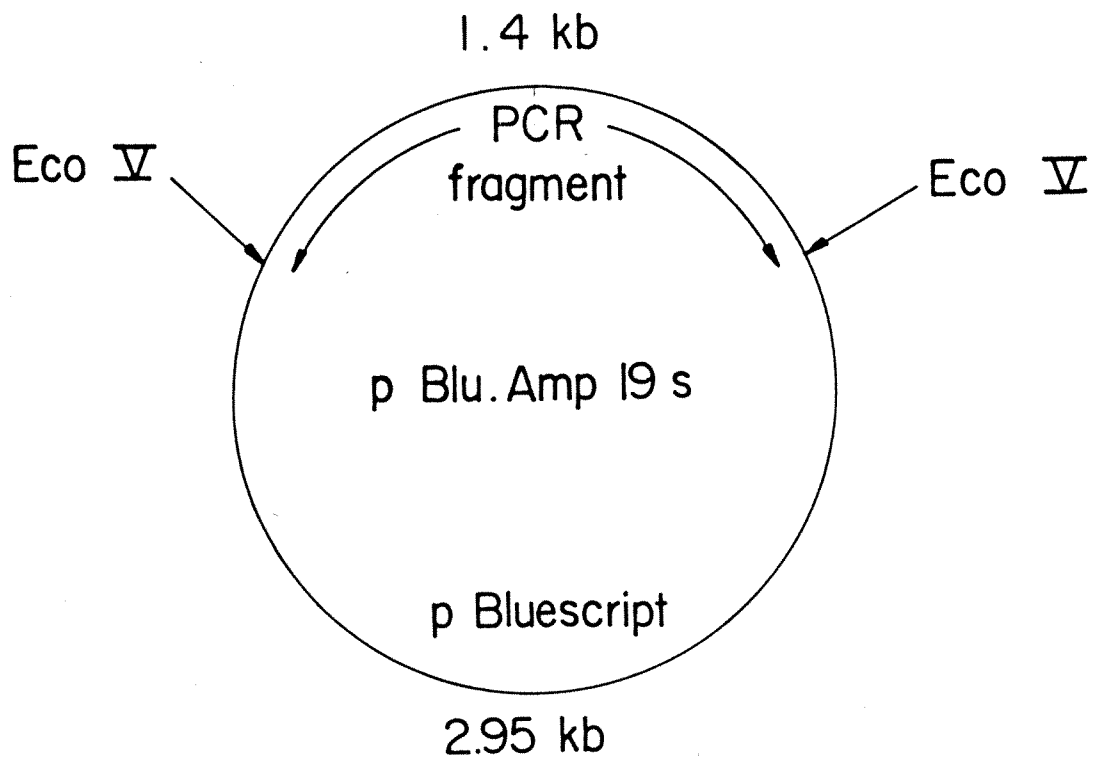
Şekil 6. Prob I ve prob II'nin hazırlanması. A. pUKS 202 plazmitinin yapısal haritası, B. Sıra 1, Bam HI ile kesilmiş pUKS 107; Sıra 2, Sma I ve Sst I ile kesilmiş pUKS 202; Sıra 3, Hind III ile kesilmiş λ DNA.

2-

Şekil 7. pUKS 107'nin yapısal haritası



Şekil 7. pUKS 107 'nin yapısal haritası.



Şekil 8. PCR fragmanı içeren pBlu Amp 19S'in yapısal haitası.

3.2.PCR Amplifikasyonu

Materyal ve metod 2.7.2.'de açıklanan koşullarda PCR amplifikasyonu kontaminasyon olmadan 1.4 kb'lik tek bir amplikon üretmiştir (Şekil 9). Bu nedenle söz konusu koşullarda PCR amplifikasyonu spesifiktir. Kalıp DNA konsantrasyonu 500 ng'dan daha az olduğu zaman amplifikasyon mümkün olmamıştır.

3.3.Shut-Gun Klonlama

3.3.1. *Pseudomonas* sp 19S Gen Bankasının Hazırlanması

Pseudomonas sp 19S kromozomal DNA'sı EcoR I ve Pst I ile ayrı ayrı kesilmişlerdir. ~20 kb'lik DNA fragmanları 1.2 U'lik enzimler kullanıldığında elde edilmiş ve bu fragmanlar pBluescript SK(+) vektöre yine aynı enzim bölgelerinde bağlanmışlardır. Böylece Lac Z' markeri inaktive edilmiştir. Oluşturulan rekombinant moleküller *E.coli* JM101 suşuna transfer edilmişlerdir.

3.3.2.Gen Bankalarının Taranması

Transformasyondan sonra *E.coli* JM101 hücreleri (selektif ortamda beyaz olan koloniler) MCA ve maya özütü içeren minimal ortama aktarılmışlardır. Eğer dehalogenaz geni eksprese oluyorsa MCA'yı tek karbon kaynağı olarak kullanmaları beklenmiştir.

Kültürler 1 ml'lik minimal ortamda geliştirildikten sonra klor çıkışı Materyal- Metod'da açıklandığı şekilde AgNO₃ ile test edilmiştir. Bunun için yaklaşık 200 transformant tarandığı halde hiçbirisi MCA dehalogenasyonu belirtisi göstermemiştir. Bunun nedeni tek bir pozitif klon bulabilmek için (% 99 olasılıkla) en az 1000 transformanın taranmasının gerekli olmasıdır (Clarke and Carbon, 1976), ki bu izlenen yöntem dikkate alındığında pratik değildir. Bu nedenle klonlama stratejisi değiştirilmiş ve PCR yöntemi kullanılmıştır.

