

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN (*Olea europaea* L.) BİTKİSİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN KLONLANMASI

MUNİSE YURTSEVER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. ŞENAY VURAL KORKUT

İSTANBUL, 2011

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) BİTKİSİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ
ENZİMİNİ KODLAYAN GENİN KLONLANMASI**

Munise YURTSEVER tarafından hazırlanan tez çalışması 14.11.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ayten YAZGAN KARATAŞ

İstanbul Teknik Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Yıldız Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2010-01-07 YL03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Çalışma konusunun ve araştırma yöntemlerinin belirlenmesinde, deneyleri yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi sırasında bilgi ve birikimlerinden faydalandığım Tez Danışmanım Yard. Doç. Dr. Şenay Vural Korkut'a desteği ve yönlendirici yardımları için içtenlikle teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, yardım ve desteklerini esirgemeyen Beste TACAL'a ve tüm diğer çalışma arkadaşlarıma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca desteklerini eksik etmeyen ailem ve dostlarıma,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2011

Munise YURTSEVER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.1.1 Karbonik Anhidrazlar	1
1.1.2 Enzimatik Mekanizma	3
1.1.3 Karbonik Anhidraz Gen Aileleri	4
1.1.3.1 α Karbonik Anhidraz Gen Ailesi	5
1.1.3.2 β Karbonik Anhidraz Gen Ailesi	8
1.1.3.3 γ Karbonik Anhidraz Gen Ailesi	11
1.1.3.4 δ Karbonik Anhidraz Gen Ailesi	12
1.1.3.5 ζ Karbonik Anhidraz Gen Ailesi	12
1.1.4 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Rollerini	12
1.1.4.1 CCM Mekanizmalarında CA'ların Rolü	13
1.1.4.2 Siyanobakteriler ve Mikroalglerde CO ₂ Konsantrasyon Mekanizması.....	14
1.1.4.3 C ₄ Bitkilerinde CO ₂ Konsantrasyon Mekanizması.....	15
1.1.5 Çinkonun CA Aktivitesindeki Rolü	16
1.1.6 Karbonik Anhidraz ve Stres.....	17
1.1.7 CA'ların Biyoteknolojik Kullanım Alanları	18
1.1.7.1 CA'ın Biyosensör Olarak Kullanımı.....	18
1.1.7.2 CA'ın Karbondioksit Tutulumunda Kullanımı	18
1.1.8 Zeytin.....	19
1.1.8.1 Zeytinin Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Yayılış Alanları	19
1.1.9 Zeytin ve Stres.....	22

1.2	Tezin Amacı.....	23
1.3	Hipotez	23
BÖLÜM 2		
MATERYAL METOD.....		
		25
2.1	Bitki Materyali.....	25
2.2	Tamponlar ve Çözeltiler.....	25
2.3	Moleküler Markerlar	26
2.4	Enzimler	26
2.5	Kitler	27
2.6	Besi Yerleri	27
2.6.1	Luria Broth (LB)	27
2.6.2	SOB	28
2.7	Oligonükleotidler	28
2.8	Programlar	29
2.8.1	Chromas.....	29
2.8.2	Primer 3	29
2.8.3	Blast.....	29
2.8.4	EMBOSS Transeq.....	29
2.8.5	BioEdit	29
2.9	Bitki Büyütme Koşulları	29
2.10	Bitki Örneklerinin Alınması	30
2.11	RNA İzolasyonu	30
2.11.1	RNA İzolasyonu İçin Hazırlık	30
2.11.2	Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu	30
2.11.3	Total RNA Miktarının Belirlenmesi.....	31
2.12	RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi	31
2.12.1	Formaldehit Jeli Hazırlanması.....	31
2.12.2	Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması	31
2.12.3	Total RNA'dan mRNA İzolasyonu	31
2.12.4	mRNA Spot Testi	32
2.13	RT PCR.....	32
2.13.1	cDNA Sentezi.....	32
2.13.2	PCR Reaksiyonu.....	33
2.13.3	DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz.....	33
2.13.4	PCR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu	33
2.13.5	Vektör Ligasyonu.....	34
2.13.6	Kompetan Hücrelerin Hazırlanması	35
2.13.7	Transformasyon	36
2.13.7.1	Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması.....	36
2.13.7.2	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi	36
2.13.8	Plazmit İzolasyonu	36
2.14	3'RACE	37
2.14.1	cDNA Sentezi.....	37
2.14.2	PCR Reaksiyonu.....	37
2.14.3	DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi	38

2.14.4	PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Pürifikasyonu	38
2.14.5	Vektör Ligasyonu.....	38
2.14.6	Transformasyon	38
2.14.7	Plazmit İzolasyonu	38
2.15	Genomik DNA İzolasyonu	38
2.15.1	Genomik DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi	39
2.15.2	Genomik DNA'dan PCR.....	39
2.15.3	Genomik DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi	40
2.15.3.1	PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Pürifikasyonu	40
2.15.4	Vektör Ligasyonu.....	40
2.15.4.1	Transformasyon.....	40
2.15.4.2	Plazmit İzolasyonu	40
BÖLÜM 3		
SONUÇ VE ÖNERİLER		41
3.1	Sonuçlar	41
3.1.1	Bitki Örneklerinin Alınması	41
3.1.2	RNA İzolasyonu	41
3.1.3	Total RNA'dan mRNA İzolasyonu	42
3.1.4	RT PCR ile İlgili Sonuçlar	43
3.1.4.1	PCR Ürünlerinin Analizi	43
3.1.4.2	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu.....	44
3.1.4.3	Transformasyon.....	44
3.1.4.4	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi	45
3.1.4.5	Plazmit İzolasyonu	47
3.1.4.6	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	47
3.1.5	3'RACE ve Genomik DNA'dan PCR için Primerlerin Tasarlanması .	51
3.1.6	3'RACE ile İlgili Sonuçlar	53
3.1.6.1	3'RACE PCR Ürünlerinin Analizi	54
3.1.6.2	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu.....	55
3.1.6.3	Transformasyon.....	55
3.1.6.4	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi	56
3.1.6.5	Plazmit İzolasyonu	56
3.1.6.6	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri	57
3.1.7	Genomik DNA ile İlgili Sonuçlar	60
3.1.7.1	Genomik DNA İzolasyonu.....	60
3.1.8	Genomik DNA'dan PCR.....	60
3.1.9	PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu	61
3.1.10	Transformasyon	61
3.1.11	Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi.....	62
3.1.12	Plazmit İzolasyonu	63
3.1.13	Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri.....	64
3.2	Tartışma ve Öneriler	70
KAYNAKLAR.....		75

EK-A	
BLAST ANALİZİ SONUÇLARI	87
A-1 OCA BLASTN Analizi Sonuçları	87
A-2 OCA BLASTP Analizi Sonuçları	87
EK-B	
ONCAF1 DİZİN ANALİZİ VE BLAST SONUÇLARI	90
B-1 ONCAF1 BLASTN Analizi Sonuçları	90
B-2 ONCAF1 BLASTP Analizi Sonuçları	92
EK-C	
QKB4 BLAST SONUÇLARI	94
C-1 QKB4 BLASTN Analizi Sonuçları	94
C-2 QKB4 BLASTP Analizi Sonuçları	96
EK-D	
DKB7 BLAST ANALİZİ SONUÇLARI	98
D-1 DKB7 BLASTN Analizi Sonuçları	98
D-2 DKB7 BLASTP Analizi Sonuçları	100
EK-E	
FTB2 BLAST SONUÇLARI	102
E-1 FTB2 BLASTN Analizi Sonuçları	102
E-2 FTB2 BLASTP Analizi Sonuçları	104
ÖZGEÇMİŞ	106

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
bp	Baz çifti
Ci	İnorganik Karbon
kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
pH	Ortam Reaksiyonu
U	Ünite
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/ Hacim

KISALTMA LİSTESİ

BLAST	Dizi homolojisi arama motoru
CA	Karbonik Anhidraz (Karbonat Dehidrataz)
cDNA	Komplementer DNA
DEPC	Di Etil Piro Karbonat
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribo nükleozit trifosfat
EDTA	Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
IPTG	İzopropil β -D- tiogalaktozit
k_{cat}	Dönüşüm Sayısı
LB	Luria Broth
MOPS	3-(N-morfolino) Propan Sülfonik Asit
mRNA	Mesajcı RNA
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Merkezi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RACE	cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Devir/ dakika
RT	Revers Transkriptaz
X-Gal	5-brom-4-kloro-3-indol-beta-D- galaktozit

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1	CA kinetik mekanizması [15] 4
Şekil 1.2	İnsan CAII şerit diyagramı [42] 6
Şekil 1.3	Chlamydomonas CA genlerinin organizasyonu..... 7
Şekil 1.4	α , β ve γ CA'ların şerit diyagramları..... 10
Şekil 1.5	CO ₂ konsantrasyon mekanizmasında CA potansiyel rollerini gösteren genel şeması. 14
Şekil 1.6	Zeytinin doğal yayılış alanları 21
Şekil 2.1	pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi..... 34
Şekil 2.2	pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi 35
Şekil 3.1	RNA'ların %1'lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi 42
Şekil 3.2	mRNA spot testi..... 43
Şekil 3.3	PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü 44
Şekil 3.4	Mavi beyaz seçilimi 45
Şekil 3.5	Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCR'ın jel üzerinde görüntüsü..... 46
Şekil 3.6	PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü..... 47
Şekil 3.7	DNA fragmenti dizisinin BLAST analizi sonuçlarının NCBI web sayfasındaki görüntüsü 50
Şekil 3.8	3'RACE yönteminin şematik özeti..... 54
Şekil 3.9	3'RACE PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü. 55
Şekil 3.10	EcoRI ve PstI ile plazmit kesim ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü 57
Şekil 3.11	Genomik DNA'nın agaroz jel üzerindeki görüntüsü 60
Şekil 3.12	Genomik DNA'dan yapılan PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü 61
Şekil 3.13	Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCR'ın jel üzerinde görüntüsü..... 62
Şekil 3.14	Pst I ile kesilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü 63
Şekil 3.15	Pst I ile kesilmiş plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü 64

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 β (Pisum_sativum), γ (Methanosarcina_thermophila) ve α (Homo_sapiens_CA2)- CA sınıflarına ait amino asit dizinlerinin hizalama analizi	2
Çizelge 1.2 CA sınıflarının canlı gruplarında dağılışı	5
Çizelge 1.3 Zeytinin taksonomisi.....	20
Çizelge 1.4 Türkiye’de yıllara göre zeytin üretimi ve ağaç sayısı (Kaynak: TÜİK Tarım İstatistikleri).....	22
Çizelge 2.1 Tampon ve çözeltiler	25
Çizelge 2.2 Moleküler markerlar	26
Çizelge 2.3 Enzimler	26
Çizelge 2.4 Kitler.....	27
Çizelge 2.5 LB	27
Çizelge 2.6 SOB.....	28
Çizelge 2.7 Primerler	28
Çizelge 3.1 OCA nükleotid ve aminoasit dizini	48
Çizelge 3.2 OCA BLASTN analizi sonuçları	50
Çizelge 3.3 OCA dizini BLASTP sonuçları	51
Çizelge 3.4 Kontig dizin bilgisi ve tasarlanan primerler	52
Çizelge 3.5 ONCAF1 consensus nükleotid ve aminoasit dizini	58
Çizelge 3.6 ONCAF1 BLASTN analizi sonuçları	59
Çizelge 3.7 ONCAF1 BLASTP analizi sonuçları.....	59
Çizelge 3.8 Dizin analizine gönderilen örneklerin adlandırılması	64
Çizelge 3.9 QKB4 nükleotid ve aminoasit dizini	65
Çizelge 3.10 DKB7 nükleotid ve aminoasit dizini	66
Çizelge 3.11 FTB2 nükleotid ve aminoasit dizini	67
Çizelge 3.12 BLASTN analizi sonuçları	68
Çizelge 3.13 BLASTP analizi sonuçları.....	69
Çizelge 3.14 3’RACE’ten elde edilen dizin ve kontigin hizalama analizi	70
Çizelge 3.15 Genomik DNA ve 3’RACE’den elde edilen dizinlerin hizalama analizi.....	72

**ZEYTİN (*Olea europaea*) BİTKİSİNDEN KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİ
KODLAYAN GENİN KLONLANMASI**

Munise YURTSEVER

Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Karbonik anhidraz (CA), çinko içeren bir metalloenzimdir. CO_2 ve HCO_3^- arasında geri dönüşümlü ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) reaksiyonunu gerçekleştirir ve hayvanlarda, bitkilerde, arke bakterilerde ve öbakterilerde yaygın olarak bulunur. Farklı evrimsel yollarla gelişmiş 5 farklı CA ailesi vardır: α , β , γ , δ ve ζ . CA'lar pH düzenlenmesi, CO_2 transferi, iyon değişimi, solunum, biyosentez ve fotosentez gibi birçok farklı biyolojik süreçte yer alır. Ayrıca CA transkriptinin farklı abiyotik streslere yanıt olarak anlatımında artış görülür.

Bu çalışmada soğuk stresine maruz bırakılmış zeytin bitkilerinden β -karbonik anhidraz 392 bp uzunluğunda bir cDNA fragmanı klonlandı. Klonlanan cDNA'nın dizini NCBI veritabanında bulunan *Oleae europeae* kontig dizini ile yüksek oranda benzerlik gösterdi. Kontig dizin bilgisi kullanılarak 3' ve 5' uçları için primerler tasarlandı. Tam uzunlukta cDNA klonlamak için önce 3' RACE reaksiyonları yapıldı ve 1150 bp'lik bir fragman elde edildi. Bu fragman klonlanarak dizin analizi yaptırıldı. BLASTN ve BLASTP analizleriyle tütün ve domates kloroplast CA'ları ile pamuk ve bezelye β -CA'larına %75 üzerinde benzerlik gösterdiği saptandı. İki primer birlikte kullanılarak genomik DNA'dan PCR yapıldı. Yaklaşık 900 bp'lik bir fragman elde edilerek klonlandı ve dizin analizi yaptırıldı. Genomik klonların dizinleri cDNA dizinine %95-96 benzerlik gösterdi.

Anahtar Kelime: Karbonik anhidraz (karbonat dehidrataz), zeytin, soğuk stresi.

ABSTRACT

CLONING OF GENE ENCODING CARBONIC ANHYDRASE ENZYME FROM OLIVE (*Olea europaea*)

Munise YURTSEVER

Department of Biology
MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Şenay VURAL KORKUT

Carbonic anhydrase (CA) is a zinc-containing enzyme that catalyzes the reversible hydration of carbon dioxide ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) and is widely distributed in animals, plants, archaeobacteria, and eubacteria. There are five evolutionarily unrelated CA families: α , β , γ , δ and ζ . CAs are involved in a variety of biological processes including pH regulation, CO_2 transfer, ion exchange, respiration, biosynthesis, and photosynthetic CO_2 fixation. Expression of CA transcript is differentially up regulated in response to various abiotic stresses.

In this study 392bp fragment of β -CA cDNA was cloned from leaves of olive exposed to cold stress. The sequence of cloned fragment shared significant homology with a region of *Olea europaea* contig sequence of β -carbonic anhydrase which is found in NCBI databases. Forward and reverse primers were designed using sequence information of the contig. Firstly 3'RACE reactions performed to clone full length cDNA and a fragment about 1150 bp was obtained. The fragment was cloned and sequenced. The sequence showed more than 75% similarity to tobacco and tomato chloroplast CA and cotton and pea β -CAs in BLASTN and BLASTP analysis. Genomic DNA PCR was performed using forward and reverse primers and a fragment of 900 kb was synthesized. The genomic fragment was cloned and sequenced. The sequence of genomic clones showed 95-96% to the sequence of the cDNA clone.

Key words: Carbonic anhydrase (carbonate dehydratase), olive, cold stress.

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Karbonik Anhidrazlar

Karbonik anhidraz (CA), CO_2 ve HCO_3^- arasında geri dönüşümlü ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) reaksiyonu gerçekleştiren yapısında çinko bulunan bir metallo enzimdir [1]. pH düzenlenmesi, CO_2 transferi, iyon değişimi, solunum, biyosentez ve fotosentez gibi birçok farklı biyolojik süreçte yer alır [2].

Karbonik anhidraz, 1933 yılında sığır kırmızı kan hücrelerinde keşfedilmiştir [3], [4]. Enzim ilk olarak HCO_3^- 'ün eritrositten pulmoner kapilere geçişini sağlayan katalitik faktör olarak karakterize edilmiştir. 1944 yılında Keilin ve Mann tarafından kataliz için Zn'nin spesifik rolünün gerekliliği gösterilmiştir. Bu şekilde karbonik anhidraz keşfedilen ilk çinko metalloenzim olmuştur [5].

Çizelge 1.1 β (*Pisum_sativum*), γ (*Methanosarcina_thermophila*) ve α (*Homo_sapiens_CA2*)- CA sınıflarına ait amino asit dizilerinin hizalama analizi

<i>Pisum_sativum</i>	-MSTSSINGFSLSSLSPAKTSTKRITLRPFVSASLNTSSSSSSSTFP SLI 49
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	MMFNKQIFLILSLSLALAGSGCISEG----AEDNVAQEITVDEF SN-I 45
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	-MSHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIAKGERQSPVDIDHTAKYDPSLKP LSV 49
	* :
<i>Pisum_sativum</i>	QDKPVFASSPIITPVLREEMGKGYDEAIEELQKLLREKTELKATAAEKV 99
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	RENVPVTPWNEPSAPVIDPTA-----YIDPQASVIGEVTIGA 82
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	SYDQATSLRILNNGHAFNVEFDD-----SQDKAVLKGKGPLDGT 87
 : : : . .
<i>Pisum_sativum</i>	EQITAQLGTTSSSDGIPKSEASERIKTGFLHFKEKYDKNPALY GELAKG 149
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	NVMVSPMASIRSDEGMP-----IFVGDORSNV 108
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	YRLIQFHFHWGSLDGQG-----SEHTVD 110
	: * : * : :
<i>Pisum_sativum</i>	QSPPFMFACSDSRVCPSHVLDQFGEAFVVRNVANLVPPYDQAKYAGTG 199
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	QDG-----VVLHALETINEEGEPIEDNIVEVDGKEYAVYIGNN 146
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	KKK-----YAAELHLVHWNTKYG-----DFGKAVQQPDGLAVLGIF 146
	:. * :. . : * : *
<i>Pisum_sativum</i>	AAIEYAVLHLKVSNIWVIGHSACGGIKGLLSFPFDGTYSTDFIEEWVKIG 249
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	VSLAHQS---QVHGPAAVGDDTFIGMQ---AFVFKSKVGNNCVLE----P 186
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	LKVGSAKP--GLQKVVDVLDSEIKTKGKSADFTNFDPRGLLPESLDYWTYP 194
	: : . : . : * :
<i>Pisum_sativum</i>	LPAAKAKVKAQHG-DAPFAELCTHCEKEAVNASLGNLLTYPFVREGLVNKT 298
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	RSAAIGVTIPDGRYIPAGMVTSSQAEADKLPEVTDYAYSHTNEAVVYVN 236
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	GSLLTTPPLLECVTWIVLKEPISVSSEQVLKFRKLNFNNGEGEPEELMVDNW 244
	. : : : . * : *
<i>Pisum_sativum</i>	LALKGGYYDFVKGSFELWGLEFGLSSTFSV 328
<i>Methanosarcina_thermophila</i>	VHLAEGYKETS----- 247
<i>Homo_sapiens_CA2</i>	RPAQPLKNRQIKASFK----- 260

Enzim günümüze kadar hayvan, bitki, bakteri ve arkebakteri gruplarına dâhil çok sayıda canlıda tespit edilmiştir. Hewett-Emmett ve Tashian tarafından 1996'da veri bankalarındaki dizi bilgilerinin karşılaştırılmasıyla α - CA, β - CA ve γ - CA gen aileleri olmak üzere 3 grupta toplanmıştır [6]. 2008 yılında deniz diatomlarında δ - CA [7] ve ζ - CA [8] olmak üzere iki yeni CA sınıfı tanımlanmıştır. İlk olarak ϵ sınıfı olarak adlandırılmış [9] olan CA ise kristalografik yapısına dayanarak bir β - CA tipi olarak yeniden sınıflandırılmıştır [10].

Farklı CA sınıflarının aminoasit dizileri arasında benzerlik çok azdır (Çizelge 1.1). Bu nedenle evrimsel süreçte birbirlerinden bağımsız olarak ortaya çıktıklarına inanılmaktadır. Benzerlik olmayışına karşın enzimatik mekanizma korunmuştur. Bu nedenle CA'lar katalitik fonksiyonun konvergent evrimine iyi bir örnek teşkil eder [11].

1.1.2 Enzimatik Mekanizma

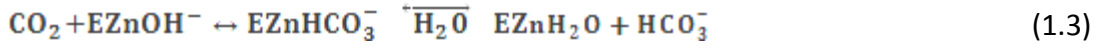
Karbondiyoksit su ile kendiliğinden etkileşerek karbonik asit oluşturur. Karbonik asit de bir proton ve bir bikarbonat iyonu oluşacak şekilde ayrışır [12] (Eşitlik 1.1).



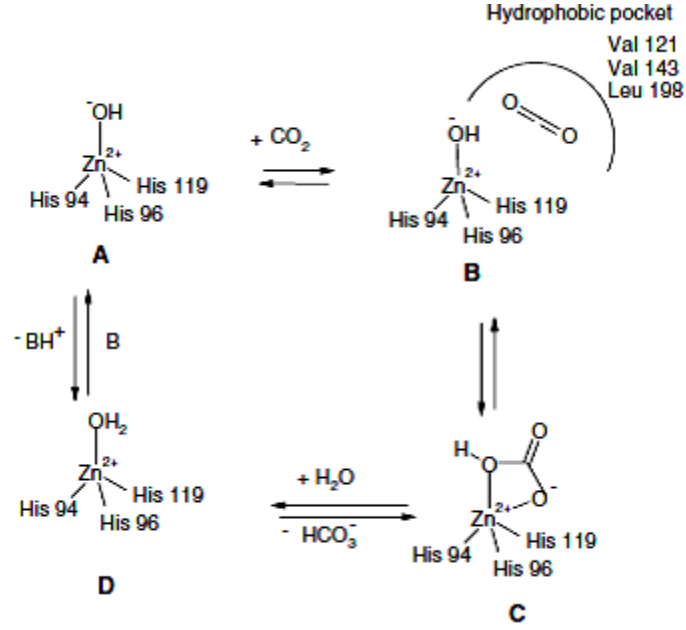
Bu reaksiyonların birinci dereceden hız sabitleri $3,5 \times 10^{-2}$ ve hidrasyon dehidrasyon reaksiyonları için 20 s^{-1} 'dir [13]. Bu hız fizyolojik reaksiyonların gerçekleşmesi için yeterli değildir. Reaksiyonları hızlandıracak katalitik bir faktöre ihtiyaç vardır. CA enzimi, karbondiyoksit ve suyun hidrasyon/dehidrasyon reaksiyonlarını karbonik asit oluşmayan farklı bir yolla katalizleyerek hızlandırır (Eşitlik 1.2). İnsandaki CAII izoformu $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ 'lik reaksiyon hızı ile bilinen en hızlı enzimlerden biridir [12].



Yapısal farklılıklarına rağmen tüm karbonik anhidraz gen aileleri iki basamaktan oluşan ortak bir kinetik mekanizmayı paylaşmaktadır. İlk basamakta (Eşitlik 1.3), çinko bağlı hidroksil iyonunun CO_2 'e nükleofilik saldırısıdır. CO_2 , HCO_3^- 'e dönüşür ve HCO_3^- bir su molekülü ile yer değiştirir.



İkinci basamakta (Eşitlik 1.4) bir H_2O molekülü çinkoya bağlanır ve iyonize olur. Protonun ortamdaki tampona geçişi ile çinkoya bağlı hidroksil grubunun yenilenişi gerçekleşir [14].



Şekil 1.1 CA kinetik mekanizması [15]

Protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması tüm mekanizma için sınırlayıcı aşamadır. Aktif merkezde bulunan çinko ile koordine olarak çalışan amino asit grupları proton uzaklaştırılması işlemini gerçekleştirir. α ve γ - CA'larda bu amino asitler 3 histidin iken β -CA'da farklı olarak bir histidin ve iki sisteindir (Şekil 1.1).

1.1.3 Karbonik Anhidraz Gen Aileleri

Bugün bilinen 5 karbonik anhidraz gen ailesi vardır: α - CA, β - CA, γ - CA, δ - CA ve ζ - CA [16], [6], [17]. Beş grup da metalloenzimdir. α - CA, β - CA ve δ - CA aktif bölgelerinde Zn kullanırken, γ - CA ortamda bulunuşuna göre Fe veya Zn, ζ - CA ise Cd veya Zn kullanmaktadır. Beş enzim sınıfının da 3D katlanışları ve oligomerizasyon durumları birbirinden farklıdır. α - CA'lar normalde monomer, nadiren de dimer halindedir. β - CA'lar dimer, tetramer ya da oktomerdir. γ - CA'lar trimer, δ - CA ve ζ - CA'lar ise monomer halindedir [18].

Farklı canlı gruplarında aynı sınıfa ait CA bulunabildiği gibi bir canlıda birden fazla sınıfa ait CA'lar bulunabilir (Çizelge 1.2). α sınıfı en çok çalışılan ve en yaygın sınıftır. Memelilerde ve diğer omurgalılarda bulunan tek sınıf olmakla beraber bitki, alg, bakteri ve virüslerde de bulunur. β sınıfı fotosentetik organizmalarda keşfedilip sonra öbakterilerde, arkebakterilerde, siyanobakterilerde, mikro alglerde ve funguslarda

bulunmuştur [6], [19]. γ sınıfı arkeler, bakteriler ve bitki mitokondrisinde tanımlanmıştır [20], [21]. δ ve ζ sınıfları ise yalnızca deniz diatomlarında bulunmuştur [8], [22], [17].

Çizelge 1.2 CA sınıflarının canlı gruplarında dağılışı

Gen Ailesi	Canlı Grubu
α - CA	Omurgalı, protozoa, algler, bitkiler, bakteriler, virüsler
β - CA	Bitkiler, algler, funguslar, omurgasızlar, arkeler
γ - CA	Arkeler, bakteriler
δ - CA	Deniz diatomları
ζ - CA	Deniz diatomları

1.1.3.1 α Karbonik Anhidraz Gen Ailesi

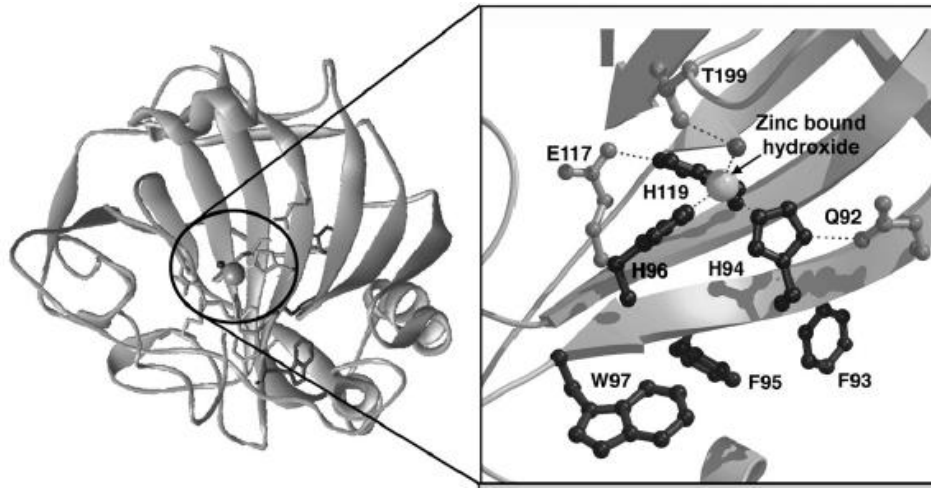
α sınıfı ilk keşfedilen ve canlılar aleminde en yaygın olan gruptur [3], [4], [23]. İlk izole edilen karbonik anhidraz dizinleri düşük aktiviteye sahip 260- aminoasitlik CA I [24], [25] ile yüksek aktiviteye sahip 259- aminoasitlik CA II' ye [25], [26] aittir. İkisi de insan eritrositlerinden izole edilmiştir.

Memelilerde kinetik özellikleri, inhibitör duyarlılıkları, hücre içindeki yeri ve son dönemde moleküler dizin analiz bilgileri kullanılarak 16 α - CA izoformu tanımlanmıştır. Bu izoformların üçü fonksiyonel histidin aminoasitlerinden bir ya da daha fazlasının değişime uğraması sonucu katalitik aktivitesini kaybetmiştir [27]. Bunlara CA- related proteinler adı verilmiştir: CARP VIII, X, XI [28], [29], [30]. Aktif izoformlardan CA I, II, III, VII ve XIII sitosolde, CA VA ve VB mitokondride yer alır. Salgılanan tek form olan CA VI tükürük ve sütte bulunur [31]. CA IV, IX, XII, XIV, XV membrana bağlı olan izoformlardır [32]. CA XV, primatlar dışındaki diğer omurgalılarda bulunur [33].

Çok sayıda karbonik anhidraz izozimi farklı dokularda, kemik yenilenmesi, kalsifikasyon, iyon transferi, asit-baz transferleri gibi farklı fizyolojik süreçte yer alır. Karbonik anhidrazların bu kadar çeşitli temel fizyolojik ve biyokimyasal süreçte (sıklıkla aynı dokuda) yer aldığı düşünülecek olursa, enzimin fizyolojik önemi ile ilgili çalışmalar karmaşıktır [34], [35]. Karbonik anhidrazın çoğunlukla doku ve hücre tiplerinde heterojen dağılışı göstermesi bu durumu daha da karışık hale getirmektedir [36], [37],

[38]. En çok araştırılan ve en önemli rollerinden biri vücuttaki solunum gazlarının taşınımıdır.

İnsan CAII enzimi (Şekil 1.2) en çok çalışılmış izoformdur [39]. 25 °C'de pH 9'da, 10^6 s^{-1} ile son derece yüksek bir dönüştürme hızına sahiptir [1]. Enzim eritrositlerden (2 mg CAII/g hemoglobin içerir) geleneksel yöntemle saflaştırılmıştır. CAII'yi kodlayan gen de klonlanmış ve *E. coli*'de fazla anlatımı yapılmıştır [40]. CAII eritrositler dışında birçok organ ve hücre tipinde de tespit edilmiştir. CAII eksikliği osteopetroz, renal tübüler asidoz ve serebral kalsifikasyon ile birlikte seyreden bir sendroma neden olmaktadır [41], [28]. Bu da izozimin kemikte, böbrekte ve beyindeki fonksiyonunun önemini olduğunu göstermektedir.



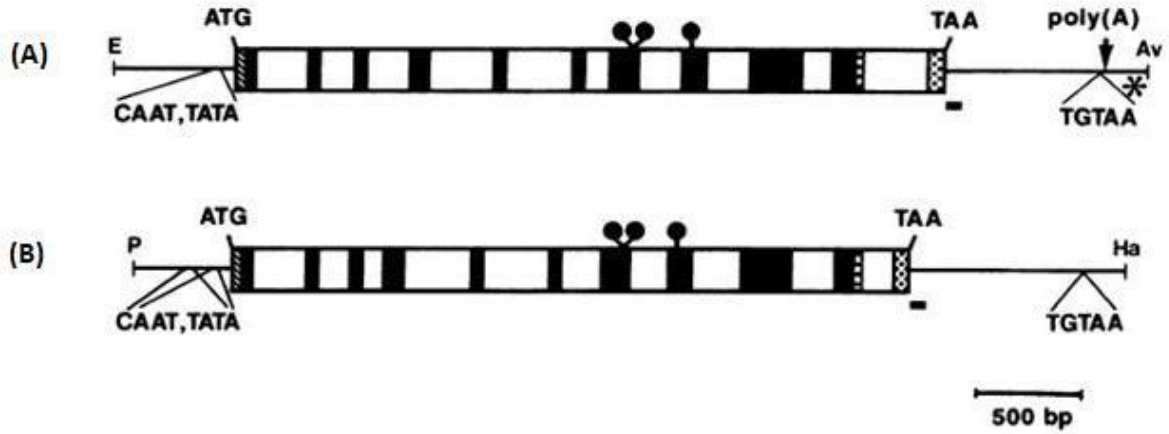
Şekil 1.2 İnsan CAII şerit diyagramı [42]

Direkt histidin ligandlar H94, H96 ve H119; ikincil kabuk ligandları Q92, E117; T199 ve hidrofobik kökler F93, F95 ve W97.

Memeliler dışındaki diğer omurgalı gruplarının CA izoformları hakkında çok az bilgi vardır. Bu konudaki literatür bilgisi yalnızca zebra balığı *Danio reiro* [43] gibi birkaç model balık türünde yapılmış çalışmalara dayanmaktadır. α -CA'lar hakkında bilinenler daha çok insan, fare ve sıçan CA'larından elde edilen bilgilere dayanır.

α -CA'lar omurgalılar dışında bakteriler, algler ve yüksek bitkilerde de bulunmuştur. Fotosentetik organizmalardan klonlanan ilk α -CA genleri, *C. reinhardtii*'de periplazmik iki karbonik anhidrazı kodlayan *Cah1* ve *Cah2* (Şekil 1.3) genleriydi [44], [45]. Bu iki gen farklı şekilde regüle edilmelerine rağmen çok benzer olan iki proteini kodlamaktaydı.

Cah1 düşük CO₂ durumunda sentezlenirken, yüksek CO₂ konsantrasyonlarında sentezlenmez. *Cah2* ise tersine, yüksek CO₂ konsantrasyonlarında sentezlenir. Ayrıca *Cah2*'nin yüksek CO₂'te sentez miktarı, *Cah1* düşük CO₂ durumunda sentezi ile kıyaslandığında azdır [45]. *Cah2* gen duplikasyonu sonucu oluştuğu ve daha zayıf bir promotora sahip olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.3 Chlamydomonas CA genlerinin organizasyonu.

(A) *Cah1* (B) *Cah2*. Koyu kutular protein kodlayan bölgeler, koyu daireler çinko ligandı histidinler, ATG başlangıç kodonu, TAA bitiş kodonu.

α - CA'ların çoğu yaklaşık 30 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. Enzim, iki yarıya sahip küresel bir form oluşturan anti paralel β - sheetlerden meydana gelir. Aktif bölge huni şeklinde çinko içeren bir krater şeklindedir. Karbonik anhidrazın katalitik fonksiyon için önemli 4 temel bileşeni vardır. Bunlar Zn bağlanma bölgesi, substrat cebi, treonin199 loop ve proton shuttle mekanizmasıdır. X-ray kristalografik veriler göstermektedir ki, Zn 15 Å derinliğindeki aktif bölgenin dibinde yer alır. Enzimatik olarak aktif olan tüm α - CA'lar çinko ile koordine olan 3 histidin aminoasidi içerir. Bu aminoasitler His94, His96, His119'dur [46]. Ayrıca her bir histidin hidrojenu yapılarak çinko iyonunun stabilizasyonuna yardım eden bir ligandı (Gln92, Asn244, Glu117) vardır [47], [48]. Substrat cebi, altı non-polar aminoasidin oluşturduğu hidrofobik bir ceptir [49]. Bu cep çinko bağlanma bölgesine bitişiktir olup karbondioksitin izolasyonundan ve çinkoya bağlı hidroksite doğru yönlendirilmesinden sorumludur. Treonin199 loop hidroksit bağlı çinko oluşumu için hidrojenu bağı donörü olarak görev yapar [50]. Proton shuttle aminoasidi ise çinkoya bağlı su molekülünden

bir proton alıp bunu sitoplâzmadaki tampon faktörlere verir [51]. Şu da belirtilmelidir ki shuttle aminoasit protonu direkt olarak çinkoya bağlı su molekülünden almaz. Proton üç su molekülünü içeren bir shuttle zinciri boyunca ilerler. Yüksek aktiviteli CA izozimlerinde proton shuttle aminoasidi His64'tür ve bu aminoasidin yapısındaki değişiklikler enzimin katalitik aktivitesini dramatik bir şekilde azaltır [52].

1.1.3.2 β Karbonik Anhidraz Gen Ailesi

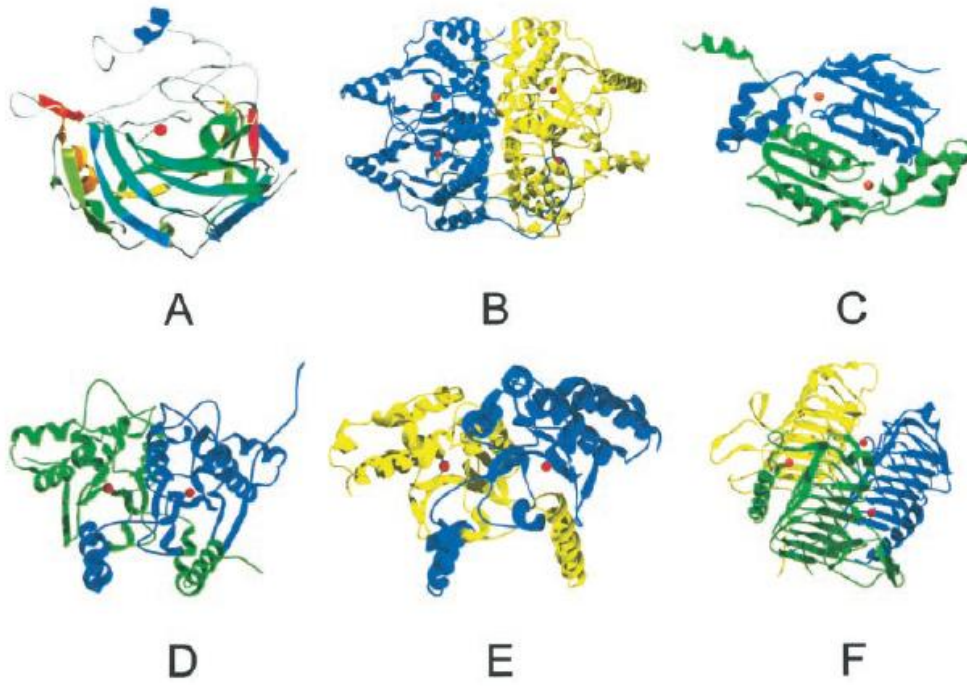
İlk β karbonik anhidraz, Neish tarafından 1939 yılında bitki yaprak kloroplastlarında bulunmuştur [53]. Fakat bunun farklı bir CA tipi olduğu 1990 yılına kadar anlaşılammıştır. 1990'da ıspanak (*Spinacea oleracea*) kloroplast CA'nın cDNA dizini belirlenmiş ve bunun α - CA ile homolog olmadığı gösterilmiştir[54]. Kısa süre sonra yüksek homoloji gösteren, bezelye (*Pisum sativum*) [55] ve *Arabidopsis thaliana* [56], [57] cDNA dizinleri yayınlanmıştır. İlk başta β - CA'nın yalnızca bitkilere özgü olduğu düşünülmüştür. Fakat daha sonra çeşitli algler, bakteriler ve arkelerden de izole edilmiştir [58].

β sınıfı diğer sınıflara göre daha fazla yapısal ve fonksiyonel çeşitlilik gösterir [59]. Fizyolojik rolleri henüz tam olarak açığa kavuşturulamamış olmakla beraber CO₂ veya HCO₃⁻ kullanan kloroplasttaki Rubisko, *E. coli*'deki siyanaz, *H. pylori*'deki üreaz gibi çeşitli enzimlere yardımcı olduğu düşünülmektedir [59]. β - CA siyanobakterilerde karboksizomun önemli bir bileşenidir. Bu canlılarda β - CA mutasyonu büyüme için yüksek CO₂ konsantrasyonu gerektirir [60]. Ayrıca yapılan çalışmalar ortaya koymaktadır ki, *Escherichia coli* [61], *Corynebacterium glutamicum* [62] ve *Saccharomyces cerevisiae* [63] aerobik şartlarda ve atmosferik CO₂ konsantrasyonunda büyüme için β - CA zorunludur. β - CA'dan yoksun mutant *S.cerevisiae*'lerde, α - CA ya da β - CA yabancı tip veya katalitik olarak tamamlanmış varyantlarda aerobik koşullarda büyüme yeteneğinin geri kazanıldığı gösterilmiştir [64].

Yüksek bitkilerde de β - CA fotosentezi destekleyen kritik fizyolojik rolü yüzünden yoğun olarak araştırılmıştır. Bu enzimin bir rolü stomal boşluklardan CO₂'in difüzyonuna direnci düşürmektir. CO₂ kloroplast stromasına absorbe edildikten sonra ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisko) enzimi tarafından karbonu fiske edilir. C₄ bitkilerinde β - CA proteini daha çok mezofil hücrelerinin sitoplâzmasında eksprese

edilir. Burada CO_2 'i, HCO_3^- 'a dönüştürerek fosfoenolpirüvat karboksilaz (PEPC) için substrat sağlar. Bu nedenle CO_2 konsantrasyon artırma mekanizmasının tamamlayıcı bir unsurudur. C_4 bitkilerinin mezofil hücrelerindeki β - CA aktivitesine olan kritik bağımlılığı CA inhibitörleri [65] ve knockdown *Flaveria bidentis* [66] kullanılarak gösterilmiştir. Daha yaygın olan C_3 bitkilerinde ise β - CA yaprak proteininin ana ögelerinden biridir (toplamın %0,5-2'si) ve aktivitesinin %95'i kloroplast stromasında gerçekleşir [67], [68]. Bununla beraber fotosentetik hücrelerin sitoplazmasında da aktivitesi gözlemlenmiştir [69]. Bu yerleşim, Rubisko için yeterli CO_2 konsantrasyonunu sağlamak amacıyla, kloroplast stromasından CO_2 difüzyonunun kolaylaştırılması ya da bikarbonatın hızla CO_2 'e dönüştürülmesi ile alakalı olabilir [19]. Stromada, alkali pH'da bikarbonat karbondioksite göre daha stabildir. Bu durum fotosentez için olumsuzdur. β - CA, CO_2 kaynağı oluşturarak Rubisko'yu da içeren Calvin döngüsü enzim kompleksi ile birlikte çalışır. Böylece fotosentez etkinliğini arttırmış olur [70]. β - CA üretiminin antisense ekspresyonu ile inhibisyonu, stoma geçirgenliğinin artırılması ile bir dereceye kadar telafi edilebilir. Ancak bunun bitki için bedeli aşırı su kaybıdır [71].

