

***Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'UN CRISPR-CAS TİP II SİSTEMİNİN TESPİTİ VE TANIMLAMASI**

DETECTION AND IDENTIFICATION CRISPR-CAS TYPE II SYSTEM OF *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

BİLGE YILMAZ

PROF. DR REMZİYE YILMAZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* 'UN CRISPR-CAS TİP II SİSTEMİNİN TESPİTİ VE TANIMLANMASI

Bilge YILMAZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

Ocak 2024, 139 sayfa

Laktik asit bakterileri (LAB), son ürün olarak laktik asit üretimi için karakterize edilen, fermente edici, aside toleranslı bakterilerin bir grubudur. Laktik asit bakterileri Gram pozitif koklar veya çubuklardır; mikro-aerofilik, aside toleranslı, katalaz negatiftir, genellikle sporsuzdur, düşük guanin sitozin (GC) içeriğine sahip hareketsizdir. Starter kültür olarak gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan laktik asit bakterilerinden biri Streptokok cinsi *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* bakterisi yoğurt üretimi için tarih boyunca başlatıcı kültürün bir parçası olmuştur.

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* ile yapılan ticari fermantasyonlar, türe özgü faj enfeksiyonuna duyarlıdır. Bu mikroorganizmanın yer aldığı süt fermantasyonu sistemlerinin olası bir virüsent fajla kontaminasyonu, ortamda bulunan starter kültürleri parçalayarak ürün kaybına neden olabilmektedir. Bu sebeple *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'un bakteriyofaj direncinin oluşumunu ve tespiti amacıyla CRISPR-Cas sistemlerinin tespiti büyük önem taşımaktadır. CRISPR-Cas sistemleri, çoğu prokaryotta doğal bir bağışıklık sistemi görevi görmesinin yanı sıra, yeni geliştirilen

genom modifikasyonları ve evrimsel araştırmalarda da bir araç olarak kullanılabilir. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, CRISPR sistemlerinin incelenmesi ve uygulanması için önemli bir model organizmadır.

Bu çalışmada, öncelikle referans mikroorganizma olarak seçilen *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258 suşunun CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin *in silico* olarak belirlenmiştir. Daha sonra CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genlerine ve Tip II-C bölgesine ait Cas9 genine spesifik primer tasarımı yapılmıştır. Son aşamada ise Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin tespiti amacıyla kalitatif qPCR uygulaması yapılarak CRISPR-Cas TİP II sisteminin tespiti ve tanımlaması tamamlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus thermophilus*, CRISPR-Cas Tip II-A, CRISPR-Cas Tip II-C, Cas9, Cas2.

ABSTRACT

DETECTION AND IDENTIFICATION CRISPR-CAS TYPE II SYSTEM OF *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Bilge YILMAZ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Remziye YILMAZ

January 2024, 139 pages

Lactic acid bacteria (LAB) are a group of bacteria characterized by their ability to produce lactic acid as the final product. They are fermentative, acid-tolerant bacteria. Lactic acid bacteria can be Gram-positive cocci or rods; they are microaerophilic, acid-tolerant, catalase-negative, generally non-spore-forming, and have low guanine-cytosine (GC) content. One of the lactic acid bacteria commonly used in the food industry as a starter culture is the *Streptococcus* genus, particularly the *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* bacterium, which has been a part of starter cultures for yogurt production throughout history.

Commercial fermentations with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* are sensitive to specific phage infections. Contamination of milk fermentation systems containing this microorganism with a virulent phage can lead to product loss by breaking down the starter cultures present in the environment. Therefore, the detection of the bacteriophage resistance of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* is of great importance for the formation and identification of CRISPR-Cas systems. CRISPR-Cas systems not only serve as a natural immune system in most prokaryotes but can also be

used as a tool in newly developed genome modifications and evolutionary research. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* is an important model organism for the study and implementation of CRISPR systems.

In this study, the Cas9 and Csn2 genes of the CRISPR-Cas Type II-A and Type II-C regions of the selected reference microorganism *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258 strain were determined *in silico*. Subsequently, specific primers for the Cas9 and Csn2 genes of the Type II-A region and the Cas9 gene of the Type II-C region were designed. In the final stage, a qualitative qPCR application was performed to detect the CRISPR-Cas Type II-A and Type II-C regions of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* strains in the Hacettepe University Food Engineering Department FoodOmics Laboratory Culture Collection, completing the detection and characterization of the CRISPR-Cas Type II system.

Keywords: *Streptococcus thermophilus*, CRISPR-Cas, Type II-A, Type II-C, Cas9, Cas2.

TEŞEKKÜR

Lisanüstü hayatım boyunca yalnızca akademik değil, kiőisel olarak da beni eğiten, emeklerini esirgemeyen, eşsiz bilgisiyle hayatıma yön veren, öğrencisi olarak onu temsil etmekten gurur ve mutluluk duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Remziye YILMAZ'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında tecrübelerini paylaşan, teknik ve manevi olarak sağladıkları destekler dolayısıyla Uz. Meltem YILDIRIM'a, Humen CEBBARİ başta olmak üzere tüm BMLab çalışanlarına; laboratuvar imkanlarını benimle paylaşan değerli Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŐEKER'e ve bana yardımcı olan değerli öğrencileri Esin BAYAN ve Nazım Sergen MISIRLI'ya,

FoodOmics Laboratuvarı çalışanları değerli arkadaşlarım Beyza SAYMAN, İpek Ceren YEŐİLDAĒ, Elif Bircan MUYANLI ve Begüm Zeynep HANÇERLİOĒULLARI'na,

Tüm hayatım boyunca emeklerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, verdikleri sevgi ve gösterdikleri fedakarlıklar için sevgili babam İsmail YILMAZ, annem Fatma YILMAZ, ablalarım Ayőegül YILMAZ ve Nurgül YILMAZ, sevgili kardeşim Zeynep YILMAZ, desteklerini esirgemeyen amcam Yusuf YILMAZ'a,

Her daim yanımda olan ve yeri geldiğinde ikinci ailem gibi olan sevgili dostlarım Mustafa Furkan GÜL, Furkan Kerem DEDE, Elif Nur DİLBİRLİĒİ, Hatice ÇETİNKAYA, Umut BAŐ, Emin Onuralp GÖLBAŐI ve Utku İP'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilge YILMAZ

Ocak 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Laktik Asit Bakterileri.....	4
2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Endüstrisinde Kullanımı.....	6
2.3. <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	8
2.3.1. Morfolojisi ve Hücre Yapısı.....	10
2.3.2. Hücresel Gelişimi.....	11
2.3.3. <i>Streptococcus thermophilus</i> 'un Biyokimyasal Olarak Tanımlanması.....	12
2.3.3.1. Bakterilerin Makroskopik ve Mikroskopik Morfolojilerinin İncelenmesi.....	12
2.3.3.2. 37°C'de Gelişim Testi	13
2.3.3.3. Katalaz Testi.....	14
2.3.3.4. Gram Reaksiyonları.....	15
2.3.3.5. Glukozdan Gaz Oluşturma Testi	15
2.3.4. <i>Streptococcus thermophilus</i> Bakteriyofajları	16
2.4. CRISPR-Cas Sistemleri.....	17
2.4.1. Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR- Sistemlerinin Keşfi ve Oluşumu	22
2.4.3. <i>Streptococcus thermophilus</i> 'ta CRISPR-Cas Sistemlerinin Keşfi ve Oluşumu.....	28
2.4.4. CRISPR-Cas Tip II Sistemi ve <i>Streptococcus thermophilus</i> için Önemi	29
2.5. <i>Streptococcus thermophilus</i> için CRISPR-Cas Sistemlerinin Tespiti için Kullanılan Veritabanları	31

2.5.1. ATCC Genome Portal.....	37
2.5.2. NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası	38
2.5.3. CRISPRCasFinder	40
2.5.4. NCBI Blast.....	40
2.5.5. Primer3web	41
2.6. qPCR ile CRISPR-Cas Bölgelerinin Tespiti.....	42
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	45
3.1. Materyal	45
3.1.1. Mikroorganizmalar	45
3.1.2. Besiyerleri	45
3.1.3. Kimyasallar	45
3.1.4. Ekipmanlar	46
3.1.5. Sarf Malzemeleri.....	46
3.2. Metot	48
3.2.1. <i>in silico</i> Analizler	48
3.2.1.1. <i>Streptococcus thermophilus</i> CRISPR-Cas Sistem Seçimi için Veri toplama	49
3.2.2. <i>in vitro</i> Analizler	54
3.2.2.1. <i>Streptococcus thermophilus</i> Suşlarının Canlandırılması	55
3.2.2.2. Mikroorganizmaların Stok Kültürlerinin Hazırlanması.....	56
3.2.2.3. Biyokimyasal Testler ile Önceden Tanımlanmış Suşların Kontrolü	56
Makroskobik Morfoloji.....	57
Mikroskobik Morfoloji	58
37°C’de Gelişim Testi	58
Katalaz Testi	59
Gram Reaksiyonları	59
Glukozdan Gaz Oluşturma Testi.....	60
3.2.2.4. DNA İzolasyonu	61
3.2.2.5. Kalitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR).....	63
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	65
4.1. <i>in silico</i> Analizler	65

4.1.1. <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 Suşunun Tam Genom Sekansının Eldesi	65
4.1.2. CRISPR-Cas Tip II Bölgesindeki Mevcut Gen Sekanslarının Eldesi	67
4.1.3. Seçilen Cas9 ve Csn2 Genlerinin Hizalanması	70
4.1.4. Primer Tasarımı	76
4.2. <i>in vitro</i> Analizler	78
4.2.1. FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'na ait olan <i>Streptococcus thermophilus</i> Suşlarının Canlandırılması	78
4.2.2. Biyokimyasal Testler ile Önceden Tanımlanmış Suşların Kontrolü.....	80
37°C'de Gelişim Testi	80
Katalaz Testi.....	81
Gram Reaksiyonları.....	82
Glukozdan Gaz Oluşturma Testi	83
4.2.3. DNA İzolasyonu.....	85
4.2.4. <i>Streptococcus thermophilus</i> İzolatlarında CRISPR-Cas Tip II Bölgesinin Tespiti Amacıyla qPCR Uygulaması.....	86
4.2.4.1. CRISPR-Cas Tip II-A Bölgesi Cas9 Geni için qPCR Analizi	86
4.2.4.2. CRISPR-Cas Tip II-A Bölgesi Csn2 Geni için qPCR Analizi.....	90
4.2.4.3. CRISPR-Cas Tip II-C Bölgesi Cas9 Geni için qPCR Analizi	93
4.3. <i>Streptococcus thermophilus</i> İzolatlarında CRISPR-Cas Tip II Bölgesinin Tespiti Amacıyla Uygulanan qPCR Analizinin Doğrulanması	96
5. YORUM	104
5. KAYNAKLAR.....	107
EKLER	117
EK 1 – Referans suş <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258'e ait primer tasarımında kullanılan gen sekansları.....	117
EK 2 – NCBI BLAST ile genlerin <i>Streptococcus thermophilus</i> suşlarına ait sekanslar hizalaması	123
EK 3 – Primer3 ile tasarlanan oligo primerler	134
EK 4 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	136
EK 5- Tez Çalışması Orjinallik Raporu	138
ÖZGEÇMİŞ	139

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırılması (2020) [2].	4
Çizelge 2. Dünya genelinde laktik asit bakterilerinin bazı gıdalarda kullanımı [6].	7
Çizelge 3. <i>Streptococcus thermophilus</i> için BacDive sınıflandırması [9].	9
Çizelge 4. Starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin cinslerinin özellikleri [11].	10
Çizelge 5. <i>Streptococcus thermophilus</i> 'un morfolojik özellikleri [9].	11
Çizelge 6. <i>Streptococcus thermophilus</i> 'un gelişimi için gerekli ortam ihtiyacı [9].	12
Çizelge 7. Laktik asit bakterilerinde endojen ve eksojen CRISPR-Cas uygulamalarına örnekler [34].	25
Çizelge 8. CRISPR taramaları için gen temelli veritabanlarının detayları.	32
Çizelge 9. Farklı amaçlara uygun olarak hazırlanmış araçların ve veritabanlarının listesi [62].	34
Çizelge 10. NCBI GenBank bölümleri [80].	39
Çizelge 11. Mikroorganizmaların tanımlanmasının doğrulanmasında uygulanan biyokimyasal testler.	57
Çizelge 12. qPCR protokolü	63
Çizelge 13. qPCR kitinin LightCycler® 96 cihazına optimize edilmiş protokolü	64
Çizelge 14. <i>S. thermophilus</i> ATCC® 19258™ suşunun ticari özellikleri [89].	65
Çizelge 15. <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258 suşunun dizileme özeti [89].	66
Çizelge 16. <i>S. thermophilus</i> CKDB027 suşunun COG fonksiyonel kategorileri ile ilişkili gen sayısı [110].	68
Çizelge 17. CRISPRCasFinder ile elde edilen gen sekanslarının son 600 baz çifti (bp).	69
Çizelge 18. CRISPR-Cas Tip II-A Cas9 geni BLAST hizalaması özeti.	72
Çizelge 19. CRISPR-Cas Tip II-A Csn2 geni BLAST hizalaması özeti.	73
Çizelge 20. CRISPR-Cas Tip II-C Cas9 geni BLAST hizalaması özeti.	75
Çizelge 21. CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait primerler.	76
Çizelge 22. CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait primerler.	77

Çizelge 23. <i>S. thermophilus</i> suşlarının gelişme özellikleri ve makroskobik, mikroskobik morfolojileri.	79
Çizelge 24. Mikroorganizmaların biyokimyasal testlerle saflığının doğrulanması testlerinin sonuçları.	84
Çizelge 25. Tüm mikroorganizmalar ve tüm genler için qPCR analizinde kullanılan DNA izolatları.....	85
Çizelge 26. <i>S. thermophilus</i> suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçları (16.05.2023).....	87
Çizelge 27. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 genine ait qPCR amplifikasyon ve erime eğrileri.....	89
Çizelge 28. <i>S. thermophilus</i> suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 geni için qPCR analizi sonuçları. Analiz tarihi 16.05.2023.	90
Çizelge 29. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 genine ait qPCR amplifikasyon ve erime eğrileri.	92
Çizelge 30. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçları. Analiz tarihi 16.05.2023.	93
Çizelge 31. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni amplifikasyon ve erime eğrileri.....	95
Çizelge 32. <i>S. thermophilus</i> suşlarında qPCR analizinin doğrulanması amacıyla uygulanan analizler.	96
Çizelge 33. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II- A Bölgesi Cas9 geninin qPCR analizinin doğrulanması.....	97
Çizelge 34. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrileri.....	98
Çizelge 35. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II- A Bölgesi Csn2 geninin qPCR analizinin doğrulanması. Analiz tarihi 7.06.2023.....	99
Çizelge 36. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrileri.....	100
Çizelge 37. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C Bölgesi Cas9 geninin qPCR analizinin doğrulanması.	102
Çizelge 38. <i>S. thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrileri.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. CRISPR aracılığı bağışıklığın adımları	18
Şekil 2. CRISPR-Cas Sınıf 1, Sınıf 2 sistemleri ve 13 çekirdek gen ailesi.	19
Şekil 3. CRISPR-Cas Sınıf 1 lokuslarının organizasyonu.	20
Şekil 4. CRISPR-Cas Sınıf 2 lokuslarının organizasyonu.	21
Şekil 5. CRISPR-Cas Tip II sistemi.	30
Şekil 6. <i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258 suşunun CRISPR-Cas Tip II bölgesinin <i>in silico</i> belirlenmesi.	48
Şekil 7. <i>Streptococcus thermophilus</i> suşlarında CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti amacıyla uygulanan <i>in vitro</i> analizler.	54
Şekil 8. <i>S. thermophilus</i> suşuna ait dairesel genom haritası.	67
Şekil 9. <i>S. thermophilus</i> 'daki CRISPR-Cas lokuslarının yapısı.	68
Şekil 10. CRISPR-Cas Tip II-A Cas9 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 63 tekrar ile Blast Hit dağılımı.	71
Şekil 11. CRISPR-Cas Tip II-A Csn2 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 63 tekrar ile Blast Hit dağılımı.	73
Şekil 12. CRISPR-Cas Tip II-C Cas9 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 94 tekrar ile Blast Hit dağılımı.	74
Şekil 13. Makroskobik inceleme sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258, <i>S. thermophilus</i> HUF19ZN2M1012, <i>S. thermophilus</i> HUF19ZN7M1039, <i>S. thermophilus</i> HUF22BDT2034.	78
Şekil 14. Mikroorganizmaların 37°C'de gelişim testi sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258, <i>S. thermophilus</i> HUF19ZN2M1012, <i>S. thermophilus</i> HUF19ZN7M1039, <i>S. thermophilus</i> HUF22BDT2034.	80
Şekil 15. Mikroorganizmaların katalaz testi sonuçları. Soldan sağa olmak üzere; <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258, <i>S. thermophilus</i> HUF19ZN2M1012, <i>S. thermophilus</i> HUF19ZN7M1039, <i>S. thermophilus</i> HUF22BDT2034.	81
Şekil 16. Mikroorganizmaların Gram reaksiyonu sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; <i>S. thermophilus</i> ATCC 19258, <i>S. thermophilus</i>	

HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, *S.thermophilus*
HUF22BDT2034.....82

Şekil 17. Mikroorganizmaların glukozdan gaz oluşturma testi sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; *S. thermophilus* ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, HUF22BDT2034.....83

Şekil 18. *S. thermophilus* suşları için CRISPR-Cas Tip II bölgesine ait seçilen genlerin var-yok analizi.....105

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

PC	Pik Kapasitesi
Q	Adsorpsiyon kapasitesi (ng/g)
R_s	Ayırıcılık
t_R	Alıkonma zamanı

Kısaltmalar

ATCC	American Type Culture Collection - Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BPC Agar	Bromokresol moru agar - Bromocresol purple lactose agar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Baz çifti – base pair
Cas	CRISPR-associated proteins
CDS	Kodlama dizileri - CoDing Sequence
COG	Ortolog gruplar kümesi - Clusters of Orthologous Genes
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA'ları
Cq	The quantification cycle - kuantifikasyon döngüsü
DDBJ	Japonya DNA Veri Bankası - DNA Data Bank of Japan
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dsDNA	Çift sarmallı DNA – Double stranded DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENA	Avrupa Nükleotid Arşivi - European Nucleotide Archive
HDR	Homoloji odaklı onarım - Homology-directed repair
kb	Kilo baz
LAB	Laktik asit bakterileri

<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>M. xanthus</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>
MRS	DE MAN, ROGOSA and SHARPE
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Yeni Jenerasyon Dizileme – Next Generation Sequencing
NIH	Ulusal Sağlık Enstitüleri - National Institutes of Health
nm	Nanometre
nt	Nükleotid
Ort. Std. Sapma	Ortalama Standart Sapma
Ort. Tm	Ortalama Erime Sıcaklığı
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu - Polymerase chain reaction
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pfu	Plak oluşturma birimi – Plaque forming unit
qPCR	Kalitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu - Qualitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribo nükleik asit
RT-PCR	Real-time PCR
RuvC	Rekombinant UV-C
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
SD	Standart sapma (standard deviation)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu - Scanning Electron Microscope
ssDNA	Tek sarmallı DNA – Single stranded DNA
SSR	Short Sequence Repeats - Kısa Dizi Tekrarları
TEM	Transemision electron microscope - Geçirimli elektron mikroskobu
Tm	Erime sıcaklığı - Melting temperature

1. GİRİŞ

Streptococcus salivarius subsp. thermophilus (*Streptococcus thermophilus*, *S. thermophilus*, *St*), laktik asit bakterilerinin önemli bir türüdür ve özellikle süt ve süt ürünlerinin fermentasyonunda rol oynar; yoğurt, peynir ve diğer fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılır. Bu bakterinin keşfi, 20. yüzyılın başlarında ve özellikle yoğurt üretimi ile ilgilenen bilim adamları tarafından yapılmıştır. *Streptococcus thermophilus* bakterisinin hammaddesi olan yoğurt, tarih boyunca birçok kültürün bir parçası olmakla birlikte son yüzyılda test ve geliştirme çalışmaları, bu ürünün daha geniş bir şekilde kullanılmasına ve daha uzun raf ömrüne yol açmıştır. Ancak, bu bakterinin varlığı ve önemi hakkında bilimsel bir çalışma, 19. yüzyılda Fransız bilim insanı Élie Metchnikoff tarafından yapılmıştır. Metchnikoff, 1908 yılında yayımladığı "Yaş Hemen Her Derde Çare" adlı kitabında, yoğurdun insan sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahip olduğunu öne sürmüştür. Bu çalışma, *Streptococcus thermophilus*'un sağlık üzerinde olumlu etkileri hakkında ilk bilimsel kanıtlardır. Daha sonra, 20. yüzyılda yapılan araştırmalar, *Streptococcus thermophilus*'un süt ürünlerinin fermentasyon sürecinde laktik asit ürettiğini ve bu sürecin ürünlerin lezzetini iyileştirdiğini göstermiştir. Ayrıca, bu bakterinin probiyotik özelliklere sahip olduğu ve bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkilere sahip olabileceği de keşfedilmiştir. Bugün, *Streptococcus thermophilus*, yoğurt üretimi ve diğer fermente süt ürünleri endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bakteri, yoğurt üretimi sürecinde diğer laktik asit bakterileri ile birlikte çalışarak, ürünün kıvamının düzgün olmasını, besin değerinin artmasını ve mikrobiyal güvenliğinin sağlanmasını sağlar.