3.4."Southern" Hibridizasyon

BamH I ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sının Southern Blot analizinde biotin ile markalanmış Prob I , Prob II ve Prob III kullanılmışlardır.

Her bir prob ile hibridizasyon 25°C ile 68°C arasında değişen çeşitli sıcaklıklarda yapılmıştır. BamH I fragmanlar tek bir sinyali ~5.5 kb'lik bir pozisyonda yalnız Prob III ile vermişlerdir. Gerek hibridizasyon, gerekse yıkamalar için en az seçici koşullarda bile Prob I ve Prob II hibridize olmamışlardır.

EcoR I, Pst I ve Sma I ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sı Prob I ve Prob II ile hibridize olmamıştır (Şekil 10). Aynı şekilde *deh cI* ve *deh cII* genleri arasında homoloji görülmemiştir. Fakat, PCR amplikon (Prob III) prob olarak kullanıldığında BamH I fragmanları ile hibridize olmuş, ve ~5.5 kb'lik bir pozisyonda tek bir hibridizasyon sinyali oluşturmuştur.

Aynı şekilde Prob III, Şekil 8'de de görüldüğü gibi BamH I ve Sma I ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sı ile, sırasıyla 5.5 kb ve 2.3 kb'lik pozisyonlarda sinyal oluşturmuşlardır (Şekil 11). Fazla miktarda Prob II kullanıldığında Pst I ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sı ile hibridize olmamış ancak Prob I ve Prob II arasında kros hibridizasyon gözlenmiştir.

Fazla miktarda Prob I kullanıldığında ise BamH I ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sı ile yine hibridize olmamıştır (Şekil 12). Fazla miktarda Prob III pUKS 107 DNA'sı (Prob II'yi taşımaktadır) ile sinyal vermemiştir.

3.5. *Pseudomonas* sp 19S Dehalogenaz Geninin Klonlanması

5-6 kb büyüklüğünde *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sının BamH I fragmenleri jelden izole edilmiş (Şekil 13) ve pUC 18 plazmite BamH I bölgesinde bağlanmıştır. Böylece oluşturulan plazmit molekülleri *E.coli* MV1190 hücrelerine transfer edilmiştir. Selektif LB ortamından yaklaşık 200 beyaz koloni toplanmış ve MCA yada 2-CPA içeren minimal ortamda gelişmeleri, "micro titer plate" ler kullanılarak Materyel ve Metod'da açıklandığı şekilde test edilmiştir. İkinci testten sonra seçilen 10 pozitif klonda önce plazmit analizi, daha sonra da hücre lizatlarında dehalogenaz aktivite testi spektrofotometrik olarak yapılmıştır. *E.coli* pUC 18.5 SB olarak adlandırılan bir klon 2-CPA ve MCA'den klor çıkışı katalize etme özelliğine sahip olup 5.5 kb'lik bir fragmenti üzerinde taşıyan bir rekombinant pUC 18 plazmitine sahiptir (Şekil 14).

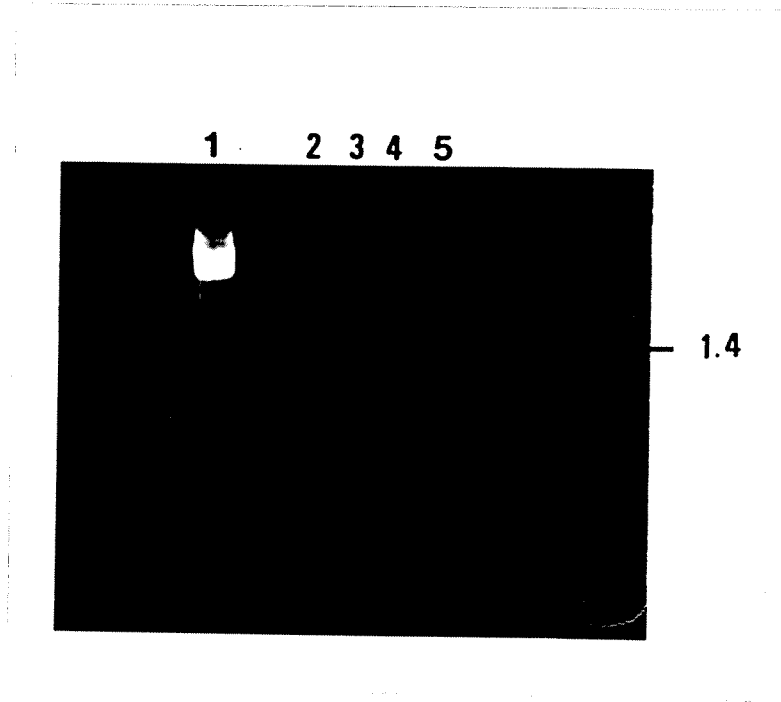
3.6. Klonlanmış Dehalogenaz geninin Karakterizasyonu

E.coli pUC 18.5 SB'den hazırlanan hücre lizatları MCA'yi indüklenmiş *Pseudomonas* sp 19S'le aynı oranda dehalojenasyon özelliğine sahiptir (Tablo 1).