β - sınıfı enzimlerin karakterizasyonu diğer sınıflardan kesin farklılıklar gösterir. α - sınıfı ve γ - sınıfı enzimler her zaman monomer ve trimerdir. Fakat β - sınıfı enzimler dimer, tetramer, heksamer ve oktamer olabilir [72]. Kristal yapı analizlerine göre enzimin sekonder yapısının da farklı olduğu görülmüştür. Son olarak kristal yapı çinkonun farklı olarak korunmuş iki sistein (Cys160, Cys223) ve bir histidin (His220) tarafından bağlandığını ortaya koymaktadır [73], [74], [72].



Şekil 1.4 α , β ve γ CA'ların şerit diyagramları

Aktif bölgelerdeki çinko iyonları kırmızı küreler halinde gösterilmiştir. (A) insan α -CAII, (B) *P. purpureum*'a ait β -CA, (C) *P. sativum* β -CA, (D) *M. thermoautotrophicum*'a ait β -CA, (E) *E. coli*'ye β -CA, (F) *M. thermophila*'ya ait β -CA. Hemen hemen tüm β -CA'lar monomer/pseudo monomer başına bir çinko iyonu içerir.

Filogenetik analizler β -sınıfının diğer sınıflardan daha fazla çeşitlilik gösterdiğini işaret etmektedir (Şekil 1.4) [58]. Hizalama analizlerine göre yalnızca 5 aminoasit tamamen korunmuştur: üç çinko ligandı ile bir aspartat ve bir arjinin [20]. Tüm β -CA'lar başka proteinlerde olmayan eşsiz bir α/β katlanışına sahiptir. β -CA'lar 45-200 kDa arasında moleküler kütlede çeşitli oligomerik durumlarda bulunabilmektedir. Fakat temel yapı ünitesi dimer veya bunun yapısal dengi olarak görülmektedir. PSCA, ECCA, HICA, Rv1284, Rv3588 ve MTCA'da temel dimer iki identik protein zincirinden oluşur. PPCA ve HTCA'da ise temel yapısal ünite genin duplike olup birleşmesi ile oluşmuş bir pseudo dimerdir. Tüm β -CA'larda genel yapısal element 2-1-3-4 sıralamasına sahip dört zincirden oluşan merkezi paralel β sheet yapısıdır. Her monomer ya da pseudo monomer bu yapıdan oluşur. Bazı β -CA'larda beşinci bir anti paralel β zinciri ($\beta 5$) $\beta 4$ ile birlikte bulunur. Her monomer veya pseudo-monomerde 8-10 β -sheet zincirinin anti-paralel olarak düzenlenmesi ile oluşan bir β çekirdeğine sahip HTCA bir istisnadır.

Çinko iyonu enzimin aktif bölgesinin yerini belirler. HTCA burada da bir istisnadır. HTCA, β sınıfının eşsiz bir üyesidir. Hatta ilk başta ayrı bir olarak düşünülmüş ve ϵ adı

altında gruplandırılmıştır [9]. Fakat X-ray yapısı HTCA'nın tüm çinko ligandlarını kaybedecek şekilde evrimleşmiş pseudo monomer bir β - CA olduğunu ortaya koymuştur [10].

β - CA enziminin kinetik karakterizasyonu, reaksiyonun α - CA ile pek çok ortak noktası olduğunu göstermektedir. Bezelye enzimi için k_{cat}/K_m oranı $1,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ iken k_{cat} değeri 4×10^5 'tir [75]. Bu nedenle enzim nerdeyse α - CAII ($10^6 \text{ sn}^{-1} k_{cat}$ ile en hızlı α - CA izozimi) kadar hızlı ve etkindir. Reaksiyon pH artışı ile aktive olur. Ancak enzimin davranışı α - CA'dan daha karmaşıktır ve tek bir pK_a değeri tespit edilmesini engeller [75]. Bir β - CA monomeri yaklaşık 25 kDa'lık moleküler ağırlığa sahiptir. Kloroplast CA'ları genellikle nükleusta kodlanır ve onları kloroplast stromasına yönlendirecek yaklaşık 110 aminoasitlik bir sinyal ön dizisi taşırlar [76]. Enzimin her bir alt ünite için bir çinko iyonuna bağlandığı belirlenmiştir. İspanaktaki EXAFS (extended X-ray absorption fine structure) ve mutagenез çalışmaları ile bezelyedeki mutagenез çalışmalarının sonuçları metal ligandlarının Cys160, His220 ve Cys223 olduğunu göstermektedir [77], [78], [79].

1.1.3.3 γ Karbonik Anhidraz Gen Ailesi

γ sınıfının 3-4.5 milyar yıl önce evrimleştiği düşünülmektedir [58]. Buna göre α sınıfının evriminden 200-300 milyon yıl evvel bu sınıf vardı [6], [80]. Ancak 1994 yılında γ - CA, arke-bakteri *Methanosarcina thermophila*'da keşfedilmiştir [81]. Kristal yapısı çözülmüş olan bu enzim, α ve β sınıfı karbonik anhidrazilardan farklılıklar gösterir [82]. İdentik alt ünitelerden oluşan trimer şeklinde işlev gösterir. Her bir monomerde bir sol-el β -heliks baskındır. Trimer her alt ünite için bir tane olmak üzere üç çinko iyonu içerir. α sınıfında olduğu gibi üç histidin ve bir su molekülü çinko ile koordine haldedir. Fakat histidinler iki ayrı alt ünite tarafından sağlanır. *Methanosarcina thermophila* proteini için His81 ve His122 bir alt üniteden, His117 ise diğer bir alt üniteden ligand olarak davranan aminoasitlerdir. Alt ünitelerin ara yüzünde olmasına rağmen γ - CA aktif bölgesinin yapısı, α - CA'larinkine benzerdir [82].

γ sınıfı karbonik anhidrazlar arkeler ve bakteriler dışında fotosentetik ökaryotlarda da görülür [21]. Arabidopsis γ - CA protein ailesi beş üye tarafından temsil edilir. Bunlardan üçü fonksiyonel olarak önemli aminoasitlerin hemen hepsini taşır: γ CA1(At1g19580),

γ CA2 (At1g47260) ve γ CA3 (At5g66510). Diğer iki öge daha divergent proteinlerdir: γ CAL1 (CAL: carbonic anhydrase-like; At5g63510) ve γ CAL2 (At3g48680). Beş Arabidopsis γ CA/ γ CAL alt ünitelerinin tamamının mitokondriyal kompleks 1 ile birlikte bulunduğu gösterilmiştir [83], [84]. Şu ana kadar incelenmiş tüm fotosentetik ökaryotlarda en az bir γ CA ve bir γ CAL bulunmaktadır [85].

1.1.3.4 δ Karbonik Anhidraz Gen Ailesi

δ karbonik anhidraz bilinen diğer sınıfların aminoasit dizini ile homoloji göstermemektedir. 1997 yılında deniz diatomu *Thalassiosira weissflogii*'den δ sınıfına ait TWCA1 proteini izole edilmiştir [7]. Bu enzimin aktif bölgesi α ve γ sınıflarının aktif bölgelerine benzerlik göstermektedir. Çinko atomu üç histidin aminoasidi ile bir su molekülü ile koordine haldedir ve aktif merkez geometrisi α - CA'yı benzer [86]. Diğer kısımlarında dizin benzerliği olmamasına rağmen bu özelliğine dayanarak bazı araştırmacılar TWCA1'i α - CA'ların uzak bir homoloğu olarak nitelemiştir. Günümüze dek deniz fitoplanktonlarına ait bir dizi karbonik anhidraz δ sınıfına dahil olmuştur ve δ -CA'ların ayrı bir sınıf olduğu kabul edilmiştir [87], [88], [22].

1.1.3.5 ζ Karbonik Anhidraz Gen Ailesi

Thalassiosira weissflogii diatomundan δ - CA dışında, Cd içeren bir karbonik anhidraz, CDCA1, izole edilmiştir. Bu enzim, yeni düzenlenen ζ - CA sınıfının ilk üyesi olmuştur. CDCA1 hemen hemen identik üç tekrarın meydana getirdiği yaklaşık 66 kDa ağırlığında bir proteindir [8]. Cd içeren enzim aktif bölgesine Zn bağlandığında da fonksiyon göstermektedir. Deniz ortamındaki bulunurluklarına göre metal iyonları bir biri ile yer değiştirmektedir [17], [86], [89].

1.1.4 Karbonik Anhidrazların Fizyolojik Roller

C_i canlı hücrelerinin temel metabolitlerinden biridir. C_i türevleri olan CO_2 ve HCO_3^- arasındaki dönüşüm hızı metabolik reaksiyonlar için sınırlayıcı olabilir [90]. Karbonik anhidrazlar bu dönüşümü katalizleyerek çok sayıda fizyolojik süreçte yer alır. Bu rollerden biri spesifik fizyolojik reaksiyonlar için CO_2 veya HCO_3^- sağlanmasıdır. Örneğin, Rubisko ve yağ asidi sentezinin ilk basamağını gerçekleştiren asetil CoA karboksilaz

enzimi sadece CO₂ kullanabilir, HCO₃ kullanamaz PEP karboksilaz ise sadece HCO₃ kullanabilir [91].

CA'ların üstlenebileceği ikinci rol C_i'nin hücre içerisinde doğru yerlere iletilmesidir. Düşük CO₂ konsantrasyonlarında Clamydomonas hücreleri aktif olarak CO₂ biriktirmelidir. Bu durumda C_i'nin hücre dışından fiksasyon merkezi olan kloroplastlara iletilmesi gerekmektedir. Ci alımının transport proteinleri yanında CA aktivitesiyle gerçekleştiği düşünülmektedir [91].

CA'ların üçüncü bir rolü CO₂ biriktirilmesindedir [92]. CO₂ biyolojik membranları geçip hücre dışına sızma eğilimindedir. Sızmanın engellenebilmesi için CO₂ CA tarafından hemen HCO₃'e dönüştürülür. Membranın HCO₃ geçirgenliği CO₂'ye göre bir milyon kat daha azdır [91].

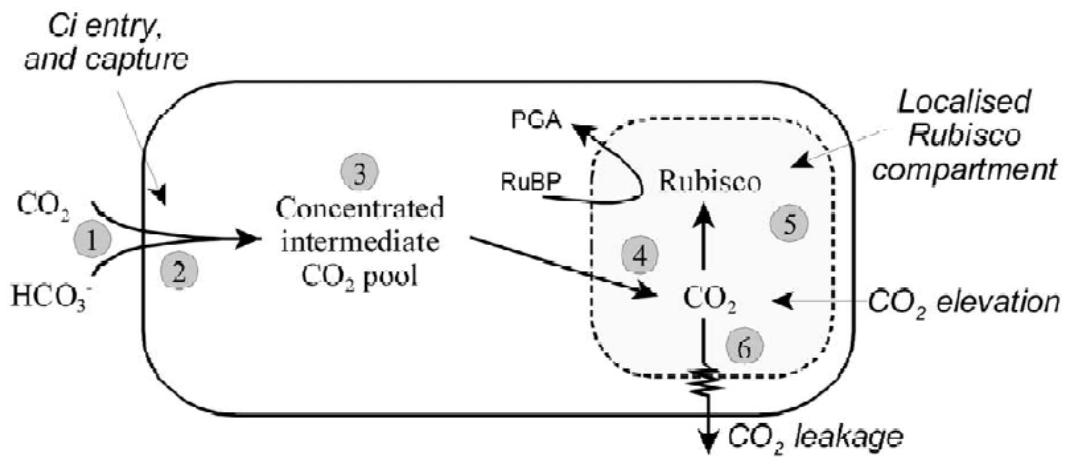
CA aktivitesi pH dengesi için de gereklidir [90]. Memeli sistemlerinde CO₂'nin HCO₃'e dönüşümü tampon kapasitesini sağlamaktadır.

Son olarak karbonik anhidrazların elektron taşıma sisteminde yer alabileceği düşünülmektedir. Siyanobakterilerde CA benzeri proteinlerin tilakoid ve plazma membranındaki NADH dehidrogenaz kompleksleri ile işbirliği içinde olduğuna dair bulgular vardır [93], [94]. Yüksek bitkiler ve Clamydomonas'ta da γ-CA ya da γ-CA benzeri proteinler NADH dehidrogenaz veya mitokondri kompleks I ile işbirliği halindedir [83], [95]. Bitki ve ökaryotik alglerde γ-CA'nın rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak siyanobakterilerde CA benzeri proteinlerin NADH dehidrogenaz kompleksi ile işbirliği siyanobakteriyal CCM (karbondioksit konsantrasyon mekanizması) için gereklidir. Bu proteinler siyanobakterilerde CO₂'yi HCO₃'e dönüştürerek, CO₂'in hücre dışına sızmasını engelleyen vektörel CA'lar olarak hareket eder [91].

1.1.4.1 CCM Mekanizmalarında CA'ların Rolü

Bitkilerde fotosentezin düzenlenmesinde CA'nın rolü önemlidir. Bitkiler ortamda düşük konsantrasyonda bulunan C_i'yi alıp biriktirmek zorundadır. Ayrıca CO₂ fiksasyonunda anahtar enzim olan Rubisko'nun O₂'ye olan ilgisi CO₂'ye olan ilgisinden daha fazladır. Bu nedenle bitkilerde, siyanobakteri ve alglerde CCM ortaya çıkmıştır. CCM

(Karbondioksit konsantrasyon mekanizması)'nın genel şeması ilk olarak 1981'de oluşturulmuştur [96]. Günümüze dek bu mekanizma detaylı olarak araştırılmıştır [19], [97], [98]. CCM, karbonik anhidrazlar ve C_i taşıyıcılarının birlikte çalışmasıyla oluşan ve Rubisko'nun aktif merkezi yakınında CO_2 konsantrasyonunu hücre dışı ortama göre 1000 kat arttıran bir sistemdir. CA, C_i girişi, C_i 'nin hücre dışına sızmasının engellenmesi ve hücre içinde C_i formlarının dönüştürülmesi dâhil CCM'nin tüm aşamalarında (Şekil 1.5) yer alır [99].



Şekil 1.5 CO_2 konsantrasyon mekanizmasında CA potansiyel rollerini gösteren genel şeması.

(1) Hücre yüzeyinde CO_2 sağlanması, (2) CO_2 yakalama mekanizmasına katılım, (3) Konsantre CO_2 havuzunun oluşturulması, (4) Konsantre HCO_3^- havuzundan CO_2 salımı, (5) CO_2 'in yüksek olduğu özelleşmiş kompartimanlarda özelleşmiş CA bulunabilir, (6) CO_2 sızmasının engellenmesi.

1.1.4.2 Siyanobakteriler ve Mikroalglerde CO_2 Konsantrasyon Mekanizması

Dünya üzerindeki fotosentetik kökenli organik maddenin yarısını siyanobakteri ve mikroalgler üretmektedir. Bu nedenle CO_2 konsantrasyon mekanizmaları çok önemlidir [19]. Fotosentez yapan sucul canlılarda Rubisko'nun CO_2 ilgisinin düşük olması yanında, sudaki konsantrasyonu havadan 10^4 kat düşük olan CO_2 'nin difüzyonu problemi ile karşı karşıyadır. Bu nedenle bu canlılarda CCM'nin önemi artmaktadır [99].

Günümüzde siyanobakterilerde C_i taşınması için 5 sistem bilinmektedir. Bunların üçü HCO_3^- taşıyıcıları, diğer ikisi kolaylaştırılmış CO_2 difüzyon sistemleridir [19]. Ökaryotik alglerde C_i 'nin hücre içine taşınma şeması hipotez aşamasında kalmakla birlikte, son birkaç yılda C_i taşıyıcılarını kodlayan bazı genler keşfedilmiştir [98].

Hücre içine giren C_i , siyanobakteri sitoplâzmasında veya ökaryotik alglerin kloroplast stromasında HCO_3^- olarak birikir. Bu C_i formunun baskınlığı bu kompartımanların zayıf alkali pH'ları (7,4 - 8,2) tarafından belirlenir. Ayrıca HCO_3^- birikimiyle, CO_2 'in hücre dışına spontan kaçış riski de ortadan kaldırılmış olur [19].

Hücre içinde biriktirilen C_i formu HCO_3^- 'ün, fotosentetik asimilasyonda Rubisko tarafından kullanılan C_i formu CO_2 'ye dönüştürülmesi gerekir. Bu dönüşümü Rubisko ile koordine halde çalışan CA tarafından gerçekleştirilir. Hücre içi konsantrasyonunun artışı sonucu CO_2 'in hücre dışına çıkışı kaçınılmaz olacaktır [100], [101]. Bundan kaçınmak için siyanobakterilerde dönüşüm karboksizom denen mikro cisimlerde gerçekleşir. Bu mikrocisimler CA (*CsoSCA*, *CcaA* veya *CcmM* proteinleri) taşıyan protein kılıfla çevrilidir ve iç kısımlarında bol miktarda Rubisko içerirler. HCO_3^- 'ün CO_2 'ye dönüştürülebilmesi için karboksizomun matriksi asidik (pH<6,3) olmalıdır. Çünkü asidik ortamda C_i formları arasındaki denge CO_2 'ye doğru kayar. CO_2 fiksasyonu sırasında asidik ürün (fosfogliserat) oluşumu da HCO_3^- dehidrasyonunu kolaylaştırır [100].

Prokaryotik karboksizomların fonksiyonel analogları ökaryotik mikroalglerde pirenoidlerdir. Pirenoidler kloroplastlarda yer alan protein içerikli yapılardır ve nerdeyse hücredeki tüm Rubiskoyu içerirler [99]. Kloroplast tilakoidleri pirenoid matriksinin içinden geçer veya içine sokulur. *Chlamydomonas reinhardtii* ile yapılan çalışmalar, HCO_3^- 'ün CO_2 'ye dönüşümünün lümende bulunan CA, *Cah3* tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir [102]. *Cah3* Fotosistem II'de yer alır [103] ve pirenoid tilakoidlerinde yer alır [101]. CO_2 molekülleri, lümende ışık altında pH yaklaşık 5'te üretilir ve pirenoid matriksinde konsantrasyon gradiyenti boyunca ilerler. Bu moleküllerin karboksilasyonu Rubisko tarafından pirenoid matriksinde gerçekleştirilir. Karboksizomlarda olduğu gibi pirenoidlerde de Rubisko ve CA arasındaki işbirliği CO_2 sızmasının engellemesi için önemlidir [99].

1.1.4.3 C_4 Bitkilerinde CO_2 Konsantrasyon Mekanizması

Yüksek bitkilerin C_4 CCM, detayları tanımlanan ilk fotosentetik CCM'dir. Yaprak bazlı bu karasal CCM çok hücreli anatomik farklılıklara ve yaprak içinde metabolik koordinasyona dayalıdır. Yaprak mezofil hücreleri ve fotosentetik demet kını hücreleri

arasında etkileşimler gerçekleşir. Diğer tüm CCM'lerde tek hücreye dayalı bir operasyon vardır [83].

C₄ yüksek bitkilerinde temel CO₂ yakalama mekanizması mezofil hücreleri sitosolünde yer alan PEP karboksilazdır. Bu enzim, CO₂'in okzaloasetat olarak fiksasyonu için Rubisko'nun aksine substrat olarak HCO₃⁻ kullanır. Bu nedenle dış ortamdan giren CO₂ bir CA tarafından hızla HCO₃⁻'e dönüştürülmelidir [83]. Mezofil karbonik anhidrazı C₄ yolundaki ilk enzimdir. C₄ fotosentezinin bu enzime olan kritik bağımlılığı CA inhibisyonu [65] ve antisens RNA teknikleri kullanılarak mezofil CA aktivitesinin azaltılmasıyla gösterilmiştir [69].

Temel CA aktivitesi mezofil hücrelerinde gerçekleşir. Demet kını hücrelerinde CA bulunmaz. Bunun nedeninin demet kını hücrelerinde biriken CO₂'in HCO₃⁻'e dönüşerek yitirilmesinin ve plazmodezmatadan geri sızmasının engellenmesi olduğu ileri sürülmüştür [104]. Bu hipotez, *Flaveria bidentis* demet kını hücrelerinin sitosolünde CA'nın ektopik ekspresyonu yoluyla test edilmiştir [105]. Demet kını hücrelerinde sızdırma artmıştır. Bununla beraber sonuçlar bunun iyi ayarlanmış bir mekanizma olduğunu, siyanobakterilerdeki gibi C₄ fotosentezi kısa devreye uğratmadığını göstermiştir [83].

1.1.5 Çinkonun CA Aktivitesindeki Rolü

Geçiş metalleri olan çinko, bakır, demir ve nikel canlılar için esansiyel minerallerdir. Çinko(Zn), demirden sonra en çok bulunan iz elementtir. 300'den fazla çinko enzimi keşfedilmiştir [106], [107], [108]. Bu enzimlerin aktivitesi de Zn eksikliğinden etkilenir. CA, Zn'ye bağımlı olduğu keşfedilen ilk enzimdir. Çalışmalar göstermiştir ki her bir alt ünite için bir Zn atomu içerir [109]. Zn enzimin aktif bölgesinin yakınındaki 3 histidin grubunun imidazol halkaları ile koordine haldedir [110]. Enzimin katalitik aktivitesi için Zn iyonu gereklidir [111]. Bitki enziminin aksiyon mekanizması aktif bölge merkezindeki Zn'nin bir H₂O molekülü ile koordinasyonunu gerektirir. Fizyolojik pH'da (yaklaşık 7) Zn-H₂O kompleksi ayrışarak Zn-bağlı hidroksit iyonunu meydana getirir [109]. CO₂ hidrasyon reaksiyonunda aktif bölgedeki Zn-OH ile reaksiyona girer. Tersine dehidrasyon reaksiyonunda HCO₃⁻, Zn-H₂O ile etkileşir [90].

Guliev ve diğeri (1992) *in vitro* koşullarda Zn⁺²'nin CA molekülünden uzaklaştırılması sonucu CA'nın aktivitesini geri dönüşümsüz olarak yitirdiğini rapor etmiştir. Bununla beraber Rengel'in çalışması (1995) bitkilerde Zn eksikliğinde CA'nın Zn kaynağı olarak davrandığını göstermektedir. Bitkilerin yetersiz Zn koşullarına transfer edilmesi ile Zn kaynağı kademeli olarak azalırken CA da aktivitesini yitirir. Bu CA molekülleri fonksiyonel değildir ve başka ürünlerin yapımı için katabolize edilirler. Zn kaynağının yenilenmesi için *de novo* protein sentezi gereklidir [112].

Birçok araştırmacı Zn eksikliğinde fotosentez ve CA aktivitesi arasındaki bağıntıyı açıklamayı denemiştir. Zn eksikliğinde domates [103], sitrus [114], ıspanak [115] ve buğdayda [112] CA aktivitesinde düşüş olduğu gözlemlenmiştir [116]. Düşük Zn koşullarında ıspanak yapraklarında düşük seviyedeki CA aktivitesine rağmen fotosentez oranında bir azalma olmamıştır [117]. Pamukta kuvvetli Zn eksikliği durumunda fotosentez oranının en yüksek olduğu gösterilmiştir [117]. Soya bitkilerinde büyüme, fotosentez, fotorespirasyon ve CA aktivitesi arasında bir ilişki bulunmuştur. Kritik Zn seviyesinde CA aktivitesi ve fotosentez oranı azalırken, respirasyon artmıştır [118]. Buğdayda Triolo ve Bassanelli (1976) CA aktivitesi ve fotorespirasyon oranı arasında bir bağıntı olduğunu gözlemlemiştir [119]. Bazı sonuçlar Zn eksikliğinde CA aktivitesindeki büyük azalma sonucu CO₂'in stoma açıklığında Rubiskonun olduğu kısma taşınmasının azaldığını göstermektedir. Aynı zamanda Rubisko aktivitesi ve fotosentez oranının çok az değıştiği kanıtlanmıştır [120].

1.1.6 Karbonik Anhidraz ve Stres

Çeřitli çalışmalarda CA ekspresyonunun regülasyonuna ışık, tuz içeriği ve karbondioksit konsantrasyonu gibi çevresel faktörlerin etkisi olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Pirińç β - CA geni *OsCA1* ile yapılan bir çalışmada tuz stresi ve ozmotik stres altında CA ekspresyonu ve aktivitesi incelenmiştir. Stres uygulanması sonucu pirińç fidelerinde CA ekspresyonu seviyesi 72 saate kadar artış gözlenmiştir. CA aktivitesinde de kontrol grubuna göre %50 kadar artış saptanmıştır. Ayrıca *OsCA1* genin aktarıldığı *Arabidopsis* bitkilerinde genin fazla anlatımı bitkilere büyümede avantaj sağlamıştır [121].

Pennisetum glaucum ile yapılan bir çalışmada da ışık, tuzluluk, susuzluk ve sıcaklık streslerinin *PgCA* geninin ekspresyonuna etkileri RNA blot analizleriyle araştırılmıştır. Karanlıkta büyüyen yapraklarda belirgin bir CA ekspresyonu görülmemiştir. Tuz stresi uygulanması ile transkript seviyesi artış göstermiş ve 24 saat kadar yüksek seviyede kalmıştır. Benzer şekilde susuzluk stresi ile transkript seviyesi 48 saatte maksimum seviyeye ulaşmıştır. Sıcaklık stresinde ise 30 dakikada transkript seviyesi çok yükselmiş ve 4 saat boyunca bu seviyede kalmıştır [122].

1.1.7 CA'ların Biyoteknolojik Kullanım Alanları

1.1.7.1 CA'ın Biyosensör Olarak Kullanımı

Karbondiyoksit reaktant ve ürün olarak en önemli çevresel gazlardan biridir. Bu gazın niteliksel ve niceliksel tespiti için yoğun bir çaba harcanmaktadır. CO₂ tespiti için kimyasal, optik ve elektrokimyasal çeşitli yöntemler ve sensörler geliştirilmiştir. Fakat bunlar hassasiyet, hız veya çevreye duyarlılık açısından çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. CO₂'i substrat olarak kullanan immobilize edilmiş enzimlerin biyosensör olarak kullanılması bu açıdan bir çözüm oluşturabilir. CA enziminin bu amaçla kullanıma dair çalışmalar yapılmıştır. Sığır eritrositleri ile yapılan çalışmada diğer yöntemlere göre 10 kat hızlı şekilde CO₂ tespiti mümkün olmuştur [123].

1.1.7.2 CA'ın Karbondiyoksit Tutulumunda Kullanımı

Yükselen CO₂ salınımının neden olduğu küresel ısınma günümüzün en önemli çevre sorunlarından biridir. CO₂ konsantrasyonlarının azaltılması üç yolla sağlanabilir. Bu yollar enerjinin etkin kullanımı, CO₂'in yakalanıp ortamdan uzaklaştırılması ve alternatif temiz enerji kaynaklarının kullanımınıdır [124]. Temiz enerji kaynaklarının kullanımı ve ulaşılabilirliği henüz yeterli seviyede olmadığı için CO₂ tutulumu ve depolanması ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu amaçla CA enzimlerinin kullanılması, ABD ve Kanada gibi gelişmiş ülkelerde hükümet ve özel girişimciler arasında ilgi odağı olmuştur [125].

New Mexico Teknoloji Enstitüsü (NTMI) ve Amerikan Elektrik Gücü Araştırma Enstitüsü (EPRI), kömürle çalışan bir termik santralin baca gazından CO₂'in CA kullanımı ile tutulması için bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada Ca⁺² içeren yapay deniz suyu

kullanılmıştır. Deniz suyundaki CO₂ miktarında hızla azalma ve CaCO₃ oluşumunda artış rapor edilmiştir [125].

Çok sayıda farklı araştırmacı grup, CA'nın CO₂ tutulumunda kullanımı konusunda araştırmalar yürütmektedir. Mirjafari vd. çözeltilerdeki CO₂'in hidrasyonunu arttırmak için CA kullanımını araştırmıştır. Liu vd. CA varlığında oluşan CaCO₃'ün sudan çöktürülmesin çalışmıştır. Favre vd. kalsiyum karbonat oluşumunda CA'nın kullanımı ile ilgili detaylı bir çalışma yapmıştır [126].

Araştırmalar biyokatalizörlerin yüksek katalitik etkinlik ve yüksek seçicilik gibi avantajlara sahip olduğunu göstermektedir. Ancak uygulamada yüksek maliyet, sınırlı stabilite gibi bazı problemler de vardır. Bu problemleri çözmek için enzimin bir destek üzerinde sabitlenmesi (immobilizasyon) faydalı bir çözüm olarak görülmektedir. Bu şekilde enzimin termal ve işlevsel stabilitesi sağlanır, ürünün uzaklaştırılması ve enzimin geri kazanımı mümkün olur [127]. Farklı canlılardan elde edilen saf CA veya CA'ca zenginleştirilmiş mikroorganizmaların immobilizasyonu için kitosan ve sodyum alginat gibi maddeler kullanımı ile ilgili çalışmalar sürmektedir [128].

1.1.8 Zeytin

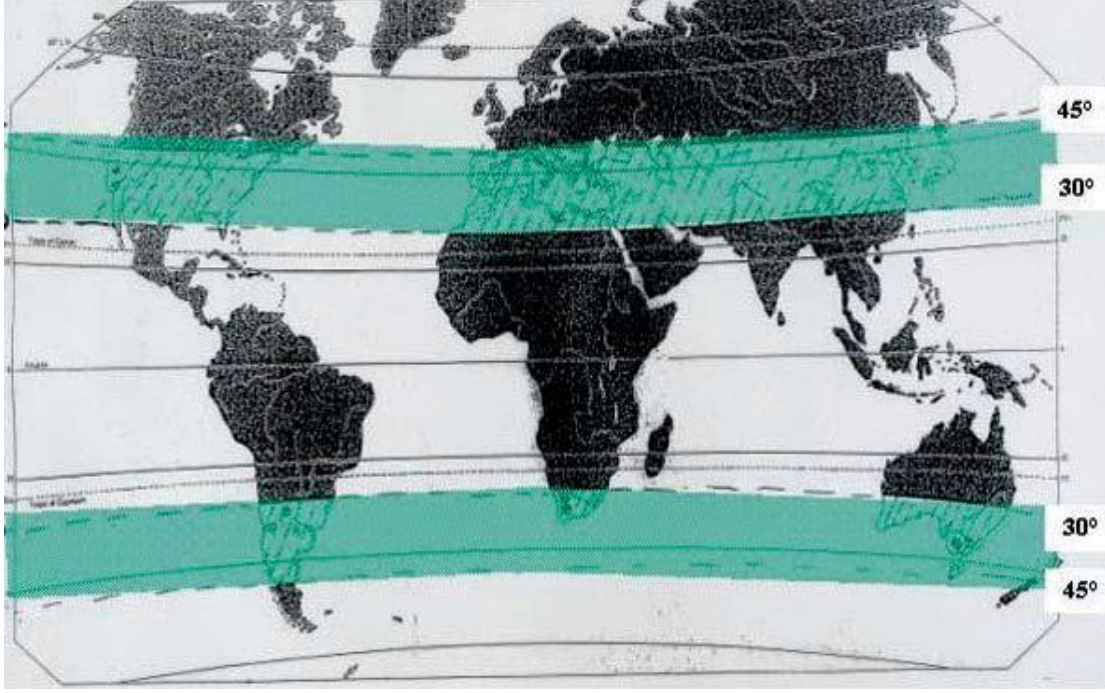
1.1.8.1 Zeytinin Taksonomisi, Yaşam Koşulları ve Yayılış Alanları

Zeytin (*Olea europaea* L.), Oleaceae familyasına dâhil olan *Oleae* cinsine aittir (ayrıntılı sınıflandırma Çizelge 1.3'de gösterilmektedir). Akdeniz Havzası'nın simgesi olan bir ağaçtır ve iki formu bulunur. Biri yabani form olan *Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sylvestris*, diğeri kültür formu olan *Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *europaea*'dır [129]. Yabani ve kültür formları aynı kromozom sayısı sahiptir (2n=46) [130]. Zeytin, *Olea europaea* L. subsp. *oleaster* olarak adlandırılan varyeteden, M.Ö. 4000 yıllarında, Akdeniz havzasının doğusunda ehlileştirilmiş, çeşitli göçlerle doğudan batıya doğru tüm bölgeye yayılmıştır [131]. Yapılan çekirdek, plastid ve mitokondriyal DNA analizleri ve parmak izi profillemeye çalışmaları da *Olea europaea* L. subsp. *europaea*'nın *oleaster*'den kültüre edildiğini göstermektedir [132], [133].

Çizelge 1.3 Zeytinin taksonomisi

Kingdom	<i>Plantae</i>
Subkingdom	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Class	<i>Magnoliopsida</i>
Subclass	<i>Asteridae</i>
Order	<i>Scrophulariales</i>
Familya	<i>Oleaceae</i>
Genus	<i>Olea</i>

Zeytin, 12m'ye kadar uzayabilen ve 8 m'ye kadar yayılabilen, her dem yeşil, 500 yıldan fazla yaşayabilen bir bitkidir. Zeytin yaprakları tanince zengindir ve bu onlara gri-yeşil bir renk verir. Yaprakların sadece alt yüzünde stoma bulunur. Zeytinin başlangıçta yeşil olup olgunlaşınca siyah-mor renge dönüşen, bazı kültürlerde ise yeşil kalan meyvesi botanik olarak drup denilen gruba girer. Meyvenin yüzeyi (ekzokarp) tüy ve stoma içermez. Yenilen kısım etli kısım olan mezokarptır. Çekirdek (endokarp) tohumu çevreler [134].



Şekil 1.6 Zeytinin doğal yayılış alanları

Ilıman iklim bitkisi olan zeytinin doğal yayılışı her iki yarım kürede de 30-45° enlemleri arasındadır (Şekil 1.6). Akdeniz havzası dışında Portekiz, Batı Afrika, ABD, Avustralya, Azerbaycan ve Çin'de kültürü yapılmaktadır [135]. Zeytin gerçek bir dormansiden yoksundur ve kültivasyonu -12°C'nin altındaki sıcaklıklarda yaşayamamasıyla sınırlanmaktadır. -7°C'nin altında yapraklarda ciddi hasar oluşur [136]. Yüksek rakımlar don tehlikesi ve kısa vejetatif süre nedeniyle zeytin yetiştirmeye uygun değildir. Bu nedenle Akdeniz ülkelerinde genelde 800 m üzerinde zeytin yetiştirilmez [137].

Dünya zeytin ağacı varlığının %97'si Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yer almaktadır. Akdeniz'in belli başlı zeytin üreten ülkeleri İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Portekiz, Suriye, Fas ve Cezayir'dir.

Ülkemizde tarihin ilk devrelerinden beri zeytinin kültürü yapılmaktadır. Türkiye'de zeytin üretimi (Çizelge 1.4), Ege, Akdeniz ve Marmara olmak üzere coğrafi konum bakımından başlıca üç bölgede yoğunlaşmıştır. Mevcut zeytinliklerin %75'i engebeli, besin maddeleri yönünden nispeten fakir topraklarda, %25'i ise düz ve hafif meyilli arazilerde bulunmaktadır [138].

Çizelge 1.4 Türkiye’de yıllara göre zeytin üretimi ve ağaç sayısı (Kaynak: TÜİK Tarım İstatistikleri)

	Ağaç sayısı (Bin)			Üretim (Ton)		
	Toplam	Meyve Veren	Meyve Vermeyen	Toplam	Sofralık	Yağlık
1990	86 560	80 600	5 960	1 100 000	337 000	763 000
1995	87 581	81 437	6 144	515 000	206 000	309 000
2000	97 770	89 200	8 570	1 800 000	490 000	1 310 000
2001	99 000	90 000	9 000	600 000	235 000	365 000
2002	101 600	91 700	9 900	1 800 000	450 000	1 350 000
2003	102 750	92 250	10 500	850 000	350 000	500 000
2004	107 100	94 950	12 150	1 600 000	400 000	1 200 000
2005	113 180	96 625	16 555	1 200 000	400 000	800 000
2006	129 265	97 773	31 492	1 766 749	555 749	1 211 000
2007	144 329	104 219		1 075 854	455 385	620 469
2008	151 630	106 139	45 491	1 464 248	512 103	952 145
2009	153 723	109 127	44 596	1 290 654	460 013	830 641
2010	157 156	111 398	45 758	1 415 000	375 000	1 040 000

1.1.9 Zeytin ve Stres

Zeytinler kurak Akdeniz iklimine iyi adapte olmuş, uzun süreli su stresine dayanıklı bitkilerdir [139]. Zeytin, gaz alış verişini azaltıp terlemeyi ve su alımını kontrol ederek, yapraklar ve kök arasında yüksek bir su potansiyel gradiyenti oluşturarak ve Fotosistem II’yi koruyan bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırarak kuraklığa karşı yüksek tolerans gösterir. Ayrıca zeytin yapraklarında da dayanıklılığı arttıran bazı anatomik değişiklikler gerçekleşir. Su eksikliği boyunca yaprak boyutunda küçülme ile beraber yaprak hücrelerinin yoğunluğunda, yaprak tüylerinin sayısında ve stomalarda artış ile beraber yüksek güneş ışığına ve sıcaklığa uyumlu skleromorfik yaprakların oluşumu zeytinde kuraklığa dayanıklılığa katkıda bulunur [140].

Zeytinlikler, yaz kuraklığı ve kaliteli sulama suyu eksikliği ya da buharlaşma yüzünden yüksek seviyede toprak tuzluluğuna maruz kalırlar. Kültivarları arasındaki farklılığa rağmen diğer meyve ağaçlarına kıyasla zeytin tuz stresine daha dayanıklıdır. Büyüyen dokuların zarar görmesi tuzun kök seviyesinde dışarı atılması, sürgüne tuz

transportunun inhibisyonu, toksik iyonların olgun yapraklarda biriktirilmesi ve daha yüksek bir $K^+ : Na^+$ oranı sağlanması ile engellenir [141].

Zeytin ağaçları dormansiye girmediği için düşük sıcaklıklara karşı duyarlıdır [142]. Zeytin organları donmaya farklı düzeyde hassasiyet gösterir. Mancuso (2000) bir laboratuvar deneyinde organları en az hassas olandan en hassasa doğru kök, yapraklar, sürgün ve tomurcuk şeklinde sıralamıştır. Kökler toprağın koruyucu etkisi nedeniyle donmaya nerdeyse hiç maruz kalmazlar. Yapraklardaki hasar şu sırayla görülür: yaprak ayasının aşağı doğru kıvrılması, palizat parankima hücrelerinin ölmesine bağlı renkli noktalar oluşumu, kısmen ya da tamamen kurumayla beraber yaprağın karakteristik kahverengiye dönmesi. Apikal bölgedeki tomurcukların yanması çalimsı bir büyümeye neden olur. Gövde ve dallarda, kabuk ve kambiyum çatlar. Kabuk renksiz hal alırken, odun ise kremden kahverengiye dönük bir renk alır [143].

1.2 Tezin Amacı

CA gen ailesi, bütün canlı gruplarında bulunan bir gen ailesidir. Çeşitli abiyotik streslere maruz kalan canlılarda CA anlatımının arttığına dair bulgular vardır. Zeytinde CA geninin homoloğu, daha önce klonlanmamıştır ve genin tam uzunluktaki dizin bilgisi mevcut değildir. Bu çalışmada soğuk stresine maruz bırakılmış zeytinlerden, CA'nın bitkilerde bulunan formu olan β - CA geninin klonlanması amaçlanmıştır. Klonlama için 3'RACE ve genomik DNA'dan PCR yöntemleri kullanılmıştır. Klonlanan cDNA'lar dizin analizi yaptırılarak zeytin β - CA geninin tam uzunluktaki dizin bilgisinin elde edilmesi hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Zeytin (*Olea europae*) Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen, ekonomik olarak değerli bir bitkidir. Meyveleri besin olarak tüketilmekte ve yağ üretimi için kullanılmaktadır. Bunun dışında enzim kodlayan genlerin bitkinin farklı dokularından klonlanması ve ekspresyonu gibi farklı stratejiler geliştirilerek zeytin temelli kaynaklar biyoteknolojide kullanılabilir. CA enzimi, CO₂ tutulumunda ve ortamdaki CO₂ gazının tespiti için geliştirilen sistemlerde kullanılan bir enzimdir. Zeytin CA enziminin

gelecekte bu sistemlerde kullanılabilmesi mümkün olabilir. Zeytin CA geni ile ilgili bilgiler ileride bu konuda yapılacak çalışmalar için bir ön bilgi oluşturacaktır.