Bilim insanları, CRISPR-Cas9 sistemlerinin spesifik DNA dizilerini tanımasından yararlanmakta ve bunu yeni özellikleri olan mikroorganizmaların geliştirilmesi sürecinde uygulamaktadır. CRISPR, Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar, bakterilerin doğal bağışıklık sistemidir ve özellikle DNA bazlı bakteri virüslerine karşı savunma mekanizması olarak görev yapar. Aynı zamanda CRISPR-Cas9 sisteminin de temelini oluşturur. CRISPR molekülü, molekül boyunca tekrarlanan ve düzenli aralıklara sahip kısa palindromik DNA dizilerinden oluşur. Bu dizilerin arasında, daha önce bakterilere saldıran organizmaların yabancı DNA dizileri olan "aralayıcılar" bulunur.

CRISPR molekülü ayrıca CRISPR ile ilişkili genleri veya Cas genlerini de içerir. Bunlar, sırasıyla helikaz ve nükleaz adı verilen, DNA'yı çözen ve DNA'yı kesen proteinleri kodlar.

Bu sistem, bakteri genomundaki DNA dizilerini hedefleyebilir ve istenmeyen parçaları kesip çıkarabilir. Bakteriler CRISPR sistemi ile tekrarlanan virüs saldırılarına karşı bağışıklık kazanır. CRISPR bağışıklık sistemi, bakterileri adaptasyon, CRISPR RNA'nın üretimi ve hedefleme gibi üç adım aracılığı ile korur: Bir virüsten gelen DNA, bakterileri istila ettiğinde viral DNA, kısa segmentlere işlenir ve tekrarlar arasında yeni bir aralayıcıya dönüştürülür. Bunlar önceki enfeksiyonların genetik hafızası olarak görev yapar. İkinci olarak, aralayıcılar ve Cas genleri dahil olmak üzere transkripsiyona uğrayarak tek sarmallı bir RNA oluşturur. Ortaya çıkan tek sarmallı RNA'ya, aralayıcıda istilacı viral DNA dizisinin kopyalarını içeren CRISPR RNA adı verilir. Hedefleme ise, CRISPR RNA'ları viral DNA'yı tanımlar ve CRISPR ile ilişkili proteinleri onlara yönlendirir. Protein daha sonra hedeflenen viral materyali parçalayıp yok eder.

Bu çalışmada, *Streptococcus thermophilus* suşlarında, bakterilerin bakteriyofajlara karşı geliştirdikleri bir çeşit bağışıklık sistemi olan CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmanın deneysel çalışmalar bölümü iki kısımdan oluşacak şekilde planmıştır. Çalışmanın birinci kısmı; *in silico* çalışmalardan oluşmaktadır. Bu aşamada referans olarak seçilen *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 suşunun tam genom sekansı elde edildikten sonra, suşun sahip olduğu CRISPR-Cas sistemlerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Burada, CRISPR-Cas Tip II sisteminin tespiti amacıyla seçilen genlerin sekansları elde edilmiştir. Elde edilen gen sekansları, diğer *Streptococcus thermophilus* suşları ile hizalandıktan sonra, gen sekanslarının son 400 bp'ı ile qPCR primerleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler, çalışmanın ikinci aşamasında kalitatif PCR analizinde CRISPR-Cas Tip II sisteminin tespitinde kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmı; *in vitro* çalışmalardan oluşmaktadır. Bu aşamada öncelikle önceden tanımlanmış ve stoklanmış Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *Streptococcus thermophilus* suşlarının canlandırılması gerçekleştirilmiştir. Eşzamanlı olarak, laboratuvar dışından

temin edilen *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 ve *Streptococcus thermophilus* HUF22BDT2034 suşları canlandırılmış ve kültür koleksiyonuna eklenmiştir. Canlandırılan suşların biyokimyasal kontrollerinin gerçekleştirilmesinin ardından genomik DNA izolasyonu ve tasarlanan qPCR primerlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Primerlerin eldesi ile kalitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile, *Streptococcus thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II sistemi tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, gıda endüstrisinde birçok fermente gıda ürününün üretiminde kullanılan önemli bakterilerdir ve filogenetik olarak Lactobacillales takımına ait bakteri grubudur. Laktik asit bakterileri; 6 aile, 30'dan fazla cins ve 300'den fazla türü barındırırlar [1].

Zheng ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada laktik asit bakterilerinden Lactobacillaceae ve Leuconostocaceae ailelerinin sınıflandırılması tüm genom dizileme teknikleriyle yeniden değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucu olarak Lactobacillus cinsinin 25 cinse ayrılması önerilmiştir. Çizelge 1'de 2020 yılında Zheng ve arkadaşları tarafından yayınlanan çalışma sonucu Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırılması verilmiştir [2, 3]

Çizelge 1. Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus ve Enterococcus cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırılması (2020) [2].

	Lactococcus	Streptococcus	Lactobacillus	Enterococcus
Alem	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Şube	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Sınıf	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Takım	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales
Aile	Streptococcaceae	Streptococcaceae	Lactobacillaceae	Enterococcaceae
Cins	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>

Laktik asit bakterileri (LAB), ana veya tek son ürün olarak laktik asit üretimi için karakterize edilen, fermente edici, aside toleranslı bakterilerin çok çeşitli bir grubudur. Laktik asit bakterileri Gram pozitif koklar veya çubuklardır; mikro-aerofilik, aside

toleranslı, katalaz negatiftir, genellikle sporsuzdur, düşük guanin sitozin (GC) içeriğine sahip hareketsizdir. LAB, gastrointestinal sistem, ağız boşluğu, solunum yolu ve vajinal boşluk gibi insan boşluklarının yanısıra; süt, et, sebze ve bitkiler gibi çevresel ortamlar dahil olmak üzere çok sayıda niş içinde yaygın olarak bulunan her yerde bulunan mikroorganizmalar olmasına rağmen, amino asitler, vitaminler, mineraller, yağ asitleri, peptitler, nükleotid bazları ve karbonhidratlar için karmaşık beslenme gereksinimlerine sahiptirler [4, 5].

Laktik asit bakterilerinin (LAB); gıda, ilaç ve kimya endüstrilerinde çok uzun yıllardır geniş uygulamaları bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin hücre dışı polisakkaritleri veya glukanları salgılama yetenekleri de çok çeşitli alanlarda ilgi uyandırmışlardır. LAB'lerin salgıladıkları bu glukanlar, endüstriyel olarak yararlı fiziko-kimyasal özelliklerinden dolayı çok büyük ticari değere sahiptir. LAB'lerden elde edilen glukanlar; fermente gıda formülasyonlarının reolojisini, dokusunu, ağızda bıraktığı hissi iyileştirmede ve antitümör aktivitesi, immünomodülatör biyoaktivite ve antikanserojenite gibi insan sağlığı üzerinde faydalı fizyolojik etkiler kazandırmada önemli bir rol oynamaktadır [6].

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde yoğurt, peynir, ekşi mayalı ekmek, lahana turşusu, turşu, bira, şarap ve diğer fermente gıdalar ile silaj gibi hayvan yemlerinin yapımında kullanılmaktadır. Laktik asit bakterileri ayrıca prebiyotikler, nötrasötikler, tatlandırıcılar, nemlendiriciler, kolon kanserine karşı ilaç ve bağışıklık uyarıcısı olarak uygulamaları olan çeşitli fonksiyonel oligosakkaritler üretebilir [6].

Laktik asit bakterileri buldukları ortamın içeriğindeki hegzosları fermente ederek laktik asit oluştururlar. Bu bakteriler, laktik asit fermantasyonu sonucu meydana getirdikleri son ürüne göre iki gruba ayrılırlar: homofermantatif ve heterofermantatif laktik asit bakterileri. Homofermantatif laktik asit bakterileri, hegzoslardan sadece laktik asit (%90-100) oluştururlar. Heterofermantatif laktik asit bakterileri ise, laktik asidin (%50) yanısıra etanol, asetat ve CO₂ oluştururlar [7].

Laktik asit fermantasyonu sonucu meydana gelen laktik asit, asetik asit, asetaldehit ve diasetil gibi aromatik bileşikler; yoğurt, peynir çeşitleri, kefir, ekşi krema, fermente çiğ sucuk, tarhana gibi gıdaların kendine özgü tadın ve aromanın elde edilmesini sağlarlar. Bundan dolayı seçilen bazı laktik asit bakterisi suşlarından starter kültürler, aroma geliştirici kültürler ve probiyotik kültürler üretilmektedir. Laktik asit bakterilerinden starter kültür özelliği gösteren bakterilerin ürettikleri laktik asit, ortamın asitliğinin artmasını sağlar. Bu sayede asidi tolere edemeyen mikroorganizmalar bu ortamda yaşayamazlar veya yaşamaları güçleşir. Laktik asit bakterileri aside tolaeranslı mikroorganizmalar oldukları için bu ortamda rekabetçi konumdadırlar. Bunun sonucunda ortamda mevcut olan patojen ve diğer mikroorganizmaların inhibe edilmesini sağlarlar. Buna ek olarak laktik asit bakterilerinin hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve amonyak gibi metabolitleri, diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel özellik göstermektedirler. Dolayısıyla bir gıda maddesinde laktik asit bakterilerinin varlığı ve metabolik aktiviteleri ile istenmeyen mikroorganizmaların inhibe edilmesi sağlanabilmektedir [7].

2.2. Laktik Asit Bakterilerinin Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde özellikle fermente gıdaların üretilmesinde starter kültür olarak, gıdalarda asitlik ve aroma geliştirici, metabolitleri sayesinde antimikrobiyal aktivite göstermeleri ve probiyotik özelliklerinden dolayı çok önemli bir yer tutmaktadırlar [6].

Çizelge 2 Dünya genelinde laktik asit bakterilerinin bazı gıdalarda kullanımını özetlemektedir.

Çizelge 2. Dünya genelinde laktik asit bakterilerinin bazı gıdalarda kullanımı [6].

Fermente Gıda	Laktik Asit Bakterisi	Ülke	Kaynak
Kimchi	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kore	Çin lahanası, turp, kırmızı biber, sarımsak ve zencefilin fermente karışımı
	<i>Latilactobacillus curvatus*</i>		
	<i>Levilactobacillus brevis*</i>		
	<i>Latilactobacillus sakei*</i>		
	<i>Lactiplantibacillus plantarum*</i>		
Kefir	<i>Lentilactobacillus kefir*</i>	Rusya	Fermente süt ürünleri
	<i>Levilactobacillus brevis*</i>		
İsviçre Peyniri	<i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>lactis*</i>	İsviçre	Süt ürünleri
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		
Naem	<i>Weissella cibaria</i>	Tayland	Fermente taze domuz eti
	<i>Leuconostoc citreum</i>		
Mageu	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Güney Afrika	Fermente mısır lapası
	<i>Pediococcus cerevisiae</i>		
	<i>Lactococcus lactis*</i>		
Balao Balao	<i>Streptococcus sp.</i>	Filipinler	Fermente pirinç ve karides karışımı
	<i>Leuconostoc sp.</i>		
	<i>Pediococcus sp.</i>		
Gari	<i>Lactiplantibacillus pentosus*</i>	Nijerya	Fermente manyok
	<i>Leuconostoc fallax</i>		
	<i>Weissella paramesenteroides</i>		
	<i>Limosilactobacillus fermentum*</i>		
Kishk	<i>Latilactobacillus sakei*</i>	Mısır	Fermente tahıl ve süt karışımı
	<i>Leuconostoc sp.</i>		
Laban Rayeb	<i>Enterococcus faecalis*</i>	Mısır	Fermente sütler

Ras Peyniri	<i>Lactococcus sp.</i>	Mısır	Süt ürünleri
	<i>Lactobacillus sp.</i>		
	<i>Enterococcus sp.</i>		
	<i>Pediococcus sp.</i>		
Lahana Turşusu	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Batı ülkeleri	Fermente lahana
	<i>Lactiplantibacillus plantarum*</i>		
	<i>Pediococcus acidilactici</i>		
Ekşi Maya	<i>Limosilactobacillus fermentum*</i>	Avrupa	Fermente tahıllar
	<i>Levilactobacillus brevis*</i>		
	<i>Lactiplantibacillus plantarum*</i>		
	<i>Limosilactobacillus panis*</i>		
	<i>Weissella cibaria</i>		

*işaretli suşların orijinal kaynaktaki isimleri, BacDive veritabanındaki [8] güncel isimleri ile değiştirilmiştir.

2.3. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus*, bu mikroorganizmanın önemli bir tanımı Orla-Jensen (1919) tarafından verilmiştir. Tipik *S. thermophilus*, onu bilinen diğer streptokoklardan açıkça ayıran fizyolojik özelliklere sahiptir.

S. thermophilus, yalnızca sığır et suyu özütü (beef extract) ve pepton içeren basit katı veya sıvı ortamlarda gelişemez, daha zengin bir ortam veya uygun karbonhidrat ile desteklenmiş bir besiyeri ortamı talep eder. *S. thermophilus* en uygun katı besiyerinde bile, yalnızca çok küçük "iğne noktalı" koloniler üretir [9].

Çizelge 3 *Streptococcus thermophilus* için BacDive veritabanı sınıflandırmasını göstermektedir. BacDive platform sistemi, her bakteri ve arke türü için geniş bir meta veri yelpazesi sağlar. Mevcut BacDive sürümü, 1800'den fazla cins ve 9000'den fazla türe dağılmış 23.400'den fazla suşu kapsamaktadır. BacDive'deki suşların 6000'e yakını, kendi

türlerinin tip suşlarını temsil etmektedir. BacDive, mikrobiyal çeşitliliğin tüm yönleriyle ilgili bilgi sağlamaya çalışmaktadır ve bu nedenle 400'den fazla önceden tanımlanmış veri alanını kapsamaktadır [8].

Çizelge 3. *Streptococcus thermophilus* için BacDive sınıflandırması [8].

Alem	Bakteri
Şube	<i>Bacillota</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Lactobacillales</i>
Aile	<i>Streptococcaceae</i>
Cins	<i>Streptococcus</i>
Tür	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
Tam bilimsel adı (PNU*)	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
Sinonim	<i>Streptococcus thermophilus</i>

S. thermophilus, mandıra ortamına yüksek oranda adapte olmuştur ve doğada yalnızca süttten izole edilebilir. Çeşitli hayvanlardan elde edilen çiğ sütlerde düşük seviyelerde bulunur. >40 °C'de büyütülerek seçilen koloniler çiğ sütlerden izole edildiğinde, bu mikroorganizmanın genellikle *S. thermophilus* olduğu kanıtlanacaktır. İnkübasyon sıcaklığı, karışık bir popülasyondan *S. thermophilus*'u zenginleştirmenin seçici bir yoludur. Bromokresol moru agar (BCP), *S. thermophilus*'u karışık bir popülasyondan seçici olarak izole etmede çok faydalıdır. Türe özgü DNA problemlerinin geliştirilmesiyle, şüpheli klonların pozitif tanımlaması artık kolayca yapılabilmektedir [10].

Starter kültür olarak gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan Streptokok cinsi *S. thermophilus* ve diğer laktik asit bakteri cinslerinin genel özellikleri Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinin cinslerinin özellikleri [11].

Cins	Hücre Morfolojisi ^a	Fermantasyon	Laktat İzomeri	DNA (%G+C mol)	Rogosa Agar'da Gelişim
<i>Lactococcus</i>	Zincir şekilli kok	Homo	L	33-37	-
<i>Lactobacillus</i>	Çubuk	Homo/hetero	D/L, D, L	32-53	± ^b
<i>Leuconostoc</i>	Kok	Hetero	D	38-41	±
<i>Oenococcus</i>	Kok	Hetero	D		+
<i>Streptococcus</i>	Zincir şekilli kok	Homo	L	40	-
<i>Pediococcus</i>	Kok, dörtlü	Homo	D/L	34-42	+
<i>Tetragenococcus</i>	Kok, dörtlü	Homo	D/L		+

^aKısa çubuk ile kok arasında ayırım yapmak zor olabilir. ^b± Çoğu suş pozitifdir.

Tabloya göre starter kültür olarak kullanılan laktik asit bakterilerinden *Streptococcus* cinsi mikroorganizmaların zincir şekilli kok, homofermentatif ve L laktat izomerine sahip, DNA'larının GC içeriğinin %40 olduğu ve Rogosa Agar (MRS Agar)'da gelişim göstermedikleri söylenebilir.

2.3.1. Morfolojisi ve Hücre Yapısı

S. thermophilus, bazıları çok uzun olabilen çiftler ve zincirler halinde meydana gelen, çapı 0,7-0,9 µm olan, küresel ila oval arası hareketsiz bir koktur. Bakterinin optimum büyüme sıcaklığı 40–45 °C, minimum 20–25 °C ve maksimum 47–50°C civarındadır. *S. thermophilus* arginini hidrolize etmez. Laktoz, fruktoz, sükroz ve glikoz dahil olmak üzere sınırlı sayıda şekeri fermente eder. *S. thermophilus*, laktoz metabolizması sırasında galaktozu fermente etmez. *S. thermophilus* ayrıca antibiyotiklere ve dezenfektanlara nispeten duyarlı olması ve düşük proteolitik aktiviteye sahip olmasıyla da karakterize edilir. Streptokoklar arasında gruba özgü antijen içermemesi bakımından benzersizdir [10].

Streptococcus thermophilus'un morfolojik özellikleri Çizelge 5'de özetlenmiştir.

Çizelge 5. *Streptococcus thermophilus*'un morfolojik özellikleri [8].

Hemoliz tipi	Beta
Hemoliz yeteneği	-
İnkübasyon periyodu	1-2 gün

S. thermophilus; beta hemoliz yapabilirler fakat alfa ve gama hemoliz yeteneği bulunmaz (bu yeteneğe sahip streptokoklar hastalık etmenlerdir) ve 1-2 günlük bir inkübasyon periyoduna sahiptirler.

2.3.2. Hücresel Gelişimi

S. thermophilus suşlarının büyümesinde büyük bir çeşitlilik vardır. Bazıları sütü hızlı asitlendiren türlerdir ve diğer suşların sütte etkili büyüme için karmaşık ihtiyaçları vardır. *S. thermophilus* suşları, büyüme için serbest amino asitlere ihtiyaç duyar. Bunlar arasında glutamik asit, histidin, metiyonin, sistin, valin, lösin, izolösin, triptofan, arginin ve tirozin bulunur. Bu bakteriler, hidrolize protein veya maya özleri içeren ortamlarda iyi gelişir. Çiğ inek sütündeki mevcut nitrojenin düşük seviyesi, bakterinin iyi bir hücresel gelişimini desteklemek için yetersizdir ve takviye gereklidir. Bu doğrultuda çiğ sütte *S. thermophilus* gelişimini desteklemek için şunlar yapılabilir:

- Yoğurt üretimi için sütün ısıtılması (peynir altı suyu proteinlerinin çökeltilmesi için yeterli),
- *S. thermophilus* 'un uygun (proteolitik) bir *Lactobacillus* kültürü ile eşleştirilmesi.

S. thermophilus, sterilize edilmiş sulandırılmış yağsız kurutulmuş sütte hızla ürer ve gaz içermeyen sağlam bir pıhtı oluşturur [10]. *S. thermophilus*'un gelişimi için gerekli ortam ihtiyacı Çizelge 6'da özetlenmiştir.

Çizelge 6. *Streptococcus thermophilus*'un gelişimi için gerekli ortam ihtiyacı [8].

	Todd-Hewitt Medium (DSMZ Medium 697)
	MRS Medium (DSMZ Medium 11)
Geliştiği besiyeri	Columbia Blood Medium (DSMZ Medium 693)
	Medium 6 - Columbia Agar, 10 % at kanı
	M17 Medium
Gelişim sıcaklığı	37-42 °C
Geliştiği sıcaklık aralığı	Mezofilik
Oksijen ihtiyacı	Aerob
Oksijen toleransı	Mikroaerofil

S. thermophilus gelişimi için Todd-Hewitt Medium (DSMZ Medium 697), MRS Medium (DSMZ Medium 11), Columbia Blood Medium (DSMZ Medium 693), Medium 6 - Columbia Agar ve M17 Medium besiyerlerinin içeriğine ihtiyaç duyan, optimum gelişim sıcaklığı 37-42 °C olan mezofilik, aerobik ve mikroaerofil olan bir mikroorganizmadır.

2.3.3. *Streptococcus thermophilus*'un Biyokimyasal Olarak Tanımlanması

Bir bakteri izolatının herhangi bir analizine başlamadan önce, kültürün saflığının doğrulanması gerekir. Bir biyokimyasal testin tekrarlanabilirliği, testin bir tanımlama prosedüründe güvenilir bir adım olması açısından temel öneme sahiptir. Bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılan yöntemlerin uluslararası düzeyde standardize edilmesi ve dikkatle uygulanması oldukça önemlidir [12].