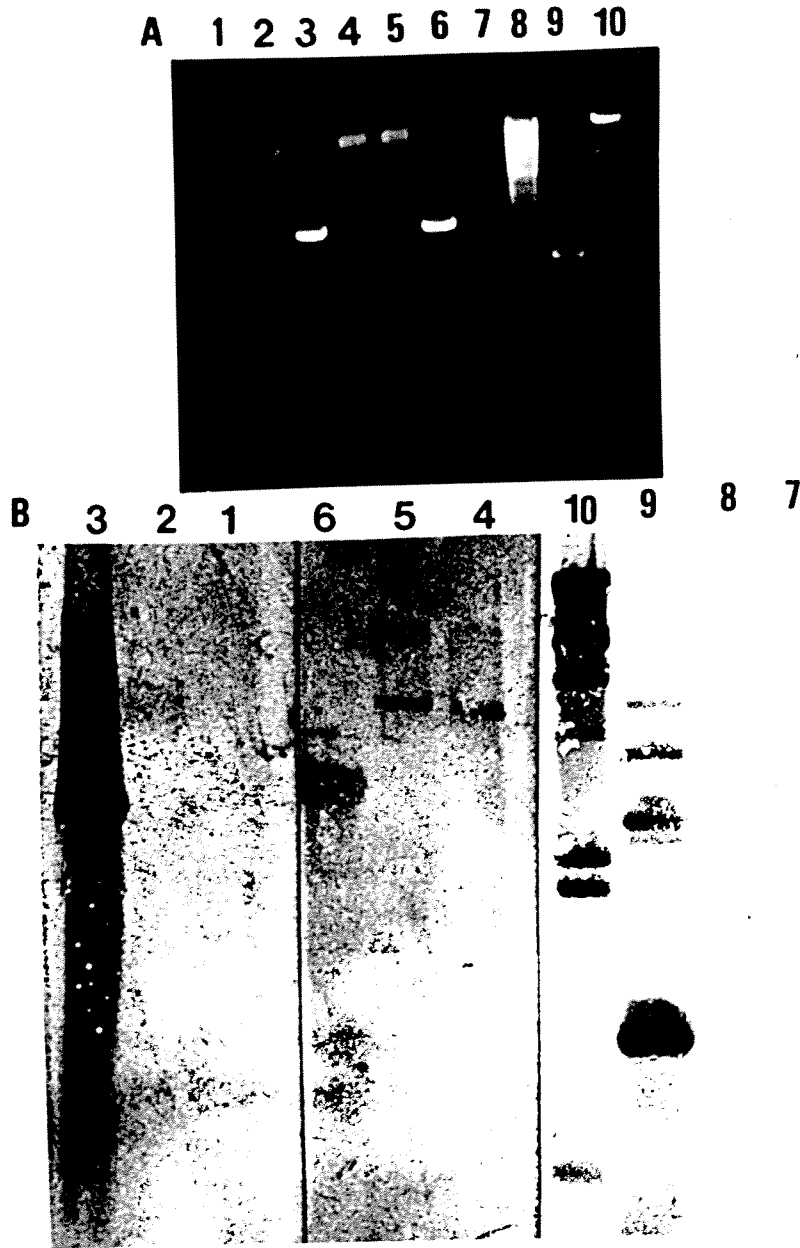
Rekombinant plazmit *E.coli* JM 101'a aktarıldığında ve klonlanan DNA fragmanının büyüklüğü ~2 kb'ye indirildiğinde de benzer aktivite gözlenmiştir.

E.coli pUC 18.5 SB'de dehalogenaz ekspresyonu konstitütiftir. Hücreler MCA bulunduğunda ve bulunmadığında geliştirildiklerinde lizatlarında önemli ölçüde dehalogenaz aktivitesi saptanmıştır.

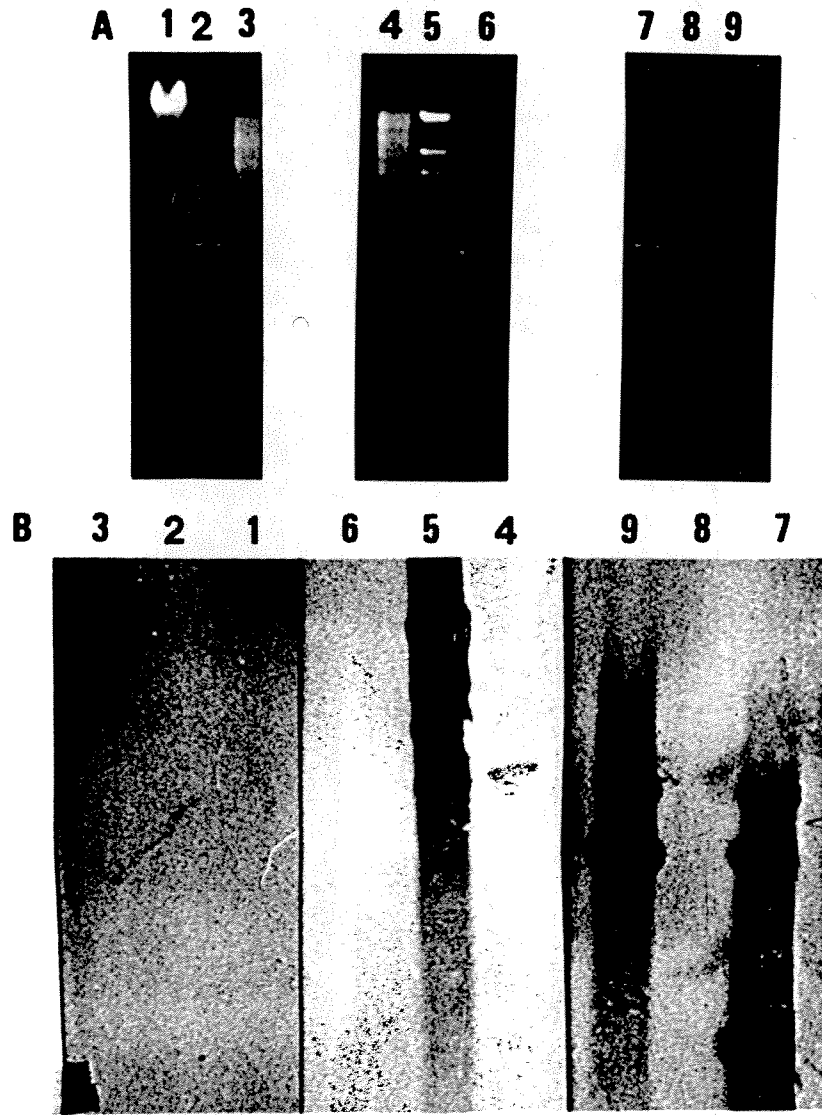
TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ



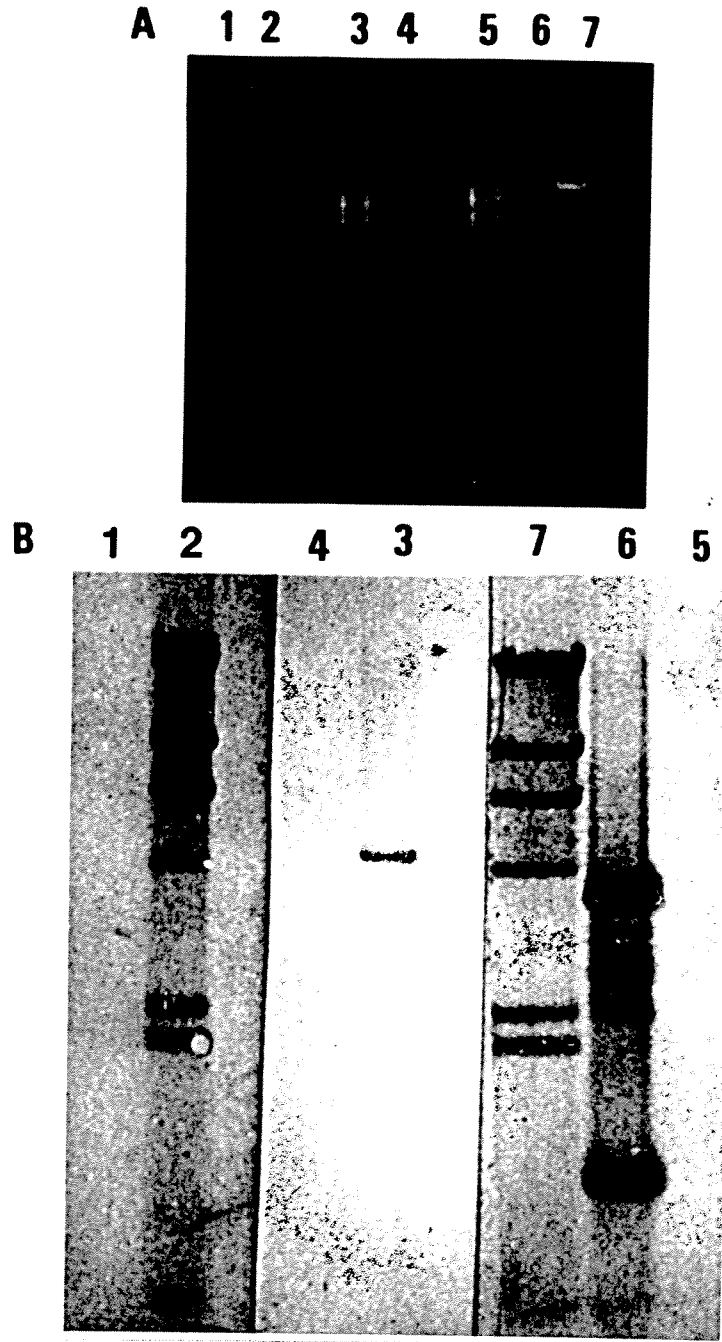
Şekil 9. *Pseudomonas* sp 19S'in haloasit dehalogenaz geninin PCR amplifikasyonu. Sıra 1, 123 bp ladder marker; Sıra 2, 10ng kalıp DNA ile reaksiyon ürünü; Sıra 3, 20ng kalıp DNA ile reaksiyon ürünü; Sıra 4, 50ng kalıp DNA ile reaksiyon ürünü; Sıra 5, 500ng kalıp DNA ile reaksiyon ürünü.