BÖLÜM 2

MATERYAL METOD

2.1 Bitki Materyali

1 yaşındaki *Olea europaea* L. Gemlik Kültürü Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

2.2 Tamponlar ve Çözeltiler

Çizelge 2.1 Tampon ve çözeltiler

Tampon veya çözelti	Yapısı veya hazırlanma şekli
DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su	% 0,1' lik solüsyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.
TE çözeltisi (1 X), pH 8.0	10 mM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM EDTA
Etanol	% 75- 80 stok solüsyonu hazırlandı.
Etidyum bromür stok solüsyonu (EtBr)	5 mg/ml EtBr' e steril deiyonize su ilave edildi.
MOPS (5 X)	0.2 MOPS pH 7, 50 mM NaOAc, 50 mM EDTA ve DEPC' li su bir gece inkübe edildikten sonra otoklavlandı.
RNA loading çözeltisi	1mM EDTA, pH 8.0, % 0.4 bromfenol mavisi ve % 50 gliserol karışımı, DEPC' li su ilave edildi.
dNTP karışımı	20 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı.
EDTA solüsyonu	250 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl karışımı hazırlandı. pH 8.0'e ayarlandı.

Çizelge 2.1 Tampon ve çözeltiler (devam)

TBE çözeltisi (5 X)	54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1 L saf suya tamamlandı.
DNA loading çözeltisi	250 mM Tris-HCl pH 7.5, % 0.2 bromfenol mavisi, % 0.2 ksilen siyanol ve % 40 gliserol karışımı
Ampisillin stok solüsyonu	100 mg/ ml ddSu ilave edildi. Filtreden geçirildi. – 20 °C’ de bekletildi.
X- Gal stok solüsyonu	50 mg 5-bromo-4- kloro-3-indol β - D- galaktosidaz 1 ml DMF(di metil formamid) de çözüldü. Alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C’ ye kaldırıldı.
IPTG stok solüsyonu	1 M (240 mg/ml) izopropanol β -D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20 °C’ de saklandı.

2.3 Moleküler Markerlar

Çizelge 2.2 Moleküler markerlar

RiboRuler high range RNA Ladder	6000 bp, 4000 bp, 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 500 bp ve 200 bp bantları gözlenir.
MassRuler DNA Ladder Low Range	1 X’ lik TBE’ de 1031 bp ile 80 bp arasında toplam 11 bant gözlenir.
PstI ile kesilmiş Lambda	%1’ lik agarozda 11501 bp ile 247 bp arasında toplam 17 bant gözlenir.

2.4 Enzimler

Çizelge 2.3 Enzimler

Taq polimeraz	Qiagen Taq DNA Polymerase
	Fermentas Long PCR Enzyme Mix

2.5 Kitler

Çizelge 2.4 Kitler

RACE kiti	Roche 5'/3' RACE Kit 2nd Generation
mRNA izolasyon kiti	Qiagen Oligotex mRNA Spin- Column
3'RACE kiti	Invitrogen 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends
Genomik DNA izolasyon kiti	Qiagen DNeasy Plant Mini Kit
Jel pürifikasyon kiti	QIAquick Gel Extraction Kit
Ligasyon kiti	Promega pGEM-T Easy Vector Systems
Plazmit izolasyon kiti	Roche High Pure Plasmid Isolation Kit

2.6 Besi Yerleri

2.6.1 Luria Broth (LB)

Çizelge 2.5 LB

Besin çeşidi	Miktarı
Trypton	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 1lt' ye tamamlandı. pH 7'ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 30 dakika otoklavlandı.

Katı LB için sıvı 1L LB'ye 15 g Agar ilave edildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı.

2.6.2 SOB

Çizelge 2.6 SOB

Besin çeşidi	Miktarı
Tripton	10 g
Yeast extract	2,5 g
NaCl	0,292 g
MgCl ₂	1,015 g
KCl	0,093 g

Çizelgedeki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 500mL'ye tamamlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlandı.

SOC için 98 g SOB' ye 2 mL glikoz ilave edildi.

2.7 Oligonükleotidler

Çizelge 2.7 Primerler

Primerin Adı	Primer Dizini
Oligo d(T)-anchor	5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTTTTTTTTTTTTTTTTT - 3'
PCR Anchor	5' -GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C -3'
F1	5'- CCG AAG AAG CGC GCT GGA AGG AAG -3'
F2	5'- AAG AAA CCG GCA GGC CGG AAG AAG TT -3'
CAF1	5'- AAC GGA TGC GCA CTT ACT TC -3'
CAR1	5'- CAG GCT CCA CAG TTC AAA GC -3'
AP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT TTT TTT TTT TTT TTT -3'
AUAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'

2.8 Programlar

2.8.1 Chromas

İnternette indirilebilen bir programdır. Vektör dizilerinin çıkartılması için kullanılmıştır. Dizinler hem FASTA formatında görülebilir hem de kromatogram dosyalarını açar.

2.8.2 Primer 3

İnternet üzerinden kullanılan bir programdır. Primer tasarımı için kullanılmıştır [144].

2.8.3 Blast

NCBI internet sayfası üzerinden kullanılan bir dizin bilgisine benzerlik gösteren dizinleri tespit etmeye yarayan bir programdır [145].

2.8.4 EMBOSS Transeq

Nükleotid dizinlerini karşılıkları olan peptid dizinlerine çeviren internet üzerinden kullanılan bir programdır [146].

2.8.5 BioEdit

İnternet üzerinden ücretsiz indirilip kullanılabilen, dizin hizalama fonksiyonlarına sahip bir programdır.

2.9 Bitki Büyütme Koşulları

Zeytin fidanlarının yaprakları yıkanarak olası zirai ilaç kalıntıları uzaklaştırıldı ve fidanlar temiz saksılara dikildi. Ortam koşullarına uyum sağlamaları için bitkiler bir hafta süreyle 22 °C'de, 14 saat gündüz / 15 °C'de, 10 saat gece periyodunda, gündüz 150 $\mu\text{mol M}^2\text{s}^{-1}$ ışık, gece ise karanlık olacak şekilde tutuldu.

Bir haftanın sonunda, 4 °C'de, 14 saat gündüz / 2 °C'de, 10 saat gece periyodunda, gündüz 150 $\mu\text{mol M}^2\text{s}^{-1}$ ışık, gece ise karanlık olacak şekilde 10 gün süreyle soğuk stresi verildi.

2.10 Bitki Örneklerinin Alınması

Bir haftalık büyüme sonunda, stres verilmeden hemen önce bitkiden yaprak örneği alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80 °C'de saklandı. Daha sonra sırası ile 15 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, bir gün, bir hafta ve on gün sonunda yaprak örnekleri alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80 °C'de saklandı.

2.11 RNA İzolasyonu

2.11.1 RNA İzolasyonu İçin Hazırlık

RNA molekülleri nükleotidlerdeki riboz molekülünün OH grubu nedeniyle biyolojik ortamlarda fazlaca bulunan ribonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır. Bu nedenle RNA izolasyonundan önce ortamdaki RNaz'ların uzaklaştırılması için Applichem DEPC solüsyonu kullanıldı.

RNA izolasyonundan önce kullanılacak havan ve havaneleri, tüm cam ve plastik malzemeler % 0,1'lik DEPC'li su içerisinde bir gece bekletildi, daha sonra 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Yine benzer şekilde, izolasyonda kullanılacak Tris dışındaki tüm solüsyonlara ve saf suya % 0,1 oranında DEPC ilave edildi. Bir gece boyunca bekletilip 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı. Tris, önceden DEPC ile muamele edilip otoklavlanmış çift distile suda hazırlandı.

2.11.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örnekleri, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde toz haline getirilerek, 2 ml'lik ependorf tüpüne alındı. Her 100 mg örnek için 1 ml Trizol Reagent (bitki ağırlığının % 10' u olacak şekilde) ilave edildi. Nükleoprotein komplekslerinin ayrışması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler kabaca vortekslendi. 1 ml Trizol Reagent için 0,2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2- 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra 12000 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda tüpün içindeki karışım, alt kırmızı faz, interfaz ve renksiz üst faz olmak üzere üçe ayrıldı. RNA üst fazdaydı. Üstteki faz ayrı bir tüpe alınarak 1 ml Trizol Reagent için 0,5 ml olacak şekilde izopropanol eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında

inkübe edildikten sonra üst faz alınarak, 12000 xg hızda 4 °C' de 20 dakika santrifüjlendi.

RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml Trizol Reagent için 1 ml %75'lik etanol eklenip, 7500 xg hızda 4 °C' de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dökülüp pellet şeffaf görününceye kadar kurutuldu. Kuruyan pellet 100 µl DEPC'li su içerisinde çözülerek, 65 °C' de 10 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen örnekler -80 °C' de saklandı.

2.11.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Trizol kullanılarak izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. RNA'ların konsantrasyonları $OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{sulandırma faktörü}$ formülüyle hesaplandı.

2.12 RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi

2.12.1 Formaldehit Jeli Hazırlanması

Tüm elektroforez aparatları DEPC'li su ile yıkanarak temizlendi. % 1'lik jel hazırlamak için 0,8 gram Agaroz (Applichem), 16ml 5X MOPS, 50 ml su ile çözüldü, 60 °C'ye soğutuldu. İçerisine 60 °C'ye ısıtılmış 14 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü.

2.12.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması

4,5 µl RNA'ya, 2 µl 5X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 1 µl Etidyum bromür ilave edilerek, 55 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Bu karışıma 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Total RNA'lar MOPS tamponuyla hazırlanmış % 1'lik Agaroz jelde 60 V'da 90 dakika yürütüldü.

2.12.3 Total RNA'dan mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu Oligotex mRNA Spin- Column Protokolü kullanılarak yapıldı. Bitki örneklerinden çıkarılan total RNA'lar, toplam miktar 0,25- 0,50 mg ve son hacim 500 µl

olacak şekilde 500 µl RNaz içermeyen su, 30 µl Oligotex süspansiyonu ve 500 µl OBB tamponu ile karıştırılarak mRNA izolasyonunda kullanıldı.

Sekonder yapıların yok edilmesi için RNA çözeltisi, 70 °C' de 5 dakika ve 25 °C' de 10 dakika inkübe edildikten sonra 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra pellet 2 defa 500 µl OW 2 tamponu ile yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 2 dakika Small Spin Column'da santrifüjlendi. Üst sıvı döküldükten sonra kolonda kalan mRNA'lar, 70 °C' de bekletilen 10 µl OEB tamponu ile 2 defa yıkandı ve 18000 xg hızda 20 °C' de 1 dakika santrifüjlenerek 1. ve 2. elüsyonlar oluşturuldu. Oluşturulan mRNA elüsyonları -80 °C' de saklandı.

2.12.4 mRNA Spot Testi

mRNA miktarını belirlemek amacıyla, 0.25 g Agaroz, 20 ml DEPC'li su ile çözüldü, 60 °C'ye soğutuldu. İçerisine 3 µl Etidyum Bromür eklenerek jel tepsisine döküldü.

Kontrol RNA' sı (1µg/ 1µl) 2,5, 5, 25 ve 50 kez sulandırılarak, sırası ile 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 10 ng ve 5 ng'lık sulandırma serileri oluşturuldu. Jele 1 µl spotlandı. İzole edilen 1. ve 2. elüsyon mRNA'larda jele 1µl spotlandı. Örnekler jel üzerine damlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Elde edilen fotoğraf üzerindeki kontrol RNA'sının UV görünürlüğü göz önüne alınarak miktar hesabı yapıldı.

2.13 RT PCR

2.13.1 cDNA Sentezi

Stres verilmemiş, 1 günlük ve 10 günlük soğuk stresi verilmiş RNA'lardan Roche RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde 0,2 µg mRNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. mRNA'ya oligo d(T) primer (1,775mM), dNTP karışımı (0,5mM) ve su eklenip, 65 °C'de 10 dakika ve 4 °C'de 1 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun üzerine, 5x İlk Zincir Tamponu ve 25U Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 55 °C'de 90 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

2.13.2 PCR Reaksiyonu

200 µl'lik PCR tüpü içerisinde, 1 µl kalıp cDNA, 10x Qiagen PCR Buffer, 5x Q Solution, dNTPs (250 µM), forward primer (250 µM) ve PCR Anchor primer (250 µM) primer, 2,5U Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) koyulup, 50 µl'ye tamamlandı.

Farklı primer bağlanma sıcaklıklarında iki PCR gerçekleştirildi.

1. PCR döngüsü şöyledir. 94 °C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C'de 15 saniye denatürasyon, 52 °C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20 °C de saklandı.

2. PCR döngüsü ise şöyledir. 94°C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 56 °C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp, -20 °C'de saklandı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

2.13.3 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analiz

%1'lik jel hazırlamak için 0,8 g Agaroz (Aplichem), 80 ml 1X TBE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60°C'ye soğutulup içersine etidyum bromür eklenerek jel tepsisine döküldü.

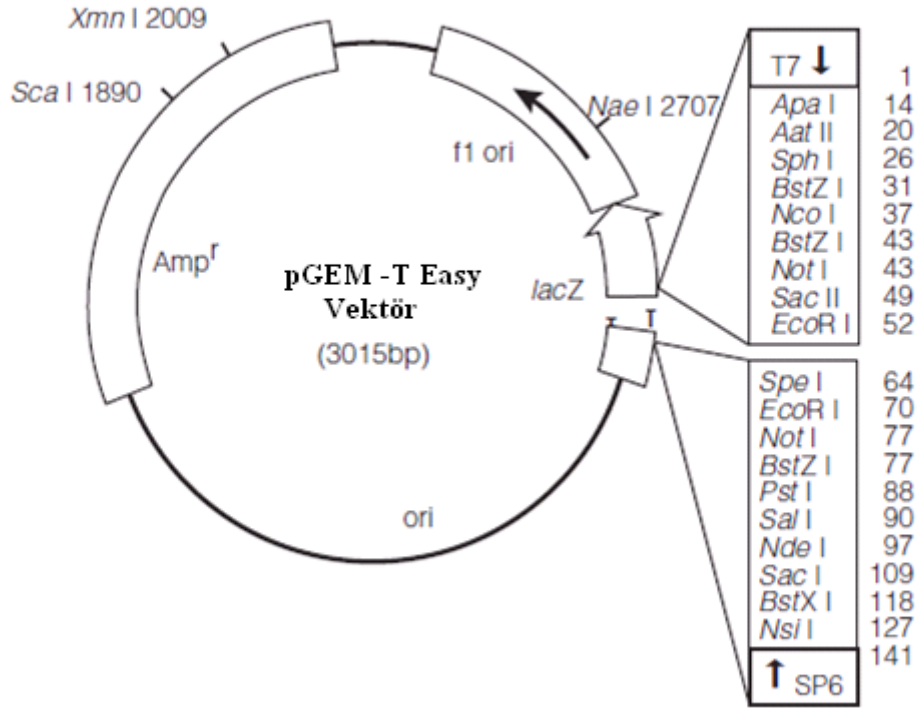
Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70 V'ta 80 dakika yürütüldü.

2.13.4 PCR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu

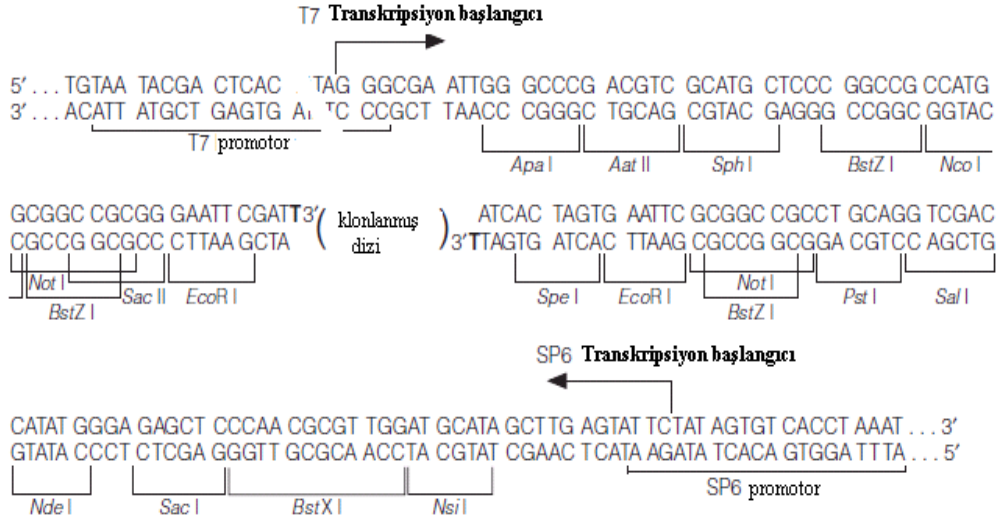
PCR ürünlerinin pürifikasyonu Qiaquick Jel Ekstraksiyon Kiti ile kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde yapıldı. Fragman agaroz jelden bisturi yardımı ile kesilip 2 ml'lik tüplere alındı. Jel hacminin 3 katı kadar QG tamponu eklenip 50 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Jel hacmi kadar izopropanol eklendi ve karıştırıldı. QIAquick kolonlarına aktarılarak 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. 0,5 ml QG tamponu eklenip 17900 xg hızda santrifüj edildi. 0,75 ml PE tamponu eklenip 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. QIAquick kolonları 1,5 ml'lik temiz tüplere alınarak 30 µl steril su eklenerek 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi.

2.13.5 Vektör Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. pGEM-T Easy vektörünün Şematik gösterimi Şekil 2.1 de ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 2.2’de verilmiştir (Promega Vektör Kullanım Kılavuzu).



Şekil 2.1 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi



Şekil 2.2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi

Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi vektör DNA'sı ile cDNA oranları 1/3 ve 1/2 arasında olacak şekilde hazırlandı. Ligasyonlar, 4 °C'de 24 saat inkübe edildi.

2.13.6 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Ultra kompetan hücreler Inoue ve arkadaşlarının (1990) optimize ettiği protokoldeki gibi hazırlandı. 250ml SOB içersine 5–10 *E.coli* DH5α kolonisi ekilerek 22 °C'de 20–24 saat kadar OD₆₀₀ 6,6'ya ulaşana kadar büyütüldü. 10 dakika buzda bekletildikten sonra 3000xg hızda 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi. 80 ml soğuk TB içersinde çözülüp, 10 dakika buzda bekletildi. 3000 xg hızda 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra 20 ml soğuk TB içersinde çözülüp % 7 si kadar DMSO ilave edildi. 10 dakika buzda bekletilip sıvı azot ile dondurularak -80 °C'de saklandı.

2.13.7 Transformasyon

2.13.7.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması

2.16'da anlatıldığı şekilde hazırlanan ultra kompetan hücrelerden 200 µl'si ile vektöre bağlanmış DNA dan 5 µl'si karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 42 °C' de 1 dk tutulduktan sonra buzun üzerine alınarak 300 µl SOC ilave edilerek, 37 °C'de 250 rpm hızda 1 saat büyütüldü.

Transformasyon karışımı katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37 °C'de 16 saat büyütüldü. Katı besi yerleri içine plazmit almış kolonilerin seçimi için 100 µg/ml ampisilinle ve rekombinant plazmitlerin seçimi için 0,5mM IPTG ve 30 µg/ml X- gal içermekteydi.

Mavi renkte gözlemlenen koloniler içlerine cDNA almadan kapanmış plazmitleri bulunan hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise cDNA'ları alarak kapanmış plazmitler bulunan hücrelerden oluşmaktaydı.

2.13.7.2 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA'yı taşıyıp taşımadıkları kontrol etmek amacı ile koloniler kürdanla alınarak 50 µl su içersinde çözülür. 100 °C'de 10 dakika tutulduktan sonra, 1,5 µl'si kalıp olarak kullanıldı. 10x Qiagen PCR Buffer, 5x Q Solution, dNTPs (0,625 mM), forward primer (0,625 mM) ve reverse primer (0,625 mM) primer, 2,5U Taq Polimeraz enzimi (5U/ µl) koyulup 50 µl'ye tamamlandı.

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek ekilerek, 37 °C'de 16 saat büyütüldüler.

2.13.8 Plazmit İzolasyonu

2.13.7.2'de anlatıldığı biçimde belirlenen kolonilerde büyüme görülürse, ampisilin (100 µg/ml) içeren 3ml Luria-Bertani 37 °C'de 250 RPM hızda 16 saat büyütüldü. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı.

2 ml kültür santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü, üzerine RNaz içeren Süspansiyon çözeltisinden 250 µl ilave edilerek hücreler yeniden çözüldü. 250 µl Liziz çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 350 µl Binding çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 13000 xg hızda 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant filtrelere pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı atıldı. Yüksek nükleaz aktivitesini engellemek için, filtrelere 500 µl Yıkama Çözeltisi I pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Hücreleri yıkamak için filtrelere 700 µl Yıkama Çözeltisi II pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı atıldı ve filtre kurutulmak için 13000 xg hızda 1 dakika santrifüjlendi. DNA'yı filtreden ayırmak için filtre temiz tüpe alınıp, üzerine 100 µl elüsyon çözeltisi eklenip 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpe geçen DNA -20°C de saklandı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

2.14 3'RACE

2.14.1 cDNA Sentezi

Kontrol, 1 haftalık ve 10 günlük soğuk stresi verilmiş RNA'lardan Invitrogen 3'RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı cDNA sentezi yapıldı. 4 µg total RNA steril su ile 11 µl'ye tamamlandı ve AP primeri (500nM) eklendi. 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi. 10x PCR Buffer, MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (500µM), DTT (10 mM) eklenip 42 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyona 200 U Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 42 °C'de 90 dakika ve 70 °C'de 15 dakika inkübe edildi. 2 U RNase H eklenerek 20 dakika 37 °C'de inkübe edildi.

2.14.2 PCR Reaksiyonu

200 µl'lik PCR tüpü içerisinde 2 µl kalıp cDNA, 10x Qiagen PCR Buffer, 5x Q Solution, dNTPs (200 µM), CAF1 primer (200 nM) ve AUAP primer (200 nM), 2,5U Taq Polimeraz enzimi koyulup, 50 µl'ye tamamlandı.

PCR döngüsü 94 °C de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C 15 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20 °C'de saklandı.

2.14.3 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik jel 2.13.3'te anlatıldığı gibi hazırlandı.

2.14.4 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Pürifikasyonu

PCR ürünlerinin pürifikasyonu 2.13.4'te anlatıldığı şekilde yapıldı.

2.14.5 Vektör Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu 2.13.5'te anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.14.6 Transformasyon

Transformasyon 2.13.7'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.14.7 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu 2.13.8'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

2.15 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu DNeasy Plant Mini Kit kullanım kılavuzunda anlatıldığı biçimde yapıldı.

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örneği, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içersinde toz haline getirilerek 2 ml'lik mikro santrifüj tüpüne alındı. 100 mg örnek için 400 µl Buffer AP1 ve 4 µl RNase A ilave edilerek vortekslendi. 10

dakika 65 °C'de inkübe edildi. 130 µl Buffer AP2 eklenip 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi. 5 dakika 20000 xg hızda santrifüjlendi. Süpernatant QIA shredder kolonlara pipetle aktarıldı ve 2 dakika 20000 xg hızda santrifüjlendi. Süzüntü yeni tüplere alınarak 1,5 katı kadar Buffer AP3/E eklenip pipetlenerek karıştırıldı. Karışım DNeasy Mini Kolonlara aktarıldı ve 1 dakika 6000 xg hızda santrifüjlendi. DNeasy Mini Kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi ve 500 µl Buffer AW eklenip, 1 dakika 6000 xg hızda santrifüjlendi. Tüplerdeki sıvı atıldı ve kolonlara tekrar 500 µl Buffer AW eklenip, 2 dakika 20000 xg hızda santrifüjlendi. Kolonlar, yeni eppendorflara alındı, üzerlerine 100 µl su eklenip, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilip, 6000 xg hızda 1 dakika santrifüjlenerek DNA'ların eppendorflara geçmesi sağlandı. Elde edilen DNA -20°C de saklandı.

2.15.1 Genomik DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik agaroz jel daha önce 2.13.3'te anlatıldığı biçimde hazırlanarak örnekler 80 dakika 70 V'ta yürütüldü.

2.15.2 Genomik DNA'dan PCR

1'er ve 1,5'ar µl genomik DNA kalıp olarak kullanılarak ve farklı enzimlerle PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

- 200 µl'lik PCR tüpü içerisinde 1/1,5 µl genomik DNA, Qiagen 10x PCR Tampon, 5x Q Solüsyonu, dNTPs (200 µM), CAF1 primeri (200 nM) ve CAR1 primeri (200 nM), 2,5U Taq Polimeraz enzimi koyulup, 50 µl'ye su ile tamamlandı.

-200 µl'lik PCR tüpü içerisinde 1/1,5 µl genomik DNA, Fermentas 10x Uzun PCR Tamponu, 500nM MgCl₂, dNTPs (200 µM), CAF1 primeri (200 nM) ve CAR1 primeri (200 nM), 2,5U Uzun PCR enzim karışımı koyulup, 50 µl'ye su ile tamamlandı.

-200 µl'lik PCR tüpü içerisinde 1/1,5 µl genomik DNA, Fermentas 10x Uzun PCR Tamponu, 500nM MgCl₂, dNTPs (200 µM), %5 DMSO, CAF1 primeri (200 nM) ve CAR1 primeri (200 nM), 2,5U Uzun PCR enzim karışımı koyulup, 50 µl'ye su ile tamamlandı.

PCR döngüsü 94 °C de 18 dakika denatüre edildikten sonra, 94 °C 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 2 dakika uzatma

aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72 °C 'de 10 dk son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20 °C'de saklandı.

2.15.3 Genomik DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik agaroz jel daha önce 2.13.3'te anlatıldığı biçimde hazırlanarak örnekler 80 dakika 70 V'ta yürütüldü.

2.15.3.1 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Pürifikasyonu

PCR ürünlerinin agaroz jelden pürifikasyonu 2.13.4'da anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.15.4 Vektör Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanılarak 2.13.5'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.15.4.1 Transformasyon

Transformasyon 2.13.7'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

2.15.4.2 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu 2.13.8'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Dizin analizine gönderilmeden önce çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

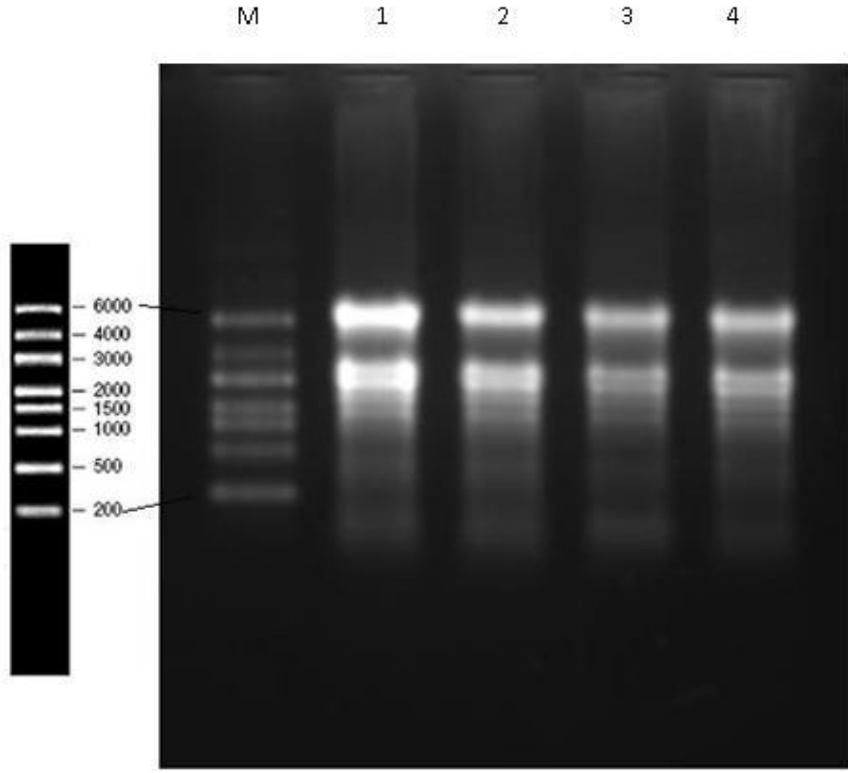
3.1 Sonuçlar

3.1.1 Bitki Örneklerinin Alınması

Bitkilere stres verilmeden önce yaprak örnekleri alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Örnek alınmasından sonra bitkilere 2.9'da belirtilen stres koşulları uygulandı. 15 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 12 saat, bir gün, bir hafta ve on gün örnekleri alınarak sıvı azot içerisinde donduruldu ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.1.2 RNA İzolasyonu

Yapraklardan RNA izolasyonu 2.11.2 'de anlatıldığı biçimde yapıldı. %1'lik RNA jeline yüklenerek (Şekil 3.1) kalitesi belirlendi.

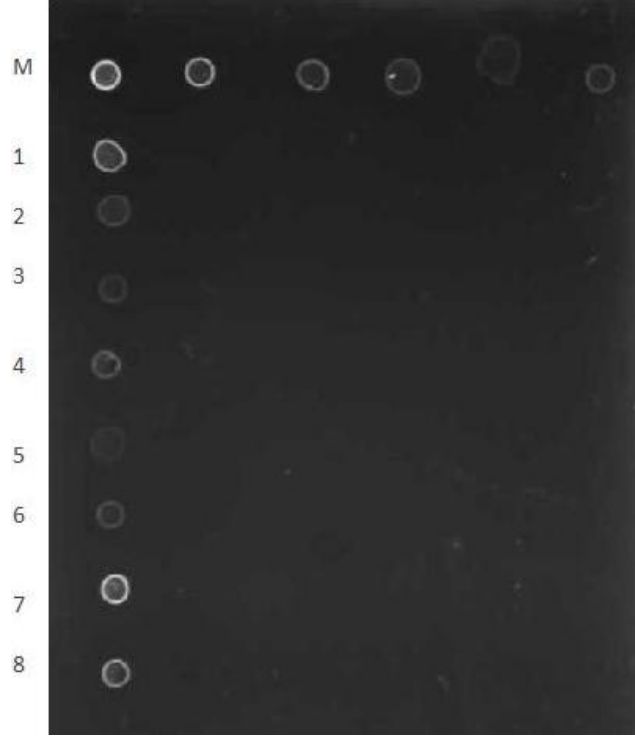


Şekil 3.1 RNA'ların %1'lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi

M: High Range RNA Ladder, 1. Kontrol RNA örneği, 2. 1 gün soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 3. 1 hafta soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 4. 10 gün soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı

3.1.3 Total RNA'dan mRNA İzolasyonu

Total RNA'dan mRNA izolasyonu 2.12.3'te anlatıldığı şekilde yapıldı. mRNA'ların miktarı spot testi (Şekil 3.2) ile 2.12.4'te anlatıldığı şekilde belirlendi.



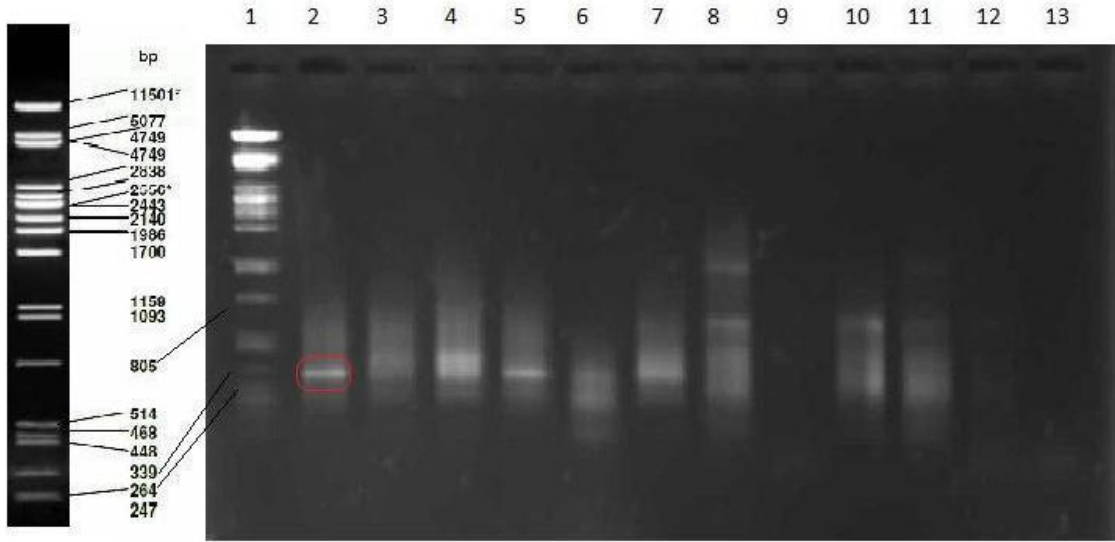
Şekil 3.2 mRNA spot testi

M. Referans mRNA 50 ng/µl, 25 ng/µl, 12,5 ng/µl, 10 ng/µl, 7,5 ng/µl, 5 ng/µl; 1. Kontrol örneği mRNA'sı 1. elüsyon, 2. Kontrol örneği mRNA'sı 2. elüsyon, 3. 1 gün soğuk stresi verilmiş örnek mRNA'sı 1. elüsyon, 4. 1 gün soğuk stresi verilmiş örnek mRNA'sı 2. elüsyon, 5. 1 hafta soğuk stresi verilmiş örnek mRNA'sı 1. elüsyon, 6. 1 hafta soğuk stresi verilmiş örnek mRNA'sı 2. elüsyon, 7. 10 gün soğuk stresi örnek mRNA'sı 1. elüsyon, 8. 10 gün soğuk stresi verilmiş örnek mRNA'sı 2. elüsyon.

3.1.4 RT PCR ile İlgili Sonuçlar

3.1.4.1 PCR Ürünlerinin Analizi

2.13.1'de anlatıldığı şekilde sentezlenen kontrol, 1 gün, 1 hafta ve 10 gün cDNA'ları kullanılarak 2.13.2'de belirtilen koşullarda yapılan PCR'ın ürünleri %1'lik Agaroz jele yüklenerek, kalite ve büyüklüğü kontrol edildi. Bunlardan F1 ve PCR Anchor primerleriyle 52°C ve 56 °C primer bağlanma sıcaklığında kontrol RNA; 56 °C primer bağlanma sıcaklığında 10 günlük stres verilmiş RNA kullanılarak kurulan reaksiyonlar en iyi sonucu vermiştir ve yaklaşık 300 bp boyunda bir DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü

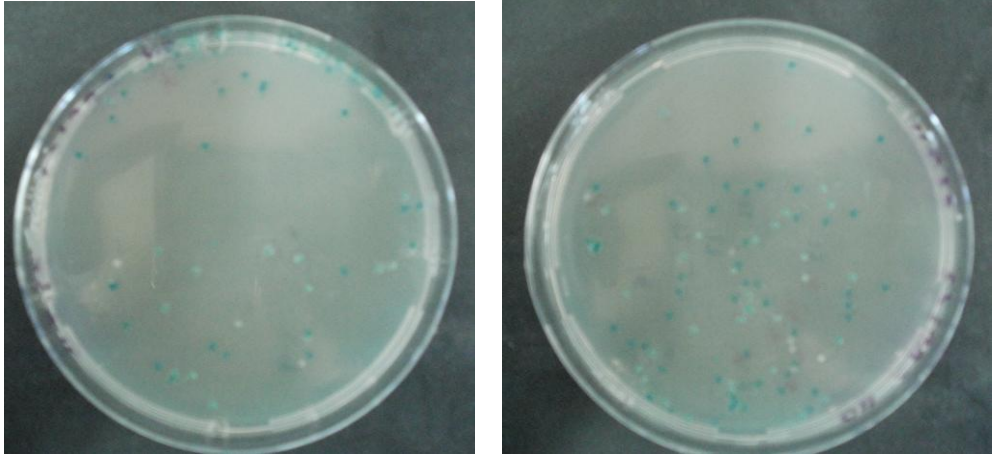
1. PstI ile kesilmiş Lambda DNA, 2. F1 ile kontrol örneği (52°C primer bağlanma sıcaklığında), 3. F1 ile 1 günlük stres verilmiş örnek (52°C primer bağlanma sıcaklığında), 4. F1 ile 10 günlük stres verilmiş örnek (52°C primer bağlanma sıcaklığında), 5. F1 ile kontrol örneği (56°C primer bağlanma sıcaklığında), 6. F1 ile 1 günlük stres verilmiş örnek (56°C primer bağlanma sıcaklığında), 7. F1 ile 10 günlük stres verilmiş örnek (56°C primer bağlanma sıcaklığında), 8. F2 ile kontrol örneği (52°C primer bağlanma sıcaklığında), 9. F2 ile 1 günlük stres verilmiş örnek (52°C primer bağlanma sıcaklığında), 10. F2 ile 10 günlük stres verilmiş örnek (52°C primer bağlanma sıcaklığında), 11. F2 ile kontrol RNA örneği (56°C primer bağlanma sıcaklığında), 12. F2 ile 1 günlük stres verilmiş örnek (56°C primer bağlanma sıcaklığında), 13. F2 ile 10 günlük stres verilmiş örnek (56°C primer bağlanma sıcaklığında).

3.1.4.2 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren kontrol örnekleri ve 10 günlük stres verilmiş örnekler 2.13.5'te anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

3.1.4.3 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 µl'si 2.13.6'da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 µl kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Mavi beyaz seçilimi (Şekil 3.4) için antibiyotik (100 µg/ml), IPTG (0,5mM) ve X- gal (30 µg/ml) ilave edilmiş katı Luria-Bertani ortamına ekilerek 37 °C 'de 16 saat büyütüldü.

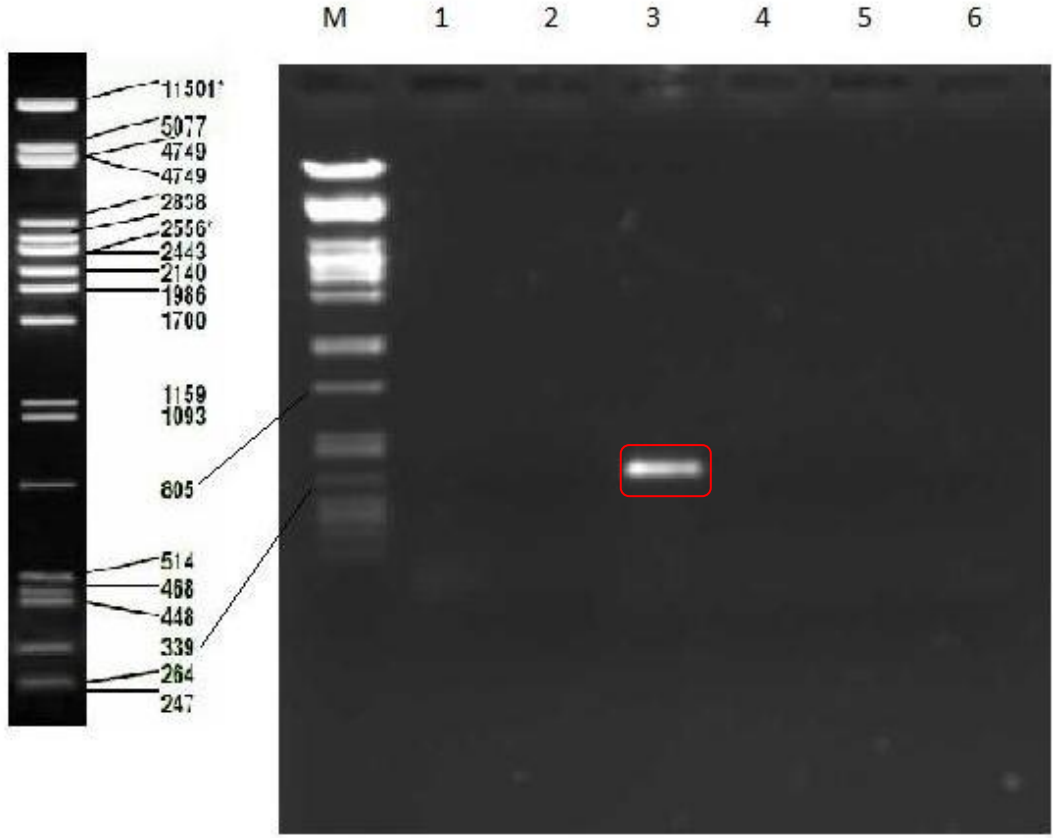


Şekil 3.4 Mavi beyaz seçilimi

16 saat sonunda, stres verilmemiş F1 52°C'nin transformasyonunda 2 beyaz koloni, stres verilmemiş F1 56°C'nin transformasyonundan 4 beyaz koloni elde edildi.

3.1.4.4 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA'yı taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için, 2.13.7.2'de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde kontrol edildi. Koloni kontrol PCR'ında sadece F1 primeri ile yapılan 56°C kontrol örneğinin pozitif olduğu görüldü.



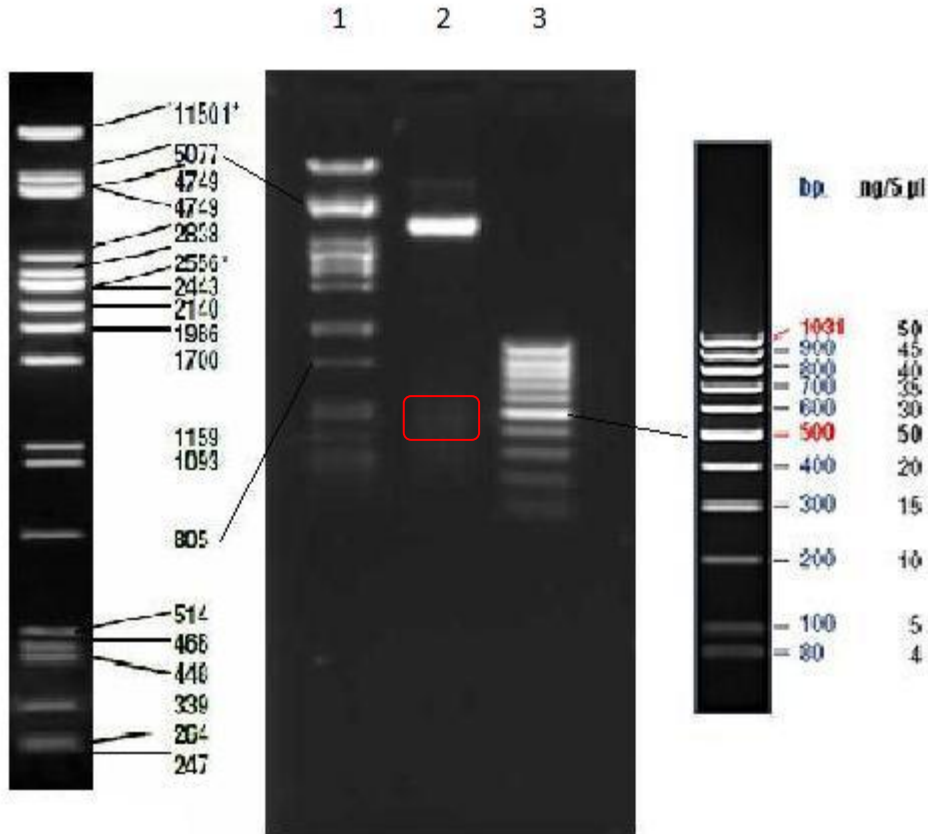
Şekil 3.5 Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCR'ın jel üzerinde görüntüsü.