2.3.3.1. Bakterilerin Makroskobik ve Mikroskobik Morfolojilerinin İncelenmesi

Bakterilerin morfolojilerinin incelenmesi için birçok farklı yöntem ve teknik kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında makroskobik ve mikroskobik incelemeler yer almaktadır. İşte bu incelemeleri yaparken kullanılan bazı kaynaklar:

Mikroskobik incelemeler:

- 1. Işık mikroskobu:** Bakterilerin mikroskobik yapısını, şekil ve büyüklüklerini incelemek için kullanılan bir yöntemdir. Işık mikroskobu, bakterileri ışık kaynağından geçirerek objektif lensler ve mercekler aracılığıyla büyütür [13].
- 2. Elektron mikroskobu:** Işık mikroskobundan daha yüksek çözünürlük ve büyütme sağlayan bir tekniktir. İki tip elektron mikroskobu vardır: taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope - SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope, TEM). SEM, yüzeyin detaylarını incelemek için kullanılırken, TEM, kesitlerin iç yapısını incelemek için kullanılır [14].
- 3. Floresan mikroskopi:** Bakterilerin özel boyalarla işaretlenmesi ve floresan mikroskopi kullanılarak incelenmesidir. Flüoresan boyalar, bakterileri belirli bileşenlerine göre etiketleyebilir ve bu sayede hücrenin farklı yapılarını veya organellerini vurgulayabilir [15].

Makroskobik incelemeler:

- 1. Kültür tekniği:** Bakterilerin laboratuvar ortamında çoğaltılması ve kültürlenmesidir. Bu teknik, bakterilerin gözle görülebilen koloniler halinde büyümesini sağlar [16].
- 2. Biyokimyasal testler:** Bakterilerin çeşitli enzimlerini ve metabolizma ürünlerini test etmek için kullanılan tekniklerdir. Bu testler, bakterilerin kimyasal profillerini analiz ederek tanılamaya yardımcı olur [17].
- 3. Moleküler biyoloji teknikleri:** Bakterilerin DNA'sını analiz etmek ve moleküler düzeyde tanılamak için kullanılan yöntemlerdir. Bunlar arasında PCR, DNA dizileme, elektroforez gibi teknikler bulunmaktadır [18].

2.3.3.2. 37°C'de Gelişim Testi

S. thermophilus, laktik asit bakterilerinden biridir ve 37°C sıcaklıkta optimum gelişme sağlar. Bu bakterinin gelişim testi, *S. thermophilus*'un belirli bir sıcaklıkta (37°C) nasıl gelişim gösterdiğini değerlendirmek için yapılır.

Bu testin amacı, *S. thermophilus*'un belirli bir sıcaklıkta optimum büyüme sağlayıp sağlamadığını belirlemektir. Bu test, laboratuvar ortamında *S. thermophilus*'un üretim performansını ve üretim süreçlerinde kullanılabilirliğini değerlendirmek için de kullanılabilir.

S. thermophilus'un gelişim testi, farklı besiyerlerine bakterinin ekilmesini ve belirli bir sıcaklıkta inkübe edilmesini içerir. Genellikle M17 Agar gibi bir besiyeri kullanılır. Bu agar, Streptococcus'ların büyümesini destekleyen bir besin kaynağı içerir.

S. thermophilus'un gelişim testi aşağıdaki adımları içerebilir [19]:

- **M17 Agar besiyerinin hazırlanması:** M17 Agar besiyeri, üretici talimatlarına göre hazırlanır ve oda sıcaklığında sterilize edilir.
- ***Streptococcus thermophilus*'un bakteri suşunun hazırlanması:** İyi karakterize edilmiş bir *S. thermophilus* suşu kullanılır. Bu suş, uygun besiyerinde ekilir ve inkübe edilerek çoğaltılır.
- **Besiyerin inokülasyonu:** M17 Agar besiyeri, *Streptococcus thermophilus* suşu ile bulaştırılır. Bu, steril teknik kullanılarak yapılır ve besiyerine mikroorganizmanın eşit bir şekilde yayılması sağlanır.
- **İnkübasyon:** Besiyerine bulaşmış *S. thermophilus* suşu, belirli bir sıcaklıkta (37°C) inkübe edilir. İnkübasyon süresi genellikle 24-48 saat arasında değişebilir.
- **Gözlem:** İnkübasyon süresi sonunda, besiyerinde *S. thermophilus* kolonileri gözlemlenir. Kolonilerin sayısı, morfolojisi ve büyüklüğü değerlendirilir.

Gelişim testi sonuçları, *S. thermophilus*'un belirli sıcaklıkta optimum büyüme gösterip göstermediğini gösterir. Kolonilerin yoğunluğu ve morfolojisi, bakterinin büyüme potansiyelini ve üretim performansını belirlemek için kullanılabilir.

2.3.3.3. Katalaz Testi

Katalaz enzimi, aerobik ve pek çok fakültatif anaerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *E. coli*, *Pseudomonas* ve *Bacillus*

gibi bakteriler katalaz pozitif mikroorganizmalara örnektir. *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* gibi laktik asit bakterileri ve *Clostridium*'lar genelde katalaz negatif bakterilerdir.

2.3.3.4. Gram Reaksiyonları

Gram reaksiyonlarının izlenmesi amacıyla uygulanan Gram boyama prosedürü; bakteri hücrelerinin boyutu, şekli ve düzeninin gözlemlenmesi sağlar. Ancak morfoloji, boyama reaksiyonları ve hareketlilik, kültürün yaşı ve besiyerinin bileşimi gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir.

2.3.3.5. Glukozdan Gaz Oluşturma Testi

Bakteriler belirli karbonhidratları, belirli şekillerde metabolize ederler. Örneğin glukoz, bazı bakteriler tarafından fermantasyonla parçalanabilmektedir. Buna karşılık, bazı bakteriler glukozu aerobik oksidasyon, diğer bazıları ise hem aerobik oksidasyon hem de fermantasyonla metabolize edebilirler. Diğer taraftan bazı bakteriler glukozu hiçbir şekilde kullanamamaktadır.

Karbonhidrat fermantasyon testlerinde karbonhidratlar genellikle tek tek ele alınıp incelenmektedir. Bu amaçla test edilecek karbonhidratlar eklenerek hazırlanmış olan karbonhidrat fermantasyon test broth'larından yararlanılmaktadır. Test edilecek karbonhidratı (örneğin glukoz) içeren besiyerine, incelenecek bakteri kültürü inoküle edilir. İnkübasyonun bitiminde, besiyerinde asit ve/veya gaz oluşumu takip edilerek, incelenen bakterinin bu karbonhidratı fermente edip etmediği hakkında karara varılır.

Karbonhidrat fermantasyonu (parçalanması) sonucu oluşan asitler, sıvı karbonhidrat besiyerindeki indikatörün rengini değiştirecektir. Bu şekilde, test edilen karbonhidrattan asit oluşturanlarla oluşturmayanları ayırmaak mümkün olmaktadır. Fermantasyon sonucu gaz oluşumu ise, besiyerinde yer alan Durham tüpündeki gaz birikiminden kolaylıkla anlaşılır. Bazı bakteriler, test edilen karbonhidrattan yalnızca asit, bazıları ise hem asit hem de gaz oluşturmaktadır [20].

2.3.4. *Streptococcus thermophilus* Bakteriyofajları

Öldürücü veya değil olmak üzere tüm *S. thermophilus* bakteriyofajları (faj), boyutu 31 ila 45 kb arasında değişen bir çift sarmallı DNA genomu içerir. Genellikle küçük bir taban plakası ile aynı temel izometrik kafa morfolojisine (çap olarak 65 nm) ve uzun kontraktıl olmayan kuyruklara (230-260 nm uzunluğunda) sahiptirler. Morfolojik grup, Bradley'nin B grubudur (siphoviridae). Bu, mezofilik laktokoklar için faj içindeki morfolojik çeşitlilikle çelişir. Genetik düzeyde, tüm *S. thermophilus* fajları, tek bir DNA homoloji grubuna aittir.

Son araştırmalar, *S. thermophilus*'un faj dirençli hale gelmek için kısa faj türevli dizileri entegre edebildiğini göstermiştir.

S. thermophilus fajları arasında coğrafi çeşitlilik olduğu görülmektedir. İsviçre'de yapılan araştırmalar, peynir fabrikalarına giren sütün 10 ila 130 pfu ml⁻¹ arasında değişen *S. thermophilus* faj titrelerine sahip olabileceğini bulmuştur. Çalışmalar, "yeni" endüstriyel fajın mevcut faj popülasyonundan türetilmediğini, ancak gelen çiğ süt fajıyla aynı olduğunu göstermiştir. Fajların endüstriyel olmayan doğal ortamlarındaki değişkenliği üzerine çok az çalışma yapılmıştır.

S. thermophilus ile yapılan ticari fermantasyonlar, türe özgü faj enfeksiyonuna duyarlıdır. Virü lent fajla kontaminasyon, asit üretimini yavaşlatmak ve hatta durdurmak için yeterli starterleri parçalayarak ürün kaybına neden olabilir. Faj enfeksiyonu asit üretimini geciktirmek için yetersiz olsa bile, yoğurt starteri olan *S. thermophilus* bileşenindeki bir azalma, daha düşük bir lezzet puanı verebilir ve elde edilen yoğurdun dokusu üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilir. *S. thermophilus* faj, aşağıdaki nedenlerden dolayı modern yoğurt fabrikalarında peynir fabrikalarına kıyasla daha az sorun yaratma eğilimindedir:

- Süt için yüksek ısı işlem çoğu çiğ süt fajını öldürür.
- Peynir yapımında peynir altı suyunun uzaklaştırılması ve ayrılması, çevre boyunca faj dağılımını teşvik eder.
- Yoğurt fabrikalarında genellikle bir işleme gününde daha az fermantasyon tankı dolumu olur.

Süt fabrikalarında fajın her yerde bulunması, onları yok etmeye çalışmak yerine süt fajını kontrol etmeye odaklanan araştırma çabalarına yol açmıştır.

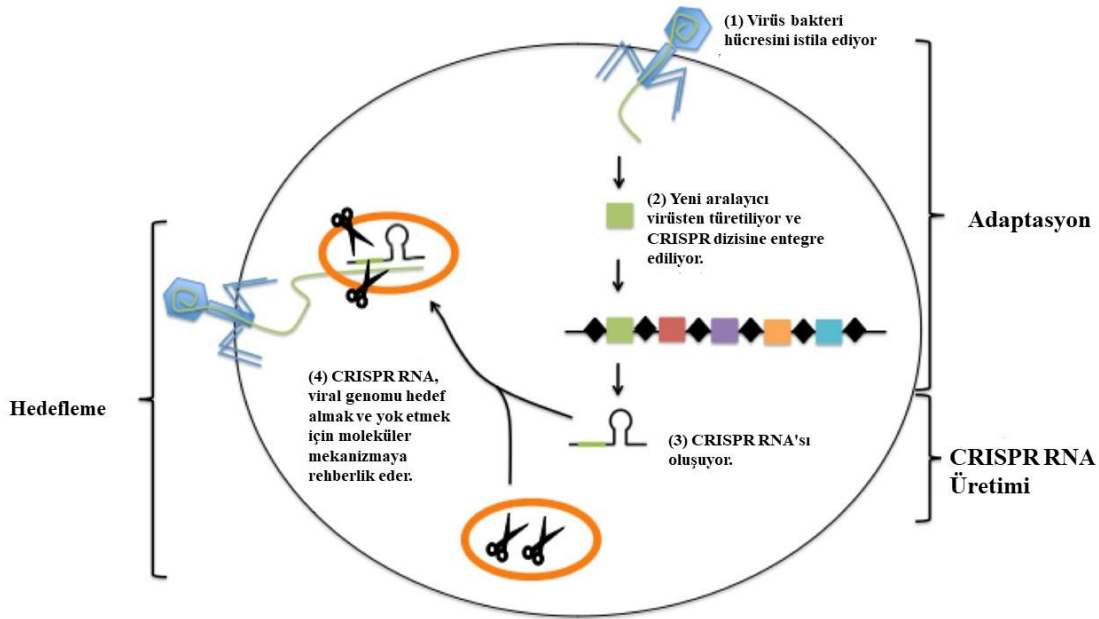
S. thermophilus bakteriyofajı için hızlı tespit yöntemleri, süt ve süt ürünleri üretim işletmelerinde faj saldırısını önlemek için önemli bir araçtır. Kantitatif, daha hassas ve daha hızlı prosedürlere olan talebin artmasıyla birlikte, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonunun (qPCR) geliştirilmesi üzerinde durulmuştur [11].

S. thermophilus'un bakteriyofaj direncinin oluşumunu ve tespiti amacıyla CRISPR-Cas sistemlerinin tespiti büyük önem taşımaktadır. CRISPR-Cas sistemleri, çoğu prokaryotta doğal bir bağışıklık sistemi görevi görmesinin yanı sıra, yeni geliştirilen genom modifikasyonları ve evrimsel araştırmalarda da bir araç olarak kullanılabilir. *S. thermophilus*, CRISPR sistemlerinin incelenmesi ve uygulanması için önemli bir model organizmadır [21].

2.4. CRISPR-Cas Sistemleri

CRISPR (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar)-Cas (CRISPR ile ilişkili endonükleaz protein) modülleri, çoğu arke ve birçok bakteri tarafından kodlanan, virüsler ve plazmitler gibi istilacı genetik elementlere karşı hareket eden adaptif bağışıklık sistemleridir. Eşsiz aralayıcılarla serpiştirilmiş farklı kısa tekrar dizileri, bakteri ve arke genomlarında yıllardır tanınmaktadır ve bu tekrar dizilerinin önemli bir ortak fonksiyona sahip olabileceği öne sürülmesine rağmen, bu fonksiyonun doğası ancak son zamanlarda aydınlatılmıştır [22].

CRISPR molekülü, molekül boyunca tekrarlanan ve düzenli aralıklara sahip kısa palindromik DNA dizilerinden oluşur. Bu dizilerin arasında, daha önce bakterilere saldıran organizmaların yabancı DNA dizileri olan "aralayıcılar" bulunur. CRISPR molekülü ayrıca CRISPR ile ilişkili genleri veya Cas genlerini de içerir. Bunlar, sırasıyla helikaz ve nükleaz adı verilen, DNA'yı çözen ve DNA'yı kesen proteinleri kodlar [23].



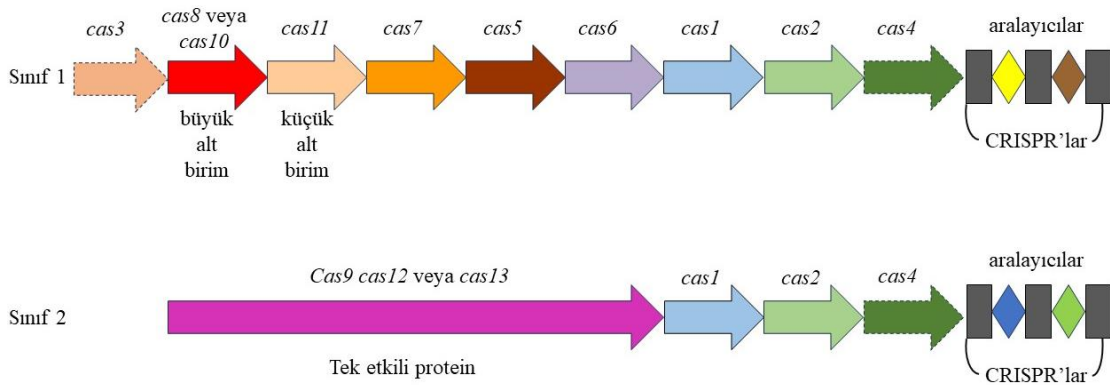
Şekil 1. CRISPR aracılığıyla bağışıklığın adımları [24].

Şekil 1, CRISPR aracılı bağışıklığın adımlarını göstermektedir. CRISPR'ler bakteri genomunda istilacı virüslere karşı savunmaya yardımcı olan bölgelerdir. Bu bölgeler kısa DNA tekrarlarından (siyah elmaslar) ve aralayıcılardan (renkli kutular) oluşur. Daha önce görülmemiş bir virüs bir bakteriyi enfekte ettiğinde, mevcut aralayıcıların arasına virüsten türetilen yeni bir ayırıcı eklenir. CRISPR dizisi kopyalanır ve kısa CRISPR RNA molekülleri oluşturmak için işlenir. CRISPR RNA, bakteriyel moleküler mekanizma ile birleşerek istilacı virüsteki eşleşen hedef diziyeye yönlendirir. Moleküler mekanizma istilacı viral genomu kesip yok eder [24].

CRISPR dizilerine bitişik varsayılan operonlar tarafından kodlanan Cas proteinleri, hesaplama yöntemleriyle ayrıntılı olarak analiz edilmiş ve birkaç nükleaz, bir helikaz, bir polimeraz ve çeşitli RNA bağlayıcı proteinlerin karakteristiği olan alanları içerdiği bulunmuştur. Başlangıçta bu proteinlerin yeni bir DNA onarım sistemi oluşturduğu düşünülmüş, ancak bazı benzersiz CRISPR aralayıcılarının virüs ve plazmit genlerinin parçalarıyla neredeyse aynı olduğu gözlemi, CRISPR-Cas sistemlerinin arke ve bakterilerde savunmada rol oynayabileceği hipotezinin yolunu açmıştır [22].

CRISPR-Cas sistemleri, 2 sınıf ve 4 tipe ayrılmaktadır. Sınıf 1; Tip I, Tip III ve Tip IV olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Sınıf 2; Tip II, Tip V ve Tip VI olmak üzere üçe

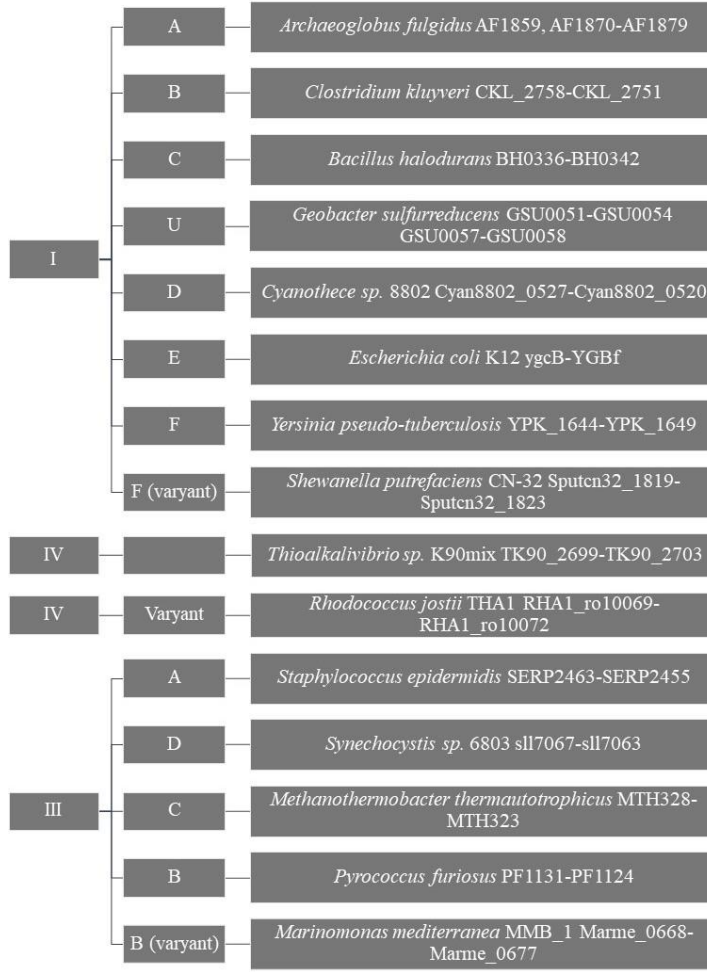
ayrılmaktadır. Şekil 2, CRISPR-Cas Sınıf 1, Sınıf 2 sistemleri ve 13 çekirdek gen ailesini göstermektedir.



Şekil 2. CRISPR-Cas Sınıf 1, Sınıf 2 sistemleri ve 13 çekirdek gen ailesi [25].

Sınıf 1'de çoklu alt birim efektör kompleksleri ve Sınıf 2'de tek protein efektör modülleri olmak üzere iki sınıfa aittir. Sınıf 2 CRISPR-Cas sistemlerinin kapsamlı karakterizasyonuna yönelik ortak genomik ve deneysel çalışmalar, iki sistemin yeni ve çeşitli alt türlerin tanımlanmasına yol açmıştır. Yeni tanımlanan Tip VI sistemler, CRISPR-Cas varyantları arasında yalnızca RNA'yı hedefleyen ilk sistemdir. Beklenmedik bir şekilde, bazı sınıf 2 sistemlerde, efektör protein ayrıca öncül-crRNA işleminden de sorumludur. Efektör komplekslerinin karşılaştırmalı analizi, Sınıf 2 sistemlerin birden fazla bağımsız durumda mobil genetik unsurlardan evrimleştiğini göstermektedir [26].