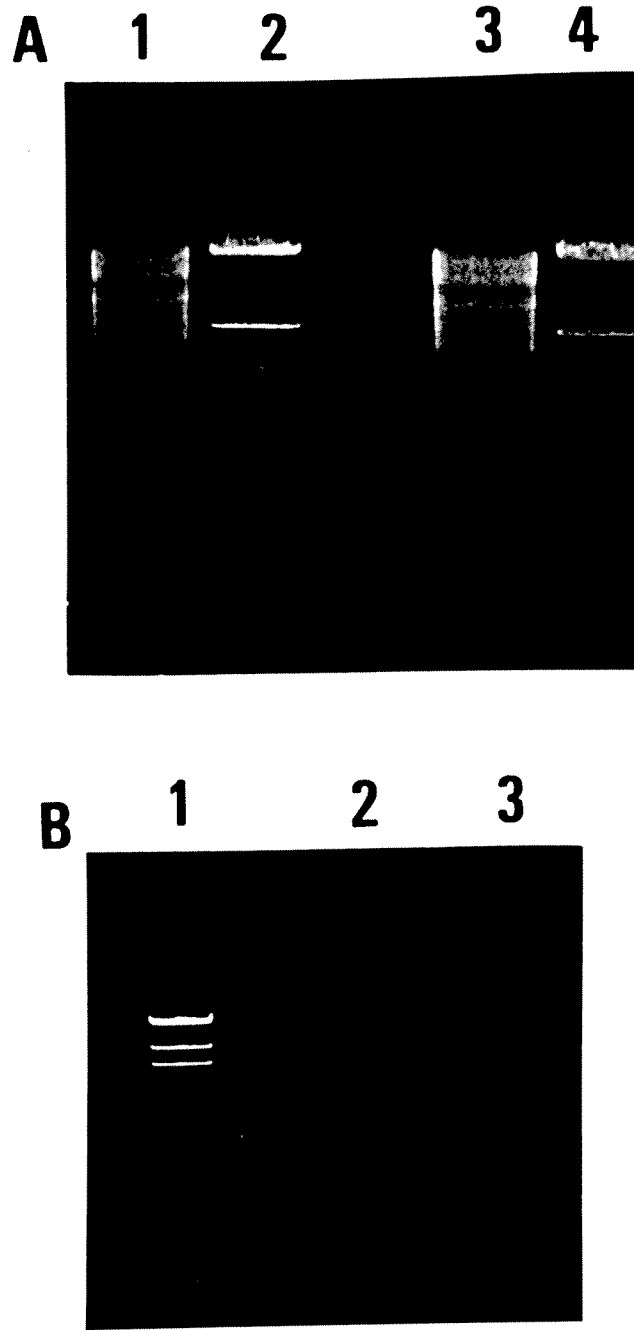
Şekil 10. *Pseudomonas* sp 19S kromozomal DNA'sında haloasit dehalogenaz geninin pozisyonunu Southern Blot analizi ile saptanması. Panel A ve B: Eco RI ile kesilmiş total DNA (Sıra 1 ve 2) ve Sma I ile kesilmiş pUKS 202 (Sıra 3) prob I ile hibridize edilmiştir; Sma I ile kesilmiş total DNA (Sıra 4 ve 5) ve pUKS 202 (Sıra 6) prob III ile hibridize edilmiştir; Pst I (Sıra 7) ve Sma I (Sıra 8) ile kesilmiş total DNA, ve Bam HI (Sıra 9) ile kesilmiş pUKS 107 prob II ile hibridize edilmiştir; Sıra 10, Hind III ile kesilmiş λ DNA.



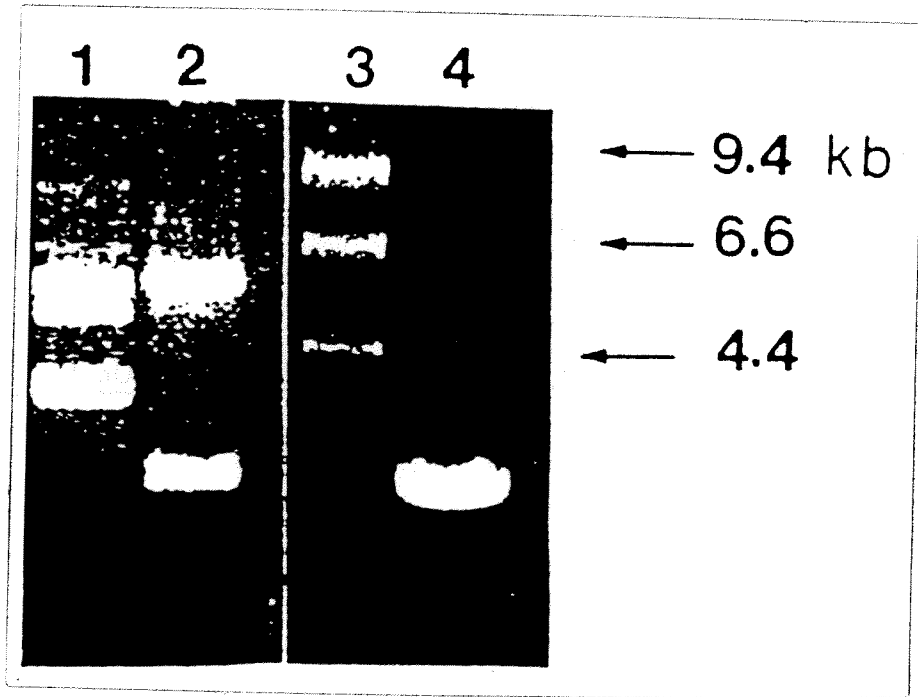
Şekil 11. *Pseudomonas* sp 19S kromozomal DNA'sının prob I, prob II ve prob III kullanılarak Southern Blot ile analizi. Panel A (jel) ve B (membran):Eco RI (Sıra 1), Sma I (Sıra 3) ve Bam HI (Sıra 2 ve 6) ile kesilmiş pUKS 107 prob III ile hibridize edilmiştir; Pst I (Sıra 8) ile kesilmiş total DNA, ve Bam HI ile kesilmiş pUKS 107 ve pUKS 202 prob II ile hibridize edilmiştir. Sıra 5, Hind III ile kesilmiş λ DNA.