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1. ve 2. kontrol örneği F1 52°C koloni kontrol PCR, 3., 4., 5. ve 6. kontrol örneği F1 56°C koloni kontrol PCR.

3.1.4.5 Plazmit İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen koloniden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.13.8'de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

İzole edilen plazmitler PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek lineer hale getirildi.



Şekil 3.6 PstI ve EcoRI enzimleri ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü

1. PstI ile kesilmiş λ DNA, 2. PstI ve EcoRI ile kesilmiş plazmit, 3. Low Range DNA Ladder.

3.1.4.6 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

İstenilen DNA'yı içerdiği tespit edilen plazmit OCA olarak adlandırıldı ve İontek firmasına dizin analizi yapılması için yollandı. Dizin analizi sonucunda 392 bp uzunluğunda bir dizin elde edildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 OCA nükleotid ve aminoasit dizini

F1 primeri																
1	TCC	GAA	GAA	GCG	CGC	TGG	AAG	GAA	GCA	GTG	AAT	GTA	TCA	CTT	GGG	45
1	S	E	E	A	R	W	K	E	A	V	N	V	S	L	G	15
46	AAC	CTG	CTG	AGT	TAT	CCA	TTT	GTT	AGA	GAA	GGA	TTG	GTG	AAG	AAA	90
16	N	L	L	S	Y	P	F	V	R	E	G	L	V	K	K	30
91	ACT	TTG	GCG	CTA	AAG	GGA	GGA	TAT	TAT	GAT	TTT	GTA	AAA	GGA	AGC	135
31	T	L	A	L	K	G	G	Y	Y	D	F	V	K	G	S	45
136	TTT	GAA	CTG	TGG	AGC	CTG	GAA	TTT	GGT	CTT	TCT	AGA	TCA	GTC	TCT	180
46	F	E	L	W	S	L	E	F	G	L	S	R	S	V	S	60
181	GTA	TGA	ACA	AAT	TAA	TCT	CTG	TTC	CCT	ATG	AAG	TTT	TTA	ATG	TCA	225
61	V	*	T	N	*	S	L	F	P	M	K	F	L	M	S	75
226	CAA	AAA	TGT	ATT	TTA	ACG	ATA	TGT	GTA	ATG	GAG	AAC	AAT	TGT	GTC	270
76	Q	K	C	I	L	T	I	C	V	M	E	N	N	C	V	90
271	ATC	CTT	AAT	TTC	TTG	TAA	TAA	ATT	CAG	AAA	TTG	TAT	TTT	CTG	ATA	315
91	I	L	N	F	L	*	*	I	Q	K	L	Y	F	L	I	105
316	ATT	AAT	AAA	TAA	AAA	CAG	CAT	CCC	AGT	TTT	ATT	TAA	AAA	AAA	AAA	360
106	I	N	K	*	K	Q	H	P	S	F	I	*	K	K	K	120
PCR anchor primeri																
361	AAA	AAA	GTC	GAC	ATC	GAT	ACG	CGT	GGT	CAA	390					
121	K	K	V	D	I	D	T	R	G	Q						

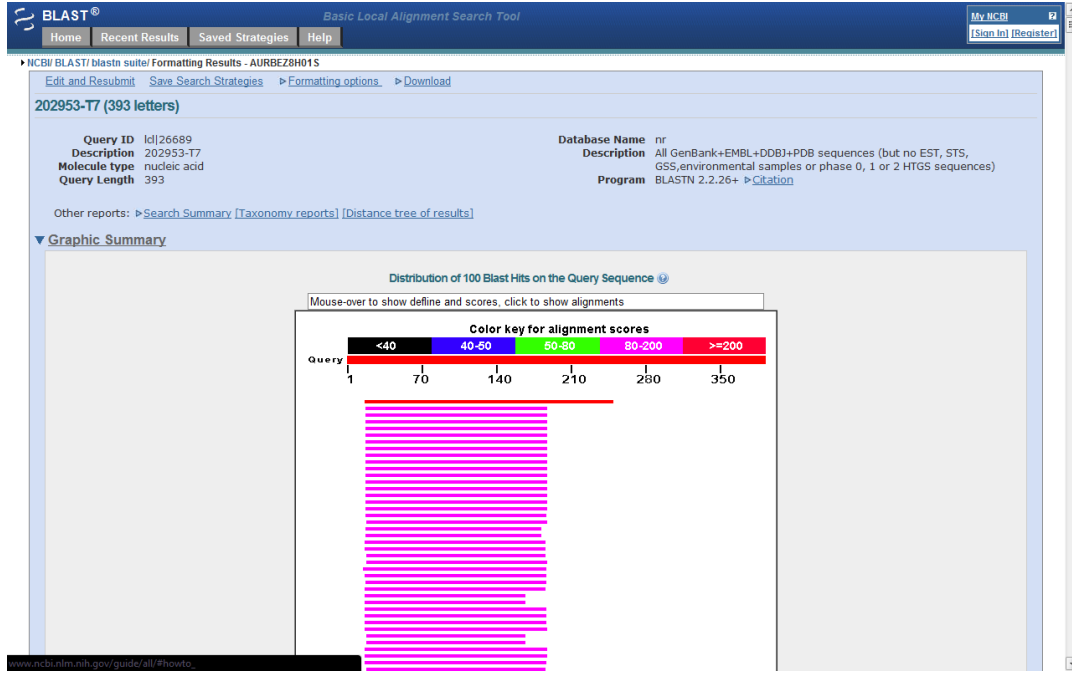
Elde edilen DNA dizininin GenBank veritabanında kaydedilmiş dizilere benzerliklerinin ve olası fonksiyonlarının belirlenmesinde BLAST programı NCBI web sitesinden kullanıldı [146]. BLAST programı yaygın olarak kullanılan dizi benzerlik sorgulaması programıdır. CHROMAS programı ile vektör dizileri çıkarılan dizinin BLASTN (nükleotid veritabanlı benzerlik araştırması) ve BLASTP (aminoasit veritabanlı benzerlik araştırılması) analizi yapıldı.

BLASTN analizlerinin sonuçları üç bölüm halindedir. Birinci bölüm (Şekil 4.7 A), dizinin özelliği hakkında bilgi verir ve benzerlik skorunu grafiksel olarak gösterir.

İkinci bölüm (Şekil 4.7 B), incelenen dizi ile benzerlik gösteren sekansları ve bu sekansların analiz sonuçlarını verir. Analiz sonuçlarında; veritabanındaki dizilerin tanınmasını sağlayan numaralar (Accession number), benzerlik gösteren dizinin fonksiyonuna ve ait olduğu organizmaya ait bilgi (Description), karşılaştırılan dizilerin uzunluk anlamında ne derece birbirlerini kapsadıkları (Query Coverage), karşılaştırılan dizilerin bir pozisyonda aynı nükleotide sahip olmasının rastlantısal olabilme durumu

(E- value terimi), birbirleri arasında benzerlik tespit edilen diziler arasındaki homolojinin derecesi (Maximum Identity) belirtilir.

Üçüncü bölüm (Şekil 4.7 C) ise benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotid düzeyinde benzerliklerini verir.



A

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene, GEO, Gene, Structure, Map Viewer, PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
qi 295798040 FN614304.1	Olea europaea partial mRNA for carbonic anhydrase (ca ge	414	414	59%	3e-112	99%	
qi 349731537 FQ394658.1	Vitis vinifera clone SSOAFA1Y115	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349730861 FQ394183.1	Vitis vinifera clone SSOAFA22YD04	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349727542 FQ394038.1	Vitis vinifera clone SSOAFA22Y010	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349724478 FQ393428.1	Vitis vinifera clone SSOAFA26YB01	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349724443 FQ393393.1	Vitis vinifera clone SSOAFA26YD15	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349715961 FQ391968.1	Vitis vinifera clone SSOAFA8YD21	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349711243 FQ396309.1	Vitis vinifera clone SSOAFA10Y113	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349710576 FQ396239.1	Vitis vinifera clone SSOAFA10Y015	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349710565 FQ396228.1	Vitis vinifera clone SSOAFA11YA24	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349710561 FQ396224.1	Vitis vinifera clone SSOAFA11YB09	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349709758 FQ396018.1	Vitis vinifera clone SSOAFA12Y112	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349708235 FQ395693.1	Vitis vinifera clone SSOAFA14YJ02 >gi 349730852 emb FQ3	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349708133 FQ395591.1	Vitis vinifera clone SSOAFA15YC08	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349708121 FQ395579.1	Vitis vinifera clone SSOAFA15YD07	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349706607 FQ395238.1	Vitis vinifera clone SSOAFA16YP06	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349706566 FQ395197.1	Vitis vinifera clone SSOAFA17YD16	174	174	43%	4e-40	82%	
qi 349714762 FQ380262.1	Vitis vinifera clone SSOACG8YM04	172	172	43%	1e-39	82%	
qi 147821885 AM467689.2	Vitis vinifera contig VV78X207576.2, whole genome shotgur	172	172	43%	1e-39	82%	
qi 349715193 FQ380495.1	Vitis vinifera clone SSOACG55YJ20	163	163	41%	9e-37	81%	
qi 225452451 NM_002727921.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC1002491	163	163	41%	9e-37	81%	U G M
qi 4754914 AF132855.1	Gossypium hirsutum carbonic anhydrase isoform 2 (CA2) mR	163	163	43%	8e-37	81%	U
qi 4754912 AF132854.1	Gossypium hirsutum carbonic anhydrase isoform 1 (CA1) mR	163	163	43%	8e-37	81%	U
qi 205028801 AF482951.1	Gossypium hirsutum Acala carbonic anhydrase (CAH2) gene	159	159	42%	9e-36	80%	
qi 46879218 AC124951.19	Medicago truncatula chromosome 6 clone mth2-7p23, comp	158	158	43%	3e-35	80%	
qi 62865756 AY974608.1	Nicotiana benthamiana clone 30F62 chloroplast carbonic an	152	152	43%	1e-33	79%	
qi 62865754 AY974607.1	Nicotiana benthamiana clone 30C84 chloroplast carbonic an	150	150	43%	5e-33	79%	
qi 33958978 JN032701.1	Dimocarpus longan chloroplast carbonic anhydrase (CA) mR	149	149	43%	2e-32	79%	
qi 3061270 AB012863.1	Nicotiana paniculata mRNA for NPCA1, complete cds	149	149	43%	2e-32	79%	
qi 225319101 AK19649.1	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1092DE06, HTC in	147	147	38%	6e-32	81%	U G U
qi 350537678 NM_001247119.1	Solanum lycopersicum carbonic anhydrase (ca2), mRNA >gi	147	147	38%	6e-32	81%	
qi 8096276 AB009887.1	Nicotiana tabacum mRNA for carbonic anhydrase, partial cd	147	147	43%	6e-32	78%	
qi 3109201 U19255.1	Nicotiana tabacum chloroplast carbonic anhydrase mRNA,	147	147	43%	6e-32	78%	
qi 170218 U194135.1	Nicotiana tabacum chloroplast carbonic anhydrase gene, cc	147	147	43%	6e-32	78%	
gi 147821885 refseq NM_001247119.1	Solanum lycopersicum carbonic anhydrase (ca2), mRNA >g	143	143	43%	7e-31	78%	

B

```

▼ Alignments
Select All  Get selected sequences  Distance tree of results

>gi|1295798040|emb|FN814304.1| Olea europaea partial mRNA for carbonic anhydrase (ca gene),
clone SAAC
Length=331
Score = 414 bits (458), Expect = 3e-112
Identities = 232/234 (99%), Gaps = 0/234 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 18  GAAGGAAACAGTGAATGATCACTTGGGAACTGCTGAGTATCCATTTGTTAGAGAAGG  77
Sbjct 98  GAAGGAAACAGTGAATGATCACTTGGGAACTGCTGAGTATCCATTTGTTAGAGAAGG  157
Query 78  ATTGGTGAAGAAAACITTTGGCCCTAAGGGAGGATATATGATTTGTAAAAGGAAGCTT  137
Sbjct 158  ATTGGTGAAGAAAACITTTGGCCCTAAGGGAGGATATATGATTTGTAAAAGGAAGCTT  217
Query 138  TGAAGTGGAGCCCTGGAAITTTGGTCTTTCTAGATCAGTCTCTGTATGAACAAATTAATC  197
Sbjct 218  TGAAGTGGAGCCCTGGAAITTTGGTCTTTCTAGATCAGTCTCTGTATGAACAAATTAATC  277
Query 198  TCIGTTCCTATGAGTATTTAATGTCACAAAATGATTTAAGCATATGTGT  251
Sbjct 278  TCIGTTCCTATGAGTATTTAATGTCACAAAATGATTTAAGCATATGTGT  331

>gi|349731537|emb|FQ394658.1| Vitis vinifera clone SS0AF1Y115
Length=1131
Score = 174 bits (192), Expect = 4e-40
Identities = 141/171 (82%), Gaps = 0/171 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 19  AAGGAAACAGTGAATGATCACTTGGGAACTGCTGAGTATCCATTTGTTAGAGAAGGA  78
Sbjct 815  AAGGAAACAGTGAATGATCACTTGGGAACTGCTGAGTATCCATTTGTTAGAGAAGGC  874
Query 79  TTGGTGAAGAAAACITTTGGCCCTAAGGGAGGATATATGATTTGTAAAAGGAAGCTT  138
Sbjct 875  TTGGTGAAGAAAACITTTGGCCCTAAGGGAGGATATATGATTTGTAAAAGGAAGCTT  934
Query 139  GAAGTGGAGCCCTGGAAITTTGGTCTTTCTAGATCAGTCTCTGTATGAACAA  189
Sbjct 935  GAAGTGGAGCCCTGGAAITTTGGTCTTTCTAGATCAGTCTCTGTATGAACAA  985

>gi|349730861|emb|FQ394183.1| Vitis vinifera clone SS0AF22YD04
Length=1122
Score = 174 bits (192), Expect = 4e-40
Identities = 141/171 (82%), Gaps = 0/171 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 19  AAGGAAACAGTGAATGATCACTTGGGAACTGCTGAGTATCCATTTGTTAGAGAAGGA  78
Sbjct 875  AAGGAAACAGTGAATGATCACTTGGGAACTGCTGAGTATCCATTTGTTAGAGAAGGC  873

```

C

Şekil 3.7 DNA fragmanı dizininin BLAST analizi sonuçlarının NCBI web sayfasındaki görüntüsü

A. Birinci bölüm, B. İkinci bölüm, C. Üçüncü bölüm

OCA fragmanı BLASTN analizi sonucu ilk sırada *Olea europaea* karbonik anhidraz kısmi mRNA dizinine benzerlik göstermiştir. Tüm benzerlik listesi Ek 1’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 OCA BLASTN analizi sonuçları

İsim	Primerler	Dizi Uzunluğu	RNA	BLASTN	Skor
OCA	F1-PCR Anchor	392	Kontrol	<i>Olea europaea</i> karbonik anhidraz kısmi mRNA	414

BLASTP analizleri için dizinlerin protein bilgisi kullanıldı. Klonlama yönlü olmadığından doğru protein kodlayan dizinin vektöre yerleşme şansı 1/6’dır. Ayrıca dizin okumalarındaki olası yanlışlıklar frame kaymalarına neden olabilir. Bu nedenlerle EMBOSS Transeq internet programında kontiglere ait proteinlerin 1., 2. ve 3. framelerde aminoasit dizin bilgisi oluşturuldu [146]. Her üç frame için BLASTP analizleri yapıldı.

OCA dizininin BLASTP analizi sonuçları Ek 1’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 OCA dizini BLASTP sonuçları

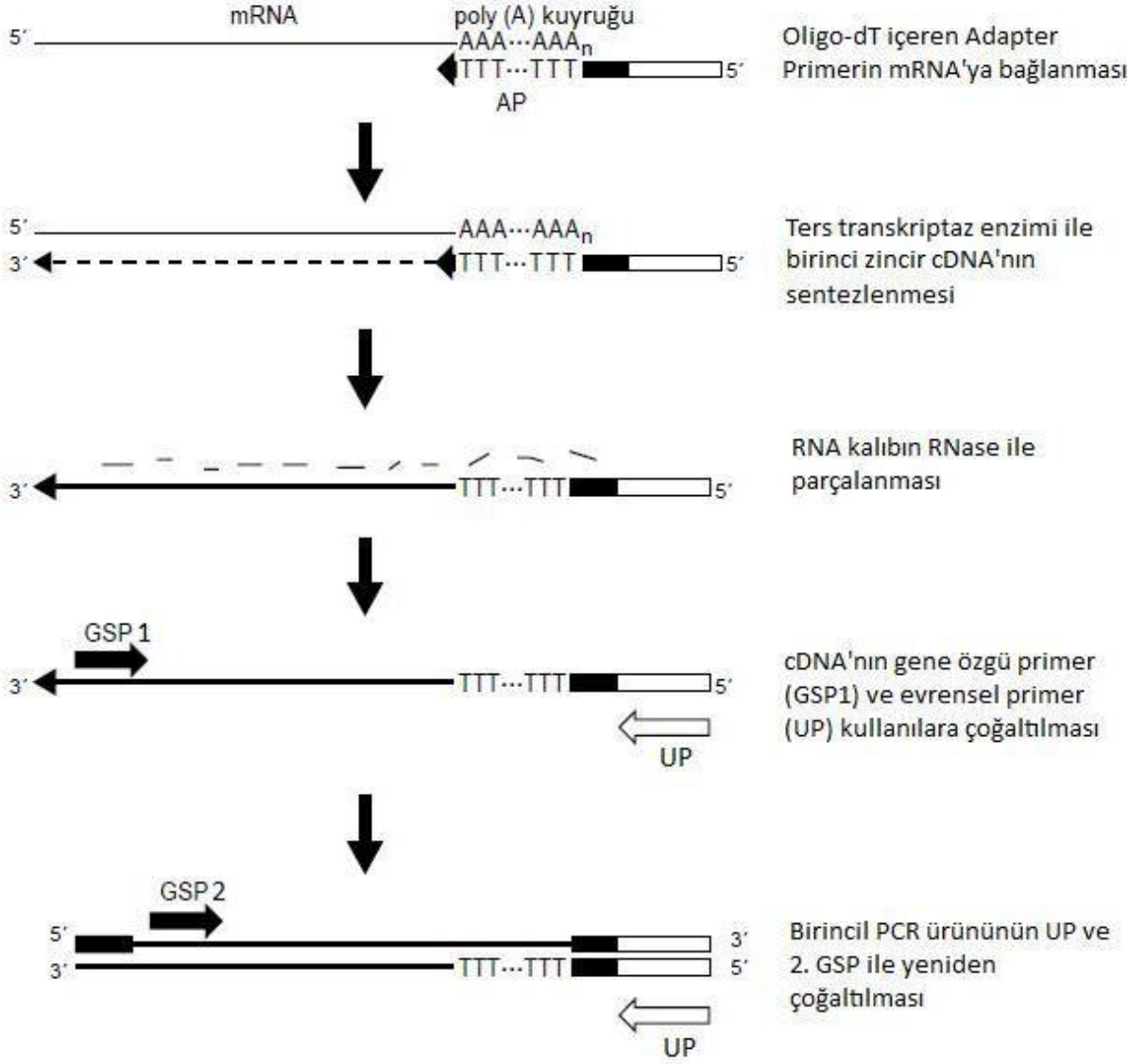
İsim	Dizi Uzunluğu	Korunmuş Domain	BLASTP	Skor
OCA Frame1	131	β -CA süper ailesi	Karbonik anhidraz [<i>Olea europaea</i>]	109

3.1.5 3’RACE ve Genomik DNA’dan PCR için Primerlerin Tasarlanması

Tam uzunluktaki cDNA’yı elde edebilmek için, ileri ve geri primerler Primer3 programı kullanılarak NCBI web sayfasında bulunan Özdemir Özgentürk vd. çalışmasındaki zeytin CA kontig dizin bilgisinden yararlanılarak tasarlandı (Çizelge 3.4) [147].

3.1.6 3'RACE ile İlgili Sonuçlar

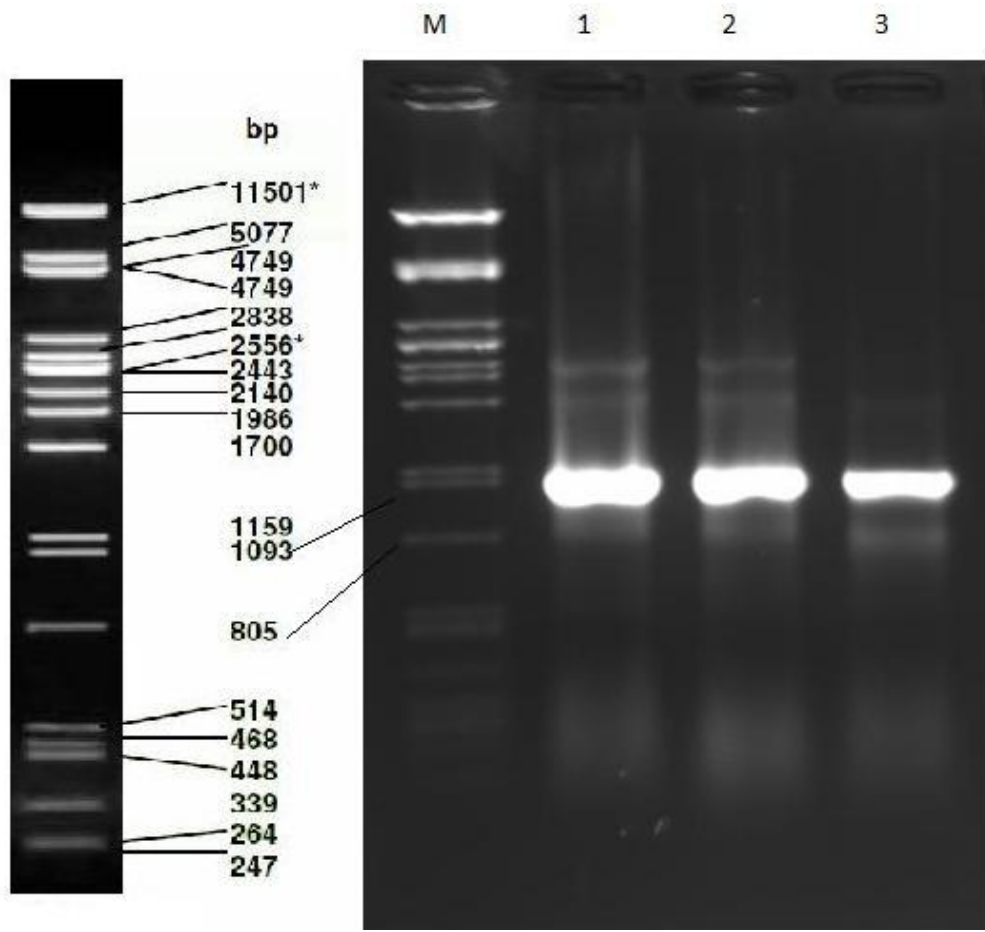
RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), kelime anlamı olarak cDNA uçlarının hızlı oaltımıdır. Dizinleri tam olarak bilinmeyen cDNA'ların uzatılarak tam uzunlukta cDNA'lar elde edilmesine yarayan PCR temelli bir yöntemdir [148]. Mesajcı RNA birinci zincir cDNA'nın çoğaltılması için kalıp olarak kullanılır. cDNA'dan PCR'ın gerçekleştirilebilmesi için genin bilinen bir bölgesinden tasarlanmış bir primer ve evrensel bir primer gereklidir [149]. Kullanılan primerler ve reaksiyonun işleyişi açısından 3'RACE ve 5'RACE olarak 2'ye ayırmak mümkündür. 3'RACE'te, mRNA'nın poli(A) kuyruğuna bağlanan bir oligo-dT ve gen spesifik primer kullanılarak cDNA'nın 3' ucu PCR ile çoğaltılır. 3'RACE yönteminin zeti Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8 3'RACE yönteminin şematik özeti

3.1.6.1 3'RACE PCR Ürünlerinin Analizi

2.14.1'de anlatıldığı şekilde sentezlenen kontrol, 1 hafta ve 10 gün cDNA'ları kullanılarak 2.14.2'de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1'lik Agaroz jele yüklenerek, kalite ve büyüklüğü kontrol edildi. Üç reaksiyon da iyi çalıştığı gözlemlendi.



Şekil 3.9 3'RACE PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü.

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1. Kontrol örneği, 2. 1 hafta stres verilmiş örnek, 3. 10 gün stres verilmiş örnek

3.1.6.2 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

1 haftalık ve 10 günlük stres verilmiş örnekler 2.13.5'te anlatıldığı biçimde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

3.1.6.3 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 μ l'si 2.13.6'da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 μ l kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Mavi beyaz seçilimi (Şekil 3.4) için antibiyotik (100 μ g/ml), IPTG (0,5mM) ve X- gal (30 μ g/ml) ilave edilmiş katı LB ortamına ekilerek 37°C 'de 16 saat büyütüldü.

1 hafta stres verilen örneğin transformasyonundan 3, 10 gün stres verilen örneğin transformasyonundan 1 beyaz koloni elde edilmiştir.

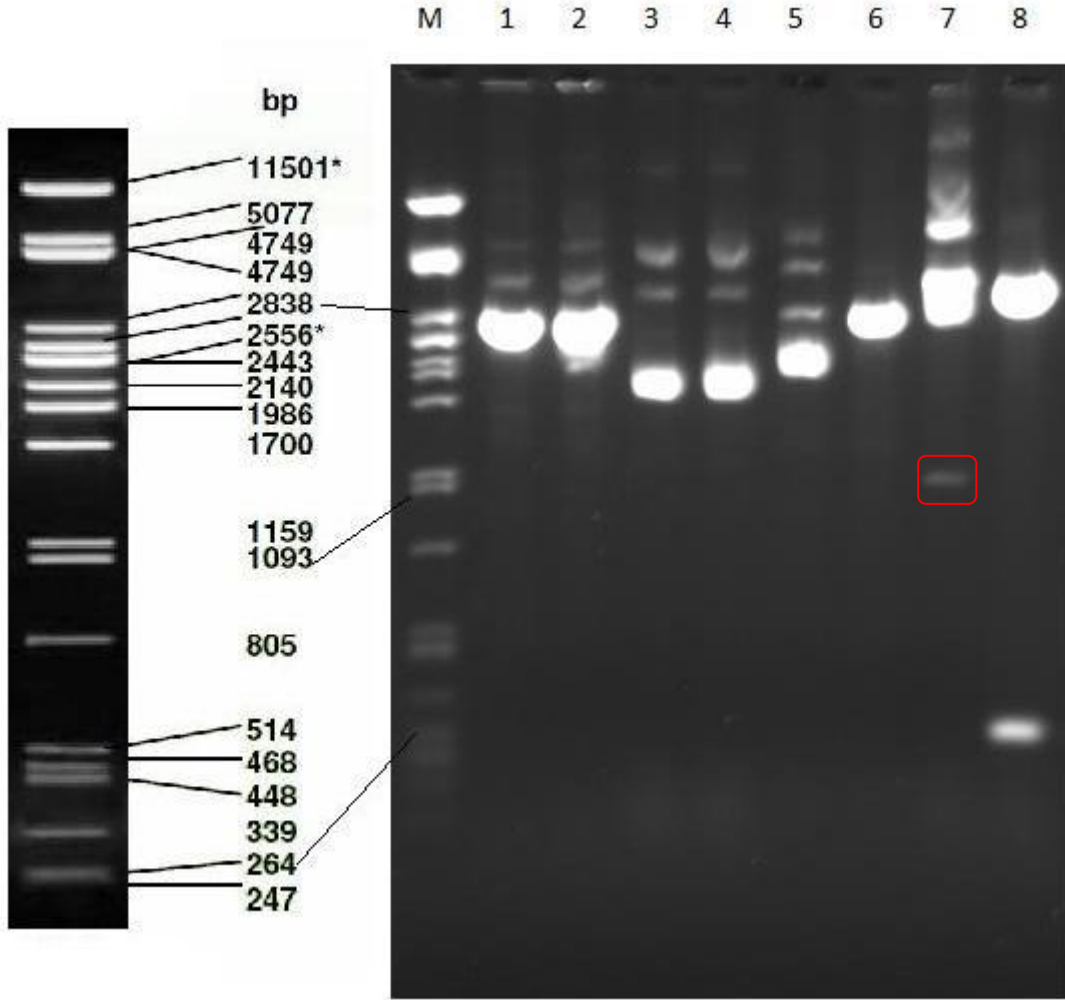
3.1.6.4 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Beyaz kolonilerin istenilen DNA'yı içerip içermediğini görmek için kurulan PCR çalışmadığı için, kolonilerden plazmit izolasyonu yapıp plazmitler kesim enzimleri ile kesildi.

3.1.6.5 Plazmit İzolasyonu

Pozitif koloniden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak 2.13.8'de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı.

İzole edilen plazmitler EcoRI ve PstI enzimleri ile kesilerek lineer hale getirildi. 10 gün stres verilen örneğin plazmit kesiminde istenilen DNA'yı taşıdığı görüldü. EcoRI ile istenilen DNA'nın kesilmesi, PstI ile de plazmitin sadece lineer hale getirilmesi hedeflenmiştir. Ancak DNA fragmanı PstI kesim bölgesi içerdiği için, PstI kesim reaksiyonu sonucunda da 500 bp büyüklüğünde bir fragmanı görülmüştür.



Şekil 3.10 EcoRI ve PstI ile plazmit kesim ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1. EcoRI ile kesilmiş 1 haftalık plazmit 1, 2. PstI ile kesilmiş 1 haftalık plazmit 1, 3. EcoRI ile kesilmiş 1 haftalık plazmit 2, 4. PstI ile kesilmiş 1 haftalık plazmit 2, 5. EcoRI ile kesilmiş 1 haftalık plazmit 3, 6. PstI ile kesilmiş 1 haftalık plazmit 3, 7. EcoRI ile kesilmiş 10 günlük plazmit 1, 8. PstI ile kesilmiş 10 günlük plazmit 1

3.1.6.6 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

İstenilen DNA'yı içerdiği tespit edilen plazmit ONCAF1 olarak adlandırıldı ve İontek ve Biogen firmalarına iki yönde de dizin analizi yapılması için yollandı.

Gelen sonuçların vektör dizinleri CHROMAS programı ile çıkartıldı. Bioedit programı ile iki dizin birleştirilerek 1150 bp uzunluğunda consensus dizini oluşturuldu. Bu dizinin BLASTN ve BLASTP programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.2 ve 3.3'te verilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar ve benzerlik listesinin tamamı Ek-B'de verilmiştir.

Çizelge 3.5 ONCAF1 consensus nükleotid ve aminoasit dizini

		CAF1 primeri														
1	TAA	CGG	ATG	CGC	ACT	TAC	TTC	CCT	CAT	TCC	TAA	TTC	TTC	CCT	CAA	45
1	*	R	M	R	T	Y	F	P	H	S	*	F	F	P	Q	15
46	GAG	AAC	GCC	CCT	TTC	GTT	ACT	TTG	TAA	AGC	GTC	GTC	TAT	ATT	TCT	90
16	E	N	A	P	F	V	T	L	*	S	V	V	Y	I	S	30
91	TCC	ACC	GAG	TCT	CTA	TTC	AAA	AAT	AAC	CCT	GTT	TTT	TTG	CTG	CTC	135
31	S	T	E	S	L	F	K	N	N	P	V	F	L	L	L	45
136	CTG	CTC	CTA	TCA	TTC	CAC	CCC	CAT	TTT	GAG	AGA	AGA	TAT	GGG	GAA	180
46	L	L	L	S	F	H	P	H	F	E	R	R	Y	G	E	60
181	AGA	GTA	CGA	GGA	AGC	CAT	TTG	CCG	GAC	TTC	AAA	AAA	CTT	CTC	AGT	225
61	R	V	R	G	S	H	L	P	D	F	K	K	L	L	S	75
226	GAG	AAT	GGA	GAA	TTG	GCA	CCA	GTG	CCT	GCA	GCA	AAA	ATT	GAT	CAG	270
76	E	N	G	E	L	A	P	V	P	A	A	K	I	D	Q	90
271	ATT	AAA	GCA	GAG	TTG	GCA	ACG	GTT	GAC	AAA	ACC	ACC	GTT	TCC	AGC	315
91	I	K	A	E	L	A	T	V	D	K	T	T	V	S	S	105
316	ACT	GTT	GAG	CAG	CTG	AAA	AAT	GGC	TTT	GTC	CAC	TTC	AAA	AGA	GAG	360
106	T	V	E	Q	L	K	N	G	F	V	H	F	K	R	E	120
361	AAA	TAT	GAG	AAA	AAT	CCA	GCC	TTG	TAT	GGT	GAA	CTT	GCC	AAA	GGC	405
121	K	Y	E	K	N	P	A	L	Y	G	E	L	A	K	G	135
406	CAG	AGC	CCA	ACG	TAT	ATG	GTA	TTT	GCC	TGC	TCC	GAT	TCA	CGT	GTC	450
136	Q	S	P	T	Y	M	V	F	A	C	S	D	S	R	V	150
451	TGC	CCG	TCA	CAC	GTC	CTG	AAT	TTG	CAC	CCG	GGA	GAG	GCA	TTC	ATG	495
151	C	P	S	H	V	L	N	L	H	P	G	E	A	F	M	165
496	GTC	CGA	AAC	ATT	GCT	AAC	ATG	GTC	CCT	GCC	TAT	GAT	AAG	GTT	AGA	540
166	V	R	N	I	A	N	M	V	P	A	Y	D	K	V	R	180
541	TAC	TCT	GGA	GTT	GGG	TCT	GCC	ATC	GAG	TAT	GCT	GTT	CTT	CAC	CTA	585
181	Y	S	G	V	G	S	A	I	E	Y	A	V	L	H	L	195
586	AAG	GTT	AAG	GAA	ATC	ATA	GTC	ATT	GGA	CAC	AGT	GCA	TGT	GGA	GGA	630
196	K	V	K	E	I	I	V	I	G	H	S	A	C	G	G	210
631	ATC	AAG	GGG	CTC	ATG	TCT	CTC	TCT	GAT	GAT	GGA	TCC	ACC	TCC	ACT	675
211	I	K	G	L	M	S	L	S	D	D	G	S	T	S	T	225
676	GAC	TTC	ATC	GAG	GAC	TGG	GTG	AAG	ATC	TGT	TTA	CCT	GCA	AAG	GCC	720
226	D	F	I	E	D	W	V	K	I	C	L	P	A	K	A	240
721	AAG	GTG	AAA	GCC	GAG	CTT	GGG	AAT	GCA	CCT	TTC	GCG	GAT	CAG	TGT	765
241	K	V	K	A	E	L	G	N	A	P	F	A	D	Q	C	255
766	GGA	CTA	TGT	GAG	AAG	GAA	GCA	GTG	AAT	GTA	TCA	CTT	GGG	AAC	CTG	810
256	G	L	C	E	K	E	A	V	N	V	S	L	G	N	L	270
811	CTG	AGT	TAT	CCA	TTT	GTT	AGA	GAA	GGA	TTG	GTG	AAG	AAA	ACT	TTG	855
271	L	S	Y	P	F	V	R	E	G	L	V	K	K	T	L	285

Çizelge 3.5 ONCAF1 consensus nükleotid ve aminoasit dizini (devam)

856	GCG	CTA	AAG	GGA	GGA	TAT	TAT	GAT	TTT	GTA	AAA	GGA	AGC	TTT	GAA	900
286	A	L	K	G	G	Y	Y	D	F	V	K	G	S	F	E	300
901	CTG	TGG	AGC	CTG	GAA	TTT	GGT	CTT	TCT	AGA	TCA	GTC	TCT	GTA	TGA	945
301	L	W	S	L	E	F	G	L	S	R	S	V	S	V	*	315
946	ACA	AAT	TAA	TCT	CTG	TTC	CCT	ATG	AAG	TTT	TTA	ATG	TCA	CAA	AAA	990
316	T	N	*	S	L	F	P	M	K	F	L	M	S	Q	K	330
991	TGT	ATT	TTA	ACG	ATA	TGT	GTA	ATG	GAG	AAC	AAT	TGT	GTC	ATC	CTT	1035
331	C	I	L	T	I	C	V	M	E	N	N	C	V	I	L	345
1036	AAT	TTC	TTG	TAA	TAA	ATT	CAG	AAA	TTG	TAT	TTT	CTG	ATA	ATT	AAT	1080
346	N	F	L	*	*	I	Q	K	L	Y	F	L	I	I	N	360
1081	AAA	TAA	AAA	CAG	CAT	CCC	AGT	TTT	ATT	TAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1125
361	K	*	K	Q	H	P	S	F	I	*	K	K	K	K	K	375
1126	AAA	AAA	GTA	CTA	GTC	GAC	GCG	TGG								1149
376	K	K	V	L	V	D	A	W								

Çizelge 3.6 ONCAF1 BLASTN analizi sonuçları

İsim	Primerler	Dizi Uzunluğu	RNA	BLASTN	Skor
ONCAF1	CAF1-AUAP	1150	10 gün stres verilmiş	<i>Olea europaea</i> karbonik anhidraz kısmi mRNA	581

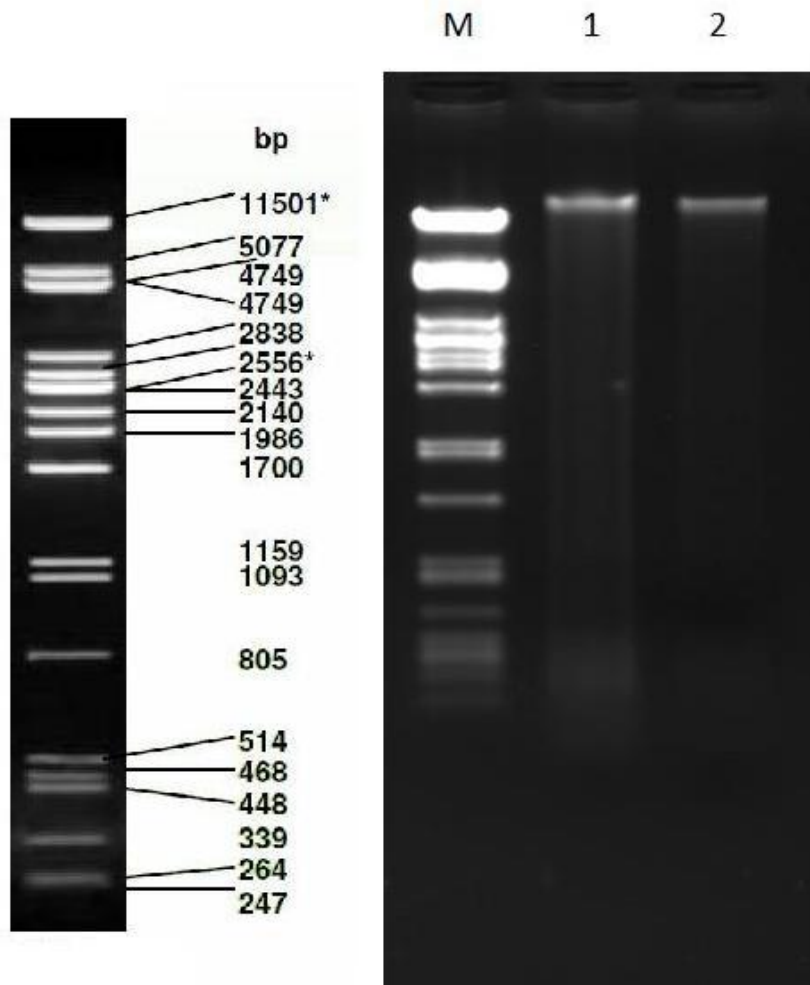
Çizelge 3.7 ONCAF1 BLASTP analizi sonuçları

İsim	Dizi Uzunluğu	Korunmuş Domain	BLASTP	Skor
ONCAF1 Frame1	384	β -CA Clade B	<i>Solanum lycopersicum</i> karbonik anhidrazi	404

3.1.7 Genomik DNA ile İlgili Sonuçlar

3.1.7.1 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA 2.15'te belirtildiği şekilde izole edilip %1'lik agaroz jelde yürütülerek kalitesi kontrol edildi.