CRISPR-Cas Sınıf 1 lokuslarının organizasyonu Şekil 3'de ve Sınıf 2 lokuslarının organizasyonu Şekil 4'te ayrıntılandırılmıştır. Nükleaz aktivitesini gerçekleştirmek için çoklu Cas komplekslerine ihtiyaç duyan sistemler Sınıf I CRISPR-Cas sistemine dâhil edilirken, tek bir Cas proteininin gerekli olduğu sistemler Sınıf II'de yer almaktadır [27]



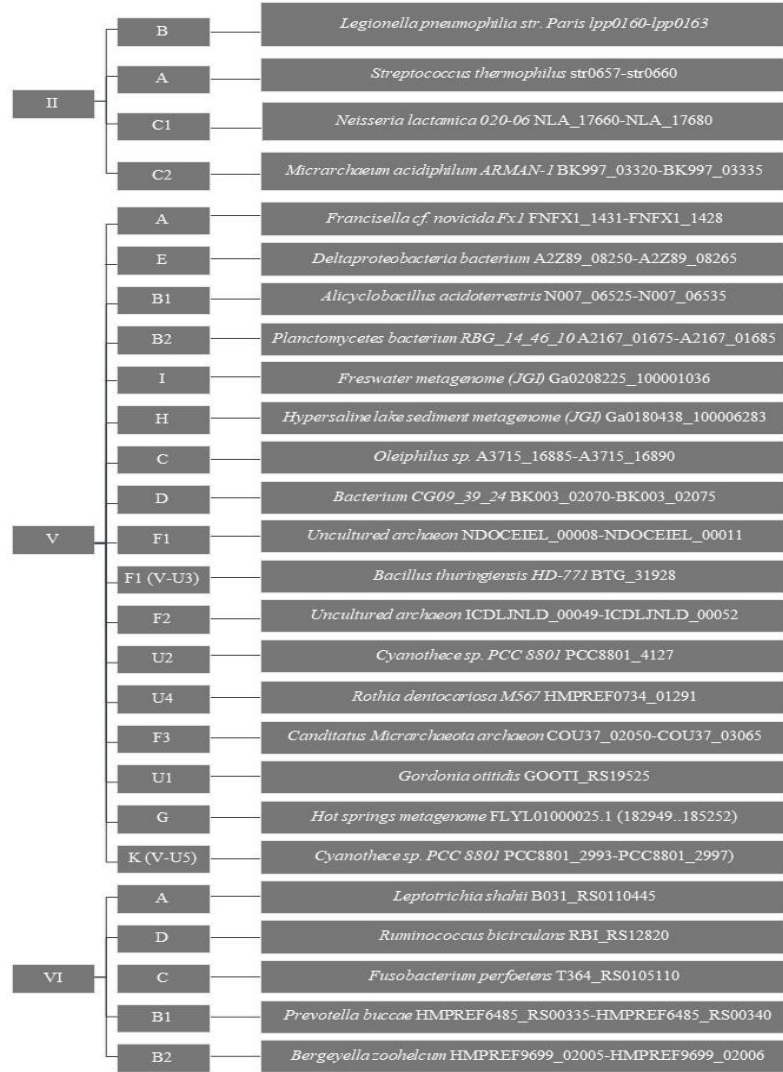
Şekil 3. CRISPR-Cas Sınıf 1 lokuslarının organizasyonu [26].

CRISPR-Cas Sınıf 1; Tip I, Tip IV ve Tip III'den oluşmaktadır. CRISPR-Cas Tip I tipi; Tip I-A, Tip I-B, Tip I-C, Tip I-U, Tip I-D, Tip I-E, Tip I-F ve Tip I-F (varyant) olmak üzere 8 alt tipe, CRISPR-Cas Tip IV tipi; Tip IV ve Tip IV (varyant) olmak üzere 2 alt tipe, Tip III tipi; Tip III-A, Tip III-D, Tip III-CC, Tip III-B ve Tip III-B (varyant) olmak üzere 5 alt tipe ayrılmaktadır.

Sınıf 1 sistemler, çok sayıda arkeada temsil edilen ancak bakterilerde daha az görülen en yaygın ve çeşitli Tip I, Tip III'ün yanı sıra adaptasyon modülünden yoksun ilkel CRISPR-Cas lokuslarını içeren nadir Tip IV'ü içerir [26].

Şekil 3'de yer alan CRISPR-Cas Tip I-E alt tipine sahip olan *Escherichia coli*, CRISPR-Cas sistemlerinin keşfinde büyük öneme sahiptir. 1987 yılında fosfat metabolizmasına

yardımcı olan genler araştırılırken, *Escherichia coli* genomunda benzer DNA dizilerinin tanımlanmasıyla CRISPR/Cas sistemi keşfedildi. Daha sonra bu diziler, halofilik arkelerin de dahil olduğu diğer bakteri genomlarında da tanımlandı. CRISPR-Cas dizileri, bir organizmanın evrimsel ilişkisinde önemli bir rol oynar. CRISPR-Cas'ın fonksiyonel karakterizasyonu Cas veya Cas9 ile ilişkili proteinlere bağlıdır. Hipertermofilik arkelerde Cas proteininin DNA onarım mekanizmasında rol oynadığı varsayılmaktadır [28].



Şekil 4. CRISPR-Cas Sınıf 2 lokuslarının organizasyonu [29].

Sınıf 2 CRISPR-Cas sistemleri Tip II, V ve VI'yı içerir. Bu tiplerin ayırt edici özelliği efektör komplekslerinin Tip II'deki Cas9 gibi tek, büyük, çok alanlı bir proteinden oluşmasıdır. Kısmen potansiyel yeni genom düzenleme araçları arayışı kapsamında yeni sınıf 2 sistemlerin hesaplamalı keşfine odaklanan çabalar sayesinde, bu sınıf 2015 sınıflandırmasından bu yana büyük bir genişleme yaşadı. 2015 yılında 2 tip ve 4 alt tipten,

sınıf 2, 3 tip ve 17 alt tipe genişletildi. Yeni keşifler, Tip V'in yanı sıra Tip VI sistemlerin çok sayıda farklı varyantını içeriyor; bu, yalnızca RNA'yı parçalayan ilk ve şimdiye kadarki tek CRISPR-Cas sistemi çeşitidir [29].

2.4.1. Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR- Sistemlerinin Keşfi ve Oluşumu

1980'lerin sonları ve 1990'ların başlarında, düzenli aralıklarla tekrarlanan diziler hem bakteriyel hem de arkeal genomlarda tespit edildi. Şu anda Kümeleşmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar veya CRISPR olarak bilinmektedirler. Biyoteknoloji için biyolojik önemlerinin ve potansiyel uygulamalarının anlaşılmasında iki aşamalı bir gelişme izlenmiştir. İlk çalışmalar az sayıda olup, bakteri ve arkeada aralıklı tekrar dizileri ve birbirleriyle fiziksel olarak bağlantılı korunmuş genlerin betimlendiği çalışmalardır ve bunların birlikte fonksiyonel olduğu düşünülmektedir [30].

CRISPR-Cas sistemleri, bakteri ve arke genomlarında doğal olarak bulunan bir savunma mekanizmasıdır. Bu sistemler, mikroorganizmaların bakteriyofajlara karşı korunmasını sağlar. CRISPR olarak adlandırılan bu sistem, bakteri genomlarında tekrarlanan DNA dizileridir. Bu tekrarlayan diziler arasında, virüslere özgü DNA parçaları da bulunabilir. CRISPR dizileri, bir tür molekül olan Cas enzimleriyle birlikte çalışır. Cas enzimleri, virüslerin genetik materyalini algılayarak hedef alır ve yok eder. Bu şekilde, bakteri virüslerin saldırısına karşı korunur [31].

CRISPR-Cas sistemlerinin tespiti, öncelikle bakteri genomlarının dizilenmesiyle yapılır. Genom dizilimi verilerinde CRISPR tekrarlamalarını ve bunlara eşlik eden Cas genlerini arayarak bulunabilir. Bu araştırma, hem yeni CRISPR-Cas sistemlerinin keşfedilmesini sağlar hem de mevcut sistemlerin çeşitliliğini ve yaygınlığını belirlemek için kullanılır [32].

Prokaryotik organizmaların genomlarında tekrarlayan diziler yaygın bulunur ve bu bölgelerin tanınması, tam bakteriyel genom dizilerinin mevcudiyetiyle giderek kolaylaşmaktadır. Bu dizilerin uzunluğu, sırası ve konumu genellikle çok değişken olup tek bir tür için genellikle benzersizdir. Kısa dizi tekrarlarının (SSR) iki ana sınıfı ayır

edilebilir; bitişik tekrarlar ve araya serpiştirilmiş tekrarlar. Bitişik tekrar birimlerinin sayısı genellikle türden türe değişir ve bakteriyel populasyonlardaki genetik heterojenite farklı gen transkripsiyonu veya çevirisine bağlı olarak fenotipik farklılıklara yol açabilir [33].

CRISPR aracılı otomatik bağışıklığın, özellikle kromozom kaybının gözlenen fenotipleri açıklayabileceği düşünülmektedir. CRISPR'a bağlı (Cas) genlerin tanımlanması ile önemli bir gelişme yaşanmıştır; bu da tekrar-aralık dizilerinin daha karmaşık bir CRISPR-Cas protein sisteminin bir parçası olduğunu göstermektedir. İlk biyoinformatik analizlerde Cas protein dizilerinin nükleik asit metabolizmasında yer alabileceği tahmin edilmişse de, onların gerçek fonksiyonlarına dair ilk anlayış keşfedilen spesifik dizilerin kökeninden elde edilen bulgulardan ortaya çıkmıştır. Detaylı dizi çalışmaları, misafir genetik elementlerin DNA'sındaki uyumlu olmayan dizilerin (daha sonra protodiziler olarak adlandırılanlar) değişkenlik gösterdiğini göstermiş ve bu, CRISPR-Cas sistemlerinin yabancı DNA'ya karşı bağışıklık oluşturabileceği hipotezine yol açmıştır. Bu hipotezi destekleyen deneysel kanıtlar, firmiküt *S. thermophilus*'un fajlarla enfekte edildiği durumlarda ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde plazmid konjugasyon testlerine dayanarak elde edilmiştir. Bu nedenle, CRISPR-Cas sistemleri adaptif ve kalıtsal bir genetik bariyerin benzersiz bir formunu oluşturur [30].

Kısacası, bir genetik element tarafından enfekte edilme sırasında, istenilen hücrenin genomik CRISPR dizilerine, istenen genetik elementin dizisiyle aynı dizilere sahip yeni diziler eklenir (edinim). Ardından, CRISPR dizisinden türeyen ve büyük çoğunluğu veya tüm diziyeye sahip küçük işlenmiş CRISPR RNA'ları (crRNA'lar), Cas proteinleri ile bir kompleks (ifade) oluşturur. Bu ribonükleoprotein kompleksleri daha sonra istilacı nükleik asitteki tamamlayıcı bir diziyi hedefleyerek eşlenen dizide kesme (girişim) yapar [30].

Endojen CRISPR-Cas proteinleri, süt başlangıç kültürlerini avlayan fajlar gibi istilacı nükleik asit materyallerine karşı savunmak için adaptif bağışıklık sistemleri olarak işlev gören CRISPR-Cas sistemlerini içerir.

CRISPR-Cas sistemleri arkelerin yaklaşık %85'inde ve bakterilerin %40'ında mevcuttur ve özellikle *Lactobacillus*'un yaklaşık %63'ünde, *Bifidobacterium*'un %77'sinde ve *S. thermophilus* suşlarının %100'ünde bulunur. CRISPR-Cas sisteminin CRISPR bileşeni, faj ve plazmidler gibi yabancı istilacıların genetik kayıtları olarak görev yapan benzersiz aralayıcıları ayıran bir dizi korunmuş tekrardan oluşur [34].

Laktik asit bakterilerinde endojen ve eksojen CRISPR-Cas uygulamaları, Çizelge 7'de özetlenmiştir.

Çizelge 7. Laktik asit bakterilerinde endojen ve eksojen CRISPR-Cas uygulamalarına örnekler [34].

Cins	Tür	Endojen / Eksojen	CRISPR-Cas Bileşeni	Uygulama	Referans
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	Endojen	CRISPR dizisi	CRISPR tekrarları ve aralayıcılar türler ve suşlar arasındaki karşılaştırmalarda temel olarak kullanılır. Aralayıcı genler, CRISPR tabanlı gerinim tiplmesi için kullanılabilir.	[35]
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Eksojen	SpyCas9	Nikaz Cas9 ^{D10A} , ³ , plazmid bazlı onarım şablonuyla çerçeve içi silmeler ve kromozomal gen yerleştirme oluşturmak için kullanılabilir.	[36]
	<i>crispatus</i>	Endojen	Kademeli Cas3	Tip I-E sistemi, eklemelerin, silmelerin ve tek baz ikamelerinin eklenmesi için plazmid bazlı rekombinasyon için yeniden programlanabilir.	[37]
	<i>gasseri</i>	Endojen	LgaCas9	Doğal Tip II-A Cas9'un, plazmit girişim analizlerinde işlevsel olduğu ve daha sonra çeşitli tek kılavuz RNA (sgRNA)'larla kendi kendini hedefleyen analizler için yeniden tasarlandığı gösterilmiştir.	[38]
	<i>plantarum</i> , <i>brevis</i>	Eksojen	SpyCas9	Tek gen silmeleri ve kromozomal gen değişimi için dsDNA onarım şablonlarını kullanan Cas9 genom düzenleme sistemi.	[39]
	<i>plantarum</i>	Eksojen	dCas9	Birden fazla hedef genin eş zamanlı transkripsiyonel yıkımı için geliştirilen uyarılabilir CRISPRi sistemi.	[40]

	<i>plantarum</i>	Eksojen	SpyCas9	Heterolog rekombinaz yoluyla çift sarmallı oligonükleotid yeniden birleştirme ve endojen HDR yoluyla plazmid bazlı yeniden birleştirme yoluyla elde edilen mutasyonlar ve silmeler.	[41]
	<i>plantarum</i>	Eksojen	SpyCas9	Gen nakavtlarını ⁴ , eklemeleri ve nokta mutasyonlarını sağlamak için Cas9 destekli dsDNA ve ssDNA yeniden birleştirme	[42]
	<i>reuteri</i>	Eksojen	SpyCas9	Cas9 düzenlemeyle birleştirilmiş ssDNA rekombinasyonu, yüksek verimli rekombinant seçimine olanak sağladı.	[43]
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	Eksojen	SpyCas9	Spesifik nokta mutasyonları, eklemeleri ve silmeleri olan mutantların verimli bir şekilde üretilmesi için ssDNA, Cas9 bazlı karşı seçimle bir araya getirilir.	[44]
	<i>lactis</i>	Eksojen	SpyCas9	Faj enfeksiyonu proteotip tanımlamasının ardından, SpyCas9 kendi kendini hedefleyen ve onarım şablonu plazmidleri, faj enfeksiyonundaki rollerini incelemek üzere genleri devre dışı bırakmak için kullanılır.	[45]
	<i>lactis</i>	Eksojen	SpyCas9	<i>Lactococcus lactis</i> 'in farklı alt popülasyonları, baskın bir alelin öldürücü Cas9 hedeflemesi yoluyla seçilir.	[46]
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	Endojen	Sth3Cas9	Tip II-A sistemi, kendi kendini hedefleme ve boyutu 8 kb ila 102 kb arasında değişen genomik ada (genomic island) ⁵ silme işlemleri için yeniden programlandı.	[47]

<i>thermophilus</i>	Endojen	Sth1Cas9	Tip II-A sistemi, rekombinasyon verimliliğini artırmak ve virülan faj genomuna spesifik nokta mutasyonları, delesyonlar ve bir metiltransferaz genini dahil etmek için seçici bir baskı olarak kullanılır.	[48]
<i>thermophilus</i>	Eksojen	Sth1Cas9, Sth3Cas9	Kendi kendini hedefleme için kullanılan CRISPR1 ve CRISPR3 StCas9 nükleazları, <i>E. coli</i> 'de Tip I-E kendi kendini hedeflemeyle karşılaştırıldığında verimlilik sağlar.	[49]
<i>mutans</i>	Endojen	SmuCas9	Kendi kendini hedefleme, birden fazla geni düzenlemek için kullanılan Tip II-A sistemi çift sarmallı onarım şablonlarıyla gerçekleştirilir.	[50]

³Nikaz Cas9^{D10A}: Cas9 geninde bulunan RuvC ve HNH domainlerinden birisinin katalitik aktivitesinin inhibe edilmesi ile, tek sarmallı DNA kırıklarına neden olan nikaz mutantları oluşabilmektedir. Bu genetik araç sayesinde, tek bir adımda transformasyonun sağlanmasıyla tek gen çıkarılmasına ya da eklenmesine olanak sağlamıştır [51].

⁴Gen nakavtları: Genomik ile ilgili olarak nakavt, bir organizmadaki bir veya daha fazla spesifik genin etkisiz hale getirilmesi veya çıkarılması için genetik mühendisliğinin kullanılması anlamına gelir. Bilim adamları, bir organizmadan bir genin çıkarılmasının etkisini incelemek için nakavt organizmalar yaratırlar; bu da genellikle o genin işlevi hakkında bir şeyler öğrenmelerine olanak tanır [52].

⁵Genomik ada (genomic island): Genomik adalar (GI'ler), bir popülasyonda yatay olarak aktarılan genleri oluşturan ayrı DNA segmentlerini ifade eder. Bu bölge, konağın kromozomuna entegre olabilir; eksize edilir ve transformasyon, konjugasyon veya transdüksiyon yoluyla yeni bir konakçıya aktarılır. Bu bölgede kodlanan proteinler muhtemelen alıcı organizmada yeni işlevler sunar [53].

Çizelge 7'de özetlenen bilgiler doğrultusunda laktik asit bakterilerinden biri olan *S. thermophilus*'un endojen CRISPR-Cas sistemlerinin tespiti, tez çalışmasının temel hedeflerinden biridir.

2.4.3. *Streptococcus thermophilus*'ta CRISPR-Cas Sistemlerinin Keşfi ve Oluşumu

S. thermophilus, termofilik bir laktik asit bakterisi olup, yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin üretiminde önemli bir rol oynar. Bu bakterinin genomunda CRISPR-Cas sistemlerinin varlığı ve işlevi üzerine yapılmış araştırmalar bulunmaktadır [22, 23, 33].

S. thermophilus'ta bulunan CRISPR-Cas sistemleri, bakterinin viral enfeksiyonlarla mücadelesinde önemli bir rol oynar. Bu sistemlerin yapısı ve işleyişi, bakterinin viral enfeksiyonlara karşı nasıl korunduğunu anlamada kritik bir noktadır. Araştırmalar, *S. thermophilus*'un CRISPR-Cas sistemlerinin viral DNA'yı keserek inaktive ettiğini ve böylece bakterinin hayatta kalmasını sağladığını göstermiştir.

CRISPR-Cas sistemlerinin önemi oldukça büyüktür. Bu sistemleri anlamak, bakterilerin nasıl virüslere karşı savunma mekanizmaları geliştirdiğini anlamamıza yardımcı olur. Ayrıca, CRISPR-Cas sistemleri biyoteknolojide gen düzenleme aracı olarak kullanılmaktadır. Teknolojik olarak düzenlenebilir gen zinciri oluşturabildikleri için, bir organizma üzerinde hedefli genetik değişiklikler yapmak için kullanılabilirler. Bu, tarımdan tıbbı ve biyokimyaya kadar birçok alanda kullanılan gen düzenleme teknolojilerine olanak sağlar.

2.4.4. CRISPR-Cas Tip II Sistemi ve *Streptococcus thermophilus* için Önemi

Mevcut sınıflandırmaya göre CRISPR-Cas Tip II sistemlerinin üç alt tipi bulunmaktadır.

Tip II-A sistemleri Csn2 olarak bilinen ek bir geni kapsar. Csn2 proteini aralayıcı entegrasyonunda yer alır ancak müdahale için gerekli değildir. Csn2'nin ara parça entegrasyonundaki spesifik işlevi belirsizliğini koruyor, ancak Csn2'nin, dsDNA uçlarını bağlayan ve onları ekzonükleolitik bozulmadan koruyan, aynı zamanda kırılmaları kapatmak için DNA onarım proteinlerini işe alan bir aksesuar bileşen olduğu varsayılmıştır.