Şekil 12. *Pseudomonas* sp 19S kromozomal DNA'sının Southern Blot ile analizi. Panel A (jel) ve B (membran): Bam HI ile kesilmiş *Pseudomonas* sp 19S total DNA'sı (Sıra 2, 3 ve 5) sırası ile prob II, prob III ve prob I ile hibridize edilmişlerdir; pUKS 107 (Sıra 4) ve pUKS 202 (Sıra 6) sırası ile fazla miktarda prob III ve prob I ile hibridize edilmiştir. Sıra 1 ve 7, Hind III ile kesilmiş λ DNA.



Şekil 13. 5-6 kb büyüklüğündeki Bam HI fragmentlerinin agaroz jelden izolasyonu. Panel A, Sıra 1 ve 3 Bam HI ile kesilmiş kromozomal DNA, Sıra 2 ve 4 Hind III ile kesilmiş λ DNA, Panel B, Sıra 1 Hind III ile kesilmiş λ DNA, Sıra 2 ve 3 Jelden izole edilmiş 5-6 kb büyüklüğündeki Bam HI fragmanlar.



Şekil 14. *Pseudomonas* sp 19S dehalogenaz geninin pUC 18S vektöre klonlanması. pUC 18.5 SB, 5.5 kb'lik klonlanmış fragmenti (dehalogenaz geni) taşıyan rekombinant plazmittir. Sıra 1, kesilmemiş pUC 18.5 SB; Sıra 2, Bam HI ile kesilmiş pUC 18.5 SB; Sıra 3, Hind III ile kesilmiş λ DNA; Sıra 4, Bam HI ile kesilmiş pUC 18.

E.coli pUC 18.5 SB plazmit, 1.4 kb'lik PCR amplikon prob olarak kullanılarak Southern Bloth hibridizasyonla analiz edildiğinde homolog fragment taşıdığı görülmüştür (Şekil 15).

Tablo 1. Hücre lizatlarının MCA dehalogenasyonu.(1) Hücreler MCA içeren minimal ortamlarda geliştirilmiştir. (2) Hücreler glukoz içeren minimal ortamlarda geliştirilmiştir.

SUŞLAR	Dehalogenasyon $\Delta A_{460} \cdot \text{min}^{-1}$	
	+ MCA ¹	- MCA ²
<i>Pseudomonas</i> 19 S	0.8×10^{-2}	—
<i>E. coli</i> pUC 18.5SB	1.2×10^{-2}	1.0×10^{-2}



Şekil 15. Dehalogenaz geninin (*deh* 5. SB) pUC 18.5 SB plazmitte gözlenmesi. DNA hibridizasyonunda biotin ile markalanmış 1.4 kb'lik PCR amplikon prob olarak kullanılmıştır. Sıra 1, kesilmemiş pUC 18.5 SB; Sıra 2, pUC 18.5 SB'den izole edilen 5.5 kb'lik fragment (*deh* 5. SB); Sıra 3, Hind III ile kesilmiş λ DNA.

4.TARTIŞMA

Bugüne dek birçok haloalkanoik asit dehalogenaz enziminin bulunmuş ve karakterize edilmiş olmasına karşın sadece 7 tanesini kodlayan gen klonlanmış ve nükleotid dizileri saptanmıştır. Bunlardan 5 tanesi: *deh cI* ve *deh cII* (Schneider *et al.*, 1991), *dhl B* (Van der Ploeg *et al.*, 1991), *had L* (Barth *et al.*, 1992), ve *deh H* 109 (Kawasaki *et al.*, 1994), L-stereospesifik 2- haloasit dehalogenazları kodlamaktadırlar. Bu 5 dehalogenazın her ne kadar substrat spesifisiteleri farklı olsa bile evölüsyon açısından birbirleri ile ilişkili olma olasılığı yüksektir (Kawasaki *et al.*, 1992). Amino asit düzeyinde özellikle üç bölgede son derece korunmuş motifler yer almaktadır (Şekil 2). Bu çalışmada bu korunmuş bölgelerden ikisi dikkate alınarak hazırlanan prob lar kullanılmak suretiyle PCR ile *Pseudomonas* sp 19S'in dehalogenaz geninin 1.4 kb'lik kısmı amplifiye edilmiştir. Bu amplikon, klonlama stratejimizde prob olarak kullanılarak, sekizinci dehalogenaz geni başarı ile klonlanmış ve *E.coli*'de ekspres edilmiştir. Klonlanmış *deh cI* ve *deh cII* genlerinin prob olarak başarısız olmaları ilginçtir. Bu durum, dehalogenazlarda DNA düzeyinden ziyade, amino asit düzeyinde yüksek oranda homoloji olduğunun bir göstergesidir.