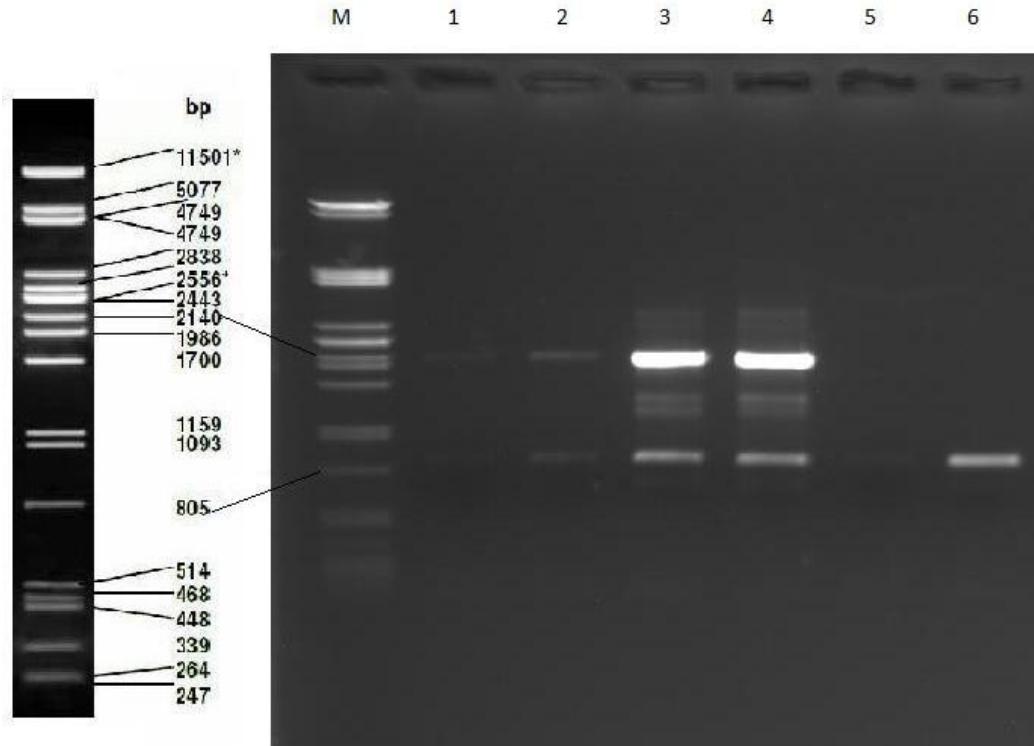
Şekil 3.11 Genomik DNA'nın agaroz jel üzerindeki görüntüsü

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1. Genomik DNA 1. elüsyon, 2. Genomik DNA 2. Elüsyon.

3.1.7.2 Genomik DNA'dan PCR

Genomik DNA'dan PCR 2.15.2'de anlatıldığı biçimde yapıldı ve %1'lik agaroz jel üzerinde kalite ve büyüklüğü kontrol edildi. Qiagen enzimi ile yapılan PCR'lardan 2150 bp ve 900 bp boyutlarında iki farklı bant elde edilmiştir. Fermentas enzimi ile DMSO'suz yapılan PCR'lardan yaklaşık 2150 bp ve 900 bp boyutlarında iki keskin bant

ve farklı boyutlarda daha silik bantlar elde edilmiştir. Fermentas enzimi ile DMSO kullanılarak yapılan PCR'lardan 900 bp büyüklüğünde tek bant elde edilmiştir.



Şekil 3.12 Genomik DNA'dan yapılan PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1. 1 μ l genomik DNA'dan Qiagen enzimi ile, 2. 1,5 μ l genomik DNA'dan Qiagen enzimi ile, 3. 1 μ l genomik DNA'dan Fermentas enzimi ile DMSO'suz, 4. 1,5 μ l genomik DNA'dan Fermentas enzimi ile DMSO'suz, 5. Fermentas enzimi ile DMSO'lu, 6. Fermentas enzimi ile DMSO'lu kurulan PCR.

3.1.7.3 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu

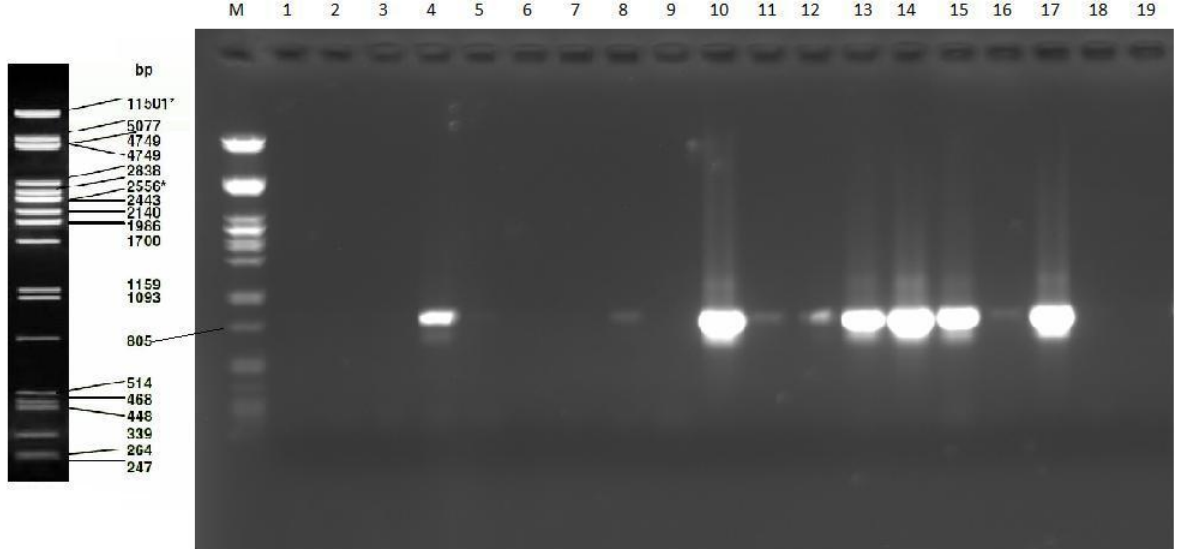
Genomik DNA'dan PCR'ların ürünleri 2.13.15'te anlatıldığı şekilde Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

3.1.7.4 Transformasyon

pGEM-T Easy vektörüne bağlanan DNA'nın 5 μ l'si 2.13.6'da anlatıldığı biçimde hazırlanan 200 μ l kompetan hücre ile karıştırılarak transformasyon yapıldı. Mavi beyaz seçilimi (Şekil 3.4) için antibiyotik (100 μ g/ml), IPTG (0,5mM) ve X- gal (30 μ g/ml) ilave edilmiş katı Luria-Bertani ortamına ekilerek 37 °C 'de 16 saat büyütüldü.

3.1.7.5 Pozitif Kolonilerin Belirlenmesi

Büyüyen kolonilerin istenilen DNA'yı taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için, 2.13.7.2'de belirtilen koşullarda PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde kontrol edildi.

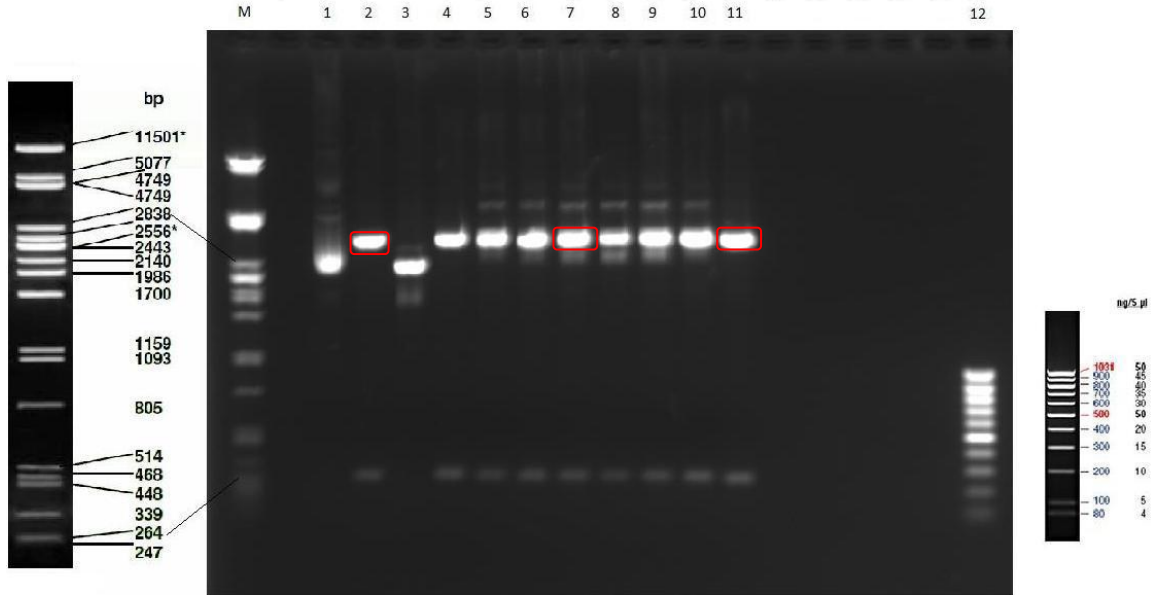


Şekil 3.13 Büyüyen kolonilerin istenilen DNA dizisini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek amacıyla yapılan PCR'ın jel üzerinde görüntüsü.

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1., 2., 3., 4. Qiagen enzimi ile küçük banttıan elde edilen koloniler; 5., 6. Qiagen enzimi ile büyük banttıan elde edilen koloniler, 7., 8. Fermentas enzimi ile DMSO'lu PCR'dan elde edilen; 9., 10., 11., 12., 13.,14., 15., 16., 17. Fermentas enzimi ile DMSO'suz küçük banttıan elde edilen koloniler; 18., 19. Fermentas enzimi ile DMSO'suz büyük banttıan elde edilen koloniler.

3.1.7.6 Plazmit İzolasyonu

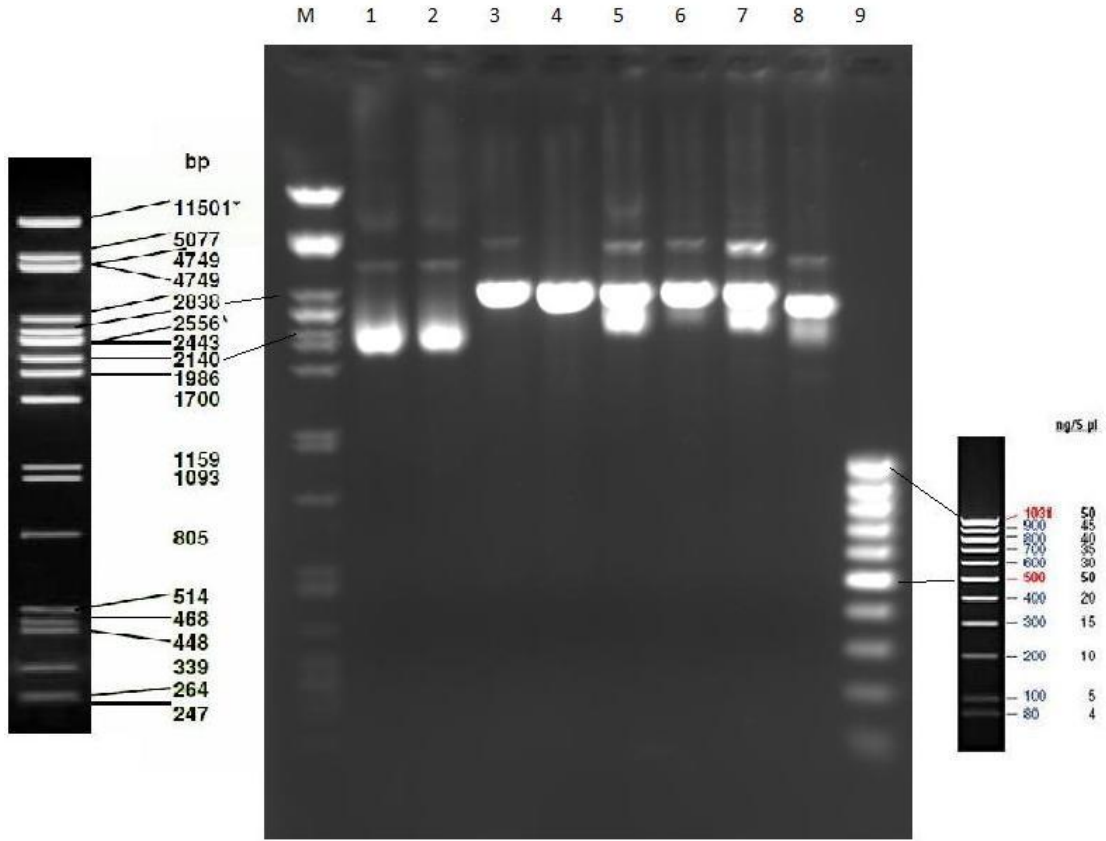
Kontrol PCR'ında pozitif sonuç gösteren kolonilerden 2.13.8'de belirtildiği biçimde plazmit izolasyonu yapıldı. Bu plazmitler PstI enzimi ile kesildi.



Şekil 3.14 Pst I ile kesilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü

M. PstI ile kesilmiş λ DNA, 1. kesilmemiş plazmit, 2. Qiagen küçük banttardan elde edilen plazmit, 3. Qiagen büyük banttardan elde edilen plazmit, 4. Fermentas DMSO'lu PCR'dan elde edilen plazmit, 5., 6., 7., 8., 9., 10., 11. Fermentas DMSO'suz küçük banttardan elde edilen plazmitle.

Büyük bantlardan ikinci kez ligasyon kurulup transformasyon yapıldı. Bu transformasyonlardan elde edilen beyaz kolonilerden plazmit izolasyonu yapıp PstI ile kesildi.



Şekil 3.15 Pst I ile kesilmiş plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü

M. PstI I ile kesilmiş λ DNA, 1. kesilmemiş plazmit, 2.,3., 4., 5., 6. Qiagen büyük banttardan elde edilen PstI ile kesilmiş plazmitler, 7., 8. Fermentas DMSO'suz büyük banttardan elde edilen PstI ile kesilmiş plazmitler

3.1.7.7 Dizin Analizi ve Benzerlik Analizleri

İstenilen DNA'yı içerdiği tespit edilen küçük bant örneklerinden 3 plazmit, büyük bant örneklerinden 2 plazmit seçilip Biogen firmasına dizin analizi yapılması için yollandı. Dizin analizine gönderilen plazmitlerin adlandırılması Şekil 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3. 8 Dizin analizine gönderilen örneklerin adlandırılması

QKB4	Qiagen enzimi ile PCR'dan elde edilen küçük bant
DKB7	Fermentas enzimi ile DMSO'suz PCR'dan elde edilen küçük bant
FTB2	Fermentas enzimi ile DMSO'lu PCR'dan elde edilen tek bant
QBB4	Qiagen enzimi ile PCR'dan elde edilen büyük bant
DBB1	Fermentas enzimi ile DMSO'lu PCR'dan elde edilen büyük bant

Gelen sonuçların vektör dizinleri CHROMAS programı ile çıkartıldı ve BLASTN ve BLASTP programları ile benzerlik analizleri yapıldı. Elde edilen benzerlik sonuçları Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7’de verilmiştir. Dizin analizinden gelen sonuçlar Ek-C, Ek-D ve Ek-E’de verilmiştir. Büyük bantlardan klonlama başarısız olduğu için sonuç alınamamıştır.

Çizelge 3.9 QKB4 nükleotid ve aminoasit dizini

		CAF1 primeri															
2		AAC	GGA	TGC	GCA	CTT	ACT	TCC	CTC	ATT	CCT	AAT	TCT	TCC	CTC	AAG	46
1		N	G	C	A	L	T	S	L	I	P	N	S	S	L	K	15
47		AGA	CGC	CCC	TTC	GTA	CTT	TGT	CAA	GCG	TCG	TCT	AAT	TCT	CCA	CCG	91
16		R	R	P	F	V	L	C	Q	A	S	S	N	S	P	P	30
92		AGT	CTC	ATT	CAA	AAT	AAG	CCT	GTT	TTT	GCT	GCT	CCT	GCT	CCT	ATC	136
31		S	L	I	Q	N	K	P	V	F	A	A	P	A	P	I	45
137		ATC	CAC	CCC	ATT	TTG	AGA	GAA	GAT	ATG	GGG	AAA	GAG	TAC	GAG	GAA	181
46		I	H	P	I	L	R	E	D	M	G	K	E	Y	E	E	60
182		GCC	ATT	GCC	GGA	CTT	CAA	AAA	CTT	CTC	AGT	GAG	AAT	GGA	GGA	TTG	226
61		A	I	A	G	L	Q	K	L	L	S	E	N	G	G	L	75
227		GCA	CCA	GTG	GCT	GCA	GCA	AAA	ATT	GAT	CAG	ATT	AAA	GCA	GAG	TTG	271
76		A	P	V	A	A	A	K	I	D	Q	I	K	A	E	L	90
272		GCA	ACG	GTT	GAC	AAA	ACC	ACT	GTT	TCC	AGC	ACT	GTT	GAG	CAG	CTG	316
91		A	T	V	D	K	T	T	V	S	S	T	V	E	Q	L	105
317		AAA	AAT	GGC	TTT	GTC	CAC	TTC	AAA	AGA	GAG	AAA	TAT	GAG	AAA	AAT	361
106		K	N	G	F	V	H	F	K	R	E	K	Y	E	K	N	120
362		CCA	GCC	TTG	TAT	GGT	GAA	CTT	GCC	AAA	GGC	CAG	AGC	CCA	ACG	TAT	406
121		P	A	L	Y	G	E	L	A	K	G	Q	S	P	T	Y	135
407		ATG	GTA	TTT	GCC	TGC	TCC	GAT	TCA	CGT	GTC	TGC	CCG	TCA	CAC	GTC	451
136		M	V	F	A	C	S	D	S	R	V	C	P	S	H	V	150
452		CTG	AAT	TTG	CAC	CCG	GGA	GAG	GCA	TTC	ATG	GTC	CGA	AAC	ATT	GCT	496
151		L	N	L	H	P	G	E	A	F	M	V	R	N	I	A	165
497		AAC	ATG	GTC	CCT	GCC	TAT	GAT	AAG	GTT	AGA	TAC	TCT	GGA	GTT	GGG	541
166		N	M	V	P	A	Y	D	K	V	R	Y	S	G	V	G	180
542		TCT	GCC	ATC	GAG	TAT	GCT	GTT	CTT	CAC	CTA	AAG	GTT	AAG	GAA	ATC	586
181		S	A	I	E	Y	A	V	L	H	L	K	V	K	E	I	195
587		ATA	GCC	ATT	GGA	CAC	AGT	GCA	TGT	GGA	GGA	ATC	AAG	GGG	CTC	ATG	631
196		I	A	I	G	H	S	A	C	G	G	I	K	G	L	M	210
632		TCT	CTC	TCT	GAT	GAT	GGA	TCC	ACC	TCC	ACT	GAC	TTC	ATC	GAG	GAC	676
211		S	L	S	D	D	G	S	T	S	T	D	F	I	E	D	225
677		TGG	GTG	AAG	ATC	TGT	TTA	CCT	GCA	AAG	GCC	AAG	GTG	AAA	GCC	GAG	721
226		W	V	K	I	C	L	P	A	K	A	K	V	K	A	E	240

Çizelge 3.9 QKB4 nükleotid ve aminoasit dizini (devam)

722	CTT	GGG	AAT	GCA	CCT	TTC	GCG	GAT	CAG	TGT	GGA	CTA	TGT	GAG	AAG	766
241	L	G	N	A	P	F	A	D	Q	C	G	L	C	E	K	255
767	GAA	GCA	GTG	AAT	GTA	TCA	CTT	GGG	AAC	CTG	CTG	AGT	TAT	CCA	TTT	811
256	E	A	V	N	V	S	L	G	N	L	L	S	Y	P	F	270
812	GTT	AGA	GAA	GGA	TTG	GTG	AAG	AAA	ACT	TTG	GGC	GCT	AAA	GGG	AGG	856
271	V	R	E	G	L	V	K	K	T	L	G	A	K	G	R	285
857	ATA	TTA	TGA	TTT	TGT	AAA	AGG	AAG	CTT	TGA	ACT	GTG	GAG	CCT	898	
286	I	L	*	F	C	K	R	K	L	*	T	V	E	P		

CAR1 primeri

Çizelge 3.10 DKB7 nükleotid ve aminoasit dizini

1	TAA	ACG	GAT	GCG	CAC	TTA	CTT	TCC	CTC	ATT	CGT	AAA	TTC	TTC	CCT	45	
1	*	T	D	A	H	L	L	S	L	I	R	K	F	F	P	15	
46	CAA	AGA	GAC	GCC	CCT	TCG	TAC	TTT	GTC	AAA	GCG	TCG	TCT	AAT	TCT	90	
16	Q	R	D	A	P	S	Y	F	V	K	A	S	S	N	S	30	
91	CCA	CCG	AGT	CTC	ATT	CAA	AAT	AAG	CCT	GTT	TTT	GCT	GCT	CCT	GCT	135	
31	P	P	S	L	I	Q	N	K	P	V	F	A	A	P	A	45	
136	CCT	ATC	ATC	CAC	CCC	ATT	TTG	AGA	GAA	GAT	ATG	GGG	AAA	GAG	TAC	180	
46	P	I	I	H	P	I	L	R	E	D	M	G	K	E	Y	60	
181	GAG	GAA	GCC	ATT	GCC	GGA	CTT	CAA	AAA	CTT	CTC	AGT	GAG	AAT	GGA	225	
61	E	E	A	I	A	G	L	Q	K	L	L	S	E	N	G	75	
226	GGA	TTG	GCA	CCA	GTG	GCT	GCA	GCA	AAA	ATT	GAT	CAG	ATT	AAA	GCA	270	
76	G	L	A	P	V	A	A	A	K	I	D	Q	I	K	A	90	
271	GAG	TTG	GCA	ACG	GTT	GAC	AAA	ACC	ACC	GTT	TCC	AGC	ACT	GTT	GAG	315	
91	E	L	A	T	V	D	K	T	T	V	S	S	T	V	E	105	
316	CAG	CTG	AAA	AAT	GGC	TTT	GTC	CAC	TTC	AAA	AGA	GAG	AAA	TAT	GAG	360	
106	Q	L	K	N	G	F	V	H	F	K	R	E	K	Y	E	120	
361	AAA	AAT	CCA	GCC	TTG	TAT	GGT	GAA	CTT	GCC	AAA	GGC	CAG	AGC	CCA	405	
121	K	N	P	A	L	Y	G	E	L	A	K	G	Q	S	P	135	
406	ACG	TAT	ATG	GTA	TTT	GCC	TGC	TCC	GAT	TCA	CGT	GTC	TGC	CCG	TCA	450	
136	T	Y	M	V	F	A	C	S	D	S	R	V	C	P	S	150	
451	CAC	GTC	CTG	AAT	TTG	CAC	CCG	GGA	GAG	GCA	TTC	ATG	GTC	CGA	AAC	495	
151	H	V	L	N	L	H	P	G	E	A	F	M	V	R	N	165	
496	ATT	GCT	AAC	ATG	GTC	CCT	GCC	TAT	GAT	AAG	GTT	AGA	TAC	TCT	GGA	540	
166	I	A	N	M	V	P	A	Y	D	K	V	R	Y	S	G	180	
541	GTT	GGG	TCT	GCC	ATC	GAG	TAT	GCT	GTT	CTT	CAC	CTA	AAG	GTT	AAG	585	
181	V	G	S	A	I	E	Y	A	V	L	H	L	K	V	K	195	

Çizelge 3.10 DKB7 nükleotid ve aminoasit dizini

586	GAA	ATC	ATA	GTC	ATT	GGG	CAC	AGT	GCA	TGT	GGA	GGA	ATC	AAG	GGG	630
196	E	I	I	V	I	G	H	S	A	C	G	G	I	K	G	210
631	CTC	ATG	TCT	CTC	TCT	GAT	GAT	GGA	TCC	ACC	TCC	ACT	GAC	TTC	ATC	675
211	L	M	S	L	S	D	D	G	S	T	S	T	D	F	I	225
676	GAG	GAC	TGG	GTG	AAG	ATC	TGT	TTA	CCT	GCA	AAG	GCC	AAG	GTG	AAA	720
226	E	D	W	V	K	I	C	L	P	A	K	A	K	V	K	240
721	GCC	GAG	CTT	GGG	AAT	GCA	CCT	TTC	GCG	GAT	CAG	TGT	GGG	CTA	TGT	765
241	A	E	L	G	N	A	P	F	A	D	Q	C	G	L	C	255
766	GAG	AAG	GAA	GCA	GTG	AAT	GTA	TCA	CTT	GGG	AAC	CTG	CTG	AGT	TAT	810
256	E	K	E	A	V	N	V	S	L	G	N	L	L	S	Y	270
811	CCA	TTT	GTT	AGA	GAA	GGA	TTG	GTG	AAG	AAA	ACT	TTG	GCG	CTA	AAG	855
271	P	F	V	R	E	G	L	V	K	K	T	L	A	L	K	285
856	GGA	GGA	TAT	TAT	GAT	TTT	GTA	AAA	GGA	AGC	TTT	GAA	CTG	TGG	AGC	900
286	G	G	Y	Y	D	F	V	K	G	S	F	E	L	W	S	300
901	CTG		903													
301	L															

Çizelge 3.11 FTB2 nükleotid ve aminoasit dizini

3																
0	ACG	GAT	GCG	CAC	TTA	CTT	CCC	TCA	TTC	CTA	ATT	CTT	CCC	TCA	AGA	47
	T	D	A	H	L	L	P	S	F	L	I	L	P	S	R	14
48	GAC	GCC	CCT	TCG	TAC	TTT	GTC	AAG	CGT	CGT	CTA	ATT	CTC	CAC	CGA	92
15	D	A	P	S	Y	F	V	K	R	R	L	I	L	H	R	29
93	GTC	TCA	TTC	AAA	ATA	AGC	CTG	TTT	TTG	CTG	CTC	CTG	CTC	CTA	TCA	137
30	V	S	F	K	I	S	L	F	L	L	L	L	L	L	S	44
138	TCC	ACC	CCA	TTT	TGA	GAG	AAG	ATA	TGG	GGA	AGG	AGT	ACG	AGG	AAG	182
45	S	T	P	F	*	E	K	I	W	G	R	S	T	R	K	59
183	CCA	TTG	CCG	GAC	TTC	AAA	AAC	TTC	TCA	GTG	AGA	ATG	GAG	GAT	TGG	227
60	P	L	P	D	F	K	N	F	S	V	R	M	E	D	W	74
228	CAC	CAG	TGG	CTG	CAG	CAA	AAA	ATC	GAA	TTC	ATT	GAT	CAG	ATT	AAA	272
75	H	Q	W	L	Q	Q	K	I	E	F	I	D	Q	I	K	89
273	GCA	GAG	TTG	GCA	ACG	GTT	GAC	AAA	ACC	ACC	GTT	TCC	AGC	ACT	GTT	317
90	A	E	L	A	T	V	D	K	T	T	V	S	S	T	V	104
318	GAG	CAG	CTG	AAA	AAT	GGC	TTT	GTC	CAC	TTC	AAA	AGA	GAG	AAA	TAT	362
105	E	Q	L	K	N	G	F	V	H	F	K	R	E	K	Y	119
363	GAG	AAA	AAT	CCA	GCC	TTG	TAT	GGT	GAA	CTT	GCC	AAA	GGC	CAG	AGC	407
120	E	K	N	P	A	L	Y	G	E	L	A	K	G	Q	S	134

Çizelge 3.11 FTB2 nükleotid ve aminoasit dizini (devam)

408	CCA	ACG	TAT	ATG	GTA	TTT	GCC	TGC	TCC	GAT	TCA	CGT	GTC	TGC	CCG	452
135	P	T	Y	M	V	F	A	C	S	D	S	R	V	C	P	149
453	TCA	CAC	GTC	CTG	AAT	TTG	CAC	CCG	GGA	GAG	GCA	TTC	ATG	GTC	CGA	497
150	S	H	V	L	N	L	H	P	G	E	A	F	M	V	R	164
498	AAC	ATT	GCT	AAC	ATG	GTC	CCT	GCC	TAT	GAT	AAG	GTT	AGA	TAC	TCT	542
165	N	I	A	N	M	V	P	A	Y	D	K	V	R	Y	S	179
543	GGA	GTT	GGG	TCT	GCC	ATC	GAG	TAT	GCT	GTT	CTT	CAC	CTA	AAG	GTT	587
180	G	V	G	S	A	I	E	Y	A	V	L	H	L	K	V	194
588	AAG	GAA	ATC	ATA	GTC	ATT	GGA	CAC	AGT	GCA	TGT	GGA	GGA	ATC	AAG	632
195	K	E	I	I	V	I	G	H	S	A	C	G	G	I	K	209
633	GGG	CTC	ATG	TCT	CTC	TCT	GAT	GAT	GGA	TCC	ACC	TCC	ACT	GAC	TTC	677
210	G	L	M	S	L	S	D	D	G	S	T	S	T	D	F	224
678	ATC	GAG	GAC	TGG	GTG	AAG	ATC	TGT	TTA	CCT	GCA	AAG	GCC	AAG	GTG	722
225	I	E	D	W	V	K	I	C	L	P	A	K	A	K	V	239
723	AAA	GCC	GAG	CTT	GGG	AAT	GCA	CCT	TTC	GCG	GAT	CAG	TGT	GGA	CTA	767
240	K	A	E	L	G	N	A	P	F	A	D	Q	C	G	L	254
768	TGT	GAG	AAG	GAA	GCA	GTG	AAT	GTA	TCA	CTT	GGG	AAC	CTG	CTG	AGT	812
255	C	E	K	E	A	V	N	V	S	L	G	N	L	L	S	269
813	TAT	CCA	TTT	GTT	AGA	GAA	GGA	TTG	GTG	AAG	AAA	ACT	TTG	GCG	CTA	857
270	Y	P	F	V	R	E	G	L	V	K	K	T	L	A	L	284
858	AAG	GGA	GGA	TAT	TAT	GAT	TTT	GTA	AAA	GGA	AGC	TTT	GAA	CTG	TGG	902
285	K	G	G	Y	Y	D	F	V	K	G	S	F	E	L	W	299
903	AGC	CTG														908
300	S	L														

Diziner, kendi aralarındaki hizalama analizlerinde %98-99 benzerlik göstermektedir. Daha önce klonlanan ONCAF1 örneği ile ise %95-96 benzerlik göstermiştir. Hizalama analizleri Ek-F'de verilmiştir.

Çizelge 3.12 BLASTN analizi sonuçları

İsim	Primerler	Dizi Uzunluğu	BLASTN	Skor
QKB4	CAF1-CAR1	899	<i>Nicotiana tabacum</i> β-CA	578
DKB7	CAF1-CAR1	903	<i>Nicotiana tabacum</i> β-CA	587
FTB2	CAF1-CAR1	908	<i>Nicotiana paniculata</i> NPCA mRNA'sı	571

Çizelge 3.13 BLASTP analizi sonuçları

İsim	Dizi Uzunluğu	Korunmuş Domain	BLASTP	Skor
QKB4 Frame2	300	β-CA Clade B	<i>Solanum lycopersicum</i> CA	402
DKB7 Frame1	301	β-CA Clade B	<i>Solanum lycopersicum</i> CA	436
FTB2 Frame3	302	β-CA Clade B	<i>Pachysandra terminalis</i> kloroplastik CA	367

3.2 Tartışma ve Öneriler

Bu çalışmada soğuk stresi verilen zeytin bitkisinden β karbonik anhidraz (β -CA) kısmi cDNA'sı klonlanmıştır. Bu amaçla stres verilen bitkilerin yapraklarından izole edilen mRNA'lerden RT-PCR ile cDNA sentezlenmiştir. PCR ile cDNA'ların çoğaltımı yapılmış ve 392 baz çifti uzunluğunda bir dizin elde edilmiştir. Bu cDNA fragmanının nükleotid dizini BLASTN analizi sonucu NCBI veri tabanlarında bulunan zeytin CA kontig dizinine ve CA kısmi mRNA dizinine benzerlik göstermiştir.

Tam uzunlukta cDNA elde edebilmek için benzerlik gösteren CA kontig dizini kullanılarak ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. İleri primer 3'RACE yönteminde kullanılarak yaklaşık 1150 baz çifti uzunluğunda bir fragman elde edilmiştir. Bu fragmanın T7 ve SP6 primerleri kullanılarak iki yönde de dizin analizi yaptırılmıştır. Elde edilen dizinlerden Bioedit programı ile 1150 bp uzunluğunda bir consensus dizini oluşturulmuştur. Bu dizin BLASTN analiz sonucunda çeşitli bitkilere ait CA genlerine benzerlik göstermiştir. BLASTP analizleri de aminoasit dizinin kloroplast β -CA genine ait spesifik grupları içerdiğini göstermektedir. Ayrıca primeri tasarımında kullanılan kontig dizinine de hizalama analizinde %96 benzerlik göstermiştir (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14 3'RACE'ten elde edilen dizin ve kontigin hizalama analizi

ONCAF1	--TAACGGATGCGCACTTACTTCCCTCATTCCTAATTCTTCCCTCAAGAGAACGCCCTT	58
CA-Contig	GTTAACGGATGCGCACTTACTTCCCTCATTCCTAATTCTTCCCTCAAGAGA-CGCCCTT	59

ONCAF1	TCGTTACTTTGTAAAGCGTCGTCTATATTTCTTCCACCGAGTCTCTATTCAAAAATAACC	118
CA-Contig	-CGT-ACTTTGTCAAGCGTCGTCTA-ATT--CTCCACCGAGTCTC-ATTCAAA-TAAGC	112
	*** ***** ***** ** ***** ***** ***** *	
ONCAF1	CTGTTTTTTTGCTGCTCCTGCTCCTATCATTCACCCCATTTTGAGAGAAGATATGGGG	178
CA-Contig	CTGTTTT--TGCTGCTCCTGCTCCTATCAT-CCACCC-ATTTTGAGAGAAGATATGGGG	168
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
ONCAF1	AAAGAGTACGAGGAAGCCATTGCCGGACTTCAAAAACTTCTCAGTGAGAATGGAGAAT	238
CA-Contig	AAAGAGTACGAGGAAGCCATT-GCCGGACTTCAAAAA-CTTCTCAGTGAGAATGGAGAAT	226
	***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	

Çizelge 3.14 3'RACE'ten elde edilen dizin ve kontigin hizalama analizi (devam)

ONCAF1	TGGCACCAGTGCCTGCAGCAAAAATTGATCAGATTAAAGCAGAGTTGGCAACGGTTGACA	298
CA-Contig	TGGCACCAGTGCCTGCAGCAAAAATTGATCAGATTAAAGCAGAGTTGGCAACGGTTGACA	286

ONCAF1	AAACCACCGTTTCCAGCACTGTTGAGCAGCTGAAAAATGGCTTTGTCCACTTCAAAAGAG	358
CA-Contig	AAACCACCGTTTCCAGCACTGTTGAGCAGCTGAAAAATGGCTTTGTCCACTTCAAAAGAG	346

ONCAF1	AGAAATATGAGAAAAATCCAGCCTTGTATGGTGAAGTGGCCAAAGGCCAGAGCCCAACGT	418
CA-Contig	AGAAATATGAAAAAATCCAGCCTTGTATGGTGAAGTGGCCAAAGGCCAGAGCCCAACGT	406

ONCAF1	ATATGGTATTTGCCTGCTCCGATTCACGTGTCTGCCCGTCCACACGTCTGAATTTGCACC	478
CA-Contig	ATATGGTATTTGCCTGCTCCGATTCACGTGTCTGCCCGTCCACACGTCTGAATTTGCACC	466

ONCAF1	CGGGAGAGGCATTCATGGTCCGAAACATTGCTAACATGGTCCCTGCCTATGATAAGGTTA	538
CA-Contig	CGGGAGAGGCATTCATGGTCCGAAACATTGCTAACATGGTCCCTGCCTATGATAAGGTTA	526

ONCAF1	GATACTCTGGAGTTGGGTCTGCCATCGAGTATGCTGTCTTTCACCTAAAGGTTAAGGAAA	598
CA-Contig	GATACTCTGGAGTTGGGTCTGCCATCGAGTATGCTGTCTTTCACCTAAAGGTTAAGGAAA	586

ONCAF1	TCATAGTCATTGGACACAGTGCATGTGGAGGAATCAAGGGGCTCATGTCTCTCTGTATG	658
CA-Contig	TCATAGTCATTGGACACAGTGCATGTGGAGGAATCAAGGGGCTCATGTCTCTCTGTATG	646

ONCAF1	ATGGATCCACCTCCACTGACTTCATCGAGGACTGGGTGAAGATCTGTTACCTGCAAAGG	718
CA-Contig	ATGGATCCACCTCCACTGACTTCATCGAGGACTGGGTGAAGATCTGTTACCTGCAAAGG	706

ONCAF1	CCAAGGTGAAAGCCGAGCTTGGGAATGCACCTTTCGCGGATCAGTGTGGACTATGTGAGA	778
CA-Contig	CCAAGGTGAAAGCCGAGCTTGGGAATGCACCTTTCGCGGATCAGTGTGGACTATGTGAGA	766

ONCAF1	AGGAAGCAGTGAATGTATCACTTGGGAACCTGCTGAGTTATCCATTTGTAGAGAAGGAT	838
CA-Contig	AGGAAGCAGTGAATGTATCACTTGGGAACCTGCTGAGTTATCCATTTGTAGAGAAGGAT	826

ONCAF1	TGGTGAAGAAAACTTTGGCGCTAAAGGGAGGATATTATGATTTTGTAAAAGGAAGCTTTG	898
CA-Contig	TGGGAGAAAAAACTTTGGCGCTAAAGGGAGGATATTATGATTTTGTAAAAGGAAGCTTTG	886
*** **		
ONCAF1	AACTGTGGAGCCTGGAATTTGGTCTTTCTAGATCAGTCTCTGTATGAACAAATTAATCTC	958
CA-Contig	AACTGTGGAGCCTGTAATTTGGTCTTTCTAGATCAGTCTCTGTATGAACAAATTAATCTC	946

ONCAF1	TGTTCCCTATGAAGTTTTTAAATGTCACAAAAATGTATTTTAAACGATATGTGTAATGGAGA	1018
CA-Contig	TGTTCCCTATGAAGTTTTTAAATGTCACAAAAATGTATTTTAAACGATATGTGTAATGGAGA	1006

ONCAF1	ACAATTGTGTATCCTTAATTTCTTGTAAATAAATTCAGAAATGTATTTTCTGATAATTA	1078
CA-Contig	ACAATTGTGTATCCTTAATTTCTTGTAAATAAATTCAGAAATGTATTTTCTGATAATTA	1066

ONCAF1	A-TAAATAAAAAACAGCATCCAGTTTTATTT-----	1108
CA-Contig	AATAAATAAAAAACAGCATCCATTTTATTTNNAAAGGAAAGAGAAAAAATAAATAAAT	1126
* *****		
ONCAF1	-----AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAC-----	1135
CA-Contig	ATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACAACCCCCCTTTTGTGGAAA	1186
***** **		
ONCAF1	----TAGTCGACGCG-----TGGC-	1150
CA-Contig	GAGGTAGTAAAAAAAAAATCTTTTTTTTTTTTTTTTGGC	1230
*** * * **		

Zeytin β -CA geninin intron içerip içermediğini tespit edebilmek için genomik DNA'dan PCR yapılması ve elde edilen dizin 3'RACE'ten elde edilen dizinle hizalanarak karşılaştırılması planlanmıştır. Bu amaçla zeytin yapraklarından genomik DNA izole edilmiştir. CA kontig dizinine göre tasarlanan ileri ve geri primerler kullanılarak genomik DNA'dan PCR'lar yapılmış ve yaklaşık 900 bp büyüklüğünde cDNA fragmanları elde edilmiştir. Bu fragmanlar klonlanarak dizin analizine gönderilmiştir. Dizin analizi farklılıklarına dayalı olarak 899 bp, 903 bp ve 908 bp boyutlarında dizin bilgileri elde edilmiştir. Dizinler hizalama analizlerinde kendi aralarında ve 3'RACE'ten elde edilen dizine % 98-99 benzerlik göstermiştir (Çizelge 3.15). BLASTN ve BLASTP analizleri sonucu genomik DNA dizinlerinin de β -CA kodlayan genlere benzerlik verdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.15 Genomik DNA ve 3'RACE'den elde edilen dizinlerin hizalama analizi

FTB2	-TAACGGATGCGCACTTACTT-CCCTCATTCCTAA-TTCTTCCCTCAA-GAGACGCCCT	56
QKB4	-TAACGGATGCGCACTTACTT-CCCTCATTCCTAA-TTCTTCCCTCAA-GAGACGCCCT	56
DKB7	TAAACGGATGCGCACTTACTTTCCTCATTCGTAAATTCCTCCCTCAAAGAGACGCCCT	60
ONCAF1	-TAACGGATGCGCACTTACTT-CCCTCATTCCTAA-TTCTTCCCTCAAGAGAAGGCCCT	57

FTB2	T-CGT-AC TTTGTCAA-GCGTCGTCTA-ATTC--TCCACCGAGTCTC-ATTCAAAA-TAA	108
QKB4	T-CGT-AC TTTGTCAA-GCGTCGTCTA-ATTC--TCCACCGAGTCTC-ATTCAAAA-TAA	108
DKB7	T-CGT-AC TTTGTCAAAGCGTCGTCTA-ATTC--TCCACCGAGTCTC-ATTCAAAA-TAA	113
ONCAF1	TTTCGTTACTTTGTAAA-GCGTCGTCTATATTTCTTCCACCGAGTCTCTATTCAAAAATAA	116
	* * * * *	
FTB2	GCCTGTTTTT--GCTGCTCCTGCTCCTATCAT-CCACCCC-ATTTTGAGAGAAGATATGG	164
QKB4	GCCTGTTTTT--GCTGCTCCTGCTCCTATCAT-CCACCCC-ATTTTGAGAGAAGATATGG	164
DKB7	GCCTGTTTTT--GCTGCTCCTGCTCCTATCAT-CCACCCC-ATTTTGAGAGAAGATATGG	169
ONCAF1	CCCTGTTTTTTTGCTGCTCCTGCTCCTATCATTCACCCCATTTTGAGAGAAGATATGG	176