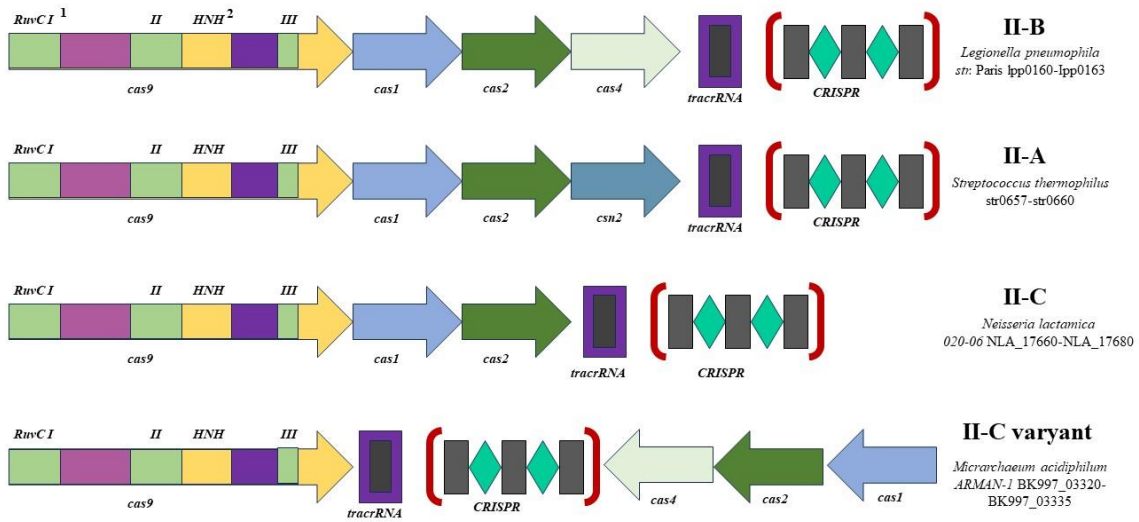
Tip II-B sistemler Csn2 geninden yoksundur ancak Cas4 ailesinden başka bir ek gene sahiptir. Cas4 proteinleri PD-(D/E)xK nükleaz ailesine aittir ve 5'-tek sarmallı DNA eksonükleaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Csn2'ye benzer şekilde Cas4 proteinlerinin CRISPR-Cas sistemlerindeki gerçek rolü bilinmemektedir. Yalnızca Tip II-A sistemiyle ilişkili olarak bulunan Csn2'den farklı olarak Cas4 geni, belirli bir CRISPR-Cas savunma mekanizmasına sıkı sıkıya bağlı değildir ve dolayısıyla ilişkili bağışıklıkta rol oynadığı öne sürülmüştür.

Orijinal sınıflandırmanın geliştirilmesinden bu yana, operonda yalnızca üç gene (Cas1, Cas2 ve Cas9) sahip çok sayıda ek Tip II CRISPR-Cas sistemi tanımlanmış ve üçüncü bir alt tip olan Tip II-C önerilmiştir.

Tip II CRISPR-Cas, CRISPR tekrar-aralayıcı dizisini ve yalnızca dört (ancak genellikle üç) Cas genini içeren minimal CRISPR-Cas sistemi olarak kabul edilir, ancak ek bakteriyel faktörler, özellikle trans-aktif edici crRNA (tracrRNA) ve RNaz III, bu sistemin işleyişine katkıda bulunur. Tüm Tip II CRISPR-Cas modülleri, aralayıcı (spacer) edinimi için gerekli olan Cas1 ve Cas2 gen çiftini içerir. Bu iki gen aynı zamanda Tip I veya Tip III'te en az bir CRISPR-Cas sistemi içeren genomların büyük çoğunluğunda da mevcuttur. Tip I'e benzer şekilde, Tip II CRISPR-Cas sistemleri, hedef olmayan DNA zincirindeki protospacer'ın hemen aşağısında yer alan, iyi tanımlanmış bir kısa protospacer bitişik motifine (PAM) ihtiyaç duyar. PAM dizisi hem aralayıcının elde edilmesi hem de hedefin tanınması ve bölünmesi için önemlidir.

Tip II sistemlerin imzası olan Cas9 geni, istilacı DNA'yı hedeflemek ve parçalamak için tek başına yeterli olan büyük, çok alanlı bir proteindir. Hedef DNA bölünmesi için Cas9'un kolaylıkla tanımlanabilen iki bölünmüş nükleaz alanı, yani HNH ve RuvC benzeri nükleazlar gereklidir.

Dikkate değer bir diğer gözlem ise Tip II-B sistemlerin dar yayılımıdır. Bu sistemler, yaygınlığının düşük olması nedeniyle şu anda istatistiksel analize uygun değildir. CRISPR-Cas Tip II-B sistemi; çoğu patojen veya kommensal olan *Francisella*, *Parasutterella*, *Sutterella*, *Legionella*, *Wolinella* (Proteobacteria) ve *Leptospira* (Spirochaeta) gibi çeşitli bakteri cinslerinin yalnızca bazı temsilcilerinde mevcuttur [54].



Şekil 5. CRISPR-Cas Tip II sistemi [26].

¹RuvC: *Escherichia coli* RuvC proteini, genetik rekombinasyon ve replikasyon sonrası onarım sırasında Holliday bağlantılarını çözer [55].

²HNH: HNH endonükleazları birçok bakteriyofaj ve profajda mevcuttur. Faj genomlarındaki bir HNH endonükleaz geninin konumu, bir terminaz geninin yanındadır ve yüksek oranda korunmuştur; bu, gen dönüşümünü daha da artıran DNA'nın kesilmesiyle homolog rekombinasyonun uyarılmasında olası bir biyolojik rol olduğunu düşündürür [56].

2.5. *Streptococcus thermophilus* için CRISPR-Cas Sistemlerinin Tespiti için Kullanılan Veritabanları

Mikroorganizmaların CRISPR-Cas sistemlerinin *in silico* olarak tespiti yapılmak istendiğinde, devreye çeşitli veritabanları girmektedir. Çeşitli amaçlara hizmet eden bu veritabanlarının, araştırılmak istenen konu veya gene spesifik olarak seçilmesi gerekmektedir.

Bu doğrultuda, CRISPR-Cas sistemlerinin tespiti için en yaygın kullanılan veritabanları, Çizelge 8'de belirtilmiştir. Çizelge 9 ise farklı amaçlara uygun olarak hazırlanmış araçların ve veritabanlarının listesini göstermektedir.

Çizelge 8. CRISPR taramaları için gen temelli veritabanlarının detayları.

Araç	Dil	Avantaj	Dezavantaj	Giriş	Çıkış	Platform	Adres	Kaynak
PatScan	C++	1. Web sunucusu sağlar 2. Çeşitli genomik kalıpları tahmin etmek için kullanılabilir	1. CRISPR'leri diğer tekrar türlerinden ayırt edemiyoruz 2. Karmaşık sonradan işleme gerektirir 3. Büyük sorgu kümesiyle uğraşırken hızlı değil 4. Tekrar sayısı önceden tanımlanmış olmalıdır	DNA / protein sekansları	Tekrar sekansları	Web sunucusu	https://patscan.sec onDarymetabolites.org/	[57]
CRISPRFinder	Perl	1. Hem güvenilir hem de şüpheli CRISPR'ler sağlar 2. Tahmin edilen bazı sonuçlar doğrudan CRISPRdb veri tabanından alınabilir.	1. Tekrarlanan mutasyonları hesaba katmaz 2. Kısa veya dejenere CRISPR'lerin tespitinde zayıf davranır 3. Büyük sorgu kümesiyle uğraşırken hızlı değil	DNA sekansları	Tekrar ve aralayıcı sekansları	Web sunucusu	https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/	[58]

PILER-CR	C++	<ol style="list-style-type: none"> 1. CRISPR'ler için sınıflandırma sağlar 2. Tekrarlardaki silme ve ekleme işlemlerini gerçekleştirebilir 3. Hızlı bir şekilde yürütülür 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Orijinal CRISPR'leri ayırt edecek özellikleri kullanmaz 2. Tandem tekrar dizileri filtrelenemiyor 3. Kullanıcı dostu değil 	DNA sekansları	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tekrar ve aralayıcı sekansları 2. Benzerliğe ve konuma göre kümeleme 	Bağımsız program	http://www.drive5.com/pilercr/	[59]
CRT	Java	<ol style="list-style-type: none"> 1. Hız tekrar sayısından bağımsızdır 2. Nispeten yüksek güvenilirlik 3. Basit veri yapısını kullanır 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Orijinal CRISPR'leri ayırt edecek özellikleri kullanmaz 2. Kısa veya dejenere CRISPR'lerin tespitinde zayıf davranır 3. Kullanıcı dostu değil 	DNA sekansları	Tekrar ve aralayıcı sekansları	Bağımsız program	http://www.room220.com/crt/	[60]
CRISPRDetect	Perl	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dizi yönü ve varyasyonları gibi ek bilgiler sağlar 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Muhtemelen daha büyük integral CRISPR'leri küçük dizilere yanlış böldü 	DNA sekansları veya tür ismi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tekrar ve aralayıcı sekansları 	Web sunucusu ve bağımsız program	http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRDetect/	[61]

2. Tahmin edilen bazı sonuçlar doğrudan CRISPRBank veri tabanından alınabilir.	2. Büyük sorgu kümesiyle uğraşırken hızlı değil	2. Mutasyonlar
3. Kısa ve dejenere dizilere duyarlı		3. Potansiyel Cas genleri

Çizelge 8’de CRISPR taramaları için gen temelli veritabanlarının detayları belirtilmiştir. Bu amaçla PetScan, CRISPRFinder, PILER-CR, CRT ve CRISPRDetect veritabanları kullanılmaktadır.

Çizelge 9. Farklı amaçlara uygun olarak hazırlanmış araçların ve veritabanlarının listesi [62].

Araç / Veritabanı	Amaç	Basit araç	Platform	Adres	Kaynak
MinCED	Metagenomdan CRISPR çeşitliliğini keşfeder.	CRT	Bağımsız program	https://github.com/ctSkennerton/minced	[63]
MetaCRAST	Metagenomdan CRISPR çeşitliliğini keşfeder.	CRT, PILER-CR ve CRISPRFinder	Bağımsız program	https://github.com/molleraj/MetaCRAST	[64]

Crass	Metagenomdan CRISPR çeşitliliğini keşfeder.	CRT	Bağımsız program	https://ctskennerton.github.io/crass/	[65]
MetaCRT	Metagenomdan CRISPR çeşitliliğini keşfeder.	CRT	Bağımsız program	https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPR/	[66]
CRISPRcompar	Farklı türlere ait CRISPR'leri karşılaştırır.	CRISPRFinder	Web sunucusu	https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/CRISPRcompar/	[67]
CRF	Geçersiz CRISPR'leri filtreler.	CRT	Bağımsız program ve web sunucusu	http://bioinfolab.miamioh.edu/crf/home.php	[68]
CRISPRstrand	CRISPR yönelimini tahmin eder.	CRT ve CRISPRFinder	Web sunucusu	http://rna.informatik.unifreiburg.de/CRISPRmap	[69]
CRISPRDirection	CRISPR yönelimini tahmin eder.	CRISPRDetect	Bağımsız program	http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRDirection/	[70]
CRISPRleader	Lideri ve CRISPR yönelimini tahmin eder.	CRT	Bağımsız program	http://www.bioinf.uni-freiburg.de/Software/CRISPRleader/	[71]
CRISPRdisco	CRISPR/Cas sistemlerini sınıflandırır.	MinCED (CRISPR tanımlayıcı) HMMER (Cas tespit edici)	Bağımsız program	https://github.com/CRISPRlab/CRISPRdisco	[72]

CRISPRCasFinder	CRISPR/Cas sistemlerini sınıflandırır.	CRISPRFinder (CRISPR tanımlayıcı) MacSyFinder (Cas tespit edici)	Bağımsız program ve web sunucusu	https://crisprcas.i2bc.parissaclay.fr	[73]
CRISPRmap	CRISPR/Cas sistemlerini sınıflandırır.	CRT, CRISPRFinder ve CRISPRstrand (CRISPR tanımlayıcı) HMMER (Cas tespit edici)	Web sunucusu	http://rna.informatik.unifreiburg.de/CRISPRmap	[74]
CRISPRone	Tahmin edilen CRISPR'leri, Cas genlerini ve yanlış CRISPR'leri toplar.	MetaCRT (CRISPR tanımlayıcı) HMMER (Cas tespit edici)	Web sunucusu (veritabanı)	https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/	[75]
CRISPRCasdb	Tahmin edilen CRISPR'leri ve Cas genlerini toplar.	CRISPRCasFinder (CRISPR tanımlayıcı) BLAST (Cas tespit edici)	Web sunucusu (veritabanı)	https://crisprcas.i2bc.parissaclay.fr/	[76]

Çizelge 9'a göre MinCED, MetaCRASST, Crass, MetaCRT, CRISPRCompar, CRF, CRISPRstrand, CRISPRDirection, CRISPRleader, CRISPRdisco, CRISPRCasFinder ve CRISPRmap veritabanlarının çeşitli amaçlarla kullanıldığı görülmektedir. Bu tabloya göre tez çalışması kapsamında, CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/>) programı oldukça önemli bir yer edinmektedir. Bu veritabanı, kullanıcı tarafından gönderilen dizi verilerindeki CRISPR'lerin ve Cas genlerinin kolayca tespit edilmesini sağlar. Bu, CRISPRFinder programının geliştirilmiş özgüllük ve CRISPR oryantasyonuna ilişkin göstergeler içeren bir güncellemesidir. Bu veritabanı; Cas genlerini, CRISPR-Cas tipini ve alt tipini tanımlamak için kullanılır [77].

2.5.1. ATCC Genome Portal

ATCC Genome Portal, Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu Merkezi (ATCC) tarafından sağlanan bir veritabanıdır. Bu veritabanı, birçok organizmanın tam genom dizilimini içermektedir ve araştırmacılara, mikroorganizmaların genetik bilgilerine kolayca erişim imkanı sunmaktadır. Veritabanı, birçok farklı bilimsel kaynaktan elde edilen verileri içermektedir. Bu kaynaklara örnek olarak, akademik, endüstriyel ve hükümet laboratuvarlarındaki araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen projeler, uluslararası konsorsiyumlar ve genetik veri paylaşım ağları sayılabilir. Bu veritabanı, genom projelerinden elde edilen verilerin bir araya getirilmesi ve depolanması işlevini görmektedir.

ATCC Genome Portal'daki veriler, organizmaların DNA dizilerinin yanı sıra, genomlarının özelliklerine ilişkin ayrıntıları da içermektedir. Örneğin, genlerin fonksiyonları, genetik varyasyonlar ve evrimsel ilişkiler gibi bilgilere ulaşmak mümkündür. Veritabanı, araştırmacıların bu bilgilere erişerek, genetik araştırmalarında kullanabilecekleri yeni ipuçları ve bilgiler edinmelerini sağlar [78].

ATCC Genome Portal, kullanıcıların genom verilerini araştırmalarında kullanmalarına olanak sağlayan çeşitli araçlar ve arayüzler sunmaktadır. Bu araçlar arasında genetik varyasyon analizi, gen ekspresyon analizi ve evrimsel filogenetik analizler gibi farklı

analizler yapabilme imkanı bulunur. Ayrıca, kullanıcılar genom verilerini indirebilir, görselleştirebilir ve çeşitli analizler yapabilirler [79].

ATCC Genome Portal, genetik araştırmacılar için çok değerli bir kaynak olan tam genom dizilim verilerini bir araya getirerek, genetik araştırmaların gelişmesine katkıda bulunur. Ayrıca, bu veritabanı, genom verilerinin kolayca erişilebilir ve paylaşılabilir olmasını sağlayarak, bilim insanlarının genetik araştırma ve keşiflerinde daha fazla işbirliği yapabilmelerine olanak tanır.

2.5.2. NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası

NCBI Gen Bankası (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) , ABD Ulusal Enstitüleri kampüsünde bulunan Ulusal Tıp Kütüphanesi'nin (NLM) bir bölümü olan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından oluşturulan ve yayımlanan, nükleotid dizileri ve destekleyici bibliyografik ve biyolojik açıklamalara ilişkin kapsamlı bir halka açık veritabanıdır [80].

GenBank verileri, Çizelge 10'da gösterilen çeşitli bölümlerde toplanmaktadır.

Çizelge 10. NCBI GenBank bölümleri [80].

Bölüm	Açıklama	Baz çifti
WGS	Tam genom shotgun verileri	17 511 809 676 629
TSA	Transkriptom shotgun verileri	511 680 950 707
PLN	Bitkiler	484 803 006 831
INV	Omurgasızlar	269 338 221 858
VRL	Virüsler	187 366 647 663
BCT	Bakteriler	166 217 792 419
VRL	Diğer omurgalılar	99 921 122 967
ROD	Kemirgenler	66 092 410 483
TLS	Hedeflenen lokus çalışmaları	43 852 280 645
EST	İfade edilen sekans etiketleri	43 330 114 068
MAM	Diğer memeliler	41 720 029 494
PAT	Patent sekansları	30 938 105 095
HTG	Yüksek verimli genomik	27 801 878 633
GSS	Genom araştırma dizileri	26 380 049 011
PRI	Primatlar	15 619 743 253
ENV	Çevresel örnekler	8 516 518 905
SYN	Sentetik	8 030 787 249
PHG	Fajlar	1 158 493 277
HTC	Yüksek verimli cDNA	740 853 492
STS	Sekans etiketli siteler	640 923 137
UNA	Açıklamasız	4 436 341

Çizelge 10'da belirtilen NCBI GenBank bölümlerinden WGS (tam genom shotgun verileri) ve BCT (bakteriler) tez çalışmasında oldukça büyük bir öneme sahiptir.

2.5.3. CRISPRCasFinder

CRISPRFinder, CRISPR dizilerinin yönelimine ilişkin iki gösterge sağlar. İlk olarak, oryantasyon, CRISPRDirection tarafından, önceki yönelimli homolog sistemlerin varlığını gerektirmeyen ve diziye eşleşen bir tekrarla birlikte kullanılan küratörlük edilmiş bir veri seti için tahmin edilmiştir. Yüksek %AT'ye sahip bölgelerin 5' bölgesi çoğunlukla yönlü bir diziye aittir, bu nedenle diziye komşu olan iki tarafta bulunan yüksek %AT'li bölge, ikinci bir yönelim göstergesi olarak kullanılır. Ayrıca, bağımsız çalışan bir programda kullanıcıların analiz edilecek yakın bölge uzunluğunu belirlemelerine olanak tanıyan bir seçenek sunulur [73].

Programın çalışma prensibi şu şekildedir [73]:

- CRISPRCasFinder web sunucusu, bağımsız ön ve arka uçlara dayanmaktadır. Ön uç, .NET Core (dotnet core) geliştirme platformu ve C# (C sharp) programlama dilini kullanarak kullanıcı dostu bir web uygulaması olarak uygulanmıştır.
- Web uygulamasının tasarımında Bootstrap çerçevesi kullanılmıştır.
- CRISPRCasFinder ayrıca Linux (Windows Subsystem for Linux dahil) ve MacOS sistemlerle uyumlu olan bağımsız bir programa dönüştürülebilmektedir.

2.5.4. NCBI Blast

Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (The Basic Local Alignment Search Tool -BLAST), diziler arasındaki yerel benzerliğin bölgelerini bulan veritabanıdır. Program, nükleotid veya protein dizilerini dizi veritabanlarıyla karşılaştırır ve eşleşmelerin istatistiksel önemini hesaplar. BLAST, diziler arasındaki işlevsel ve evrimsel ilişkileri ortaya çıkarmanın yanı sıra gen ailesi üyelerinin tanımlanmasına yardımcı olmak için de kullanılabilir [81].

Bir nükleik veya amino asit dizisinin oluşturduğu riski değerlendirmenin en yaygın yolu, NCBI veritabanının nükleik asit ve protein veritabanlarındaki hangi dizilerin, söz konusu diziyle en yakından ilişkili olduğunu belirlemek için BLAST algoritma paketini kullanmaktır. BLAST, yerel hizalamalara dayalı olarak bir dizi veritabanına karşı bir sorgu dizisi için en iyi eşleşme kümesini tahmin eden buluşsal bir algoritmadır. Algoritmanın sezgisel doğası, kesin sonuçlarının kararsız olabileceği ve özellikle çok

sayıda eşleşmenin olduğu durumlarda iyi eşleşmeleri atlayabileceği anlamına gelse de, çok çeşitli biyoinformatik kullanım durumları için oldukça etkili olduğu iyi bilinmektedir. Bu nedenle sekans riskini değerlendirmeye yönelik tipik bir yöntem, sekans için BLAST'ı NCBI'nin yedeksiz protein sekansı (nr) ve nükleotit (nr/nt) veritabanları gibi kapsamlı veritabanlarına karşı çalıştırmaktır. BLAST, sekansın herhangi bir kontrol edilmeyen sekanstan ziyade kontrollü bir patojen veya toksin ile daha yakından ilişkili olduğunun bulunması halinde, bir uzman sekansın bir istisna kategorisine girdiğine karar vermedikçe sekans kontrollü olarak kabul edilir. Bu yöntemin alternatifleri arasında FAST-NA Scanner²⁴, ThreatSEQ²⁵, SeqScreen²⁶ ve SecureDNA²⁷ dahil olmak üzere tehlikeli ve/veya kontrollü dizilerin tanımlanması için özel olarak tasarlanmış yakın zamanda geliştirilen bir dizi başka araç yer alır. Bununla birlikte, kapsamlı sekans veritabanlarına karşı BLAST yoluyla sınıflandırma, bir sekansın kontrol edilip edilmediğinin belirlenmesinde fiili standart olmaya devam etmektedir [82].