Klonlanan dehalogenaz geninin *E.coli*'de konstitütif olarak üretimi, indüklemekten sorumlu kontrol bölgesinin klonda (pUC 18.5 SB) eksik olması dolayısıyla olabilir. Benzer gözlem, Schneider *et al.*, (1991)'un *deh cI* ve *deh cII* genlerini *E.coli*'de klonlama ve ekspres etmeleri sırasında da yapılmıştır.

Hibridizasyon çalışmalarında radyoaktif olmayan problemlerin kullanılmış olması bir çok avantaj sağlamıştır. Herşeyden önce radyoaktif yöntemle karşılaştırıldığında daha emin ve tehlikesizdir. Ayrıca markalanmış nükleotidin ömrü radyoaktif markerlere göre çok daha uzundur. Enzimatik yöntemle sinyallerin gözlenmesi, otoradyografiye göre çok daha kısa bir sürede gerçekleştirilmektedir.

Bir sonraki aşamada klonlanan genin nükleik asit dizilerinin saptanması çalışmalarına başlanacaktır. Böylece *Pseudomonas* sp 19S dehalogenaz geninin, diğerleri ile ne ölçüde benzerlik gösterdiği ve hangi kategoride sınıflandırılabileceği hususları açıklık kazanacaktır.

5.KAYNAKLAR:

- Allison, L., *et al.*, 1983. The dehalogenases of a 2,2-dichloropropionate degradin bacterium. *J.Gen.Microbial.* 129:1283-1293.
- Barth *et al.* 1992. Cloning and partial sequencing analysis of an operon encoding two *Pseudomonas putida* haloalkanoate dehalogenases of opposite stereospecificity. *J.Bacteriol.* 174:2612-2619.
- Burton, M.L., and Crawford, R.L., 1988. Novel biotransformations of 4-chlorobiophenyl by *Pseudomonas* sp. *Appl.Environ.Microbiol.* 54:594-595.
- Chung, C.T., *et al.*, 1989. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 86:2172-2175.
- Clarke, L., and Carbon, J., 1976. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E.coli* genom. *Cell*, 9:9.
- Dahod and Mangand, 1986. Carbon tetrachloride provided stereoselective hydrolysis of methyl-2-chloropropionate by lipase. *Biotech.Bioeng.* 30:995.
- Foy, C.C., 1975. The chlorinated aliphatic acids in herbicides. *Chemistry, Degradation and Mode of Action.* 1:339.
- Franken, S.H., *et al.*, 1991. Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *Embo Journal* 10:1297-1302.
- Goldman, F., *et al.*, 1968. Carbon-halogen bond cleavage. III. Studies on bacterial halohydrolases. *J.Biol.Chem.* 243:428-434.
- Hardman, D.J., 1991. Biotransformation of halogenated compounds. *Crit.Rex.Biotechnol.* 11(1):1-40.
- Hardman, D.J., and Slater, J.H., 1981. Dehalogenases in soil bacteria. *J.Gen.Microbial.* 123:117-128.
- Hardman, D.J., *et al.*, 1986. Plasmids from soil bacteria enriched on halogenated alcanoic acids. *Appl.Environ.Microbiol.* 31:44-51.
- Iwasaki, I., *et al.*, 1956. A new spectrophotometric method for the determination of small amounts of chloride using the mercuric thiocyanate method. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* 29:860-864.
- Janssen, D.B., *et al.*, 1985. Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl.Environ.Microbiol.* 49:673-677.

Janssen, D.E., *et al.*, 1989. Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and expression and sequencing of *dhl A* gene. *J.Bacteriol.* 171:6791-6799.

Jensen, H.L., 1960. Decomposition of chloroacetates and chloropropionates by bacteria. *Acta.Agric.Scand.* 10:83.

Jones,D.H.A., *et al.*, 1992. Nucleotide sequence of the structural gene encoding a 2-haloalkanoic acid dehalogenase of *Pseudomonas putida* strain AJ1 and purification of the encoded protein. *J.Gen.Microbiol.* 138:675-683.

Kawasaki, H., *et al.*, 1994. Cloning and sequence analysis of a plasmid encoded 2-haloacid dehalogenase gene from *Pseudomonas putida* No.109. *Biosci.Biotech.Biochem.* 58:160-163.

Kawasaki,H., *et al.*, 1992. Lack of homology between two haloacetate dehalogenase gene encoded on a plasmid from *Moraxella* sp. strain B. *J.Gen.Microbiol.* 138:1317-1323.

Keuning, S., *et al.*, 1985. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J.Bacteriol.* 163:631-639.

Klages *et al.*, 1983. 2-Haloacid dehalogenase from a 4-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas* sp.CBS3. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.* 364:529-535.

Kocabiyık, S. and Türkoğlu, S. 1989. A thermostable dehalogenase in the extracts from *Pseudomonas* sp. strain 19S. *Biotech.Lett.* 11:397-400.

Little, M., and Williams, P.A.,1971. A bacterial halohydrolyase. *Europ.J.Biochem.* 21:99-109.

Malaveille, C.,*et al.*,1975. Mutagenicity of vinyl chloride, chloroethyleneoxide, chloroacetaldehyde and chloroethanol. *Biocem. Biophys. Res. Commun.* 63:363-369.

Motosugi, K. and Soda, K., 1983. Microbial degradation of synthetic organochlorine compounds. *Experimentia*, 34:1214-1220.

Müller and Weightman, 1995. *J.Gen.Microbiol.* Submitted.