FTB2	GGAAGGAGTACGAGGAAGCCATT-GCCGGA CTTCAAAAA-CTTCTCAGTGAGAATGGAGG	222
QKB4	GGAAGGAGTACGAGGAAGCCATT-GCCGGA CTTCAAAAA-CTTCTCAGTGAGAATGGAGG	222
DKB7	GGAAGGAGTACGAGGAAGCCATT-GCCGGA CTTCAAAAA-CTTCTCAGTGAGAATGGAGG	227
ONCAF1	GGAAGGAGTACGAGGAAGCCATTTGCCGGA CTTCAAAAA CTTCAGTGAGAATGGAGA	236
	**** *	

Çizelge 3.15 Genomik DNA ve 3'RACE'den elde edilen dizinlerin hizalama analizi
(devam)

FTB2	ATTGGCACCAGTGGCTGCAGCAAAAAATCGAATTCATTGATCAGATTAAGCAGAGTTGG	282
QKB4	ATTGGCACCAGTGGCTGCAGCAAAAA-----TTGATCAGATTAAGCAGAGTTGG	272
DKB7	ATTGGCACCAGTGGCTGCAGCAAAAA-----TTGATCAGATTAAGCAGAGTTGG	277
ONCAF1	ATTGGCACCAGTGCCTGCAGCAAAAA-----TTGATCAGATTAAGCAGAGTTGG *****	286
FTB2	CAACGGTTGACAAAACCACCGTTTCCAGCACTGTTGAGCAGCTGAAAAATGGCTTTGTCC	342
QKB4	CAACGGTTGACAAAACCACCTGTTTCCAGCACTGTTGAGCAGCTGAAAAATGGCTTTGTCC	332
DKB7	CAACGGTTGACAAAACCACCGTTTCCAGCACTGTTGAGCAGCTGAAAAATGGCTTTGTCC	337
ONCAF1	CAACGGTTGACAAAACCACCGTTTCCAGCACTGTTGAGCAGCTGAAAAATGGCTTTGTCC *****	346
FTB2	ACTTCAAAGAGAGAAAATATGAGAAAAATCCAGCCTTGTATGGTGAACCTGCCAAAGGCC	402
QKB4	ACTTCAAAGAGAGAAAATATGAGAAAAATCCAGCCTTGTATGGTGAACCTGCCAAAGGCC	392
DKB7	ACTTCAAAGAGAGAAAATATGAGAAAAATCCAGCCTTGTATGGTGAACCTGCCAAAGGCC	397
ONCAF1	ACTTCAAAGAGAGAAAATATGAGAAAAATCCAGCCTTGTATGGTGAACCTGCCAAAGGCC *****	406
FTB2	AGAGCCCAACGTATATGGTATTTGCCTGCTCCGATTACAGTGTCTGCCCGTCACACGTCC	462
QKB4	AGAGCCCAACGTATATGGTATTTGCCTGCTCCGATTACAGTGTCTGCCCGTCACACGTCC	452
DKB7	AGAGCCCAACGTATATGGTATTTGCCTGCTCCGATTACAGTGTCTGCCCGTCACACGTCC	457
ONCAF1	AGAGCCCAACGTATATGGTATTTGCCTGCTCCGATTACAGTGTCTGCCCGTCACACGTCC *****	466
FTB2	TGAATTTGCACCCGGGAGAGGCATTCATGGTCCGAAACATTGCTAACATGGTCCCTGCCT	522
QKB4	TGAATTTGCACCCGGGAGAGGCATTCATGGTCCGAAACATTGCTAACATGGTCCCTGCCT	512
DKB7	TGAATTTGCACCCGGGAGAGGCATTCATGGTCCGAAACATTGCTAACATGGTCCCTGCCT	517
ONCAF1	TGAATTTGCACCCGGGAGAGGCATTCATGGTCCGAAACATTGCTAACATGGTCCCTGCCT *****	526
FTB2	ATGATAAGGTTAGATACTCTGGAGTTGGGTCTGCCATCGAGTATGCTGTTCTTCACCTAA	582
QKB4	ATGATAAGGTTAGATACTCTGGAGTTGGGTCTGCCATCGAGTATGCTGTTCTTCACCTAA	572
DKB7	ATGATAAGGTTAGATACTCTGGAGTTGGGTCTGCCATCGAGTATGCTGTTCTTCACCTAA	577
ONCAF1	ATGATAAGGTTAGATACTCTGGAGTTGGGTCTGCCATCGAGTATGCTGTTCTTCACCTAA *****	586
FTB2	AGGTTAAGGAAATCATAGTCATTTGGACACAGTGCATGTGGAGGAATCAAGGGGCTCATGT	642
QKB4	AGGTTAAGGAAATCATAGCCATTTGGACACAGTGCATGTGGAGGAATCAAGGGGCTCATGT	632
DKB7	AGGTTAAGGAAATCATAGTCATTTGGGACACAGTGCATGTGGAGGAATCAAGGGGCTCATGT	637
ONCAF1	AGGTTAAGGAAATCATAGTCATTTGGACACAGTGCATGTGGAGGAATCAAGGGGCTCATGT *****	646
FTB2	CTCTCTGATGATGGATCCACCTCCACTGACTTCATCGAGGACTGGGTGAAGATCTGTT	702
QKB4	CTCTCTGATGATGGATCCACCTCCACTGACTTCATCGAGGACTGGGTGAAGATCTGTT	692
DKB7	CTCTCTGATGATGGATCCACCTCCACTGACTTCATCGAGGACTGGGTGAAGATCTGTT	697
ONCAF1	CTCTCTGATGATGGATCCACCTCCACTGACTTCATCGAGGACTGGGTGAAGATCTGTT *****	706
FTB2	TACCTGCAAAGGCCAAGGTGAAAGCCGAGCTTGGGAATGCACCTTTCGCGGATCAGTGTG	762
QKB4	TACCTGCAAAGGCCAAGGTGAAAGCCGAGCTTGGGAATGCACCTTTCGCGGATCAGTGTG	752
DKB7	TACCTGCAAAGGCCAAGGTGAAAGCCGAGCTTGGGAATGCACCTTTCGCGGATCAGTGTG	757
ONCAF1	TACCTGCAAAGGCCAAGGTGAAAGCCGAGCTTGGGAATGCACCTTTCGCGGATCAGTGTG *****	766
FTB2	GACTATGTGAGAAGGAAGCAGTGAATGTATCACTTGGGAACCTGCTGAGTTATCCATTTG	822
QKB4	GACTATGTGAGAAGGAAGCAGTGAATGTATCACTTGGGAACCTGCTGAGTTATCCATTTG	812
DKB7	GGCTATGTGAGAAGGAAGCAGTGAATGTATCACTTGGGAACCTGCTGAGTTATCCATTTG	817
ONCAF1	GACTATGTGAGAAGGAAGCAGTGAATGTATCACTTGGGAACCTGCTGAGTTATCCATTTG *****	826
FTB2	TTAGAGAAGGATTGGTGAAGAAAACCTTTGG-CGCTAAAGGGAGGATATTATGATTTTGT	881
QKB4	TTAGAGAAGGATTGGTGAAGAAAACCTTTGGCGCTAAAGGGAGGATATTATGATTTTGT	872
DKB7	TTAGAGAAGGATTGGTGAAGAAAACCTTTGG-CGCTAAAGGGAGGATATTATGATTTTGT	876
ONCAF1	TTAGAGAAGGATTGGTGAAGAAAACCTTTGG-CGCTAAAGGGAGGATATTATGATTTTGT *****	885
FTB2	AAAGGAAGCTTTGAACTGTGGAGCCTG-----	908
QKB4	AAAGGAAGCTTTGAACTGTGGAGCCTG-----	899
DKB7	AAAGGAAGCTTTGAACTGTGGAGCCTG-----	903
ONCAF1	AAAGGAAGCTTTGAACTGTGGAGCCTGGAATTTGGTCTTCTAGATCAGTCTCTGTATGA *****	945

Çizelge 3.15 Genomik DNA ve 3'RACE'den elde edilen dizinlerin hizalama analizi
(devam)

FTB2	-----	
QKB4	-----	
DKB7	-----	
ONCAF1	ACAAATTAATCTCTGTTCCCTATGAAGTTTTTAATGTCACAAAAATGTATTTTAACGATA	1005
FTB2	-----	
QKB4	-----	
DKB7	-----	
ONCAF1	TGTGTAATGGAGAACAATTGTGTCATCCTTAATTTCTTGTAATAAATTCAGAAATTGTAT	1065
FTB2	-----	
QKB4	-----	
DKB7	-----	
ONCAF1	TTTCTGATAATTAATAAATAAAAACAGCATCCAGTTTATTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA	1125
FTB2	-----	
QKB4	-----	
DKB7	-----	
ONCAF1	AAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGC	1150

Yapılan çalışmalar sonucu henüz tam uzunlukta cDNA elde edilememiştir. Genin 5' ucuna ait dizin bilgisinin elde edilmesi amacıyla 5'RACE çalışmalarına devam edilmektedir. Bu çalışmada kullanılmak üzere genomik DNA'dan elde edilen dizin bilgisi kullanılarak Primer3 programında yeni primerler tasarlanmıştır.

Pirinç ve *Pennisetum glaucum* ile yapılan çalışmalarda CA geninin anlatımında artış olduğuna dair bulgular elde edilmiştir [121], [122]. Strese bağlı olarak zeytin CA geninin anlatımının Northern Blot ya da Real Time PCR analizleri kullanılarak araştırılması hedeflenmektedir.

Elde edilen gen intron içermediğinden *Escherichia coli*'de ekspresyonu yapılarak kinetik özellikleri çalışılacaktır.

Bunun dışında biyosensör ya da CO₂ tutulumunda biyoteknolojik kullanımlar için immobilizasyon çalışmaları planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Khalifah R.G., (1971). "The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase, Stop-Flow Kinetic Studies on the Native Human Isoenzymes B and C", *Journal of Biol Chemistry*, 246: 2561–2573.
- [2] Yu S., Xia D., Luo Q., Cheng Y. ve Takano T., Liu S., (2007). "Purification and Characterization of Carbonic Anhydrase of Rice (*Oryza sativa* L.) Expressed in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, 52: 379–383.
- [3] Meldrum N. U. ve Roughton F. J. W., (1933). "Carbonic Anhydrase. Its Preparation and Properties" *The Journal of Physiology*, 80: 113-142.
- [4] Stadie W.C. ve O'Brien H., (1933). "The Catalysis of the Hydration of Carbon Dioxide and Dehydration of Carbonic Acid by an Enzyme Isolated From Red Blood Cells" *The Journal of Biological Chemistry*, 103: 521-529.
- [5] Keilin, D. ve Mann, T., (1944) "Activity of purified carbonic anhydrase", *Nature* 153: 107-108.
- [6] Hewett-Emmett, D. ve Tashian, R.E., (1996). "Functional Diversity, Conservation and Convergence in the Evolution Of The α -, β - And γ - Carbonic Anhydrase Gene Families", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 50-77.
- [7] Roberts S.B., Lane T.W. ve Morel F.M.M., (1997). "Carbonic Anhydrase in the Marine Diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae)", *Journal of Phycology*, 33: 845-850
- [8] Lane T.W., Saito M.A., Georget G.N., Pickering I.J., Prince R.C. ve Morel F.M.M., (2005). "A Cadmium Enzyme from a Marine Diatom", *Nature*, 435: 42.
- [9] So A. K.-C., Espie G. S., Williams E. B., Shively J. M., Heinhorst S. ve Cannon G. C., (2004). "A Novel Evolutionary Lineage of Carbonic Anhydrase (ϵ Class) Is a Component of the Carboxysome Shell", *Journal of Bacteriology*, 186 (3): 623–630.
- [10] Sawaya M. R., Cannon G. C., Heinhorst S., Tanaka S., Williams E. B., Yeates Y. O. ve Kerfeld C. A., (2006). "The Structure of β -Carbonic Anhydrase from the Carboxysomal Shell Reveals a Distinct Subclass with One Active Site for the Price of Two", *The Journal Of Biological Chemistry* 281 (11): 7546–7555.

- [11] Tems U. ve Burnell J. N., "Characterization and expression of the maize β -carbonic anhydrase gene repeat regions", (2010). *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 945-951.
- [12] Henry, R.P. ve Swenson, E.R., (2000). "The Distribution and Physiological Significance of Carbonic Anhydrase in Vertebrate Gas Exchange Organs", *Respiratory physiology*, 121: 1–12.
- [13] Edsall, J.T., (1968). "Carbon Dioxide, Carbonic Acid, and the Bicarbonate Ion: Physical Properties and Kinetics of Interconversion", Forster, R.E., Edsall, J.T., Otis, A.B., Roughton, F.J.W., (1969). *CO₂: Chemical, Biochemical, and Physiological Aspects.*, NASA , Washington, DC.
- [14] Mikulski R. L. ve Silverman D. N., (2010). "Proton Transfer in Catalysis and The Role of Proton Shuttles in Carbonic Anhydrase", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 422–426.
- [15] Supuran C.T. ve Scozzafava A., (2007). "Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15: 4336–4350.
- [16] Hewett-Emmett, D., (2000). "Evolution and Distribution of the Carbonic Anhydrase Gene Families", Chegwidde, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., (2000). *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*, Birkhauser Verlag, Boston.
- [17] Xu Y., Feng L., Jeffrey P.D., Shi Y. ve Morel F.M., (2008). "Structure and Metal Exchange in the Cadmium Carbonic Anhydrase of Marine Diatoms", *Nature*, 452: 56–61.
- [18] Supuran C. T., (2010). "Carbonic Anhydrase Inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3467–3474.
- [19] Price G. D., Badger M. R., Woodger F. J. ve Long B. M., (2007). "Advances in Understanding the Cyanobacterial CO₂- Concentrating-Mechanism (CCM): Functional Components, C_i Transporters, Diversity, Genetic Regulation and Prospects for Engineering into Plants", *Journal of Experimental Botany*, 59 (7): 1441–1461.
- [20] Smith K. S. ve Ferry J. G., (2000). "Prokaryotic Carbonic Anhydrases", *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 335-366.
- [21] Parisi G., Perales M., Fornasari M. S., Colaneri A., González-Schain N., Gómez-Casati D., Zimmermann S., Brennicke A., Araya A., Ferry J.G., Echave J. ve Zabaleta E. (2004). "Gamma Carbonic Anhydrases in Plant Mitochondria", *Plant Molecular Biology*, 55: 193–207.
- [22] McGinn P. J. ve Morel F. M. M., (2008). "Expression and Regulation of Carbonic Anhydrases in the Marine Diatom *Thalassiosira Pseudonana* and in Natural Phytoplankton Assemblages From Great Bay, New Jersey", *Physiologia Plantarum*, 133: 78–91.
- [23] Moroney J.V., Bartlett S. G. ve Samuelsson G., (2001). "Carbonic Anhydrases in Plants and Algae", *Plant, Cell and Environment*, 24: 141–153

- [24] Andersson B., Nyman, P.O. ve Strid, L. (1972). "Amino Acid Sequence of Human Erythrocyte CA B", *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 48: 670-677.
- [25] Lin, K. T. D. ve Deutsch, H. F., (1973). "Human Carbonic Anhydrases. XI. The Complete Primary Structure of Carbonic Anhydrase B", *The Journal of Biological Chemistry*, 248: 1885-1893
- [26] Henderson, L.E., Henriksson, D. ve Nyman, P.O., (1973). "Amino Acid Sequence of Human Erythrocyte Carbonic Anhydrase C", *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 52: 1388-1394
- [27] Gilmour K.M., (2010). "Perspectives on Carbonic Anhydrase", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 157: 193–197.
- [28] Sly W. S. ve Hu P. Y., (1995). "Human Carbonic Anhydrases and Carbonic Anhydrase Deficiencies", *The Annual Review of Biochemistry*, 64: 375–401
- [29] Tashian R.E., Hewett-Emmett D., Carter N.D. ve Bergenheim N.C.H., (2000). "Carbonic Anhydrase (CA)-Related Proteins (CA-RPs) and Transmembrane Proteins with CA or CA-RP Domains"; Chegwidan, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., (2000). *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*, Birkhauser, Basel.
- [30] Nishimori I., (2004). "Acatalytic CAs: Carbonic Anhydrase-Related Proteins"; Supuran C.T., Scozzfava A., Conway J., (2004). *Carbonic anhydrases: Its inhibitors and activators*, CRC Press, First Edition, Florida.
- [31] Fernley R.T., Coghlan J.P. ve Wright R.D., (1988). "Purification and Characterization of a High-MR Carbonic Anhydrase from Sheep Parotid Gland. *Biochemical Journal*, 249: 201–207.
- [32] Sly, W.S., (2000). "The Membrane Carbonic Anhydrases: From CO₂ Transport to Tumor Marker", *EXS* 90: 95–104.
- [33] Hilvo M., Tolvanen M., Clark A., Shen B., Shah G.N., Waheed A., Halmi P., Hänninen M., Hämäläinen J.M., Vihinen M., Sly W.S. ve Parkkila S., (2005). "Characterization of CA XV, a New GPI-anchored Form of Carbonic Anhydrase", *Biochemichal Journal*, 392: 83–92.
- [34] Walsh P.J. ve Henry R.P., (1991). "Carbon Dioxide and Ammonia Metabolism and Exchange"; Hochachka P.W., Mommsen T.P, (1991). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 1, Elsevier, New York.
- [35] Henry R.P., (1996). "Multiple Roles of Carbonic Anhydrase in Cellular Transport and Metabolism", *Annual Review of Physiology*, 58: 523–538.
- [36] Henry R.P., Dodgson S.J., Forster R.E. ve Storey B.T., (1986). "Rat Lung Carbonic Anhydrase: Activity, Localization, and Isozymes", *Journal of Applied Physiology* 60: 638–645.
- [37] Henry R.P., Smatresk N.J. ve Cameron J.N., (1988). "The Distribution of Branchial Carbonic Anhydrase and the Effects of Gill and Erythrocyte Carbonic Anhydrase Inhibition in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*", *Journal of Experimental Biology*, 134: 201–218.

- [38] Swenson E.R., (2000). "Respiratory and renal roles of carbonic anhydrase in gas exchange and acid-base regulation"; Chegwiddden, W.R., Carter, N.D., Edwards, Y.H., (2000). *The Carbonic Anhydases: New Horizons*, Birkhauser, Basel.
- [39] Lindskog S., (1997). "Structure and Mechanism of Carbonic Anhydrase" *Pharmacology and Therapeutics*, 74 (1): 1-20.
- [40] Forsman C., Behravan G., Jonsson, B.H., Liang Z.W., Lindskog S., Ren X.L., Sandstrom J. ve Wallgren K., (1988). "Histidine 64 is not required for high CO₂ hydration activity of human carbonic anhydrase II", *FEBS Letters*, 229: 360-362.
- [41] Sly W. S., Hewett-Emmett D., Whyte M. P., Yu Y. S. L. ve Tashian R. E., (1983). "Carbonic Anhydrase II Deficiency Identified as the Primary Defect in the Autosomal Recessive Syndrome of Osteopetrosis with Renal Tubular Acidosis and Cerebral Calcification", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 2752-2756.
- [42] Hurst T.K., Wang D., Thompson R.B. ve Fierke C.A., (2010) "Carbonic anhydrase II-based metal ion sensing: Advances and new perspectives". *Biochimica et Biophysica Acta* 1804: 393–403
- [43] Lin T.Y., Liao B.K., Horng J.L., Yah J.J., Hsiao C.D. ve Hwang P.P., (2008). "Carbonic Anhydrase 2-like a and 15a are Involved in Acid-Base Regulation and Na⁺ Uptake in Zebrafish H⁺-ATPase-Rich Cells", *American Journal of Physiology*, 294: 1250–1260.
- [44] Fukuzawa H., Fujiwara S., Tachiki A. ve Miyachi S., (1990). "Nucleotide sequences of Two Genes *CAH1* and *CAH2* Which Encode Carbonic Anhydrase Polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Nucleic Acids Research*, 18 (21): 6441-6442.
- [45] Fujiwara S., Fukuzawa H., Tachiki A. ve Miyachi S., (1990). "Structure and Differential Expression of Two Genes Encoding Carbonic Anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 87: 9779-9783.
- [46] Christianson D. W. ve Alexander R. S., (1989). "Carboxylate–Histidine–Zinc Interactions in Protein Structure and Function", *The Journal of the American Chemical Society*, 111: 6412–6419.
- [47] Kiefer L.L. ve Fierke C.A., (1994). "Functional Characterization of Human Carbonic Anhydrase II Variants with Altered Zinc Binding Sites", *Biochemistry* 33: 15233–15240.
- [48] Kiefer L.L., Paterno S.A. ve Fierke C.A., (1995). "Hydrogen Bond Network in the Metal Binding Site of Carbonic Anhydrase Enhances Zinc Affinity and Catalytic Efficiency", *The Journal of the American Chemical Society*, 117: 6831–6837.
- [49] Krebs J.F., Rana F., Dluhy R.A. ve Fierke C.A., (1993). "Kinetic and Spectroscopic Studies of Hydrophilic Amino Acid Substitutions in the

- Hydrophobic Pocket of Human Carbonic Anhydrase II”, *Biochemistry*, 32: 4496–4505.
- [50] Merz Jr.K.M., (1990). “Insights into the Function of the Zinc Hydroxide-Thr199-Glu106 Hydrogen Bonding Network in Carbonic Anhydrases”, *Journal of Molecular Biology*, 214: 799–802.
- [51] Tu C. ve Silverman D.N., (1989). “Role of Histidine 64 in the Catalytic Mechanism of Human Carbonic Anhydrase II Studied with a Sitespecific Mutant”, *Biochemistry*, 28: 7913–7918.
- [52] Lindskog S. ve Silverman D., (2000). “The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrase”; Chegwiddden W.R., Carter N.D., Edwards Y.H., (2000). *The Carbonic Anhydrases: New Horizons*. Birkhauser Verlag, Basel.
- [53] Neish A.C., (1939). “Studies on Chloroplasts II. Their Chemical Composition and the Distribution of Certain Metabolites Between the Chloroplasts and the Remainder of the Leaf”, *Biochemistry Journal* 33: 300–308.
- [54] Burnell J.N., Gibbs M.J. ve Mason J.G., (1990). “Spinach Chloroplastic Carbonic Anhydrase”, *Plant Physiology*, 92: 37-40.
- [55] Roeske, C.A., ve Ogren, W.L., (1990). “Nucleotide Sequence of Pea cDNA Encoding Chloroplast Carbonic Anhydrase”, *Nucleic Acids Research* 18: 3413.
- [56] Raines C.A., Horsnell P.R., Holder C. ve Lloyd J.C., (1992). “*Arabidopsis thaliana* Carbonic Anhydrase: cDNA Sequence and Effect of CO₂ on mRNA Levels”, *Plant Molecular Biology*, 20: 1143–1148.
- [57] Fett J.P. ve Coleman J.R. (1994). “Characterization and expression of two cDNAs encoding carbonic anhydrase in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Physiology*, 105: 707-713.
- [58] Smith K.S., Jakubzick C, Whittam T.S., ve Ferry J.G., (1999). “Carbonic Anhydrase is an Ancient Enzyme Widespread in Prokaryotes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 15184.
- [59] Rowlett R.S., (2010). “Structure and Catalytic Mechanism of the β -Carbonic Anhydrases”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 362–373.
- [60] Tachiki, A., Fukuzawa, H. ve Miyachi, S., (1992). “Characterization of Carbonic Anhydrase Isosyme CA2, Which is the *CAH2* Gene Product, in *Clamydomonas reinhardtii*”, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56: 794-798.
- [61] Merlin C., Masters M., McAteer S. ve Coulson A., (2003). “Why is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*?” *Journal of Bacteriology*, 185: 6415-6424.
- [62] Mitsuhashi S., Ohnishi J., Hayashi M. ve Ikeda M., (2004). “A Gene Homologous to Beta-Type Carbonic Anhydrase is Essential for the Growth of *Corynebacterium glutamicum* under Atmospheric Conditions”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 592–601.

- [63] Gotz R., Gnann A. ve Zimmermann F.K., (1999). "Deletion of the Carbonic Anhydrase-Like Gene NCE103 of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Causes an Oxygen-sensitive Growth Defect", *Yeast*, 15: 855–864.
- [64] Clark D., Rowlett R.S., Coleman J.R. ve Klessig D.F., (2004). "Complementation of the Yeast Deletion Mutant Delta NCE103 by Members of the Beta Class of Carbonic Anhydrases is Dependent on Carbonic Anhydrase Activity Rather Than on Antioxidant Activity", *Biochemical Journal*, 379: 609–615.
- [65] Badger M.R. ve Pfanz H., (1995). "Effect of Carbonic Anhydrase Inhibition on Photosynthesis by Leaf Pieces of C3 and C4 plants", *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 45–49.
- [66] Von Caemmerer S., Quinn V., Hancock N.C., Price G.D., Furbank R.T. ve Ludwig M., (2004). "Carbonic anhydrase and C4 photosynthesis: a Transgenic Analysis", *Plant, Cell & Environment*, 27: 697–703.
- [67] Okabe K., Yang S.-Y., Tsuzuki M. ve Miyachi S., (1984). "Carbonic Anhydrase: Its Content in Spinach Leaves and Its Taxonomic Diversity Studied with Anti-Spinach Leaf Carbonic Anhydrase Antibody", *Plant Science Letters*, 33: 145-153.
- [68] Yang S.-Y., Tsuzuki M. ve Miyachi S., (1985). "Carbonic Anhydrase of *Chlamydomonas*: Purification and Studies on its Induction Using Antiserum against *Chlamydomonas* Carbonic Anhydrase", *Plant Cell Physiology*, 26 (1): 25-34.
- [69] Price D.G., Von Caemmerer S., Evans J.R., Yu J.-W., Lloyd J., Oja V., Kell P., Harrison K., Gallagher A. ve Badger M.R., (1994). "Specific Reduction of Chloroplastic Carbonic Anhydrase Activity by Antisense RNA in Transgenic Tobacco Plants has a Minor Effect on Photosynthetic CO₂ Assimilation", *Planta* 193: 331–340.
- [70] Jebanathirajah J.A. ve Coleman J.R., (1998). "Association of Carbonic Anhydrase with a Calvin Cycle Enzyme Complex in *Nicotiana tabacum*", *Planta*, 204: 177-182.
- [71] Majeau N., Arnoldo M.A. ve Coleman J.R., (1994). "Modification of Carbonic Anhydrase Activity by Antisense and Over-Expression Constructs in Transgenic Tobacco", *Plant Molecular Biology*, 25: 377-385.
- [72] Strop P., Smith K.S., Iverson T.M., Ferry J.G. ve Rees D.C., (2001). "Crystal Structure of the "cab"-Type Beta Class Carbonic Anhydrase from the Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*", *Journal of Biological Chemistry*, 276 (13): 10299-10305.
- [73] Mitsuhashi S., Mizushima T., Yamashita E., Yamamoto M., Kumasaka T., Moriyama H., Ueki T., Miyachi S. ve Tsukihara T., (2000). "X-ray Structure of Beta-Carbonic Anhydrase from the Red Alga, *Porphyridium purpureum*, Reveals a Novel Catalytic Site for CO₂ Hydration", *Journal of Biological Chemistry*, 275: 5521–5526.

- [74] Kimber M. S. ve Pai E. F., (2000). "The Active Site Architecture of *Pisum sativum* β -Carbonic Anhydrase is a Mirror Image of that of α -Carbonic Anhydrases", *The EMBO Journal*, 19: 1407–1418.
- [75] Johansson I.M. ve Forsman C., (1993). "Kinetic Studies of Pea Carbonic Anhydrase", *European Journal of Biochemistry*, 218: 439–446.
- [76] Johansson I.M. ve Forsman C., (1992). "Processing of the Chloroplast Transit Peptide of Pea Carbonic Anhydrase in Chloroplasts and in *Escherichia coli*. Identification of Two Cleavage Sites", *FEBS Letters*, 314: 232–236.
- [77] Provart N.J., Majeau N. ve Coleman J.R., (1993). "Characterization of Pea Chloroplastic Carbonic Anhydrase. Expression in *Escherichia coli* and Site-Directed Mutagenesis", *Plant Molecular Biology*, 22, 937-943.
- [78] Bracey M.H., Christiansen J., Tovar P., Cramer S.P. ve Bartlett S.G., (1994). "Spinach Carbonic Anhydrase: Investigation of the Zinc-Binding Ligands by Site-Directed Mutagenesis, Elemental Analysis and EXAFS", *Biochemistry*, 33: 13126–13131.
- [79] Rowlett R.S., Chance M.R., Wirt M.D., Sidelinger D.E., Royal J.R., Woodroffe M., Wang Y.F.A., Saha R.P. ve Lam M.G., (1994). "Kinetic and Structural Characterization of Spinach Carbonic Anhydrase", *Biochemistry*, 33: 13967-13976.
- [80] Jiang W.P. ve Gupta D., (1999). "Structure of the Carbonic Anhydrase VI (CA6) Gene: Evidence for two Distinct Groups within the Alpha-CA Gene Family", *Biochemical Journal*, 344: 385–390.
- [81] Alber B.E. ve Ferry J.G., (1994). "A Carbonic Anhydrase from the Archaeon *Methanosarcina thermophila*", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91: 6909–6913.
- [82] Kisker C., Schindelin H., Alber B.E., Ferry J.G. ve Rees D.C., (1996). "A Left-Handed Beta-Helix Revealed by the Crystal Structure of a Carbonic Anhydrase from the Archaeon *Methanosarcina thermophila*", *EMBO Journal*, 15: 2323–2330.
- [83] Sunderhaus S., Dudkina N.V., Jansch L., Klodmann J., Heinemeyer J., Perales M., Zabaleta E., Boekema E.J. ve Braun H.-P., (2006). "Carbonic Anhydrase Subunits form a Matrix-Exposed Domain Attached to the Membrane Arm of Mitochondrial Complex I in Plants", *Journal of Biological Chemistry*: 281, 6482–6488.
- [84] Heazlewood J.L., Howell K.A. ve Millar A.H., (2003). "Mitochondrial Complex I from Arabidopsis and Rice: Orthologs of Mammalian and Fungal Components Coupled with Plant-Specific Subunits", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1604: 159–169.
- [85] Perales M., Parisi G., Fornasari M.S., Colaneri A., Villarreal F., González-Schain N., Echave J., Gómez-Casati D., Braun H.P., Araya A. ve Zabaleta E., (2004). "Gamma Carbonic Anhydrase Like Complex Interact with Plant Mitochondrial Complex I", *Plant Molecular Biology*, 56: 947–957.

- [86] Cox E. H., McLendon G. L., Morel F. M., Lane T. W., Prince R. C., Pickering I. J. ve George G. N., (2000). "The Active Site Structure of *Thalassiosira weissflogii* Carbonic Anhydrase 1", *Biochemistry*, 39: 12128.
- [87] Soto A.R., Zheng H., Shoemaker D., Rodriguez J., Read B.A. ve Wahlund T.M., (2006). "Identification and Preliminary Characterization of Two cDNAs Encoding Unique Carbonic Anhydrases from the Marine Alga *Emiliania huxleyi*", *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5500–5511.
- [88] Lapointe M., MacKenzie T.D.B. ve Morse D., (2008). "An External -Carbonic Anhydrase in a Free-Living Marine Dinoflagellate May Circumvent Diffusion Limited Carbon Acquisition", *Plant Physiology*, 147: 1427-1436.
- [89] Lane T. W. ve Morel F.M.M., (2000). "A Biological Function for Cadmium in Marine Diatoms", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97: 4627-4631.
- [90] Badger M.R. ve Price G.D., (1994). "The Role of Carbonic-anhydrase in Photosynthesis", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 369–392.
- [91] Moroney J. V., Ma Y., Freym D. W., Fusilier K. A., Pham T. T., Simms T. A., DiMario R.J., Yang J. ve Mukherjee B., (2011). "The Carbonic Anhydrase Isoforms of *Chlamydomonas reinhardtii*: Intracellular Location, Expression, and Physiological Roles", *Photosynthesis Research*, 109 (1-3): 133-149.
- [92] Braun H.P. ve Zabaleta E., (2007). "Carbonic Anhydrase Subunits of the Mitochondrial NADH Dehydrogenase Complex (Complex I) in Plants", *Plant Physiology*, 129: 114-122.
- [93] Maeda S., Badger M.R. ve Price G.D. (2002). "Novel Gene Products Associated with NdhD3/D4-containing NDH-1 Complexes are Involved in Photosynthetic CO₂ Hydration in the Cyanobacterium, *Synechococcus sp.* PCC7942", *Molecular Microbiology*, 43: 425-435.
- [94] Maeda S., Omata T., Badger M.R. ve Price G.D., (2002). "Mutation of a Low Affinity CO₂ Uptake System Leads to a Constitutive, High-Affinity State for Inorganic Carbon Uptake in the Cyanobacterium *Synechococcus sp.* PCC7942", *Plant and Cell Physiology*, 43: 67-68.
- [95] Klodmann J., Sunderhaus S., Nimtz M., Jansch L. ve Braun H.P., (2010). "Internal Architecture of Mitochondrial Complex I from *Arabidopsis thaliana*", *Plant Cell*, 22: 797–810.
- [96] Pronina N.A., Avramova S., Georgie, D. ve Semenenko V.E., (1981). "Dynamics of Carbonic Anhydrase Activity in *Chlorella* and *Scenedesmus* During Cell Adaptation to High Light and Low CO₂ Concentration", *Soviet Plant Physiology*, 28: 43-52.
- [97] Moroney J.V. ve Ynalvez R.A., (2007). "Proposed Carbon Dioxide Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Eukaryotic Cell*, 6: 1251-1259.

- [98] Spalding M.H., (2008). "Microalgal Carbon Dioxide Concentrating Mechanisms: *Chlamydomonas* Inorganic Carbon Transporters", *Journal of Experimental Botany*, 59: 1463-1473.
- [99] Kupriyanova E. V. ve Pronina N. A., (2010). "Carbonic Anhydrase: Enzyme That Has Transformed the Biosphere", *The Russian Journal of Plant Physiology*, 58 (2): 197–209.
- [100] Pronina, N.A., (2000). "The Organization and Physiological Role of the CO₂-CM in Microalgal Photosynthesis", *The Russian Journal of Plant Physiology.*, 47: 706-714.
- [101] Markelova A.G., Sinetova M.P., Kupriyanova E.V. ve Pronina N.A., (2009). "Distribution and Functional Role of Carbonic Anhydrase Cah3 Associated with Thylakoid Membranes in the Chloroplast and Pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*", *The Russian Journal of Plant Physiology*, 56: 761-768.
- [102] Karlsson J., Clarke A.K., Chen Z.Y., Hugghin S.Y., Par Y.I., Husic H.D., Moroney J.V., ve Samuelsson G., (1998). "A Novel Alpha-Type Carbonic Anhydrase Associated with the Thylakoid Membrane in *Chlamydomonas reinhardtii* is Required at Ambient CO₂", *The EMBO Journal*, 17: 1208-1216.
- [103] Park Y. I., Karlsson J., Rojdestvenski I., Pronina N., Klimov V., Oquist G. ve Samuelsson G., (1999). "Role of a Novel Photosystem II Associated Carbonic Anhydrase in Photosynthetic Carbon Assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*", *FEBS Letters*, 444: 102-105.
- [104] Burnell J.N. ve Hatch M.D., (1988). "Low Bundle Sheath Carbonic Anhydrase is Apparently Essential for Effective C₄ Pathway Operation", *Plant Physiology* 86: 1252-1256.
- [105] Ludwig M., Von Caemmerer S., Price G.D., Badger M.R. ve Furbank R.T., (1998). "Expression of Tobacco Carbonic Anhydrase in the C₄ Dicot *Flaveria bidentis* Leads to Increased Leakiness of the Bundle Sheath and a Defective CO₂-Concentrating Mechanism", *Plant Physiology*, 117: 1071-1081.
- [106] Coleman J.E., (1992). "Zinc Proteins: Enzymes, Storage Proteins, Transcription Factors, and Replication Proteins", *Annual Reviews Biochemistry*, 61: 897-946.
- [107] Christianson D.W., (1991). "Structural Biology of Zinc", *Advances in Protein Chemistry*, 42: 281-355.
- [108] Vallee B.L. ve Auld D.S, (1990). "Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and other Proteins", *Biochemistry*, 29: 5647-5659.
- [109] Reed M.L. ve Graham D., (1981). "Carbonic Anhydrase in Plants: Distribution, Properties and Possible Physiological Roles", *Progress In Phytochemistry*, 7: 47-94.
- [110] Pocker Y. ve Sarkanen S., (1978). "Carbonic Anhydrase Structure, Catalytic Versatility and Inhibition", *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 47: 149-274.
- [111] Silverman D.N., (1991). "The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase", *Canadian Journal of Botany*, 69: 1070-1078.

- [112] Rengel Z., (1995). "Carbonic Anhydrase Activity in Leaves of Wheat Genotype Differing in Zinc Efficiency", *Journal of Plant Physiology*, 147: 251-256.
- [113] Wood J. ve Silbly P., (1952). "Carbonic Anhydrase Activity in Plants in Relation to Zinc Content, *Australian Journal of Agricultural Research*, 5: 244-255.
- [114] Bar Akiva A. ve Lavron V., (1969). "Carbonic Anhydrase Activity as an Indicator of Zinc Deficiency in Citrus Leaves", *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 44: 359-362.
- [115] Randall P. J. ve Bouma D., (1973). "Zinc Deficiency, Carbonic Anhydrase, and Photosynthesis in Leaves of Spinach", *Plant Physiology*, 52: 229-232.
- [116] Lo'pez-Milla A. F., Ellis D. R. ve Grusak M. A., (2005). "Effect of Zinc and Manganese Supply on the Activities of Superoxide Dismutase and Carbonic Anhydrase in *Medicago truncatula* Wild Type and raz Mutant Plants", *Plant Science*, 168: 1015-1022.
- [117] Okhi K., (1976). "Effect of Zinc Nutrition on Photosynthesis and Carbonic Anhydrase Activity in Cotton", *Physiologia Plantarum*, 38: 300-304.
- [118] Ohki K. (1978). "Zinc Concentration in Soybean as Related to Growth, Photosynthesis, and Carbonic Anhydrase Activity", *Crop Science*, 18 (1): 79-82.
- [119] Triolo L. ve Bassanelli C., (1976). "Carbonic Anhydrase, Net Photosynthesis and Photorespiration in Zn-Deficient Leaves of *Triticum durum*: A Hypothesis of Carbonic Anhydrase Function", *Agrochimica*, 20: 457-465.
- [120] Sasaki H., Hirose T., Watanabe Y. ve Ohsugi R., (1998). "Effect of Reduction in Carbonic Anhydrase Activity Caused by Zinc Deficiency on CO₂ Transfer Resistance", *Plant Physiology*, 118 (3): 929-934.
- [121] Yu S., Zhang X., Guan Q., Takano T. ve Liu S., (2007). "Expression of a Carbonic Anhydrase Gene is Induced by Environmental Stresses in Rice (*Oryza sativa* L.)" *Biotechnology Letters*, 29: 89-94.
- [122] Kaul T., Reddy P. S., Mahanty S., Thirulogachandar V., Reddy R. A., Kumar B., Sopory S. K. ve Reddy M. K., (2011). "Biochemical and Molecular Characterization of Stress-Induced β -Carbonic Anhydrase from a C4 Plant, *Pennisetum glaucum*", *Journal of Plant Physiology*, 168: 601-610.
- [123] Cammaroto C., Diliberto L., Ferralis M., Manca R., Sanna A. ve Giordano M., (1998). "Use of Carbonic Anhydrase in Electrochemical Biosensors for Dissolved CO₂", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 48, (1-3): 439-447.
- [124] Prabhua C., Wanjari S., Gawandea S., Dasa S., Labhsetwara N., Kotwal S., Puric A. K., Satyanarayanac T. ve Rayalu S., (2009). "Immobilization of Carbonic Anhydrase Enriched Microorganism on Biopolymer Based Materials" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60 (1-2): 13-21.
- [125] Lee S.W., Park S.B., Jeong S.K., Lim K.S., Lee S.H. ve Trachtenberg M.C., (2010). "On Carbon Dioxide Storage Based on Biomineralization Strategies", *Micron*, 41 (4): 273-282.