2.5.5. Primer3web

Oligonükleotid primerleri, DNA sekanslama ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi çeşitli moleküler biyoloji tekniklerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir primer, DNA replikasyonu için başlangıç noktası görevi gördüğünden, oligonükleotidin şablon iplikçik üzerindeki hedef diziyeye spesifik bağlanması, başarılı bir deney için esastır. Bir primerin bağlanma özgülüğü, erime sıcaklığı (T_m), GC içeriği ve kendi kendini tamamlayıcılık gibi birçok özelliği tarafından belirlenir. Başlangıç primerlerinin tasarlanması genellikle bilgisayar programlarının yardımıyla yapılır. Günümüzde bu programların en yaygını Primer3 web arayüzüdür. Primer3 programı, çevrimiçi ve ücretsiz olarak kullanılabilmesi nedeniyle popülerdir [83].

Primer3, bir komut satırı C programından ve Perl'de yazılmış bir HTML web arayüzünden oluşur. Web arayüzü tüm olası seçenekleri gösteren büyük bir formdur. Bu onu güçlü kılar ama aynı zamanda ara sıra kullananlar için kafa karıştırıcıdır; Derinlemesine bilgi olmadan, belirli bir tasarım görevi için hangi ayarların önemli olduğunu söylemek zordur. Pozisyona özgü klonlama için PCR primerlerinin tasarlanması gibi bazı görevlerin mevcut web arayüzüyle gerçekleştirilmesi kolay değildir çünkü bu, programın farklı ayarlar altında birden fazla çalıştırılmasını

gerektirmektedir. Mevcut web arayüzündeki bu sorunlar nedeniyle ve liberal lisansla kolaylaştırılan bazı akademik ve ticari taraflar, Primer3 için kendi özel ihtiyaçlarına ve hedef kitlelerine göre uyarlanmış kendi komut satırlarını ve/veya web arayüzlerini oluşturmuşlardır. Bu web arayüzlerine EMBOSS', EPRIMER3 ve PCR Suite örnek olarak verilebilir [83].

2.6. qPCR ile CRISPR-Cas Bölgelerinin Tespiti

PCR, moleküler biyolojide devrim yaratarak, tek bir kopya kadar düşük frekanslarda oluşan nükleik asitlerin rutin olarak tespit edilmesini mümkün kılmıştır. Günümüzde PCR, hemen hemen her doğal olarak oluşan ve manipüle edilmiş biyolojik sistemdeki genlerin tanımlanması da dahil olmak üzere çok sayıda uygulamanın temelini oluşturmaktadır [84].

DNA ve RNA'nın tespit edilmesi için PCR ve FISH gibi kantitatif teknikler kullanılmıştır. Ancak amplifiye ürünlerin kesin miktarını ölçmek ve geleneksel PCR tekniklerinde uç nokta analizi sonuçlarıyla karşılaştırmak zordur. Teorik olarak herhangi bir döngüde başlangıç hedef sekansının miktarı ile PCR ürününün miktarı arasında niceliksel bir ilişki vardır. Gerçek zamanlı kantitatif PCR'nin (RQ-PCR) geliştirilmesi, geleneksel kantitatif PCR ile ilişkili değişkenliği ortadan kaldırmış, böylece PCR ürünlerinin rutin ve güvenilir bir şekilde ölçülmesine olanak sağlamıştır. Termal döngü işlemi sırasında floresansın tespiti iCycler(Bio-Rad), GeneAmp 5700 veya 7700(ABI-PRISM) ve Light-Cycler(Roche) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Gerçek zamanlı kantitasyonda kullanılmak üzere iki florojenik prob mevcuttur. Florojenik 5'-nükleaz tahlili (Taqman yöntemi), sekansa özgü bir PCR ürününün tespitini mümkün kılmak için bir florojenik prob kullanır. Florojenik prob, 5' ucunda raportör boya ve 3' ucunda söndürücü ile birleştirilir. İkinci yöntem, oldukça spesifik bir çift sarmallı DNA bağlama boyası olan SYBR Green I boyasını kullanır. Gerçek zamanlı PCR, DNA ve RNA'nın çok daha kesin ve tekrarlanabilir kesin niceliksel ölçümünü mümkün kılmaktadır çünkü uç nokta yerine PCR'nin üstel aşaması sırasında elde edilen CT değerlerine dayanmaktadır [85].

CRISPR-Cas sistemleri, hedef tanıma için bir veya birden fazla RNA kılavuzundan, bakteri ve arkelerde yabancı virüslere karşı nükleik asitlerini parçalayarak savunma yapmak için gelişen bir Cas enziminden oluşur. CRISPR-Cas sistemi sadece genom ve RNA düzenlemesi için değil, son zamanlarda nükleik asit tespiti için de kullanılmaya başlanmıştır. CRISPR-Cas sistemleri iki sınıfa (Sınıf 1 ve 2) gruplandırılmıştır ve nükleik asit tespiti için en yaygın kullanılan araç kutusu, Şekil 2'de ayrıntılı olarak belirtildiği gibi sınıf 2 sistemine ait Cas9, Cas12, Cas13 ve Cas14'ü içerir [86].

Genellikle, hedef amplifikasyonunun yokluğunda CRISPR-Cas tespitinin sınırı pikomolar seviyededir ve bu da yanlış negatif hatalara neden olur. Hedeflenen amplifikasyon, düşük örnek konsantrasyonları nedeniyle hatalı negatiflerin ortaya çıkmasını önleyebilir. PCR genellikle mevcut en hassas ve spesifik test olarak kabul edilir; klinik, gıda ve çevre dahil olmak üzere çeşitli alanlarda mikrobiyal tespite uygulanmıştır [87].

Doğru, hızlı ve uygun maliyetli bir nükleik asit tespit yöntemi, yaygın olarak bulaşıcı patojen teşhisinde kullanılır ve önemli bir rol oynar. Bu amaçla en çok kullanılan yöntem olan PCR bazlı teşhis, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Ancak PCR bazlı teşhis özel alet ve mesleki beceri gerektirir, bu da yaygın uygulamasını sınırlar. Nükleik asit tespitinin yüksek karmaşıklığı ve maliyeti, yöntemin hızlı enfeksiyon teşhisinde uygulanmasını engellemektedir. Nükleik asitlerin izotermal amplifikasyonu, PCR ile karşılaştırıldığında hızlı ve taşınabilir tespit için umut verici bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır, ancak duyarlılığının ve özgüllüğünün geliştirilmesi gerekmektedir [86].

Bu bilgiler doğrultusunda, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*'un CRISPR-Cas Tip II sisteminin tespiti ve tanımlaması amacıyla qPCR metodu ve Primer3web, tespit edilmesi amaçlanan genlerin primer tasarımında kullanılmıştır.

Bu çalışmada ilk olarak, referans olarak seçilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin *in silico* olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. *In silico* çalışmaların sonucu olarak belirlenen genlerine

spesifik primerlerin tasarımı yapılmıştır. Ardından FoodOmics Laboratuvarı Kùltür Koleksiyonu'nda bulunan *S. thermophilus* suşlarının qPCR uygulaması ile CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin tespiti amaçlanmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

S. thermophilus ATCC 19258 suşu, orijinal paketi içinde, liyofilize halde (0136P - Microbiologics) ticari olarak temin edilmiştir.

S. thermophilus HUF19ZN2M1012 ve *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039 suşları, Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan elde edilmiştir. *S. thermophilus* HUF22BDT2034 suşu ise, ticari olarak satılan karışık yoğurt kültüründen (Probiyotik Yoğurt Starter Kültürü) izole edilmiş, tanımlanmış ve FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Besiyerleri

S. thermophilus izolatlarının canlandırılması, makroskobik ve mikroskobik incelemelerinin gerçekleştirilmesi, stok kültürlerinin hazırlanması ve DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi amacıyla Nutrient Broth (1216.00 - Condalab) , M17 Broth (1.15029 - Merck) ve M17 Agar (M929 - HIMEDIA) kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasallar

Mikroorganizmaların stok kültürlerinin hazırlanmasında, %50 (h/h) oranında gliserol (104094.2500 -Merck) kullanılmıştır.

Aseptik koşulların sağlanması ve Gram reaksiyonlarının izlenmesinde %99,9 saflıkta etanol (64-17-5 - ISOLAB) seyreltilerek kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların biyokimyasal analizlerinden katalaz testinin gerçekleştirilmesi amacıyla %34,5-36,5 (a/h)'luk H₂O₂ (7722-84-1 - Sigma-Aldrich) çözeltisi kullanılmıştır.

Yine biyokimyasal analizlerden glukozdan gaz oluşturma testinin gerçekleştirildiği besiyerinin hazırlanmasında %0,04'lük bromkresol moru kullanılmıştır.

Mikroorganizmalardan genomik DNA izolasyonu kapsamında, GeneMATRIX Bacterial&Yeast Genomic DNA Purification Kit (E3580-01 - EURx) içerisinde temin edilen kimyasallar kullanılmıştır. Bu aşamada, kit içerisinde temin edilen kimyasallardan Lyse BG tamponuna ek olarak lizozim enzimi (Vivantis) kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti amacıyla uygulanacak qPCR analizinde FastStart Essential DNA Green Master (06402712001 - Roche) kiti kullanılmıştır.

3.1.4. Ekipmanlar

Tez alışması kapsamında kullanılan ekipmanlara ait ilgili marka ve modeller aşağıda verilmiş:

- Hassas terazi (Yıldırım KD-TBC 300 g (0,001 g))
- Kuru otoklav (Nüve Stream Art S class EN 13060 OT 23S)
- Vorteks (Biosan Vortex V-1 Plus)
- Etüv (Nüve – EN400)
- Buzdolabı (+4° ve -20°C Arçelik)
- Santrifüj (Nüve NF 800)
- Mikrosantrifüj (Neuaton i Fuge BL08VT)
- Biyogüvenlik kabini (Esco Class II BSC Air Stream)
- Isıtıcı blok (Major Science MD-01N)
- RT-PCR cihazı (Roche Lightcycler 96)

3.1.5. Sarf Malzemeleri

Mikroorganizmaların canlandırılmalarında 20 mL'lik cam deney tüpleri sıvı besiyerlerinin hazırlanmasında, 90 mm'lik steril Petri kutuları (081.02.161 - ISOLAB)

agarlı besiyerlerinin hazırlanmasında ve mikrobiyolojik analizlerde kullanılmıştır. Stok kültürlerin hazırlanmasında 2 mL'lik santrifüj tüpleri (Eppendorf) kullanılmıştır.

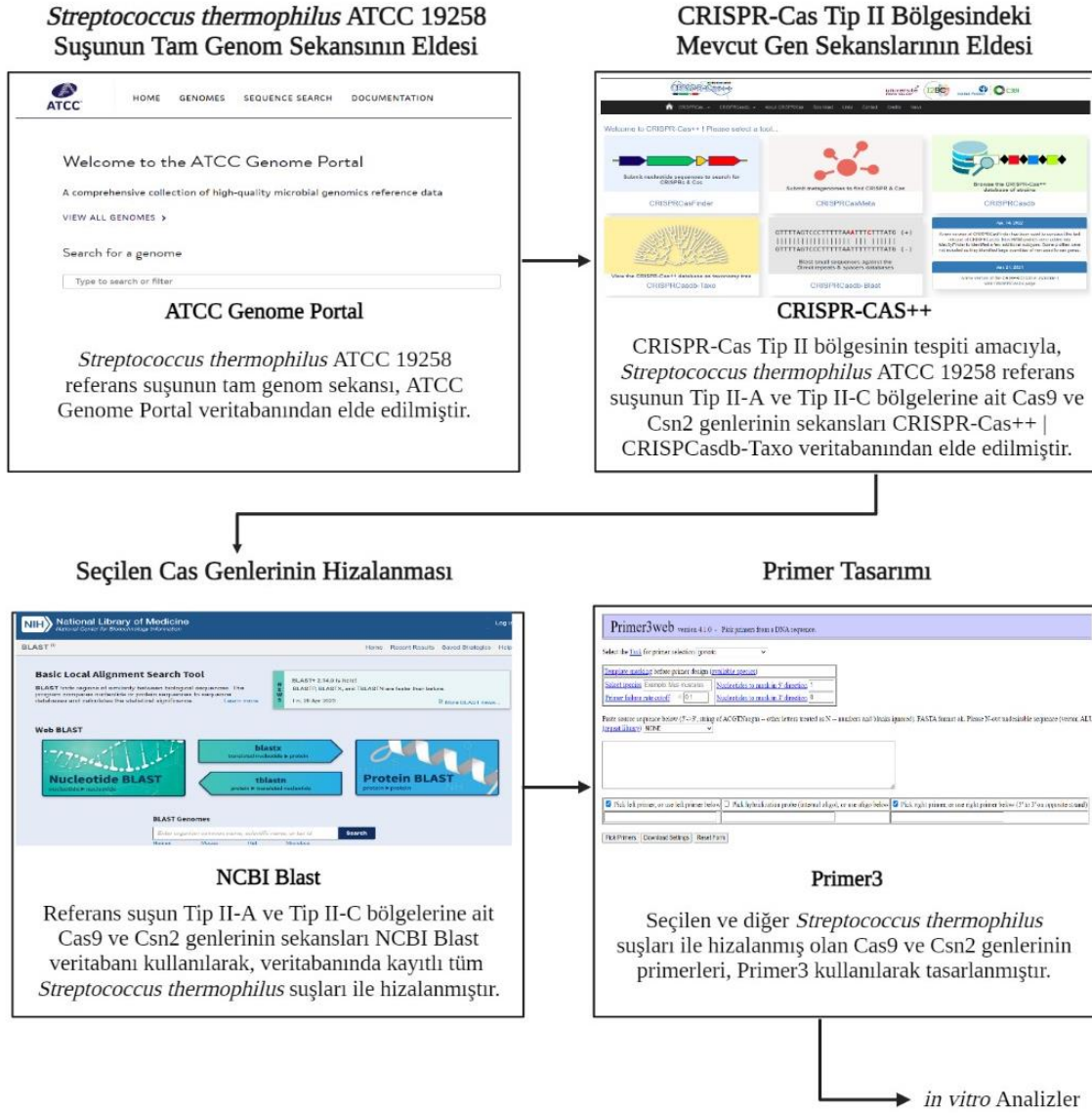
Mikroorganizmaların mikroskopik görüntülerinin elde edilmesi amacıyla preparat hazırlığında 25,4 x 76,2 mm'lik tek kullanımlık lam (7102 - Pearl) kullanılmıştır.

qPCR uygulamasında, PCR karışımlarının hazırlanmasında 0,1 mL 8'li qPCR strip-tüpleri ve optik kapakları (Gunster Biotech) kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. *in silico* Analizler

Bu çalışmada referans mikroorganizma olarak kullanılan *S. thermophilus* ATCC 19258 suşu temel alınarak gerçekleştirilen *in silico* analizlerin tamamı Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun CRISPR-Cas Tip II bölgesinin *in silico* belirlenmesi [88].

3.2.1.1. *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas Sistem Seçimi için Veri toplama

CRISPR-Cas sistem seçiminin belirlenmesi uygulaması, öncelikle ham veya işlenmiş verilere erişebilmeyi gerektirir.

ATCC Genome Portal

Doğrulanmış veri toplama için açık bir veritabanı olan ATCC: The Global Bioresource Center (<https://genomes.atcc.org/>) gen bankasından bu çalışmada referans olarak seçilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun tam genom sekansı elde edilmiştir [89, 90]. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlenir:

1. ATCC Genome Portal veritabanının anasayfasında arama çubuğuna, tam genom sekansı elde edilmek istenen ATCC 19258 yazılarak veritabanında arama başlatılır.
2. *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun “FASTA” formatında 2019 yılına ait 2,1 MB boyutunda olan tam genom sekans verisi indirilir.
3. Ekranda görülen “Genomic Data” kısmından, suşun tam genom sekans analizi hakkında ayrıntılı bilgilere ulaşılır.

CRISPRCasFinder

Ayrıca CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) veritabanı kullanılarak referans olarak seçilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna ait CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C sistemlerinde mevcut olan Cas, aralayıcı ve tekrar genlerinin sekansları tanımlanmıştır [77]. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Referans suşa ait Cas, aralayıcı ve tekrar genleri ve bu genlerin kanıt düzeylerinin (evidence level) tespiti amacıyla CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) kullanılmıştır. Referans suşun sahip olduğu CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin sekans verileri CRISPRCasdb-Taxo (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/TaxoTree>) ile tespit edilmiştir.
2. *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna ait Cas, aralayıcı ve tekrar genlerinin tespiti ve kanıt düzeylerinin tespiti gerçekleştirilmiştir.

3. CRISPRCasFinder veritabanındaki kanıt düzeyinde derecelendirme sistemi, tekrar sayısı, tekrar koruması ve aralayıcı ikili kimliğine dayanmaktadır. Kanıt düzeyi 3 ve 4 oldukça umut verici adayları; kanıt düzeyi 2 varsayılan adayları ve kanıt düzeyi 1 olası olmayan sistemleri işaretler.
4. Bu amaçla veritabanının arama butonunun altında bulunan “input sequence” kısmında bulunan “choose file” butonuna basılır. Açılan pencerede, ATCC Genome Portal aracılığıyla FASTA formatında elde edilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun tam genom sekans verisi buraya eklenerek, sayfanın sol alt kısmında bulunan “Run CRISPRCasFinder” butonuna basılır.
5. CRISPRCasFinder ile tam genom sekansı taranan *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna ait Cas, aralayıcı ve tekrar genleri ile birlikte; bu genlere ait kanıt düzeylerini (evidence level) göstermektedir.
6. Burada, kanıt düzeyi 3 ve 4 olan veriler Kabul görmekle birlikte; kanıt düzeyi 1 ve 2 olan verilerin kesinliği hakkında yorum yapılamadığından dolayı geçerli bir sonuç olarak kabul edilmemektedir.
7. Burada kanıt düzeyi 3 ve 4 olan veriler seçilip tablonun “details” kısmına tıklanıldığında, bu bölgelerdeki aralayıcı ve tekrar genlerinin sekans verileri elde edilebilmektedir.

CRISPRCasdb-Taxo

Bundan sonra CRISPRCasdb-Taxo (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/MainDb/TaxoTree>) veritabanı kullanılarak *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna ait CRISPR-Cas Tip II-A sisteminde mevcut olan Cas9 ve Csn2 genlerinin ve Tip II-C bölgesindeki Cas9 geninin sekansları elde edilmiştir [77]. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. CRISPRCasdb-Taxo veritabanında yapılan aramanın sonucu gösterilmiştir.
2. Burada ekranın solunda yer alan “Search” kısmına, referans suşun kodu yazılarak arama başlatılır. Ekranın sağ kısmı sonuç ekranını göstermektedir. Bu kısımda, suşun sahip olduğu CRISPR lokusları ve gen sekanslarına ulaşılabilmektedir.
3. *S. thermophilus* ATCC 19258 suşu için, suşun sahip olduğu CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerine ait genlerin sekanslarına, “CRISPR Id/Cas Type” başlığı altındaki uzantılara tıklanılarak ulaşılmıştır.

4. “CRISPR Id/Cas Type” başlığı altındaki “Cas-TypeII-A” uzantısına tıklanıldığında ulaşılan sonuç ekranını göstermektedir. Bu ekrandan, CRISPR-Cas Tip II-A bölgesinde belirlenmesi amaçlanan olan Cas9 ve Csn2 genlerinin sekansları elde edilmiştir.
5. “CRISPR Id/Cas Type” başlığı altındaki “Cas-TypeII-C” uzantısına tıklanıldığında ulaşılan sonuç ekranını göstermektedir. Bu ekrandan, CRISPR-Cas Tip II-C bölgesinde belirlenmesi yapılacak olan Cas9 geninin sekansı elde edilmiştir.
6. Bu aşamadan sonra, elde edilen gen sekanslarının NCBI Blast veritabanında mevcut olan diğer *S. thermophilus* suşları ile hizalanması gerçekleştirilmiştir.

NCBI BLAST

CRISPR-Cas Tip II-A sisteminde mevcut olan Cas9 ve Csn2 genlerinin ve Tip II-C bölgesindeki Cas9 geninin sekansları, NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak, NCBI veritabanında mevcut olan diğer *S. thermophilus* suşlarına ait sekanslar ile hizalanmıştır [81, 91]. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genleri ile Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin hizalanması amacıyla, NCBI BLAST anasayfasında bulunan “nucleotide BLAST” veritabanı kullanılır.
2. Açılan sayfada “Enter Query Sequence” kısmına, CRISPRCasFinder veritabanından elde edilen gen sekanslarının son 400 baz çifti yapıştırılır.
3. Sayfanın “Choose Search Set” kısmında bulunan “Organism” kısmına, sekansları hizalanacak olan mikroorganizma olan “*S. thermophilus*” yazılarak “BLAST” butonuna basılır ve arama başlatılır.
4. Açılan sayfa, arama kutusuna yazılan gen sekansının, NCBI veritabanına kayıtlı *S. thermophilus* suşlarına ait sekanslarının hizalanması sonucu benzerlik düzeylerini göstermektedir.

Genlerin veritabanındaki *S. thermophilus* suşları ile hizalanması sonucu, erişim sağlanan benzerlik oranları ve hizalama puanları değerlendirilmiştir. BLAST ile gen dizilimlerinin benzerlik oranlarının >%70 olması beklenmektedir [92].