Sambrook, J. *et al.*, 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Schneider, B., *et al.*, 1991. Complete nucleotide sequences and the comparison of the structural genes of two 2-haloalkanoic acid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. Strain CBS3. *J.Bacteriol.* 173:1530-1535.

St.John, W.D., and Sikes, D.J., 1988. Complex industrial waste sites. *Envir.Biotech.* Ommen, G.S., p.237.

Van der Ploeg *et al.*, 1991. Characterization of the haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and sequencing of the *dhl B* gene. *J.Bacteriol.* 173: 7925-7933.

Verschueren, K.H.G., *et al.*, 1993 a. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* 363:693-698.

Verschueren, K.H.G., *et al.*, 1993 b. Crystallographic and fluorescence studies of the interaction of haloalkane dehalogenase with halide ions. *Biochemistry* 32:9031-9037.

EK 1

Bakteri Kùltür Ortamlari

1.L-Broth

<u>İçindekiler</u>	<u>gm/l</u>
Yeast Extract (Oxoid)	5.0
Trypton (Oxoid)	10.0
NaCl (Merck)	10.0
pH 7.4	

2.Minimal Ortam

<u>İçindekiler</u>	<u>gm/l</u>
MgSO ₄ .H ₂ O	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
K ₂ HPO ₄	1.5
pH 7.0	

Sterilizasyon: 121°C'de 15 dak.

Minimal tuz solüsyonu,sterilizasyondan sonra %1 oranında eklenir.

EK 2

Tampon ve Reaktifler

Elektroforez tamponu:

Tris-Acetate (TAE) (50X Stok)

0.04 M Tris-acetate

0.02 M EDTA

20XSSC:

3 M NaCl

0.3 M Na-citrate

pH 7.0

BİBLİYOGRAFİK BİLGİ FORMU	
1- Proje No: TBAG 1198	2- Rapor Tarihi: 5.10.1995
3- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Eylül 1993-Eylül 1995	
4- Projenin Adı: <i>Pseudomonas</i> sp. 19S'den bir Haloasit Dehalogenaz Geninin Klonlanması	
5- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof.Dr. Semra Kocabıyık(Yürütücü), Buğraer Aslan (Yardımcı Araştırmacı)	
6- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Biyoloji Bölümü ODTÜ, 06531 Ankara	
7- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK ve TWAS	
8- Öz (Abstract): <p>"<i>Pseudomonas</i> sp. 19S' den bir haloasit dehalogenaz geninin klonlanması" adlı bu proje çerçevesinde, laboratuvarımızda izole edilen <i>Pseudomonas</i> sp. 19S suşunun termofilik bir dehalogenaz enzimini kodlayan genin <i>E.coli</i>'de klonlanması ve ekspresyonu çalışmaları yürütülmüştür. Dehalogenaz aktivitesine sahip mikroorganizmaların halojenli hidrokarbonların biyolojik yıkımından sorumlu oldukları ve böylece söz konusu çevre kirleticilerin yok edilmesinde etkin rol oynadıkları bilinmektedir. Bu çalışmada olduğu gibi genetik mühendisliği ile mikroorganizmaların yıkım kapasitelerinin artırılması mümkündür. Biyolojik yıkımdan sorumlu dehalogenaz geninin klonlanması ülkemizde çevre problemlerine moleküler biyoteknoloji yolu ile yaklaşımın ilk örneğidir. Bu dehalogenaz geni bu güne kadar klonlanmış dehalogenaz genlerinin sekizincisidir. Söz konusu genin nükleotid dizilerinin saptanması çalışmalarımız halen laboratuvarımızda devam etmektedir.</p>	
Anahtar Kelimeler: <i>Pseudomonas</i> sp. 19S, Dehalogenaz, Gen Klonlanması	
9- Proje ile ilgili Yayın/Tebliğlerle ilgili Bilgiler Ekte	
10- Bilim Dalı: Biyoloji 401 Doçentlik B. Dalı Kodu: Mol.Biol. 401.02 ISIC Kodu: Uzmanlık Alanı Kodu: 401.02.02	
11- Dağıtım (*): <input checked="" type="checkbox"/> Sınırlı <input type="checkbox"/> Sınırsız	
12- Raporun Gizlilik Durumu : <input type="checkbox"/> Gizli <input checked="" type="checkbox"/> Gizli Değil	

(*) Projenizin Sonuç Raporunun ulaştırılmasını istediğiniz kurum ve kuruluşları ayrıca belirtiniz

Proje Kapsamında Yapılan Yayınlar yada Sunulan Bildiriler

Makale:

S.Kocabıyık, B. Aslan, R. Müller, 1995. Cloning and Expression of a Haloacid Dehalogenase from Pseudomonas sp.19S. Biodegradation. 6(3) : 217-222.

Tebliğler:

1. S Kocabıyık, B. Aslan, R. Müller, 1994. Cloning and Expression of a Haloacid Dehalogenase Gene from Pseudomonas sp. Strain 19 S. IUMS Cogresses '94: 7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division. July 3-8, 1994, Praque, Czech Republic. Abstract Book p. 209.

2. S. Kocabıyık, B. Aslan, 1994. Cloning of a Dehalogenase Gene from Pseudomonas sp.19S in E. coli. 12th National Congress of Biochemistry. April 13-16, 1994, İstanbul, Turkey. Abstract Book B-52.