- [126] Prabhua C., Valechhaa A., Wanjaria S., Labhsetwara N., Kotwalb S., Satyanarayananc T. ve Rayalu S., (2011). "Carbon Composite Beads for Immobilization of Carbonic Anhydrase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71: 71-78.
- [127] Wanjaria S., Prabhua C., Yadava R., Satyanarayanab T., Labhsetwara N. ve Rayalu S., (2002). "Immobilization of Carbonic Anhydrase on Chitosan Beads for Enhanced Carbonation Reaction", *Process Biochemistry*, 46 (4): 1010-1018.
- [128] Prabhua C., Wanjari S., Gawandea S., Dasa S., Labhsetwara N., Kotwal S., Puric A. K., Satyanarayanac T. ve Rayalu S., (2009). "Immobilization of Carbonic Anhydrase Enriched Microorganism on Biopolymer Based Materials" *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60 (1-2): 13-21.
- [129] Green P.S., (2002). "A revision of *Olea* L. (Oleaceae)", *Kew Bulletin*, 57: 91-140.
- [130] Belaj A., Muñoz-Diez C., Baldoni L., Porceddu A., Barranco D. ve Satovic Z., (2007). "Genetic Diversity and Population Structure of Wild Olives from the North-western Mediterranean Assessed by SSR Markers", *Annals of Botany*, 100: 449-458.
- [131] Hatzopoulos P., Banilas G., Giannoulia K., Gazis F., Nikoloudakis N., Milioni D. ve Haralampidis K., (2002). "Breeding, Molecular Markers and Molecular Biology of the Olive Tree", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 574-586.
- [132] Besnard G., Baradat P., Chevalier D., Tagmount A. ve Bervill A., (2001), "Genetic Differentiation in the Olive Complex (*Olea europaea*) Revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA Genes" , *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 165-182.
- [133] Elbaum R., Melamed-Bessud C., Boaretto E., Galili E., Lev-Yadun S., Levy A.A. ve Weiner S., (2006). "Ancient Olive DNA in Pits: Preservation, Amplification and Sequence Analysis", *Journal of Archaeological Science*, 33: 77-88.
- [134] Wiesman Z., (2009). *Desert Olive Oil Cultivation: Advanced Bio Technologies*, First Edition, Academic Press, Burlington.
- [135] Rugini E., Biasi R. ve Muleo R., (2000). "Olive (*Olea europaea* var. *sativa*) Transformation; Mohan J.S., Minocha S.C., *Molecular Biology of Woody Plants*, 2, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- [136] D'Angeli S. , Malhó R. ve Altamura M. M., (2003). "Low-temperature Sensing in Olive Tree: Calcium Signalling and Cold Acclimation", *Plant Science*, 165 (6): 1303-1313.
- [137] Therios I. N., (2009). *Olives (Crop Production Science in Horticulture)*, 18, Oxfordshire.
- [138] Bedestenci H.Ç. ve Vuruş H., (2000). "Türkiyede Zeytin Üretiminin Geleceği", *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2 (3): 136-144

- [139] Secchi F., Lovisolo C. ve Schubert A., (2007). "Expression of OePIP2.1 Aquaporin Gene and Water Relations of *Olea europaea* Twigs During Drought Stress and Recovery", *Annals of Applied Biology*, 150 (2): 163-167.
- [140] Dichio M., Xiloyannis, Sofo A. ve Montanaro G., (2005). "Osmotic Regulation in Leaves and Roots of Olive Trees During a Water Deficit and Rewatering", *Tree Physiology*, 26: 179-185.
- [141] Goretta S., Bučević- Popović P., Pavela-Vrančić M. ve Perica S., (2007). "Salinity-Induced Changes in Growth, Superoxide Dismutase Activity, and Ion Content of Two Olive Cultivars", *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170 (3): 398-403.
- [142] Matteucci M., D'Angeli S., Errico S., Lamanna R., Perrotta G. ve Altamura M. M., (2011). "Cold Affects the Transcription of Fatty Acid Desaturases and Oil Quality in the Fruit of *Olea europaea* L. Genotypes with Different Cold Hardiness", *Journal of Experimental Botany*, February: 1-18.
- [143] Gómez-del-Campo M. ve Barranco D., (2005). "Field evaluation of frost tolerance in 10 olive cultivars", *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 3 (3): 385-390.
- [144] Primer3 (v. 0.4.0) programı, <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, (29.11.2011).
- [145] NCBI Blast programı, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome, (29.11.2011)
- [146] EMBOSS Transeq internet programı, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/>, (29.11.2011)
- [147] Özdemir Özgentürk N., Oruç F., Sezerman U., Küçükural A., Vural Korkut Ş., Ün C., (2010). "Generation and Analysis of Expressed Sequence Tags from *Olea europaea* L.", *Comparative and Functional Genomics*, 2010: 1-9.
- [148] Frohman M.A., Dush M.K. ve Martin G.R., (1988). "Rapid Production of Full-Length cDNAs from Rare Transcripts: Amplification Using a Single Gene-Specific Oligonucleotide Primer" *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*, 85 (23): 8998-9002.
- [149] Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., ve Arnheim N., (1985). "Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia", *Science* 230 (4732): 1350-1354.

BLAST ANALİZİ SONUÇLARI

A-1 OCA BLASTN Analizi Sonuçları

BLASTN 2.2.26+
 Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Query= lcl|51649
 Length=392

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 269999410 gb EZ421299.1 TSA:Olea europaea cultivar Gemlik Contig	586	4e-164
gi 295798040 emb FN814304.1 Olea europaea partial mRNA for c....	414	3e-112

A-2 OCA BLASTP Analizi Sonuçları

BLASTP 2.2.26+
 Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Reference for compositional score matrix adjustment: Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schaffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", FEBS J. 272:5101-5109.

RID: DCZHTPSU01S

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples

from WGS projects
 16,352,912 sequences; 5,622,180,029 total letters
 Query= OCA
 Length=131

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
emb CBL86547.1 carbonic anhydrase [Olea europaea]	109	1e-29
dbj BAA95793.1 carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	100	1e-25
ref XP_003618283.1 Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	101	2e-25
gb AAI17071.1 chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...	100	3e-25
ref XP_003618284.1 Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	102	3e-25
ref NP_001234048.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	103	3e-25
gb AAI17070.1 chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...	100	4e-25
ref XP_003618281.1 Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	103	7e-25
pdb 1EKJ A Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of B...	100	8e-25
ref XP_003618280.1 Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	103	9e-25
ref XP_002277957.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	102	1e-24
gb AAA34026.1 carbonic anhydrase precursor [Spinacia oleracea]	101	1e-24
gb AAA34057.1 carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	101	1e-24
prf 1707317A carbonic anhydrase	100	2e-24
emb CAN61667.1 hypothetical protein VITISV_037833 [Vitis vin...	102	2e-24
gb AAA33652.1 carbonic anhydrase [Pisum sativum] >prf 17103...	102	2e-24
sp P27141.1 CAHC_TOBAC RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	102	2e-24
dbj BAA25639.1 NPCA1 [Nicotiana paniculata]	102	2e-24
sp P17067.1 CAHC_PEA RecName: Full=Carbonic anhydrase, chloro...	102	2e-24
dbj BAD94771.1 carbonic anhydrase, chloroplast precursor [Ar...	97.1	3e-24
sp P16016.2 CAHC_SPIOL RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	100	5e-24
gb AAM22683.1 AF482951_1 carbonic anhydrase [Gossypium hirsutum]	100	6e-24
gb AAD29049.1 AF132854_1 carbonic anhydrase isoform 1 [Gossyp...	100	6e-24
gb AAD29050.1 AF132855_1 carbonic anhydrase isoform 2 [Gossyp...	100	6e-24
gb AAD27876.2 AF139464_1 carbonic anhydrase [Vigna radiata]	100	9e-24
gb ABI14813.1 chloroplast carbonic anhydrase [Pachysandra te...	100	9e-24
dbj BAD93915.1 carbonic anhydrase, chloroplast precursor [Ar...	98.6	1e-23
gb ACZ74707.1 carbonic anhydrase [Phaseolus vulgaris]	99.8	2e-23
ref NP_850490.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	98.6	2e-23
ref XP_003553833.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	99.4	2e-23
ref XP_003553834.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	99.4	3e-23
ref NP_850491.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	99.0	4e-23
gb AEK25173.1 chloroplast carbonic anhydrase [Dimocarpus lon...	98.6	4e-23
ref NP_186799.2 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	99.0	4e-23
gb ABE66400.1 carbonic anhydrase [Striga asiatica]	94.7	5e-23
gb AAS65454.1 chloroplast carbonic anhydrase precursor [Nocco...	98.6	5e-23
gb ADI52861.1 chloroplast beta-carbonic anhydrase [Brassica ...]	98.6	5e-23
gb AAL51055.2 AF454759_1 beta-carbonic anhydrase [Nicotiana t...	98.2	5e-23
ref XP_003524544.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	98.2	7e-23
dbj BAJ33678.1 unnamed protein product [Thellungiella haloph...	98.2	8e-23
ref XP_002882178.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_477371 [A...	98.2	8e-23
gb ABK96336.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	95.9	1e-22
gb ABK96524.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	96.3	3e-22
gb AAB65822.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...]	96.3	3e-22
ref XP_002298524.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	96.3	3e-22
gb AAF78507.1 AF195204_1 carbonic anhydrase isoform 1 [Pyrus ...]	90.5	4e-22
gb AAC49785.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...]	95.5	5e-22
gb ABQ41955.1 carbonic anhydrase isoform 1 [Sonneratia caseo...	90.1	5e-22
sp P46510.2 CAHX_FLABI RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	95.1	8e-22
prf 2018192A carbonic anhydrase	95.1	9e-22
sp P46512.1 CAH1_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 1; Al...	93.6	4e-21
sp P46281.1 CAHX_FLAPR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	93.2	4e-21
sp P46511.1 CAHX_FLABR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	93.2	4e-21
ref NP_001233847.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	91.3	7e-21
ref NP_974782.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	91.7	7e-21
ref XP_002871629.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_488319 [A...	91.3	7e-21
dbj BAH20249.1 AT5G14740 [Arabidopsis thaliana]	91.3	1e-20
ref NP_568303.2 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	91.7	2e-20
ref NP_001031884.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...	90.9	4e-20
gb ACU23858.1 unknown [Glycine max]	86.3	5e-20
ref XP_002525377.1 carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	89.0	9e-20
ref XP_002266686.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	88.6	1e-19
emb CBI28524.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	88.2	1e-19
gb AAO17574.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria bidentis]	87.8	2e-19
ref XP_003517731.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	87.4	3e-19
emb CAH60890.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]	87.4	3e-19

ref XP_003517730.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	87.4	3e-19
gb ADZ97029.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria vaginata]	86.7	4e-19
ref XP_003613228.1	Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	87.0	4e-19
ref XP_003613229.1	Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	87.4	4e-19
gb ADZ97028.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria cronquistii]	87.8	5e-19
ref XP_003519759.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	87.0	5e-19
ref NP_001031883.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	87.4	7e-19
gb ABC41657.1	carbonic anhydrase 2 [Flaveria pringlei]	86.3	1e-18
sp P46513.1	CAH2_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 2; Al...	84.3	1e-18
gb ABC41659.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria linearis]	86.3	2e-18
gb ABK94941.1	unknown [Populus trichocarpa]	85.1	2e-18
ref XP_002314617.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	85.1	2e-18
gb ABC41658.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria pringlei]	85.9	2e-18
gb ACU19610.1	unknown [Glycine max]	85.1	2e-18
gb ADZ97026.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria anomala]	85.9	3e-18
ref XP_003530645.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	85.5	3e-18
gb ACJ85468.1	unknown [Medicago truncatula]	84.7	4e-18
gb AAA50156.1	carbonic anhydrase [Arabidopsis thaliana]	84.0	5e-18
dbj BAD94475.1	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	80.1	5e-18
ref XP_002524642.1	carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...]	83.6	2e-17
gb ADZ97025.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria angustifolia]	82.8	3e-17
ref XP_002888778.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_476161 [A...]	81.6	5e-17
ref NP_849872.1	beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...]	80.9	7e-17
ref NP_173785.1	beta carbonic anhydrase 3 [Arabidopsis thali...]	80.5	1e-16
ref NP_177198.1	beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...]	80.9	1e-16
gb AAO17573.1	carbonic anhydrase 2 [Flaveria bidentis]	80.9	1e-16
gb ACS68659.1	carbonic anhydrase [Sonneratia alba] >gb ACS68...	75.9	1e-16
gb ADN33836.1	carbonic anhydrase [Cucumis melo subsp. melo]	79.7	2e-16
gb ADZ97027.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria brownii]	80.5	2e-16
ref XP_002890592.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata sub...]	79.3	3e-16
gb ABR16758.1	unknown [Picea sitchensis]	75.1	1e-15
gb ABQ41954.1	carbonic anhydrase isoform 1 [Sonneratia alba]	73.2	2e-15
gb ABK26336.1	unknown [Picea sitchensis] >gb ACN39821.1 unk...	76.3	5e-15
gb ACN39779.1	unknown [Picea sitchensis]	76.3	5e-15

ONCAF1 DİZİN ANALİZİ VE BLAST SONUÇLARI

B-1 ONCAF1 BLASTN Analizi Sonuçları

```

BLASTN 2.2.26+
Reference: Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and
Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA
sequences", J Comput Biol 2000; 7(1-2):203-14.

RID: DCEF86V201N

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,
GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
          15,080,577 sequences; 39,044,651,233 total letters
Query= ONCAF1 consensus

Length=1150

Sequences producing significant alignments:

          Score          E
          (Bits)        Value

emb|FN814304.1| Olea europaea partial mRNA for carbonic anhyd...  581    3e-162
dbj|AB012863.1| Nicotiana paniculata mRNA for NPCA1, complete...  578    3e-161
gb|AF454759.2| Nicotiana tabacum beta-carbonic anhydrase (CA)...  576    1e-160
gb|M94135.1|TOBCLCAA Nicotiana tabacum chloroplast carbonic a...  574    4e-160
emb|FQ394658.1| Vitis vinifera clone SS0AFA1YI15                    560    9e-156
emb|FQ394183.1| Vitis vinifera clone SS0AFA22YD04                    560    9e-156
emb|FQ394038.1| Vitis vinifera clone SS0AFA22Y010                    560    9e-156
emb|FQ393393.1| Vitis vinifera clone SS0AFA26YD15                    560    9e-156
emb|FQ391968.1| Vitis vinifera clone SS0AFA8YD21                      560    9e-156
emb|FQ396309.1| Vitis vinifera clone SS0AFA10YI13                    560    9e-156
emb|FQ396239.1| Vitis vinifera clone SS0AFA10Y015                    560    9e-156
emb|FQ396018.1| Vitis vinifera clone SS0AFA12YI12                    560    9e-156
emb|FQ395693.1| Vitis vinifera clone SS0AFA14YJ02 >emb|FQ3941...  560    9e-156
emb|FQ395591.1| Vitis vinifera clone SS0AFA15YC08                    560    9e-156
emb|FQ395579.1| Vitis vinifera clone SS0AFA15YD07                    560    9e-156
emb|FQ395238.1| Vitis vinifera clone SS0AFA16YP06                    560    9e-156
emb|FQ395197.1| Vitis vinifera clone SS0AFA17YD16                    560    9e-156
emb|FQ396224.1| Vitis vinifera clone SS0AFA11YB09                    556    1e-154
gb|L19255.1|TOBCARANHY Nicotiana tabacum chloroplastic carbon...  554    4e-154
gb|DQ781308.1| Pachysandra terminalis chloroplast carbonic an...  553    1e-153
emb|FQ380495.1| Vitis vinifera clone SS0ACG55YJ20                    549    2e-152
emb|FQ396228.1| Vitis vinifera clone SS0AFA11YA24                    549    2e-152
ref|XM_002277921.1| PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical pr...  549    2e-152
dbj|AK319649.1| Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1092DE0...  549    2e-152
ref|NM_001247119.1| Solanum lycopersicum carbonic anhydrase (...  549    2e-152
emb|FQ393428.1| Vitis vinifera clone SS0AFA26YB01                    536    1e-148
gb|JN033201.1| Dimocarpus longan chloroplast carbonic anhydra...  531    4e-147
emb|FQ380262.1| Vitis vinifera clone SS0ACG8YM04                    509    1e-140
gb|AF132854.1|AF132854 Gossypium hirsutum carbonic anhydrase ...  497    9e-137

```


ref XM_003618233.1	Medicago truncatula Carbonic anhydrase (M...	495	3e-136
gb AF132855.1 AF132855	Gossypium hirsutum carbonic anhydrase ...	493	1e-135
ref XM_003618232.1	Medicago truncatula Carbonic anhydrase (M...	489	1e-134
ref XM_003618236.1	Medicago truncatula Carbonic anhydrase (M...	479	2e-131
gb JF313387.1	Flaveria cronquistii carbonic anhydrase 3 mRNA...	479	2e-131
gb DQ273587.1	Flaveria pringlei carbonic anhydrase 3 mRNA, c...	462	2e-126
gb JF313384.1	Flaveria angustifolia carbonic anhydrase 3 mRN...	459	2e-125
gb AF139464.2 AF139464	Vigna radiata carbonic anhydrase (CipC...	459	2e-125
ref XM_003524496.1	PREDICTED: Glycine max uncharacterized pr...	457	8e-125
dbj AK243989.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-01-M19	457	8e-125
dbj AK244072.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-02-A08	452	3e-123
dbj AK244071.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-02-A07	452	3e-123
dbj AK243890.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-01-I13	452	3e-123
dbj AK287357.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-51-E04	452	3e-123
dbj AK286019.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-20-G08	452	3e-123
dbj AK244922.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-17-A06	450	1e-122
ref XM_003553785.1	PREDICTED: Glycine max carbonic anhydrase...	448	4e-122
gb JF313385.1	Flaveria anomala carbonic anhydrase 3 mRNA, co...	448	4e-122
gb M27295.1 SPICA	Spinach chloroplastic carbonic anhydrase mR...	448	4e-122
emb X52558.1	Pea cap mRNA for carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)	448	4e-122
gb J05403.1 SPICCCA	Spinach chloroplast carbonic anhydrase m...	446	1e-121
dbj AK286148.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-22-L20	444	5e-121
gb DQ273588.1	Flaveria linearis carbonic anhydrase 3 mRNA, c...	444	5e-121
gb M63627.1 PEACAMRA	P.sativum carbonic anhydrase mRNA, compl...	443	2e-120
ref XM_003553786.1	PREDICTED: Glycine max carbonic anhydrase...	441	6e-120
gb JF313386.1	Flaveria brownii carbonic anhydrase 3 mRNA, co...	435	3e-118
ref XM_002524596.1	Ricinus communis carbonic anhydrase, puta...	426	1e-115
ref NM_001246918.1	Solanum lycopersicum carbonic anhydrase (...)	423	2e-114
emb FQ396392.1	Vitis vinifera clone SS0AFA10YB03	419	2e-113
gb AY167113.1	Flaveria bidentis carbonic anhydrase 3 mRNA, c...	417	7e-113
emb FQ380586.1	Vitis vinifera clone SS0ACG48YB02	416	2e-112
gb U19737.1 FPU19737	Flaveria pringlei carbonic anhydrase mRN...	414	8e-112
gb JF313388.1	Flaveria vaginata carbonic anhydrase 3 mRNA, c...	412	3e-111
gb EF148560.1	Populus trichocarpa x Populus deltoides clone ...	401	5e-108
gb EF148363.1	Populus trichocarpa x Populus deltoides clone ...	401	5e-108
gb U08398.2 FBU08398	Flaveria bidentis carbonic anhydrase mRN...	399	2e-107
gb AY974608.1	Nicotiana benthamiana clone 30F62 chloroplast ...	399	2e-107
gb AY974607.1	Nicotiana benthamiana clone 30C84 chloroplast ...	399	2e-107
ref XM_002298488.1	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	394	8e-106
dbj AK352592.1	Thellungiella halophila mRNA, complete cds, c...	392	3e-105
gb GQ356780.1	Brassica napus chloroplast beta-carbonic anhyd...	392	3e-105
emb X65541.1	A.thaliana mRNA for carbonic anhydrase	392	3e-105
ref NM_180160.3	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase 1 (C...	389	3e-104
dbj AK226447.1	Arabidopsis thaliana mRNA for carbonic anhydr...	389	3e-104
gb AY056175.1	Arabidopsis thaliana putative carbonic anhydra...	389	3e-104
dbj AK221786.1	Arabidopsis thaliana mRNA for carbonic anhydr...	389	3e-104
gb AY081658.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase, chlor...	389	3e-104
gb AY062785.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase, chlor...	389	3e-104
ref XM_003618235.1	Medicago truncatula Carbonic anhydrase (M...	387	1e-103
gb U19738.1 FLU19738	Flaveria linearis carbonic anhydrase 1 m...	387	1e-103
gb U08402.1 FBU08402	Flaveria brownii carbonic anhydrase mRNA...	385	4e-103
gb U55838.1 PTU55838	Populus tremula x Populus tremuloides ca...	383	1e-102
ref XM_003519711.1	PREDICTED: Glycine max carbonic anhydrase...	381	5e-102
ref XM_003517683.1	PREDICTED: Glycine max carbonic anhydrase...	381	5e-102
ref XM_003517682.1	PREDICTED: Glycine max carbonic anhydrase...	381	5e-102
ref NM_180159.2	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase 1 (C...	379	2e-101
ref NM_111016.3	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase 1 (C...	379	2e-101
gb AY091066.1	Arabidopsis thaliana putative carbonic anhydra...	379	2e-101
gb AF428459.1 AF428459	Arabidopsis thaliana AT3g01500/F4P13_5...	379	2e-101
gb AF428284.1 AF428284	Arabidopsis thaliana AT3g01500/F4P13_5...	379	2e-101
ref XM_002525331.1	Ricinus communis carbonic anhydrase, puta...	378	6e-101
dbj AK287413.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-52-M01	376	2e-100
ref XM_002882132.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothet...	374	7e-100
emb CU223834.1	Populus EST from leave	369	3e-98
emb CU223036.1	Populus EST from leave	369	3e-98
ref XM_002871583.1	Arabidopsis lyrata subsp. lyrata hypothet...	367	1e-97
gb AY551530.1	Thlaspi caerulescens chloroplast carbonic anhy...	367	1e-97
gb DQ273586.1	Flaveria pringlei carbonic anhydrase 2 mRNA, c...	367	1e-97
gb U55837.1 PTU55837	Populus tremula x Populus tremuloides ca...	365	4e-97
ref NM_121478.3	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase 2 (C...	361	5e-96
ref NM_203053.2	Arabidopsis thaliana carbonic anhydrase 2	361	5e-96

B-2 ONCAF1 BLASTP Analizi Sonuçları

BLASTP 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Reference for compositional score matrix adjustment: Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schaffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", *FEBS J.* 272:5101-5109.

RID: DCGHE5XP01N

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

16,352,912 sequences; 5,622,180,029 total letters

Query= ONCAF1_consensus

Length=384

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
ref NP_001234048.1 carbonic anhydrase [<i>Solanum lycopersicum</i>]...	404	1e-138
gb ABI14813.1 chloroplast carbonic anhydrase [<i>Pachysandra te...</i>	400	8e-137
dbj BAA25639.1 NPCA1 [<i>Nicotiana paniculata</i>]	399	1e-136
sp P27141.1 CAHC_TOBAC RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	395	3e-135
gb AAL51055.2 AF454759_1 beta-carbonic anhydrase [<i>Nicotiana t...</i>	392	5e-134
gb AAA34057.1 carbonic anhydrase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	389	2e-133
gb AEK25173.1 chloroplast carbonic anhydrase [<i>Dimocarpus lon...</i>	387	4e-132
dbj BAJ33678.1 unnamed protein product [<i>Thellungiella haloph...</i>	387	1e-131
ref XP_002277957.1 PREDICTED: hypothetical protein [<i>Vitis vi...</i>	386	2e-131
gb AAD29049.1 AF132854_1 carbonic anhydrase isoform 1 [<i>Gossyp...</i>	385	2e-131
gb AAM22683.1 AF482951_1 carbonic anhydrase [<i>Gossypium hirsutum</i>]	385	3e-131
gb AAD29050.1 AF132855_1 carbonic anhydrase isoform 2 [<i>Gossyp...</i>	385	4e-131
prf 1707317A carbonic anhydrase	380	5e-130
gb ADI52861.1 chloroplast beta-carbonic anhydrase [<i>Brassica ...</i>	382	6e-130
sp P16016.2 CAHC_SPIOL RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	382	7e-130
ref NP_850491.1 carbonic anhydrase 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] ...	382	7e-130
ref NP_186799.2 carbonic anhydrase 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] ...	382	9e-130
gb AAA34026.1 carbonic anhydrase precursor [<i>Spinacia oleracea</i>]	379	1e-129
ref XP_002882178.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_477371 [A...	381	3e-129
gb ABK96524.1 unknown [<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>]	379	1e-128
dbj BAD93915.1 carbonic anhydrase, chloroplast precursor [Ar...	374	8e-128
ref XP_002298524.1 predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>] >...	377	9e-128
ref NP_850490.1 carbonic anhydrase 1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] ...	374	1e-127
gb AAB65822.1 carbonic anhydrase [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus ...</i>	374	6e-127
gb AAC49785.1 carbonic anhydrase [<i>Populus tremula</i> x <i>Populus ...</i>	374	1e-126
gb AAS65454.1 chloroplast carbonic anhydrase precursor [Nocc...	374	1e-126
gb ABK96336.1 unknown [<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>]	370	3e-126
ref XP_002871629.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_488319 [A...	369	1e-125
dbj BAH20249.1 AT5G14740 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	368	4e-125
gb AAA33652.1 carbonic anhydrase [<i>Pisum sativum</i>] >prf 17103...	370	6e-125
sp P17067.1 CAHC_PEA RecName: Full=Carbonic anhydrase, chloro...	369	8e-125
ref NP_568303.2 carbonic anhydrase 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] ...	369	1e-124
ref NP_974782.1 carbonic anhydrase 2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] ...	365	4e-124
ref XP_003553833.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	366	2e-123
gb AAO17574.1 carbonic anhydrase 3 [<i>Flaveria bidentis</i>]	363	2e-123
ref XP_003553834.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	365	4e-123
ref XP_003618284.1 Carbonic anhydrase [<i>Medicago truncatula</i>] ...	362	4e-123
ref XP_003618281.1 Carbonic anhydrase [<i>Medicago truncatula</i>] ...	365	5e-123
ref XP_003524544.1 PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	364	8e-123
sp P46511.1 CAHX_FLABR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	363	1e-122
ref XP_003618280.1 Carbonic anhydrase [<i>Medicago truncatula</i>] ...	364	1e-122
gb ABC41658.1 carbonic anhydrase 3 [<i>Flaveria pringlei</i>]	363	1e-122

gb ABC41659.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria linearis]	363	2e-122
sp P46510.2 CAHX_FLABI	RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	363	2e-122
gb ACZ74707.1	carbonic anhydrase [Phaseolus vulgaris]	363	2e-122
ref NP_001031884.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...	363	4e-122
gb ADZ97028.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria cronquistii]	362	5e-122
sp P46281.1 CAHX_FLAPR	RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	362	8e-122
sp P46512.1 CAH1_FLALI	RecName: Full=Carbonic anhydrase 1; Al...	362	9e-122
gb ADZ97029.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria vaginata]	358	2e-121
gb ADZ97025.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria angustifolia]	360	3e-121
prf 2018192A	carbonic anhydrase	360	5e-121
ref NP_001031883.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...	359	7e-121
gb ADZ97026.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria anomala]	359	8e-121
ref XP_002524642.1	carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	358	2e-120
gb AA50156.1	carbonic anhydrase [Arabidopsis thaliana]	355	3e-120
gb AAD27876.2 AF139464_1	carbonic anhydrase [Vigna radiata]	356	1e-119
emb CBI28524.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	352	3e-119
emb CAN61667.1	hypothetical protein VITISV_037833 [Vitis vin...	353	2e-118
pdb 1EKJ A	Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of B...	348	6e-118
gb ADZ97027.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria brownii]	352	7e-118
ref XP_003530645.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	351	9e-118
ref XP_002525377.1	carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	348	3e-117
ref XP_003517731.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	347	6e-117
ref XP_003517730.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	347	8e-117
ref XP_002314617.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	346	1e-116
gb ACU19610.1	unknown [Glycine max]	345	2e-116
gb ABK94941.1	unknown [Populus trichocarpa]	345	4e-116
emb CAH60890.1	carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]	345	5e-116
ref XP_003519759.1	PREDICTED: carbonic anhydrase, chloroplas...	342	5e-115
gb ABC41657.1	carbonic anhydrase 2 [Flaveria pringlei]	342	6e-115
ref XP_003613229.1	Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	337	1e-112
ref XP_003613228.1	Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	336	2e-112
ref NP_001233847.1	carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	334	3e-112
gb AAO17573.1	carbonic anhydrase 2 [Flaveria bidentis]	334	9e-112
gb ACJ85468.1	unknown [Medicago truncatula]	333	3e-111
gb ADN33836.1	carbonic anhydrase [Cucumis melo subsp. melo]	331	9e-111
ref XP_002266686.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	314	3e-104
ref NP_849872.1	beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...	307	2e-101
ref XP_002888778.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_476161 [A...	308	2e-101
ref NP_177198.1	beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...	306	9e-101
gb AAY17070.1	chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...	298	5e-99
ref XP_002890592.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata sub...	300	1e-98
ref XP_002282673.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	298	5e-98
emb CBI15026.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	298	5e-98
gb AAY17071.1	chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...	293	3e-97
ref NP_173785.1	beta carbonic anhydrase 3 [Arabidopsis thali...	296	5e-97
sp P46513.1 CAH2_FLALI	RecName: Full=Carbonic anhydrase 2; Al...	293	5e-97
ref XP_003618283.1	Carbonic anhydrase [Medicago truncatula] ...	290	7e-96
dbj BAH56801.1	AT3G01500 [Arabidopsis thaliana]	289	7e-94
gb ABR13313.1	putative carbonic anhydrase [Prunus dulcis]	283	5e-92
ref NP_001078583.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...	283	2e-91
ref XP_002282681.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	277	1e-89
emb CBI15025.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	277	1e-89
gb ABK22341.1	unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23356.1 unk...	277	2e-89
ref XP_002322163.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	276	3e-89
ref XP_002322164.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	275	1e-88
gb ACU22936.1	unknown [Glycine max]	273	7e-88
gb ABK23747.1	unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23788.1 unk...	271	2e-87
gb ACN39779.1	unknown [Picea sitchensis]	271	3e-87

QKB4 BLAST SONUÇLARI

C-1 QKB4 BLASTN Analizi Sonuçları

BLASTN 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: B4U712GU01N

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
14,874,993 sequences; 37,899,591,299 total letters
Query= G11022340 (DKB4) T7UNIVERSAL

Length=899

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 22550385 gb AF454759.2 Nicotiana tabacum beta-carbonic an...	578	3e-161
gi 3061270 dbj AB012863.1 Nicotiana paniculata mRNA for NPCA...	578	3e-161
gi 170218 gb M94135.1 TOBCLCAA Nicotiana tabacum chloroplast ...	578	3e-161
gi 225311910 dbj AK319649.1 Solanum lycopersicum cDNA, clone...	553	1e-153
gi 350537678 ref NM_001247119.1 Solanum lycopersicum carboni...	553	1e-153
gi 112292668 gb DQ781308.1 Pachysandra terminalis chloroplas...	551	4e-153
gi 349731537 emb FQ394658.1 Vitis vinifera clone SS0AFA1YI15	540	6e-150
gi 349730861 emb FQ394183.1 Vitis vinifera clone SS0AFA22YD04	540	6e-150
gi 349727542 emb FQ394038.1 Vitis vinifera clone SS0AFA22YO10	540	6e-150
gi 349724443 emb FQ393393.1 Vitis vinifera clone SS0AFA26YD15	540	6e-150
gi 349715961 emb FQ391968.1 Vitis vinifera clone SS0AFA8YD21	540	6e-150
gi 349715193 emb FQ380495.1 Vitis vinifera clone SS0ACG55YJ20	540	6e-150
gi 349711243 emb FQ396309.1 Vitis vinifera clone SS0AFA10YI13	540	6e-150
gi 349710576 emb FQ396239.1 Vitis vinifera clone SS0AFA10YO15	540	6e-150
gi 349709758 emb FQ396018.1 Vitis vinifera clone SS0AFA12YI12	540	6e-150
gi 349708235 emb FQ395693.1 Vitis vinifera clone SS0AFA14YJ0...	540	6e-150
gi 349708133 emb FQ395591.1 Vitis vinifera clone SS0AFA15YC08	540	6e-150
gi 349708121 emb FQ395579.1 Vitis vinifera clone SS0AFA15YD07	540	6e-150
gi 349706607 emb FQ395238.1 Vitis vinifera clone SS0AFA16YP06	540	6e-150
gi 349706566 emb FQ395197.1 Vitis vinifera clone SS0AFA17YD16	540	6e-150
gi 225452451 ref XM_002277921.1 PREDICTED: Vitis vinifera hy...	540	6e-150
gi 310920 gb L19255.1 TOBCARANHY Nicotiana tabacum chloroplas...	540	6e-150
gi 349710561 emb FQ396224.1 Vitis vinifera clone SS0AFA11YB09	535	3e-148
gi 339958978 gb JN033201.1 Dimocarpus longan chloroplast car...	531	3e-147
gi 349710565 emb FQ396228.1 Vitis vinifera clone SS0AFA11YA24	529	1e-146

gi 349724478 emb FQ393428.1	Vitis vinifera clone SS0AFA26YB01	515	3e-142
gi 4754912 gb AF132854.1 AF132854	Gossypium hirsutum carbonic...	493	8e-136
gi 349714762 emb FQ380262.1	Vitis vinifera clone SS0ACG8YM04	491	3e-135
gi 4754914 gb AF132855.1 AF132855	Gossypium hirsutum carbonic...	488	4e-134
gi 326582929 gb JF313387.1	Flaveria cronquistii carbonic anh...	486	1e-133
gi 83722770 gb DQ273587.1	Flaveria pringlei carbonic anhydra...	473	8e-130
gi 210145298 dbj AK243989.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	471	3e-129
gi 326582923 gb JF313384.1	Flaveria angustifolia carbonic an...	470	9e-129
gi 210141003 dbj AK244922.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	464	4e-127
gi 83722772 gb DQ273588.1	Flaveria linearis carbonic anhydra...	459	2e-125
gi 210145199 dbj AK243890.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	453	7e-124
gi 210143366 dbj AK286148.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	453	7e-124
gi 210143237 dbj AK286019.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	453	7e-124
gi 326582925 gb JF313385.1	Flaveria anomala carbonic anhydra...	452	3e-123
gi 8954288 gb AF139464.2 AF139464	Vigna radiata carbonic anhy...	452	3e-123
gi 210144575 dbj AK287357.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	448	3e-122
gi 326582927 gb JF313386.1	Flaveria brownii carbonic anhydra...	444	4e-121
gi 169056 gb M63627.1 PEACAMRA	P.sativum carbonic anhydrase m...	441	5e-120
gi 20672 emb X52558.1	Pea cap mRNA for carbonic anhydrase (E...	441	5e-120
gi 349715284 emb FQ380586.1	Vitis vinifera clone SS0ACG48YB02	437	6e-119
gi 210145381 dbj AK244072.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	435	2e-118
gi 210145380 dbj AK244071.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	435	2e-118
gi 170104 gb J05403.1 SPICPCCA	Spinach chloroplast carbonic a...	434	7e-118
gi 255567324 ref XM_002524596.1	Ricinus communis carbonic an...	430	8e-117
gi 170101 gb M27295.1 SPICA	Spinach chloroplastic carbonic an...	425	4e-115
gi 27652185 gb AY167113.1	Flaveria bidentis carbonic anhydra...	417	5e-113
gi 349711326 emb FQ396392.1	Vitis vinifera clone SS0AFA10YB03	416	2e-112
gi 295798040 emb FN814304.1	Olea europaea partial mRNA for c...	414	6e-112
gi 350540661 ref NM_001246918.1	Solanum lycopersicum carboni...	414	6e-112
gi 326582931 gb JF313388.1	Flaveria vaginata carbonic anhydr...	407	9e-110
gi 40737971 gb U08398.2 FBU08398	Flaveria bidentis carbonic a...	405	3e-109
gi 224055528 ref XM_002298488.1	Populus trichocarpa prediecte...	398	5e-107
gi 118489442 gb EF148560.1	Populus trichocarpa x Populus del...	396	2e-106
gi 118489057 gb EF148363.1	Populus trichocarpa x Populus del...	396	2e-106
gi 882241 gb U19738.1 FLU19738	Flaveria linearis carbonic anh...	392	2e-105
gi 1354516 gb U55838.1 PTU55838	Populus tremula x Populus tre...	387	9e-104
gi 297787438 gb GQ356780.1	Brassica napus chloroplast beta-c...	376	2e-100
gi 62865756 gb AY974608.1	Nicotiana benthamiana clone 30F62 ...	374	6e-100
gi 62865754 gb AY974607.1	Nicotiana benthamiana clone 30C84 ...	374	6e-100
gi 210144631 dbj AK287413.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	372	2e-99
gi 312281624 dbj AK352592.1	Thellungiella halophila mRNA, co...	370	7e-99
gi 14342 emb X65541.1	A.thaliana mRNA for carbonic anhydrase	365	3e-97
gi 1354514 gb U55837.1 PTU55837	Populus tremula x Populus tre...	365	3e-97
gi 297807490 ref XM_002871583.1	Arabidopsis lyrata subsp. ly...	363	1e-96
gi 160951531 emb CU223834.1	Populus EST from leave	361	4e-96
gi 160949999 emb CU223036.1	Populus EST from leave	361	4e-96
gi 145361764 ref NM_180160.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	361	4e-96
gi 145361763 ref NM_180159.2	Arabidopsis thaliana carbonic a...	361	4e-96
gi 145337936 ref NM_111016.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	361	4e-96
gi 110740989 dbj AK226447.1	Arabidopsis thaliana mRNA for ca...	361	4e-96
gi 20259532 gb AY091066.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	361	4e-96
gi 15810272 gb AY056175.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	361	4e-96
gi 62320916 dbj AK221786.1	Arabidopsis thaliana mRNA for car...	361	4e-96
gi 20148658 gb AY081658.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhy...	361	4e-96
gi 17065417 gb AY062785.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhy...	361	4e-96
gi 16226668 gb AF428459.1 AF428459	Arabidopsis thaliana AT3g0...	361	4e-96
gi 16226254 gb AF428284.1 AF428284	Arabidopsis thaliana AT3g0...	361	4e-96
gi 224107828 ref XM_002314581.1	Populus trichocarpa prediecte...	360	1e-95
gi 118486196 gb EF146899.1	Populus trichocarpa clone WS0121_...	360	1e-95
gi 118485782 gb EF146686.1	Populus trichocarpa clone WS01211...	360	1e-95
gi 83722768 gb DQ273586.1	Flaveria pringlei carbonic anhydra...	358	4e-95
gi 297828591 ref XM_002882132.1	Arabidopsis lyrata subsp. ly...	356	2e-94
gi 145358028 ref NM_121478.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	356	2e-94
gi 79611323 ref NM_203053.2	Arabidopsis thaliana carbonic an...	356	2e-94
gi 23397048 gb BT000663.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL09-...	356	2e-94
gi 23397026 gb BT000652.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL09-...	356	2e-94
gi 12642851 gb AF339686.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	356	2e-94
gi 11908031 gb AF326863.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	356	2e-94
gi 16226546 gb AF428428.1 AF428428	Arabidopsis thaliana AT5g1...	356	2e-94
gi 42454895 emb BX830347.1	Arabidopsis thaliana Full-length ...	356	2e-94
gi 13265565 gb AF324712.2 AF324712	Arabidopsis thaliana AT5g1...	356	2e-94
gi 222424587 dbj AK317585.1	Arabidopsis thaliana AT5G14740 m...	352	2e-93
gi 79327880 ref NM_001036807.1	Arabidopsis thaliana carbonic...	351	6e-93
gi 42455860 emb BX830730.1	Arabidopsis thaliana Full-length ...	351	6e-93
gi 145334411 ref NM_001085114.1	Arabidopsis thaliana carboni...	345	3e-91

C-2 QKB4 BLASTP Analizi Sonuçları

BLASTP 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Reference for compositional score matrix adjustment: Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schaffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", *FEBS J.* 272:5101-5109.