BLAST ile gen dizilimlerinin hizalanması sonucu hizalama puanları aşağıda belirtilen kriterler doğrultusunda değerlendirilir [93]:

- 200 baz çifti boyutundaki karşılaştırmalar için hizalama puanı en az 28 olmalıdır.
- 800 baz çifti boyutundaki karşılaştırmalardan elde edilen optimal hizalama puanları en az 31 olmalıdır.
- 1200 baz çifti boyutundaki karşılaştırmalardan elde edilen optimal hizalama puanları en az 34 olmalıdır.

Primer3

Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) programı kullanılarak, sekansları elde edilen Cas9 ve Csn2 genlerinin qPCR primerleri dizayn edilmiştir [94]. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. Primer3 veritabanının anasayfasında, veri girişi yapılacak olan kutucuğa, Cas9 ve Csn2 genlerinin sekanslarının son 400 baz dizilimi yazılır.
2. “Pick Primers” butonuna basılarak arama başlatılır.
3. Sonuç ekranında, primerlerin %GC değerleri ve bir sonraki aşamada uygulanacak olan qPCR analizinde maruz kalacakları bağlanma sıcakları göz önünde bulundurularak analize en uygun primerler seçilir.

Uygun Primerlerin Seçimi

qPCR uygulamasında kullanılacak olan primerlerin seçimi aşağıdaki kriterler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir [95].

1. Konum

PCR primerlerinin konumu bazen deneyin amacına göre belirlenir. Deneyin amacı yalnızca dizinin varlığını veya yokluğunu belirlemekse, amplifikasyon iyi çalıştığı sürece

konumun hiçbir önemi yoktur. Ancak deney, bir genin belirli bir aleline yönelik bir tahlilin parçasıysa, o zaman amplikonun ilgilenilen bölgeyi içermesi gerekli olacaktır.

2. Amplikon Uzunluğu

Genel olarak amplikonların uzunluğu 100 ile 1000 bp arasındadır. Alt sınır, amplikonun agaroz jel üzerinde görselleştirilebilmesine yönelik tipik ihtiyaçtan kaynaklanmaktadır. Üst sınır, büyük dizilerin amplifikasyonundaki zorlukların sonucudur. Minimum amplikon boyutu gerektirmeyen bir test kullanılırsa teorik olarak minimum amplikon boyutu yoktur.

3. Guanin/Sitozin İçeriği (%GC)

Primerdeki G (guanin) veya C (sitozin) olan bazların oranı olarak tanımlanan iyi PCR primerleri genellikle %40 ile %60 arasında bir G/C içeriğine sahip olacak şekilde seçilir. Ancak bunun iyi tanımlanmış bir nedeni yoktur, yalnızca tercih edilir olduğu düşünülmüştür [96].

4. Erime Sıcaklığı (T_m)

İdeal primerlerin erime sıcaklığı (T_m) değerlerinin 45°C ila 65°C arasında olması primerler arasındaki maksimum fark 5°C olması önerilmektedir [96, 97].

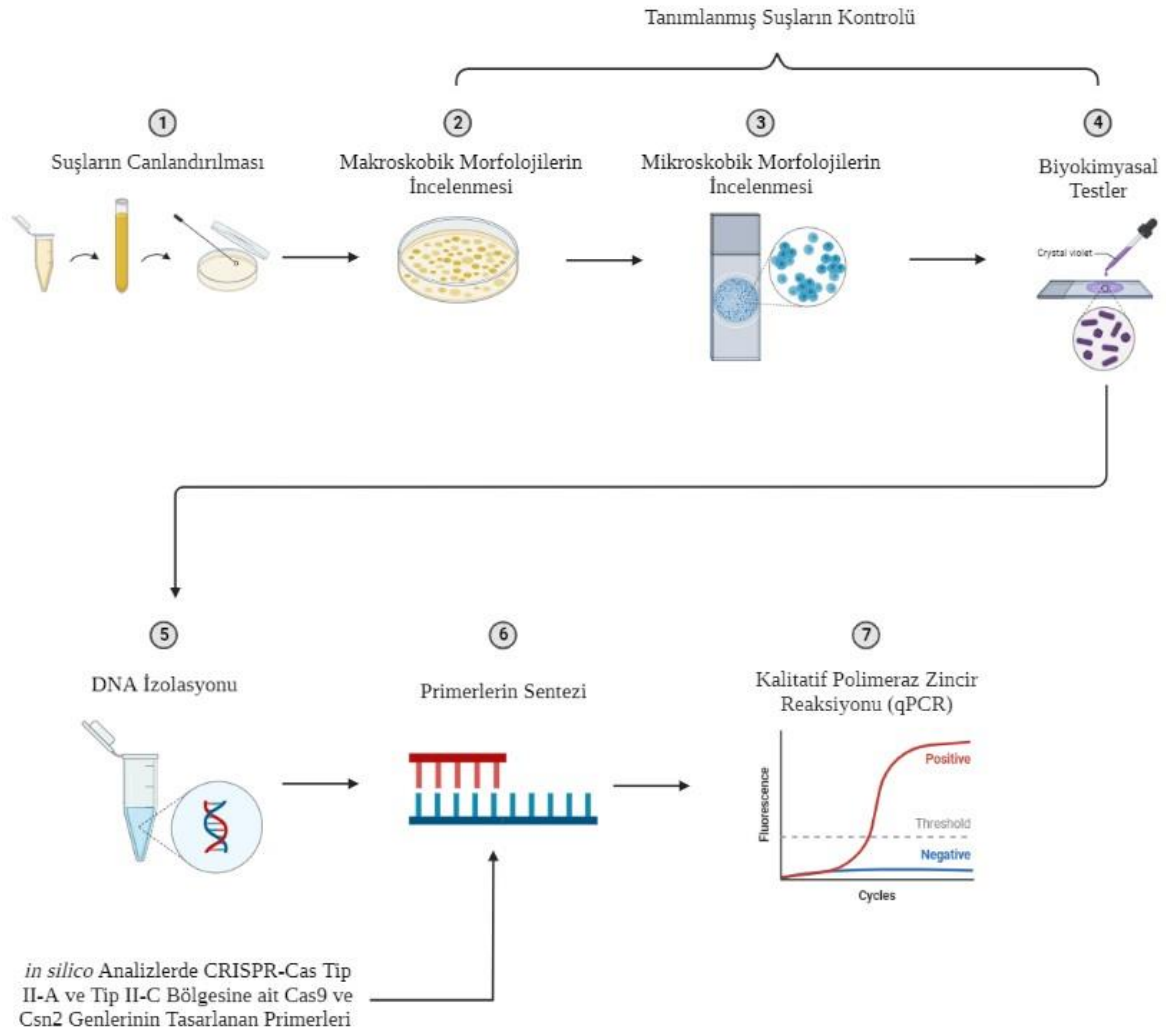
5. Baz Dizisi Uzunluğu

İdeal primerler; tekrarlanan dizilerden oluşmayan, sentetik olarak kolayca hazırlanabilen ve 18-26 bazdan oluşmaktadır [96]

Bu bilgiler doğrultusunda Primer3 ile tasarlanan primerlerden, yukarıda belirtilen kriterlere uygun veya en yakın özellikteki primerler seçilmiş ve qPCR uygulamasında kullanılmak üzere sentezlenerek ticari olarak temin edilmiştir.

3.2.2. *in vitro* Analizler

Bu çalışmada CRISPR-Cas Tip II sisteminin tespiti ve tanımlanmasının sağlanması amaçlanan Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *S. thermophilus* suşları temel alınarak gerçekleştirilen *in vitro* analizler Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti amacıyla uygulanan *in vitro* analizler [88].

In silico çalışmalar ile CRISPR-Cas Tip II-A sisteminde mevcut olan Cas9 ve Csn2 genlerinin ve Tip II-C bölgesindeki Cas9 geninin sekansları kullanılarak primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Buna göre çalışmanın bu aşamasında *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II sistemi saptanacaktır. Bu amaçla suşlardan DNA izolasyonu yapılacak ve daha sonra qPCR yöntemi kullanılarak saptama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. *Streptococcus thermophilus* Suşlarının Canlandırılması

Bu çalışmada yer alan *S. thermophilus* suşlarının canlandırılmasında M17 Broth ve M17 Agar besiyerleri ile 37°C'de 18-24 saat sürede aerobik inkübasyon koşulları sağlanmıştır.

S. thermophilus suşlarının canlandırılmasında aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. Bu çalışmada kullanılan referans suş için üretici firmanın canlandırma prosedürü uygulanmıştır [98].
2. -20 °C'de santrifüj tüplerinde muhafaza edilen *S. thermophilus* suşlarından 100 µL alınarak, steril M17 Broth besiyerine aseptik koşullarda inoküle edilmiştir.
3. Besiyeri, 37 °C'de aerobik koşullarda 16-18 saat inkübe edilmiştir.
4. Bulanıklık gözlenen sıvı besiyerinden 1-2 öze kadar alınmış ve steril M17 Agar besiyerine tek koloni düşürme yöntemi ile inokülasyon gerçekleştirilmiştir.
5. M17 Agar besiyeri, 37 °C'de aerobik koşullarda 36-48 saat inkübe edilmiştir.
6. İnkübasyon sonunda tespit edilen saf kolonilerden 2 öze alınarak tekrar M17 Broth besiyerine inoküle edilmiştir. Besiyeri, 37 °C'de aerobik koşullarda 16-18 saat inkübe edilmiştir.
7. İnkübasyon sonunda üreme gözlenen M17 Broth besiyerindeki kültürlerden 0,75 ul alınarak, içerisinde 0,75 ul steril gliserol bulunan santrifüj tüplerine %50 (h/h) oranında olacak şekilde eklenmiştir.
8. %50 (h/h) gliserol/besiyeri bulunan santrifüj tüplerine, M17 Agar besiyerinde saf kolonileri tespit edilmiş olan tüm *S. thermophilus* suşlarından 4-5 öze kadar alınarak hücre yoğunluğu arttırılmıştır.
9. Santrifüj tüpleri; gliserol, besiyeri ve *S. thermophilus* hücreleri iyice karışana kadar vorteklenmiştir.
10. Stok kültürler, tez çalışması kapsamında yürütülen diğer analizlerde kullanılana kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Mikroorganizmaların Stok Kùltürlerinin Hazırlanması

Mikroorganizmaların stok kùltürlerinin hazırlanmasında aşağıdaki adımlar izlenmiştir [99]:

1. Petri kutusunda katı besiyerinde inkübe edilmiş, üreme gözlenen ve saf kolonileri tespit edilen mikroorganizmalar ile birlikte sıvı besiyerleri de kullanılmıştır. Bu amaçla katı besiyerinde saf kolonileri tespit edilen mikroorganizmalardan tekrar sıvı besiyerine inokülasyon yapılmış ve 16-24 saat inkübe edilmişlerdir. Katı besiyerinden mikroorganizma inoküle edilmiş olan sıvı besiyerleri stoklamada kullanılmıştır.
2. Stok kùltürlerin hazırlanmasında, 2 mL'lik santrifüj tüplerine 0,75 mL gliserol eklenmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.
3. Sterilizasyonun ardından, katı besiyerinden mikroorganizma inoküle edilmiş ve üreme gözlenmiş olan sıvı besiyerinden 0,75 mL besiyeri, gliserolün üzerine ilave edilmiştir.
4. Stok kùltürdeki mikroorganizma yükünü arttırmak amacıyla santrifüj tüplerine, katı besiyerlerinde tespit edilen saf kolonilerden 2 öze kadar ilave edilmiş ve tüpler vorteklenmiştir.
5. İyice karışması sağlanan gliserol-besiyeri karışımı, -20°C'de, DNA izolasyonuna kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.2.3. Biyokimyasal Testler ile Önceden Tanımlanmış Suşların Kontrolü

Bir bakteri izolatının herhangi bir analizine başlamadan önce, kùltürün saflığının doğrulanması gerekir. *S. thermophilus* izolatlarının biyokimyasal olarak tanımlanma doğrulanması için uygulanan testler Çizelge 11'de verilmiştir.

Çizelge 11. Mikroorganizmaların tanımlanmasının doğrulanmasında uygulanan biyokimyasal testler.

Hedef Bakteri	Makroskobik Morfoloji	Streptokoklar için Ayrım Testleri
		Makroskobik Morfoloji
		Mikroskobik Morfoloji
<i>Streptococcus</i>	M17 Agar	37°C'de Gelişim Testi
<i>thermophilus</i>	37°C'de Aerobik	Katalaz Testi
		Gram Reaksiyonları
		Glukozdan Gaz Oluşturma Testi

S. thermophilus izolatlarının biyokimyasal olarak tanımlanma doğrulamasında Çizelge 11'de belirtilen ayırım testlerinden faydalanılacaktır. Bu amaçla uygulanacak testler makroskobik ve mikroskobik morfolojilerin incelenmesi, 37°C'de gelişim testi, katalaz testi, Gram reaksiyonlarının incelenmesi ve glukozdan gaz oluşturma testi şeklinde listelenmiştir.

Makroskobik Morfoloji

S. thermophilus suşlarının makroskobik morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla, öncelikle tipik kolonilerin tanımlanması yapılmıştır. Bu amaçla uygulanan protokol aşağıda belirtilmiştir [100, 101]:

1. M17 Broth besiyerinde 37°C'de aerobik koşullarda 18-24 saat inkübe edilmiş suşlar, M17 Agar besiyerine tek koloni düşürme yöntemiyle inoküle edilmiştir.
2. Agarlı besiyeri aynı koşullarda 36-48 saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda M17 Agar besiyerinde gelişim gösteren mikroorganizmaların tipik koloni özelliklerini gösteren koloni rengi, boyutu, koloni şekli, agar eğimli büyüme, yükseklik gibi parametreler kullanılarak belirlenmiştir.

Mikroskopik Morfoloji

S. thermophilus suşlarının mikroskopik morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla basit boyama tekniği kullanılmıştır [102].

Bu amaçla uygulanan metot aşağıda belirtilmiştir:

1. Temiz bir lam üzerine piset yardımıyla 1 damla damıtık su damlatılmıştır.
2. Damıtık su üzerine M17 Agar besiyerinde gelişim gösteren 18-24 saatlik genç kültürlerden standart koloniler seçilerek 1 öze örnek alınmış ve koloni, lam üzerindeki damıtık su üzerinde çözdürülmüş ve yüzeye yaydırılmıştır.
3. Lam yüzeyi kuruyana kadar bekletilmiştir.
4. Lam yüzeyi kuruduktan sonra hızlıca bek alevinden geçirilerek tespit yapılmıştır.
5. Hazırlanan preparat üzerine, yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde metilen mavisi eklenip 1 dakika beklenmiştir.
6. Preparat, damıtık suyla iyice yıkanmış ve tekrardan kurumaya bırakılmıştır.
7. Kuruyan preparat üzerine immersiyon yağı damlatılarak basit ışık mikroskopunda 100X merceğinde incelenmiştir. Basit boyama ile mikroorganizmaların hücresel şekillerinin gözlenmesi amaçlanmıştır.

37°C'de Gelişim Testi

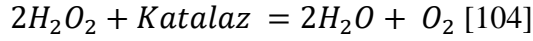
S. thermophilus suşlarının seçici sıvı besiyerinde 37°C'de gelişimleri incelenmiştir [103].

Bu amaçla uygulanan yöntem aşağıda belirtilmiştir:

1. -20°C'de stoklanmış olan izolatlarından 100 µL alınarak M17 Broth besiyerine inoküle edilmiştir.
2. Tüpler 37°C'de aerobik koşullarda 18-24 saat inkübe edilmiştir.
3. İnkübasyon sonunda saf kültür oluşumunu tespit etmek amacıyla üreme gözlenen besiyerlerinden 2-3 öze alınarak M17 Agar besiyerine tek koloni düşürme yöntemiyle inoküle edilmiştir.
4. M17 Agarlı Petri kapları, 37°C'de aerobik koşullarda 36-48 saat inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonunda saf kolonileri tespit edilen suşların 37°C'de gelişim testi sonuçları pozitif olarak kaydedilmiştir.

Katalaz Testi

Katalaz testi, bakterilerde katalaz enziminin saptanmasını amacıyla uygulanır. Testin temel prensibine ilişkin biyokimyasal gösterim aşağıda verilmiştir:



Testin uygulaması:

1. İncelenecek kültürden öze ile örnek alınarak, bir lam üzerinde damıtık su ile süspanse edilmiştir.
2. Süspanse edilmiş hücre kültürü üzerine bir öze dolusu %30'luk (a/h) H₂O₂ ilave edilip karıştırılmıştır.

Test sonunda hava kabarcıklarının çıkışı test sonucunun pozitif olduğunu, hava kabarcıklarının çıkmaması ise negatif olduğunu göstermiştir.

Gram Reaksiyonları

Mikroorganizmaları, Gram pozitif ve Gram negatif olarak ayırtmak amacıyla Gram boyama tekniğinden yararlanılmıştır [105].

Bu amaçla uygulanan yöntem aşağıda belirtilmiştir:

1. M17 Agar besiyerinde gelişim gösteren 18-24 saatlik genç kültürlerde inceleme yapılmıştır. Bu amaçla temiz bir lam üzerine piset yardımıyla 1 damla damıtık su damlatılmıştır.
2. Damıtık su üzerine, M17 Agar besiyerinde gelişim gösteren 18-24 saatlik genç kültürlerden standart koloniler seçilerek 1 öze örnek alınmış, lam üzerindeki damıtık su üzerinde çözdürülmüş ve lam yüzeyine yaydırılmıştır.
3. Lam yüzeyi kuruyana kadar bekletilmiştir.
4. Lam yüzeyi kuruduktan sonra hızlıca bek alevinden geçirilerek tespit yapılmıştır.
5. Hazırlanan preparat üzerine, yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde kristal viyole eklererek 1 dakika beklenilmiş ve preparat damıtık su ile yıkanmıştır.
6. Ardından preparat yüzeyi lügol çözeltisi ile kaplanıp 1 dakika beklenilmiş, süreç sonunda yüzey damıtık su ile yıkanmıştır.

7. Daha sonra preparat yüzeyi %96'lık etil alkol ile kaplanarak 15 saniye beklenmiştir.
8. Süreç sonunda alkol hızlıca akıtılarak yüzey damıtık su ile yıkanmıştır.
9. Son olarak preparata, yüzeyi kaplayacak şekilde safranin boyası eklenerek 30 saniye beklenilmiş ve süreç sonunda yüzey damıtık su ile yıkanmıştır.
10. Preparat yüzeyindeki su tamamen kuruduktan sonra üzerine immersiyon yağı damlatılarak basit ışık mikroskopunda 100X merceği ile mikroorganizma kolonileri incelenmiştir.

Gram reaksiyonu sonucu Gram pozitif olan bakteriler menekşe moru, Gram negatif bakteriler ise kırmızı olarak gözlenmiştir.

Glukozdan Gaz Oluşturma Testi

Karbonhidrat fermantasyon test besiyerlerinin hazırlanmasında Tryptone water veya uygun diğer bir sıvı temel besiyerinden yararlanılmaktadır [106]. Bu temel besiyeri, belli bir indikatör ve test edilecek karbonhidratı içerecek şekilde ve Durham tüpü bulunan test tüplerinde, genel olarak 4,5-5 mL miktarlarda hazırlanmaktadır. Brom kresol moru, besiyeri bileşiminin %0,04'ü oranında (a/h), glukoz ise besiyeri bileşiminin %0,0025'i oranında (a/h) eklenmiştir [107].

Testin uygulanılışı şu şekildedir:

1. İncelenecek bakteri kültüründen karbonhidrat fermantasyon test broth'larına sıvı kültürden 0,1 mL ekim yapılmıştır.
2. Tüp, optimum üreme sıcaklığında (37 °C) 2-10 gün inkübe edilmiştir.

Besiyeri renginin (indikatör renginin) değişmesi asit oluşumunu, Durham tüpünde gaz birikimi ise gaz oluşumunu gösterir.

Besiyerinde asit oluşumu gözleendiğinde test sonucu pozitifdir ve sonuç "+" ya da "A" olarak kaydedilir. Ancak test sonucunun pozitif olması durumunda, gaz oluşumu pozitif veya negatif olabilmektedir. Eğer Durham tüpünde gaz varlığı saptanmışsa sonuç "AG" olarak kaydedilir. Besiyerinde asit oluşumu gözlenmemişse sonuç negatiftir ve sonuç "-" olarak kaydedilir.

3.2.2.4. DNA İzolasyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu amacıyla GeneMATRIX Bacterial&Yeast Genomic DNA Purification Kit (E3580-01 - EURx) kullanılmıştır [108]. Kit protokolünde minör değişiklikler yapılarak genomik DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama örneğin hazırlanması, ikinci aşama lizis ve son aşama DNA ekstraksiyonudur.

Örneğin hazırlanması;

1. -20°C'de muhafaza edilen saf bakteri suşları, sıvı M17 Broth (1.15029 - Merck) besiyerine inoküle edilmiştir. Örnekler 37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.
2. 200 µL bakteri kültürü 11000 x g'de 3 dakika santrifüj edilip ve daha sonra süpernatant toplanmıştır.
3. Hücre sayısını arttırabilmek adına tekrardan 200 µL bakteri kültürü 11000 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiş ve daha sonra süpernatant toplanmıştır.
4. Ardından bakteri hücreleri %0,9 steril normal tuzlu su içinde yıkılmış ve aynı koşullar altında santrifüjleme ile toplanmıştır.