RID: B550JVAD012

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
15,916,306 sequences; 5,467,648,827 total letters
Query= DKB4
Length=300

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
ref NP_001234048.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	402	5e-139
gb ABI14813.1 chloroplast carbonic anhydrase [Pachysandra te...	401	7e-139
gb AEK25173.1 chloroplast carbonic anhydrase [Dimocarpus lon...	400	2e-138
dbj BAA25639.1 NPCA1 [Nicotiana paniculata]	398	1e-137
ref XP_002277957.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	397	4e-137
sp P27141.1 CAHC_TOBAC RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	394	3e-136
sp P16016.2 CAHC_SPIOL RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	392	3e-135
gb AAL51055.2 AF454759_1 beta-carbonic anhydrase [Nicotiana t...	389	3e-134
gb AAD29049.1 AF132854_1 carbonic anhydrase isoform 1 [Gossyp...	384	4e-132
gb AAD29050.1 AF132855_1 carbonic anhydrase isoform 2 [Gossyp...	384	6e-132
gb AAM22683.1 AF482951_1 carbonic anhydrase [Gossypium hirsutum]	384	6e-132
gb ABK96524.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	384	6e-132
gb AAB65822.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...	381	4e-131
ref XP_002298524.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	381	1e-130
gb AAA33652.1 carbonic anhydrase [Pisum sativum] >prf 17103...	380	2e-130
gb AAC49785.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...	379	6e-130
dbj BAJ33678.1 unnamed protein product [Thellungiella haloph...	376	1e-128
sp P17067.1 CAHC_PEA RecName: Full=Carbonic anhydrase, chloro...	375	3e-128
gb ADI52861.1 chloroplast beta-carbonic anhydrase [Brassica ...	374	3e-128
gb ABC41659.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria linearis]	374	5e-128
ref XP_002524642.1 carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	372	3e-127
ref XP_002882178.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_477371 [A...	371	2e-126
ref NP_186799.2 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	371	2e-126
ref NP_850491.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	370	2e-126
gb AAA34057.1 carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	366	8e-126
gb ACZ74707.1 carbonic anhydrase [Phaseolus vulgaris]	368	1e-125
gb ADZ97028.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria cronquistii]	367	3e-125
gb ABC41658.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria pringlei]	367	4e-125
emb CAN61667.1 hypothetical protein VITISV_037833 [Vitis vin...	367	4e-125
gb AAS65454.1 chloroplast carbonic anhydrase precursor [Nocc...	367	6e-125
sp P46511.1 CAHX_FLABR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	364	3e-124
sp P46510.2 CAHX_FLABI RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	364	5e-124
gb ADZ97025.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria angustifolia]	363	5e-124
gb ADZ97026.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria anomala]	363	1e-123
sp P46281.1 CAHX_FLAPR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	362	3e-123
sp P46512.1 CAH1_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 1; Al...	362	4e-123
gb AAD27876.2 AF139464_1 carbonic anhydrase [Vigna radiata]	361	6e-123
prf 2018192A carbonic anhydrase	360	2e-122
gb ADZ97027.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria brownii]	358	9e-122
gb ABK96336.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	343	5e-117
prf 1707317A carbonic anhydrase	342	2e-116
gb AAA34026.1 carbonic anhydrase precursor [Spinacia oleracea]	340	6e-116
ref XP_002871629.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_488319 [A...	336	4e-114
dbj BAD93915.1 carbonic anhydrase, chloroplast precursor [Ar...	335	6e-114
ref NP_850490.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	336	7e-114
gb AAO17574.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria bidentis]	335	7e-114

ref NP_974782.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	333	5e-113
dbj BAH20249.1 AT5G14740 [Arabidopsis thaliana]	333	1e-112
gb ADZ97029.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria vaginata]	332	1e-112
ref NP_568303.2 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	334	2e-112
emb CBI28524.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	332	2e-112
gb AAA50156.1 carbonic anhydrase [Arabidopsis thaliana]	326	4e-110
ref NP_001031884.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	327	1e-109
ref XP_002525377.1 carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...]	324	4e-109
ref NP_001031883.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	325	1e-108
gb ACU19610.1 unknown [Glycine max]	322	1e-108
dbj BAH56801.1 AT3G01500 [Arabidopsis thaliana]	323	2e-108
ref XP_002314617.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	320	6e-108
gb ABK94941.1 unknown [Populus trichocarpa]	319	2e-107
emb CAH60890.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]	318	5e-107
gb ADN33836.1 carbonic anhydrase [Cucumis melo subsp. melo]	312	1e-104
gb ACJ85468.1 unknown [Medicago truncatula]	312	2e-104
gb ABC41657.1 carbonic anhydrase 2 [Flaveria pringlei]	310	2e-103
ref NP_001233847.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	308	4e-103
gb AAO17573.1 carbonic anhydrase 2 [Flaveria bidentis]	303	5e-101
pdb 1EKJ A Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of B...	299	3e-100
ref XP_002266686.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...]	296	3e-98
ref NP_001078583.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	290	5e-95
ref NP_849872.1 beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...]	287	8e-95
ref XP_002888778.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_476161 [A...]	288	9e-95
ref NP_177198.1 beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...]	288	1e-94
emb CBI15026.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	281	1e-92
ref XP_002282673.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...]	280	5e-92
ref XP_002890592.1 predicted protein [Arabidopsis lyrata sub...]	279	2e-91
ref NP_173785.1 beta carbonic anhydrase 3 [Arabidopsis thali...]	273	2e-89
gb ACU18641.1 unknown [Glycine max]	261	2e-85
emb CBI15025.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	259	7e-84
ref XP_002282681.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...]	259	8e-84
sp P46513.1 CAH2_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 2; Al...	256	1e-83
gb ABK22341.1 unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23356.1 unk...	259	2e-83
gb AAY17070.1 chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...]	253	2e-82
gb ACU15535.1 unknown [Glycine max]	254	3e-82
gb AAY17071.1 chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...]	248	2e-80
ref XP_002322163.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	249	1e-79
gb ABR13313.1 putative carbonic anhydrase [Prunus dulcis]	248	2e-79
ref XP_002322164.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	246	1e-78
gb ACU22936.1 unknown [Glycine max]	244	4e-78
ref NP_001236204.1 carbonic anhydrase [Glycine max] >emb CAB...	243	2e-77
gb ACN39779.1 unknown [Picea sitchensis]	243	2e-77
gb ABK23747.1 unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23788.1 unk...	243	3e-77
gb ACF78806.1 unknown [Zea mays]	243	3e-77
gb ABK26336.1 unknown [Picea sitchensis] >gb ACN39821.1 unk...	242	7e-77
ref NP_001152905.1 uncharacterized protein LOC100274597 [Zea...]	238	2e-76
ref NP_001150123.1 carbonic anhydrase [Zea mays] >gb ACG3793...	236	9e-76
ref NP_001168699.1 uncharacterized protein LOC100382491 [Zea...]	238	1e-75
gb ACN28442.1 unknown [Zea mays] >gb ACN29237.1 unknown [Ze...]	236	2e-75
gb ACF78735.1 unknown [Zea mays]	242	3e-75
ref NP_001147846.1 carbonic anhydrase [Zea mays] >gb ACG2888...	236	4e-75
gb ABR17241.1 unknown [Picea sitchensis]	236	5e-75
gb ADD65763.1 putative carbonic anhydrase [Triticum turgidum...]	236	9e-75

DKB7 BLAST ANALİZİ SONUÇLARI

D-1 DKB7 BLASTN Analizi Sonuçları

BLASTN 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: B4TVP9R9013

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
14,874,993 sequences; 37,899,591,299 total letters
Query= G11022339 (DKB7) T7UNIVERSAL

Length=903

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 22550385 gb AF454759.2 Nicotiana tabacum beta-carbonic an...	587	5e-164
gi 3061270 dbj AB012863.1 Nicotiana paniculata mRNA for NPCA...	587	5e-164
gi 170218 gb M94135.1 TOBCLCAA Nicotiana tabacum chloroplast ...	587	5e-164
gi 225311910 dbj AK319649.1 Solanum lycopersicum cDNA, clone...	562	2e-156
gi 350537678 ref NM_001247119.1 Solanum lycopersicum carboni...	562	2e-156
gi 349731537 emb FQ394658.1 Vitis vinifera clone SS0AFA1YI15	553	1e-153
gi 349730861 emb FQ394183.1 Vitis vinifera clone SS0AFA22YD04	553	1e-153
gi 349727542 emb FQ394038.1 Vitis vinifera clone SS0AFA22YO10	553	1e-153
gi 349724443 emb FQ393393.1 Vitis vinifera clone SS0AFA26YD15	553	1e-153
gi 349715961 emb FQ391968.1 Vitis vinifera clone SS0AFA8YD21	553	1e-153
gi 349715193 emb FQ380495.1 Vitis vinifera clone SS0ACG55YJ20	553	1e-153
gi 349711243 emb FQ396309.1 Vitis vinifera clone SS0AFA10YI13	553	1e-153
gi 349710576 emb FQ396239.1 Vitis vinifera clone SS0AFA10YO15	553	1e-153
gi 349709758 emb FQ396018.1 Vitis vinifera clone SS0AFA12YI12	553	1e-153
gi 349708235 emb FQ395693.1 Vitis vinifera clone SS0AFA14YJ0...	553	1e-153
gi 349708133 emb FQ395591.1 Vitis vinifera clone SS0AFA15YC08	553	1e-153
gi 349708121 emb FQ395579.1 Vitis vinifera clone SS0AFA15YD07	553	1e-153
gi 349706607 emb FQ395238.1 Vitis vinifera clone SS0AFA16YP06	553	1e-153
gi 349706566 emb FQ395197.1 Vitis vinifera clone SS0AFA17YD16	553	1e-153
gi 225452451 ref XM_002277921.1 PREDICTED: Vitis vinifera hy...	553	1e-153
gi 349710561 emb FQ396224.1 Vitis vinifera clone SS0AFA11YB09	549	1e-152
gi 112292668 gb DQ781308.1 Pachysandra terminalis chloroplas...	549	1e-152
gi 339958978 gb JN033201.1 Dimocarpus longan chloroplast car...	545	2e-151
gi 310920 gb L19255.1 TOBCARANHY Nicotiana tabacum chloroplas...	544	5e-151
gi 349710565 emb FQ396228.1 Vitis vinifera clone SS0AFA11YA24	542	2e-150

gi 349724478 emb FQ393428.1	Vitis vinifera clone SS0AFA26YB01	529	1e-146
gi 349714762 emb FQ380262.1	Vitis vinifera clone SS0ACG8YM04	504	5e-139
gi 326582929 gb JF313387.1	Flaveria cronquistii carbonic anh...	500	6e-138
gi 4754912 gb AF132854.1 AF132854	Gossypium hirsutum carbonic...	495	2e-136
gi 4754914 gb AF132855.1 AF132855	Gossypium hirsutum carbonic...	491	3e-135
gi 83722770 gb DQ273587.1	Flaveria pringlei carbonic anhydra...	489	1e-134
gi 326582923 gb JF313384.1	Flaveria angustifolia carbonic an...	484	4e-133
gi 83722772 gb DQ273588.1	Flaveria linearis carbonic anhydra...	473	8e-130
gi 210145298 dbj AK243989.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	468	3e-128
gi 326582925 gb JF313385.1	Flaveria anomala carbonic anhydra...	466	1e-127
gi 210141003 dbj AK244922.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	462	1e-126
gi 326582927 gb JF313386.1	Flaveria brownii carbonic anhydra...	461	5e-126
gi 210145199 dbj AK243890.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	453	7e-124
gi 210143366 dbj AK286148.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	453	7e-124
gi 210143237 dbj AK286019.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	453	7e-124
gi 8954288 gb AF139464.2 AF139464	Vigna radiata carbonic anhy...	453	7e-124
gi 210144575 dbj AK287357.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	450	9e-123
gi 255567324 ref XM_002524596.1	Ricinus communis carbonic an...	444	4e-121
gi 170104 gb J05403.1 SPICPCA	Spinach chloroplast carbonic a...	444	4e-121
gi 169056 gb M63627.1 PEACAMRA	P.sativum carbonic anhydrase m...	443	1e-120
gi 20672 emb X52558.1	Pea cap mRNA for carbonic anhydrase (E...	443	1e-120
gi 882239 gb U19737.1 FPU19737	Flaveria pringlei carbonic anh...	439	2e-119
gi 349715284 emb FQ380586.1	Vitis vinifera clone SS0ACG48YB02	435	2e-118
gi 170101 gb M27295.1 SPICA	Spinach chloroplastic carbonic an...	434	7e-118
gi 210145381 dbj AK244072.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	430	8e-117
gi 210145380 dbj AK244071.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	430	8e-117
gi 27652185 gb AY167113.1	Flaveria bidentis carbonic anhydra...	423	1e-114
gi 40737971 gb U08398.2 FBU08398	Flaveria bidentis carbonic a...	421	4e-114
gi 326582931 gb JF313388.1	Flaveria vaginata carbonic anhydr...	417	5e-113
gi 349711326 emb FQ396392.1	Vitis vinifera clone SS0AFA10YB03	410	8e-111
gi 295798040 emb FN814304.1	Olea europaea partial mRNA for c...	410	8e-111
gi 350540661 ref NM_001246918.1	Solanum lycopersicum carboni...	407	1e-109
gi 882241 gb U19738.1 FLU19738	Flaveria linearis carbonic anh...	407	1e-109
gi 606812 gb U08402.1 FBU08402	Flaveria brownii carbonic anhy...	407	1e-109
gi 224055528 ref XM_002298488.1	Populus trichocarpa predicte...	403	1e-108
gi 118489442 gb EF148560.1	Populus trichocarpa x Populus del...	401	4e-108
gi 118489057 gb EF148363.1	Populus trichocarpa x Populus del...	401	4e-108
gi 1354516 gb U55838.1 PTU55838	Populus tremula x Populus tre...	392	2e-105
gi 312281624 dbj AK352592.1	Thellungiella halophila mRNA, co...	381	4e-102
gi 297787438 gb GQ356780.1	Brassica napus chloroplast beta-c...	379	1e-101
gi 62865756 gb AY974608.1	Nicotiana benthamiana clone 30F62 ...	378	5e-101
gi 62865754 gb AY974607.1	Nicotiana benthamiana clone 30C84 ...	378	5e-101
gi 297807490 ref XM_002871583.1	Arabidopsis lyrata subsp. ly...	372	2e-99
gi 14342 emb X65541.1	A.thaliana mRNA for carbonic anhydrase	369	2e-98
gi 210144631 dbj AK287413.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	367	8e-98
gi 297828591 ref XM_002882132.1	Arabidopsis lyrata subsp. ly...	365	3e-97
gi 145361764 ref NM_180160.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	365	3e-97
gi 145358028 ref NM_121478.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	365	3e-97
gi 145337936 ref NM_111016.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	365	3e-97
gi 110740989 dbj AK226447.1	Arabidopsis thaliana mRNA for ca...	365	3e-97
gi 79611323 ref NM_203053.2	Arabidopsis thaliana carbonic an...	365	3e-97
gi 23397048 gb BT000663.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL09-...	365	3e-97
gi 23397026 gb BT000652.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL09-...	365	3e-97
gi 15810272 gb AY056175.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	365	3e-97
gi 12642851 gb AF339686.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	365	3e-97
gi 11908031 gb AF326863.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	365	3e-97
gi 20148658 gb AY081658.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhy...	365	3e-97
gi 17065417 gb AY062785.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhy...	365	3e-97
gi 16226668 gb AF428459.1 AF428459	Arabidopsis thaliana AT3g0...	365	3e-97
gi 16226546 gb AF428428.1 AF428428	Arabidopsis thaliana AT5g1...	365	3e-97
gi 16226254 gb AF428284.1 AF428284	Arabidopsis thaliana AT3g0...	365	3e-97
gi 42454895 emb BX830347.1	Arabidopsis thaliana Full-length ...	365	3e-97
gi 13265565 gb AF324712.2 AF324712	Arabidopsis thaliana AT5g1...	365	3e-97
gi 222424587 dbj AK317585.1	Arabidopsis thaliana AT5G14740 m...	361	4e-96
gi 145361763 ref NM_180159.2	Arabidopsis thaliana carbonic a...	361	4e-96
gi 20259532 gb AY091066.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	361	4e-96
gi 62320916 dbj AK221786.1	Arabidopsis thaliana mRNA for car...	361	4e-96
gi 79327880 ref NM_001036807.1	Arabidopsis thaliana carbonic...	360	1e-95
gi 42455860 emb BX830730.1	Arabidopsis thaliana Full-length ...	360	1e-95
gi 83722768 gb DQ273586.1	Flaveria pringlei carbonic anhydra...	358	4e-95
gi 160951531 emb CU223834.1	Populus EST from leaf	356	2e-94
gi 160949999 emb CU223036.1	Populus EST from leaf	356	2e-94
gi 145334411 ref NM_001085114.1	Arabidopsis thaliana carboni...	354	5e-94
gi 79327872 ref NM_001036806.1	Arabidopsis thaliana carbonic...	351	6e-93
gi 438448 gb L18901.1 ATHCAH	Arabidopsis thaliana carbonic an...	351	6e-93

D-2 DKB7 BLASTP Analizi Sonuçları

BLASTP 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Reference for compositional score matrix adjustment: Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schaffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", *FEBS J.* 272:5101-5109.

RID: B56H12J7016

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

15,916,306 sequences; 5,467,648,827 total letters

Query= DKB7

Length=301

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
ref NP_001234048.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	436	9e-153
gb ABI14813.1 chloroplast carbonic anhydrase [Pachysandra te...	435	5e-152
dbj BAA25639.1 NPCA1 [Nicotiana paniculata]	430	4e-150
ref XP_002277957.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	428	3e-149
sp P27141.1 CAHC_TOBAC RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	427	6e-149
gb AEK25173.1 chloroplast carbonic anhydrase [Dimocarpus lon...	424	9e-148
sp P16016.2 CAHC_SPIOL RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	423	1e-147
gb AAL51055.2 AF454759_1 beta-carbonic anhydrase [Nicotiana t...	422	4e-147
gb AAD29049.1 AF132854_1 carbonic anhydrase isoform 1 [Gossyp...	416	2e-144
gb AAM22683.1 AF482951_1 carbonic anhydrase [Gossypium hirsutum]	414	5e-144
gb AAD29050.1 AF132855_1 carbonic anhydrase isoform 2 [Gossyp...	414	6e-144
gb ABK96524.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	414	6e-144
ref XP_002298524.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	412	5e-143
gb AAB65822.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...	410	2e-142
gb AAC49785.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...	409	3e-142
dbj BAJ33678.1 unnamed protein product [Thellungiella haloph...	410	5e-142
gb AAA33652.1 carbonic anhydrase [Pisum sativum] >prf 17103...	407	4e-141
gb ADI52861.1 chloroplast beta-carbonic anhydrase [Brassica ...	406	1e-140
ref NP_850491.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	405	4e-140
sp P17067.1 CAHC_PEA RecName: Full=Carbonic anhydrase, chloro...	404	6e-140
gb ABC41659.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria linearis]	404	7e-140
ref NP_186799.2 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	405	8e-140
ref XP_002882178.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_477371 [A...	404	1e-139
gb AAA34057.1 carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	398	2e-138
gb AAS65454.1 chloroplast carbonic anhydrase precursor [Nocc...	400	2e-138
gb ACZ74707.1 carbonic anhydrase [Phaseolus vulgaris]	400	2e-138
sp P46511.1 CAHX_FLABR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	397	3e-137
gb ADZ97028.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria cronquistii]	397	5e-137
gb ABC41658.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria pringlei]	397	6e-137
sp P46510.2 CAHX_FLABI RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	397	7e-137
emb CAN61667.1 hypothetical protein VITISV_037833 [Vitis vin...	397	7e-137
sp P46281.1 CAHX_FLAPR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	395	3e-136
sp P46512.1 CAH1_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 1; Al...	394	4e-136
gb ADZ97025.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria angustifolia]	394	1e-135
gb AAD27876.2 AF139464_1 carbonic anhydrase [Vigna radiata]	393	1e-135
gb ADZ97026.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria anomala]	393	2e-135
prf 2018192A carbonic anhydrase	392	3e-135
ref XP_002524642.1 carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	390	2e-134
gb ADZ97027.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria brownii]	387	6e-133
prf 1707317A carbonic anhydrase	377	2e-130
gb AAA34026.1 carbonic anhydrase precursor [Spinacia oleracea]	376	6e-130
gb ABK96336.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	374	3e-129

ref XP_002871629.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_488319 [A...	371	5e-128
dbj BAD93915.1	carbonic anhydrase, chloroplast precursor [Ar...	370	1e-127
ref NP_850490.1	carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	370	3e-127
ref NP_974782.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	369	7e-127
dbj BAH20249.1	AT5G14740 [Arabidopsis thaliana]	368	2e-126
ref NP_568303.2	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	369	5e-126
gb AAO17574.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria bidentis]	365	2e-125
emb CBI28524.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	363	6e-125
gb ADZ97029.1	carbonic anhydrase 3 [Flaveria vaginata]	361	5e-124
ref NP_001031884.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	362	2e-123
gb AA50156.1	carbonic anhydrase [Arabidopsis thaliana]	358	9e-123
ref NP_001031883.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	360	2e-122
ref XP_002525377.1	carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...]	356	9e-122
gb ACU19610.1	unknown [Glycine max]	353	7e-121
ref XP_002314617.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	351	4e-120
gb ABK94941.1	unknown [Populus trichocarpa]	350	1e-119
emb CAH60890.1	carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]	349	4e-119
gb ACJ85468.1	unknown [Medicago truncatula]	341	7e-116
gb ADN33836.1	carbonic anhydrase [Cucumis melo subsp. melo]	339	2e-115
gb ABC41657.1	carbonic anhydrase 2 [Flaveria pringlei]	340	3e-115
ref NP_001233847.1	carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	339	3e-115
pdb 1EKJ A	Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of B...	334	5e-114
gb AAO17573.1	carbonic anhydrase 2 [Flaveria bidentis]	333	1e-112
ref XP_002266686.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...]	328	7e-111
dbj BAH56801.1	AT3G01500 [Arabidopsis thaliana]	324	8e-109
ref NP_849872.1	beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...]	318	5e-107
ref XP_002888778.1	hypothetical protein ARALYDRAFT_476161 [A...]	319	6e-107
ref NP_177198.1	beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...]	318	8e-107
emb CBI15026.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	309	2e-103
ref XP_002890592.1	predicted protein [Arabidopsis lyrata sub...]	308	3e-103
ref XP_002282673.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...]	308	6e-103
ref NP_173785.1	beta carbonic anhydrase 3 [Arabidopsis thali...]	304	1e-101
ref NP_001078583.1	carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	291	2e-95
sp P46513.1	CAH2_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 2; Al...	285	5e-95
gb AAY17070.1	chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...]	284	6e-95
ref XP_002282681.1	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...]	287	1e-94
emb CBI15025.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	287	1e-94
gb ABK22341.1	unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23356.1 unk...	286	2e-94
gb AAY17071.1	chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...]	280	5e-93
gb ABR13313.1	putative carbonic anhydrase [Prunus dulcis]	282	1e-92
ref XP_002322163.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	281	1e-92
ref XP_002322164.1	predicted protein [Populus trichocarpa] >...	279	1e-91
gb ACU22936.1	unknown [Glycine max]	274	1e-89
gb ACN39779.1	unknown [Picea sitchensis]	273	4e-89
gb ABK23747.1	unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23788.1 unk...	273	4e-89
ref NP_001236204.1	carbonic anhydrase [Glycine max] >emb CAB...	272	6e-89
gb ABK26336.1	unknown [Picea sitchensis] >gb ACN39821.1 unk...	271	1e-88
gb ACU18641.1	unknown [Glycine max]	263	4e-86
ref NP_001152905.1	uncharacterized protein LOC100274597 [Zea...]	261	3e-85
sp P40880.1	CAHC_HORVU RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	265	4e-85
gb ADD65763.1	putative carbonic anhydrase [Triticum turgidum...]	262	4e-85
gb ACF78806.1	unknown [Zea mays]	262	7e-85
ref NP_001150123.1	carbonic anhydrase [Zea mays] >gb ACG3793...	259	1e-84
ref NP_001168699.1	uncharacterized protein LOC100382491 [Zea...]	260	2e-84
gb ACN28442.1	unknown [Zea mays] >gb ACN29237.1 unknown [Ze...]	258	3e-84
emb CAD66064.1	carbonic anhydrase [Lotus japonicus]	259	6e-84
ref NP_001147846.1	carbonic anhydrase [Zea mays] >gb ACG2888...	258	1e-83
gb ACF78735.1	unknown [Zea mays]	261	1e-82

FTB2 BLAST SONUÇLARI

E-1 FTB2 BLASTN Analizi Sonuçları

BLASTN 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: B4TJGRTV013

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
14,874,993 sequences; 37,899,591,299 total letters
Query= G11022338 (FTB2)T7UNIVERSAL

Length=908

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 3061270 dbj AB012863.1 Nicotiana paniculata mRNA for NPCA...	571	4e-159
gi 170218 gb M94135.1 TOBCLCAA Nicotiana tabacum chloroplast ...	571	4e-159
gi 22550385 gb AF454759.2 Nicotiana tabacum beta-carbonic an...	565	2e-157
gi 112292668 gb DQ781308.1 Pachysandra terminalis chloroplas...	540	6e-150
gi 225311910 dbj AK319649.1 Solanum lycopersicum cDNA, clone...	536	8e-149
gi 350537678 ref NM_001247119.1 Solanum lycopersicum carboni...	536	8e-149
gi 349731537 emb FQ394658.1 Vitis vinifera clone SS0AFA1YI15	535	3e-148
gi 349730861 emb FQ394183.1 Vitis vinifera clone SS0AFA22YD04	535	3e-148
gi 349727542 emb FQ394038.1 Vitis vinifera clone SS0AFA22YO10	535	3e-148
gi 349724443 emb FQ393393.1 Vitis vinifera clone SS0AFA26YD15	535	3e-148
gi 349715961 emb FQ391968.1 Vitis vinifera clone SS0AFA8YD21	535	3e-148
gi 349715193 emb FQ380495.1 Vitis vinifera clone SS0ACG55YJ20	535	3e-148
gi 349711243 emb FQ396309.1 Vitis vinifera clone SS0AFA10YI13	535	3e-148
gi 349710576 emb FQ396239.1 Vitis vinifera clone SS0AFA10YO15	535	3e-148
gi 349709758 emb FQ396018.1 Vitis vinifera clone SS0AFA12YI12	535	3e-148
gi 349708235 emb FQ395693.1 Vitis vinifera clone SS0AFA14YJ0...	535	3e-148
gi 349708133 emb FQ395591.1 Vitis vinifera clone SS0AFA15YC08	535	3e-148
gi 349708121 emb FQ395579.1 Vitis vinifera clone SS0AFA15YD07	535	3e-148
gi 349706607 emb FQ395238.1 Vitis vinifera clone SS0AFA16YP06	535	3e-148
gi 349706566 emb FQ395197.1 Vitis vinifera clone SS0AFA17YD16	535	3e-148
gi 225452451 ref XM_002277921.1 PREDICTED: Vitis vinifera hy...	535	3e-148
gi 349710561 emb FQ396224.1 Vitis vinifera clone SS0AFA11YB09	531	3e-147
gi 310920 gb L19255.1 TOBCARANHY Nicotiana tabacum chloroplas...	526	1e-145
gi 349710565 emb FQ396228.1 Vitis vinifera clone SS0AFA11YA24	524	5e-145
gi 339958978 gb JN033201.1 Dimocarpus longan chloroplast car...	518	2e-143

gi 349724478 emb FQ393428.1	Vitis vinifera clone SS0AFA26YB01	511	3e-141
gi 349714762 emb FQ380262.1	Vitis vinifera clone SS0ACG8YM04	486	1e-133
gi 4754912 gb AF132854.1 AF132854	Gossypium hirsutum carbonic...	482	2e-132
gi 326582929 gb JF313387.1	Flaveria cronquistii carbonic anh...	479	2e-131
gi 4754914 gb AF132855.1 AF132855	Gossypium hirsutum carbonic...	477	6e-131
gi 83722770 gb DQ273587.1	Flaveria pringlei carbonic anhydra...	471	3e-129
gi 326582923 gb JF313384.1	Flaveria angustifolia carbonic an...	466	1e-127
gi 210145298 dbj AK243989.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	464	4e-127
gi 210141003 dbj AK244922.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	457	6e-125
gi 8954288 gb AF139464.2 AF139464	Vigna radiata carbonic anhy...	453	7e-124
gi 83722772 gb DQ273588.1	Flaveria linearis carbonic anhydra...	453	7e-124
gi 326582925 gb JF313385.1	Flaveria anomala carbonic anhydra...	446	1e-121
gi 210145199 dbj AK243890.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	446	1e-121
gi 210143366 dbj AK286148.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	446	1e-121
gi 210143237 dbj AK286019.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	446	1e-121
gi 169056 gb M63627.1 PEACAMRA	P.sativum carbonic anhydrase m...	446	1e-121
gi 20672 emb X52558.1	Pea cap mRNA for carbonic anhydrase (E...	446	1e-121
gi 210144575 dbj AK287357.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	443	1e-120
gi 326582927 gb JF313386.1	Flaveria brownii carbonic anhydra...	441	5e-120
gi 210145381 dbj AK244072.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	439	2e-119
gi 210145380 dbj AK244071.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	439	2e-119
gi 255567324 ref XM_002524596.1	Ricinus communis carbonic an...	426	1e-115
gi 170104 gb J05403.1 SPICPCCA	Spinach chloroplast carbonic a...	426	1e-115
gi 349715284 emb FQ380586.1	Vitis vinifera clone SS0ACG48YB02	419	2e-113
gi 349711326 emb FQ396392.1	Vitis vinifera clone SS0AFA10YB03	419	2e-113
gi 882239 gb U19737.1 FPU19737	Flaveria pringlei carbonic anh...	417	5e-113
gi 170101 gb M27295.1 SPICA	Spinach chloroplastic carbonic an...	416	2e-112
gi 295798040 emb FN814304.1	Olea europaea partial mRNA for c...	414	6e-112
gi 27652185 gb AY167113.1	Flaveria bidentis carbonic anhydra...	408	3e-110
gi 40737971 gb U08398.2 FBU08398	Flaveria bidentis carbonic a...	399	1e-107
gi 350540661 ref NM_001246918.1	Solanum lycopersicum carboni...	398	5e-107
gi 224055528 ref XM_002298488.1	Populus trichocarpa predicte...	394	6e-106
gi 326582931 gb JF313388.1	Flaveria vaginata carbonic anhydr...	392	2e-105
gi 118489442 gb EF148560.1	Populus trichocarpa x Populus del...	392	2e-105
gi 118489057 gb EF148363.1	Populus trichocarpa x Populus del...	392	2e-105
gi 882241 gb U19738.1 FLU19738	Flaveria linearis carbonic anh...	385	3e-103
gi 297787438 gb GQ356780.1	Brassica napus chloroplast beta-c...	379	1e-101
gi 62865756 gb AY974608.1	Nicotiana benthamiana clone 30F62 ...	379	1e-101
gi 62865754 gb AY974607.1	Nicotiana benthamiana clone 30C84 ...	379	1e-101
gi 1354516 gb U55838.1 PTU55838	Populus tremula x Populus tre...	379	1e-101
gi 210144631 dbj AK287413.1	Glycine max cDNA, clone: GMFL01-...	376	2e-100
gi 312281624 dbj AK352592.1	Thellungiella halophila mRNA, co...	370	7e-99
gi 14342 emb X65541.1	A.thaliana mRNA for carbonic anhydrase	370	7e-99
gi 297807490 ref XM_002871583.1	Arabidopsis lyrata subsp. ly...	367	8e-98
gi 160951531 emb CU223834.1	Populus EST from leave	365	3e-97
gi 160949999 emb CU223036.1	Populus EST from leave	365	3e-97
gi 145361764 ref NM_180160.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	365	3e-97
gi 145361763 ref NM_180159.2	Arabidopsis thaliana carbonic a...	365	3e-97
gi 145337936 ref NM_111016.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	365	3e-97
gi 110740989 dbj AK226447.1	Arabidopsis thaliana mRNA for ca...	365	3e-97
gi 20259532 gb AY091066.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	365	3e-97
gi 15810272 gb AY056175.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	365	3e-97
gi 62320916 dbj AK221786.1	Arabidopsis thaliana mRNA for car...	365	3e-97
gi 20148658 gb AY081658.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhy...	365	3e-97
gi 17065417 gb AY062785.1	Arabidopsis thaliana carbonic anhy...	365	3e-97
gi 16226668 gb AF428459.1 AF428459	Arabidopsis thaliana AT3g0...	365	3e-97
gi 16226254 gb AF428284.1 AF428284	Arabidopsis thaliana AT3g0...	365	3e-97
gi 297828591 ref XM_002882132.1	Arabidopsis lyrata subsp. ly...	361	4e-96
gi 145358028 ref NM_121478.3	Arabidopsis thaliana carbonic a...	361	4e-96
gi 79611323 ref NM_203053.2	Arabidopsis thaliana carbonic an...	361	4e-96
gi 23397048 gb BT000663.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL09-...	361	4e-96
gi 23397026 gb BT000652.1	Arabidopsis thaliana clone RAFL09-...	361	4e-96
gi 12642851 gb AF339686.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	361	4e-96
gi 11908031 gb AF326863.1	Arabidopsis thaliana putative carb...	361	4e-96
gi 16226546 gb AF428428.1 AF428428	Arabidopsis thaliana AT5g1...	361	4e-96
gi 42454895 emb BX830347.1	Arabidopsis thaliana Full-length ...	361	4e-96
gi 13265565 gb AF324712.2 AF324712	Arabidopsis thaliana AT5g1...	361	4e-96
gi 83722768 gb DQ273586.1	Flaveria pringlei carbonic anhydra...	361	4e-96
gi 1354514 gb U55837.1 PTU55837	Populus tremula x Populus tre...	358	4e-95
gi 222424587 dbj AK317585.1	Arabidopsis thaliana AT5G14740 m...	356	2e-94
gi 118486196 gb EF146899.1	Populus trichocarpa clone WS0121_...	356	2e-94
gi 79327880 ref NM_001036807.1	Arabidopsis thaliana carbonic...	354	5e-94
gi 42455860 emb BX830730.1	Arabidopsis thaliana Full-length ...	354	5e-94
gi 224107828 ref XM_002314581.1	Populus trichocarpa predicte...	352	2e-93
gi 118485782 gb EF146686.1	Populus trichocarpa clone WS01211...	352	2e-93

E-2 FTB2 BLASTP Analizi Sonuçları

BLASTP 2.2.26+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Reference for compositional score matrix adjustment: Stephen F. Altschul, John C. Wootton, E. Michael Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis, Alejandro A. Schaffer, and Yi-Kuo Yu (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices", *FEBS J.* 272:5101-5109.

RID: B57WNTH8013

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects
15,916,306 sequences; 5,467,648,827 total letters

Query= FTB2

Length=302

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb ABI14813.1 chloroplast carbonic anhydrase [Pachysandra te...	367	3e-125
ref NP_001234048.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	366	6e-125
dbj BAA25639.1 NPCA1 [Nicotiana paniculata]	359	4e-122
sp P27141.1 CAHC_TOBAC RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	356	5e-121
gb AAD29049.1 AF132854_1 carbonic anhydrase isoform 1 [Gossyp...	355	1e-120
gb AAA34057.1 carbonic anhydrase [Nicotiana tabacum]	352	2e-120
gb AAM22683.1 AF482951_1 carbonic anhydrase [Gossypium hirsutum]	354	3e-120
gb AAD29050.1 AF132855_1 carbonic anhydrase isoform 2 [Gossyp...	353	4e-120
gb AAL51055.2 AF454759_1 beta-carbonic anhydrase [Nicotiana t...	353	8e-120
prf 1707317A carbonic anhydrase	350	1e-119
sp P16016.2 CAHC_SPIOL RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	352	2e-119
gb AAA34026.1 carbonic anhydrase precursor [Spinacia oleracea]	349	3e-119
ref XP_002277957.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	352	5e-119
dbj BAJ33678.1 unnamed protein product [Thellungiella haloph...	351	1e-118
gb ADI52861.1 chloroplast beta-carbonic anhydrase [Brassica ...]	349	3e-118
sp P17067.1 CAHC_PEA RecName: Full=Carbonic anhydrase, chloro...	349	4e-118
gb AEK25173.1 chloroplast carbonic anhydrase [Dimocarpus lon...	348	8e-118
ref XP_002871629.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_488319 [A...	345	8e-118
dbj BAD93915.1 carbonic anhydrase, chloroplast precursor [Ar...	345	1e-117
gb AAA33652.1 carbonic anhydrase [Pisum sativum] >prf 17103...	348	1e-117
ref NP_850490.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	345	2e-117
gb ABK96336.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	344	2e-117
gb ABK96524.1 unknown [Populus trichocarpa x Populus deltoides]	346	3e-117
ref NP_850491.1 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	346	9e-117
ref NP_974782.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	342	1e-116
ref NP_186799.2 carbonic anhydrase 1 [Arabidopsis thaliana] ...	345	2e-116
ref XP_002298524.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	345	2e-116
ref XP_002882178.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_477371 [A...	345	3e-116
dbj BAH20249.1 AT5G14740 [Arabidopsis thaliana]	342	4e-116
ref NP_568303.2 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana] ...	343	1e-115
gb AAB65822.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...]	342	2e-115
gb ACZ74707.1 carbonic anhydrase [Phaseolus vulgaris]	342	2e-115
gb AAC49785.1 carbonic anhydrase [Populus tremula x Populus ...]	342	3e-115
gb AAS65454.1 chloroplast carbonic anhydrase precursor [Nocc...	340	3e-114
pdb 1EKJ A Chain A, The X-Ray Crystallographic Structure Of B...	335	4e-114
gb AAD27876.2 AF139464_1 carbonic anhydrase [Vigna radiata]	337	3e-113
emb CB128524.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	333	4e-113
ref NP_001031884.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thalian...]	336	5e-113
gb AAA50156.1 carbonic anhydrase [Arabidopsis thaliana]	333	8e-113
gb AAO17574.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria bidentis]	332	3e-112

gb ADZ97028.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria cronquistii]	333	7e-112
ref NP_001031883.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana]	333	8e-112
prf 2018192A carbonic anhydrase	331	4e-111
sp P46510.2 CAHX_FLABI RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	331	4e-111
gb ADZ97029.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria vaginata]	327	1e-110
gb ABC41659.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria linearis]	330	2e-110
gb ABC41658.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria pringlei]	329	2e-110
sp P46511.1 CAHX_FLABR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	329	3e-110
gb ADZ97026.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria anomala]	327	2e-109
sp P46512.1 CAH1_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 1; Al...	327	2e-109
sp P46281.1 CAHX_FLAPR RecName: Full=Carbonic anhydrase; AltN...	327	2e-109
gb ADZ97025.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria angustifolia]	326	5e-109
ref XP_002524642.1 carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	326	5e-109
ref XP_002525377.1 carbonic anhydrase, putative [Ricinus com...	323	8e-109
gb ABC41657.1 carbonic anhydrase 2 [Flaveria pringlei]	323	1e-108
gb ACU19610.1 unknown [Glycine max]	322	2e-108
ref XP_002314617.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	320	1e-107
gb ABK94941.1 unknown [Populus trichocarpa]	320	1e-107
gb ADZ97027.1 carbonic anhydrase 3 [Flaveria brownii]	322	2e-107
emb CAH60890.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]	319	2e-107
emb CAN61667.1 hypothetical protein VITISV_037833 [Vitis vin...	319	2e-106
gb AAO17573.1 carbonic anhydrase 2 [Flaveria bidentis]	317	2e-106
gb ACJ85468.1 unknown [Medicago truncatula]	316	8e-106
ref NP_001233847.1 carbonic anhydrase [Solanum lycopersicum]...	310	5e-104
gb ADN33836.1 carbonic anhydrase [Cucumis melo subsp. melo]	308	4e-103
ref XP_002266686.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	295	6e-98
ref NP_849872.1 beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...	292	9e-97
ref XP_002888778.1 hypothetical protein ARALYDRAFT_476161 [A...	293	1e-96
ref NP_177198.1 beta carbonic anhydrase 4 [Arabidopsis thali...	291	4e-96
sp P46513.1 CAH2_FLALI RecName: Full=Carbonic anhydrase 2; Al...	285	9e-95
gb AAY17070.1 chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...	283	1e-94
ref XP_002890592.1 predicted protein [Arabidopsis lyrata sub...	283	5e-93
gb AAY17071.1 chloroplast carbonic anhydrase [Nicotiana bent...	279	8e-93
emb CBI15026.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	282	1e-92
ref XP_002282673.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	281	1e-92
ref NP_173785.1 beta carbonic anhydrase 3 [Arabidopsis thali...	281	3e-92
gb ABK22341.1 unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23356.1 unk...	271	3e-88
ref XP_002322163.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	270	4e-88
gb ABK23747.1 unknown [Picea sitchensis] >gb ABK23788.1 unk...	270	1e-87
gb ACN39779.1 unknown [Picea sitchensis]	269	1e-87
ref XP_002322164.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	269	1e-87
ref XP_002282681.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	268	2e-87
emb CBI15025.3 unnamed protein product [Vitis vinifera]	268	3e-87
gb ABK26336.1 unknown [Picea sitchensis] >gb ACN39821.1 unk...	268	4e-87
dbj BAH56801.1 AT3G01500 [Arabidopsis thaliana]	266	7e-86
ref NP_001078583.1 carbonic anhydrase 2 [Arabidopsis thaliana]	265	2e-85
ref NP_001152905.1 uncharacterized protein LOC100274597 [Zea...	260	4e-85
sp P40880.1 CAHC_HORVU RecName: Full=Carbonic anhydrase, chlo...	265	5e-85
gb ADD65763.1 putative carbonic anhydrase [Triticum turgidum...	262	6e-85
gb ABR13313.1 putative carbonic anhydrase [Prunus dulcis]	262	7e-85
gb ACF78806.1 unknown [Zea mays]	261	1e-84
ref NP_001168699.1 uncharacterized protein LOC100382491 [Zea...	260	2e-84
ref NP_001150123.1 carbonic anhydrase [Zea mays] >gb ACG3793...	259	2e-84
gb ACN28442.1 unknown [Zea mays] >gb ACN29237.1 unknown [Ze...	258	5e-84
gb ACU22936.1 unknown [Glycine max]	258	3e-83
ref NP_001147846.1 carbonic anhydrase [Zea mays] >gb ACG2888...	257	3e-83
ref NP_001236204.1 carbonic anhydrase [Glycine max] >emb CAB...	256	2e-82
gb ACF78735.1 unknown [Zea mays]	260	3e-82
dbj BAG87598.1 unnamed protein product [Oryza sativa Japonic...	251	1e-81
ref NP_001151431.1 LOC100285064 [Zea mays] >gb ACG42860.1 c...	250	5e-81

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı:	Munise YURTSEVER
Doğum Tarihi ve Yeri:	24.01.1985
Yabancı Dili:	İngilizce
E-posta:	mnsyurtsever@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyoloji	Yıldız Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Biyoloji	Anadolu Üniversitesi	2008
Lise	Fen	Fatih Vatan Anadolu Lisesi	2003

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2010	Yıldız Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2008	Sınav Dergisi Dershaneleri	Biyoloji Öğretmeni

YAYINLARI

Bildiri

1. **Yurtsever M.** ve Vural Korkut Ş., (2011). "Cloning of β -carbonic anhydrase cDNA from *Olea europaea* exposed to cold stres", Current Opinion in Biotechnology, 22 (1): 144.