Lizis;

1. Bakteri pelletine 300 µL Lyse BG tamponu süspanse edilir ve Eppendorf tüpünde karıştırılmıştır.
2. Lizozim enziminin BL tamponu ile kullanılır. Süspanسیون hücrelerine 50 µL BL tamponu ve 40-50 µL lizozim eklenmiştir. Ardından 2 µL RNase A eklenip birkaç defa pipetleyerek karıştırılmıştır.
3. Numune 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

DNA ekstraksiyonu;

1. Yeniden süspanse edilmiş hücre pelletine 15 µL Proteinaz K eklenmiştir. Birkaç kat ters çevrilerek veya 15 saniye vorteks ile karıştırılmıştır.
2. Numune 55°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi boyunca tüp birkaç kez ters çevirerek karıştırılmıştır.
3. Numuneye 350 µL Sol BG tamponu eklenmiş ve birkaç kere ters çevirerek karıştırılmıştır.
4. Numune 5 dakika boyunca 55°C'de inkübe edilmiştir.

5. İnkübasyon sonunda numune 15 saniye vortekslenmiştir.
6. DNA spin kolonuna 30 µL Buffer BG eklenmiş ve lizat döndürme kolonuna aktarılan kadar oda sıcaklığında en az 15 dakika tutulmuştur.
7. Lizat, 11000 x g'de 2 dakika santrifüjlenmiştir.
8. Santrifüjün ardından 600 µL kadar berrak supernatant, DNA spin kolonuna dikkatlice aktarılmıştır.
9. Spin kolonu, 11000 x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
10. Spin kolonu çıkarılır. Toplama tüpünde biriken akışkan atılır ve spin kolonu, toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
11. Kalan karışım aynı DNA spin kolonuna aktarılmış ve 11000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
12. Spin kolonu çıkarılmış, süpernatant boşaltılmış ve kolon alıcı tüpüne geri yerleştirilmiştir.
13. Döndürme kolonuna 450 µL Wash BGX tamponu eklenecek ve 11000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
14. Döndürme kolonu çıkarılmış, toplama tüpünde biriken akışkan atılmış ve kolon, aynı toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
15. Spin kolona 450 µL Wash BGX tamponu eklenmiş ve 11000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
16. Spin kolon çıkarılmış, toplama tüpünde biriken akışkan atılmış ve kolon toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
17. Wash BGX tamponun kalıntılarının giderilmesi için lizat 11000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.
18. Spin kolonu 1,5 µL'lik yeni alıcı tüpe yerleştirilmiştir. Kolona bağlı DNA'yı elute etmek için, 80°C sıcaklığa kadar ısıtılmış 50 µL elüsyon tamponu, spin kolonuna eklenmiştir.
19. Spin kolon/toplama tüpü düzeneği oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
20. Spin kolonu ve toplama tüpü, 11000 x g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
21. Spin kolon çıkarılıp DNA izolatının bulunduğu alıcı tüpün ağzı kapatılmıştır.
22. Ekstraksiyonu tamamlanan genomik DNA, -18°C'de saklanmıştır.

3.2.2.5. Kalitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

S. thermophilus suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin tespiti amacıyla analiz edilecek olan Cas9 ve Csn2 genlerinin qPCR uygulamasında Roche FastStart Essential DNA Green Master (katalog numarası: 06 924 204 001) kiti ve kit protokolü kullanılmıştır [109].

Kit protokolüne göre izlenecek adımlar şu şekildedir:

1. -20 °C'de muhafaza edilen FastStart Essential DNA Green Master ve H₂O PCR Grade çözdürülmüştür.
2. PCR primerlerinin 10x konsantre solüsyonu hazırlanmıştır.
3. Buz kalıbı üzerindeki 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne, Çizelge 12'de listelenen bileşenler sırayla ekleyerek bir reaksiyon için 20 µl'lik PCR karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 12. qPCR protokolü

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Master Mix	10 µL	2x
Primer Forward	1 µL	0,5 µM
Primer Reverse	1 µL	0,5 µM
H ₂ O PCR Grade	3 µL	
Toplam Hacim	20 µL	

4. Her bileşen pipetleme yapılarak dikkatlice karıştırılmıştır.
5. LightCycler® 8'li strip tüplerinin her birine 15 µl PCR karışımı dağıtılmıştır.
6. 8'li striplere dağıtılan PCR karışımının üzerine 5 µl (50 ng/ µL) DNA şablonu ilave edilmiş ve dikkatlice pipetlenmiştir.
7. 8'li striplerin kapakları kapatılmıştır.
8. LightCycler® 8'li strip tüpleri, uygun adaptörle birlikte 2500xG 'de 2 dakika santrifüjleyin yerleştirilmiştir.

9. Reaksiyon tüpleri LightCycler® 96 cihazına yüklenmiş ve Çizelge 13’de belirtilenlere göre qPCR programı başlatılmıştır.

Çizelge 13. qPCR kitinin LightCycler® 96 cihazına optimize edilmiş protokolü

Döngü Adımı	Sıcaklık (°C)	Zaman (°C/s)	Döngü
İlk aktivasyon	95	4,4	1
3 adımlı amplifikasyon	95	4,4	45
	60*	2,2	
	72	4,4	
Erime	95	4,4	1
	65	2,2	
	97	0,1	
Soğutma	66	2,2	1

*60°C: Sıcaklık seçimi, PCR kiti protokolünde primere bağlı olduğu belirtilmiştir. Prokole göre önerilen uygulama, ilk deneyler için hedef sıcaklığın, hesaplanan primer T_m sıcaklığının 5°C altına ayarlanması yönündedir [109].

Çizelge 13, qPCR kitinin LightCycler® 96 cihazına optimize edilmiş protokolünü göstermektedir. Analiz öncesi cihaz, burada belirtilen sıcaklık, zaman ve döngü programlarına göre ayarlanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışma sonuçları üç temel başlıkta özetlenmiştir, bu kapsamda:

- i. Referans olarak seçilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin *in silico* olarak belirlenmesi,
- ii. *in silico* çalışmaların sonucu olarak CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin ve; Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin primerlerinin tasarımı,
- iii. FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin tespiti amacıyla kalitatif qPCR uygulaması yapılmıştır.

4.1. *in silico* Analizler

4.1.1. *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 Suşunun Tam Genom Sekansının Eldesi

Suşun Ticari Özellikleri

Referans olarak seçilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun tam genom sekansı, ATCC Genome Portal (<https://genomes.atcc.org/>) veritabanından elde edilmiştir. *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun dizileme özeti Çizelge 14'de verilmiştir.

Çizelge 14. *S. thermophilus* ATCC® 19258™ suşunun ticari özellikleri [90].

Organizma Özeti	
İsim	ATCC® 19258™
İzolasyon	Pastörize süt
Etiket	Tip suş
Biyogüvenlik Seviyesi	1
Tip Suş	Evet

ATCC Genome Portal veritabanından referans suşun tam genom sekansı ile birlikte; suşun ticari ismi, izole edildiği yer, etiket bilgisi, biyogüvenlik seviyesi ve tip suş olup olmadığına dair bilgilere de ulaşılmıştır. Suşa ait tam genom dizileme bilgileri Çizelge 15’de belirtilmiştir.

Çizelge 15. *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun dizileme özeti [90].

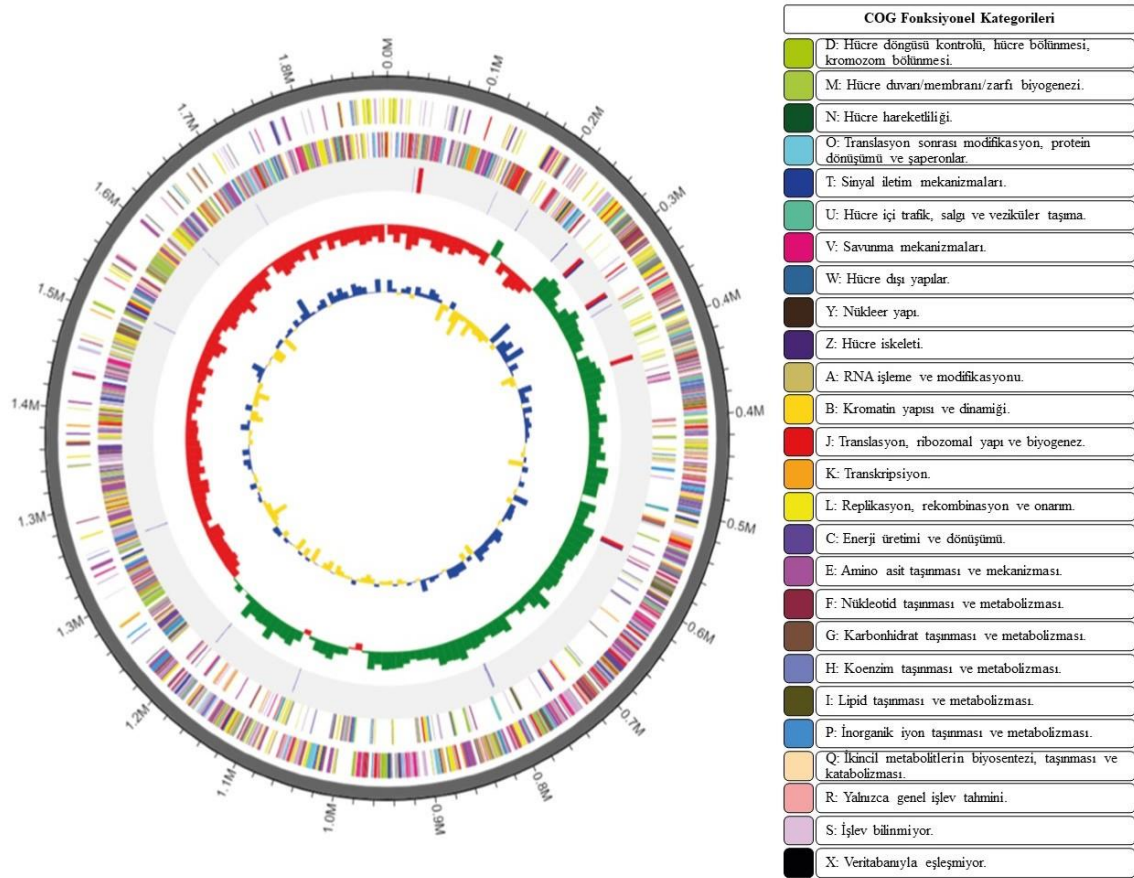
Dizileme Özeti	
Yayınlanma Tarihi	20 Aralık 2019
Uzunluk	2,102,268 nükleotit
Sekans Teknolojisi	Illumina + Oxford Nanopore Hybrid Assembly
Bitiş Sayısı	1 (halkasal)
Dizileme Düzeyi	Tam Genom Sekanslama
N50	2,102,268 nt
%GC İçeriği	%39,02

ATCC Genome Portal veritabanından elde edilen ve bir sonraki adımlarda kullanılacak olan tam genom dizilemenin tarihi, dizinin uzunluğu, kullanılan sekans teknolojisi, dizinin bitiş sayısı, dizileme düzeyi, N50 değeri ve %GC içeriğine dair bilgilere de ulaşılmıştır. N metrikleri, genom düzeneklerini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan bir dizi dizinin bitişikliğinin bir ölçüsüdür. N50, bir seri dizinin medyan ve ortalama uzunluğuyla ilgilidir. Değeri, dizi kümesindeki nükleotidlerin (en az) %50'sini birlikte temsil eden en uzun diziler grubundaki en kısa okumanın uzunluğunu temsil eder. N50 değeri, bir sıralama çalışmasının okuma uzunluğu dağılımının ağırlıklı orta noktası olarak görülebilir. Yine tabloya göre ATCC 19258 suşunun %GC içeriği %39,02’dir. Bir genomun baz bileşiminin, özellikle yüksek %GC içeriğinin, uzun zaman dilimleri boyunca sürekli değişen çevresel koşullarda, genomun baz bileşiminin belirli bir düzeyde stabilizeye işaret ettiği literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir [110]. Buna göre hem N50 değeri (2,102,268 nt) bakımından hem de % GC (%39,02) oranı bakımından *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun ham okuma verilerinin kalitesini göstermektedir.

4.1.2. CRISPR-Cas Tip II Bölgesindeki Mevcut Gen Sekanslarının Eldesi

Referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 suşuna ait CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C lokuslarının analizi için CRISPRCas++ veritabanı kullanılmıştır.

S. thermophilus ATCC 19258 tipi suşuna %99,9 benzerlik gösterdiği belirtilen bir çalışmada [111] *S. thermophilus* suşuna ait dairesel genom haritası Şekil 8'de verilmiştir. Burada çemberin dışından içine doğru COG kategori atamasıyla renklendirilmiş ileri sarmaldaki kodlama dizileri (CDS), ortolog gruplar kümesi (COG) kategori ataması, RNA, GC oranıyla renklendirilmiş ters sarmalda verildiği görülmektedir.

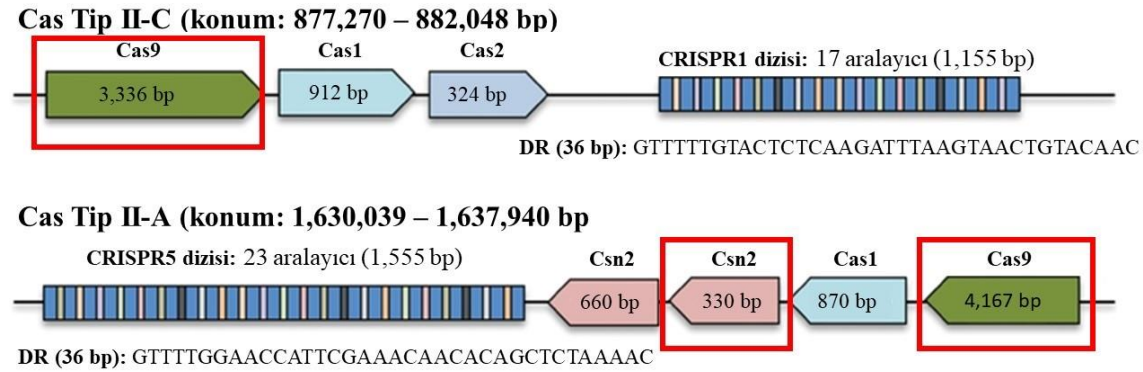


Şekil 8. *S. thermophilus* suşuna ait dairesel genom haritası.

Çizelge 16. *S. thermophilus* CKDB027 suşunun COG fonksiyonel kategorileri ile ilişkili gen sayısı [111].

ÇARK DİŞİ	İşlev	Sayı	Yüzde (%)
S	İşlev bilinmiyor	439	23.8
L	Replikasyon, rekombinasyon ve onarım	254	13.8
E	Amino asit taşınması ve metabolizması	200	10.9
J	Translasyon, ribozomal yapı ve biyogenez	148	8.0
M	Hücre duvarı/membranı/zarfi biyogenezi	99	5.4
K	Transkripsiyon	96	5.2
G	Karbonhidrat taşınması ve metabolizması	95	5.2
P	İnorganik iyon taşınması ve metabolizması	87	4.7
F	Nükleotid taşınması ve metabolizması	74	4.0
Ö	Translasyon sonrası modifikasyon, protein dönüşümü, şaperonlar	63	3.4
V	Savunma mekanizmaları	59	3.2
H	Koenzim taşınması ve metabolizması	44	2.4
C	Enerji üretimi ve dönüşümü	42	2.3
T	Sinyal iletim mekanizmaları	42	2.3
I	Lipid taşınması ve metabolizması	32	1.7
U	Hücre içi trafik, salgı ve veziküler taşıma	29	1.6
D	Hücre döngüsü kontrolü, hücre bölünmesi, kromozom bölünmesi	17	0,9
Q	İkincil metabolitlerin biyosentezi	15	0,8
N	Hücre hareketliliği	5	0,3
Z	Hücre iskeleti	1	0,1

Bu çalışmada CRISPR bölgesini doğrulamak için CRISPRCasFinder kullanılarak elde edilen gen sekanslarına göre tüm genom, biri 14 aralayıcıya sahip CRISPR-Cas Tip II-C sistemi ve diğeri 23 aralayıcıya sahip CRISPR-Cas tip II-A sistemi olmak üzere iki adet CRISPR-Cas lokus kümesi göstermiştir (Şekil 9).



Şekil 9. *S. thermophilus*'daki CRISPR-Cas lokuslarının yapısı [111].

Dört farklı doğrudan tekrar (DR) mavi renk kodludur ve ara parçalar diğer renk kodludur. Her DR'nin konsensüs dizisi ve boyutu, her lokusun altında gösterilir. Lokustaki her Cas proteininin boyutu her beşgende gösterilir (bp = baz çifti). Tez çalışmasında, Şekil 9'da gösterilen Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genleri ile Tip II-C bölgesine ait Cas9 genlerinin taraması yapılmıştır.

Arama sonucu elde edilen sekans verilerinden, kanıt düzeyi 3 ve 4 olan genlerin sekans verilerine ulaşmak için CRISPRCasdb-Taxo kullanılmıştır. Bu doğrultuda Çizelge 17 CRISPRCasFinder ile elde edilen gen sekanslarının son 600 baz çiftini (bp) göstermektedir.

Çizelge 17. CRISPRCasFinder ile elde edilen gen sekanslarının son 600 baz çifti (bp).

Gen	Sekans (Son 600 bp)
Tip II-A Cas9	ACTATTCTCAAGTGATAAATCCGATTCAAAAATAGCATTATAAGTGTCCA AAAAGTCTTGAAAATTCTTCTGAATATCATTATTTTTTGAATAAACTCTC CTTCAATTAAGAAGTGACCTCTATATTTAATCATATGAGCCAATGCAAGA TAAACTAGACGCAAATCTGCTTTTTTAGTACTATCTGCTAAATATTTCCCTT AAATGATAGATAGTTGGAAATTCATCATGATAGGCTTTTTCTTCTACTAA GTTTCCAAATATCGGATACTTACTATCACGTTTATCATCAGGAACTAAAA ACGAATCGTCAAGTCTTTGAAAGAAAGCATCATCTAATGTAGCCATCTCT GTGCTAAAAATTTCTGCAAATAAAGGATACGATTACGGCGTCTAGTATA ACGTCTTCTTGCAGTACGCTTCAATCTTCTTCTTCTGCTGTGATTCCAGA GTCAAAGAGTAATACACCTAACAGGTTCTTTTTGATATACTTTTTACTCGT ATTTCTTAAGACTTTTCATTTTTTTAGACGGAACCTTGTAATTATCAGTTAT TACAGCCCATCCAACACTATTCGTTCCAATATCAAGTCCAATTGA
Tip II-A Csn2	TTGTTGAATCCCTTCAATCTGTCTAGGTTCCAAAAATAATACATCAGCTTG TGATAACTTTGTATATTCCAAGATTTGATAAATTTTCATCTTTAGAAAAATA CGACAAGCTATTGACGAATACTAAAATTCTTTTTTAACTAAATATTTAA AAATCTGTAAAATCTCAAATATTTTTTCAAAAACCGTACAAGACTTAGTT TCGATTCTGACACCTAATGCTTTAATTAGTTCTAAAAGTGTAATCTCATCA TACTCTATATCTAGTTTCATTTTCTATACACTCTGCCATTATAATATCAGTA ATTAATGATACCAAAGAATCTATTTCTGATCTAACTTCAGGTTTATCATTC AACTGGCTTACAATATCTGTGTGAAGCAACTTTAATACCTGAGAAGTATT AATATCGTAACCTAAAATATCCGTTATTTAAAAGTAATTCAGAGGACCTTA TACTCCTTATTTTACTATCAAATATTGTTAAATTCGATTGTTTCATCATACT GATAGAATTCCTTGACTAACTGAGCAAACACACTCACATCCTCAATTACG AGAACTGTCCCCAGATTAACCTCCATAGGCTCATCCAAAAGTGA
Tip II-C Cas9	CATGGCTATATTCGTAAATATAGTAAAAAAGGCAATGGTCTGAAATCAA GAGTCTTAAATACTATGATAGTAAGCTAGGCAATCATATTGATATTACTC CGAAGGATAGTAACAATAAAGTTGTCTTACAGTCATTAACCTTGGAGA ACAGATGTCTATTTCAATAAAAAATACTGGTAAATATGAAATTTTAGGACT GAAATATTCTGATATGCAGTTCGAGAAAGGTAAGTACTGGGAAGTACTCTATTT CAAAAGAACAATATGAAAATATTAAGGTTAGAGAGGGTGTAGATGAAAA TTCTGAATTTAAGTTTACTTTTATAAAAACGATTTATTACTGCTTAAGGA

TTCCGAAAATGGCGAGCAAATCCTATTGAGGTTCACTTCTCGAAATGATA CTTCTAAACATTATGTGGAATTAACCTTATAATAGACAGAAATTTGAA GGAAGTGAATATCTGATTAATCATTAGGGACTGTTGCCAAAGGAGGTC AATGCATAAAAGGGCTAGGAAAATCAAATATTTCTATTTATAAAGTAAG AACGGATGTTCTAGGAAATCAGCATATCATCAAAAATGAGGGTGATAAG CCT

Elde edilen gen sekanslarının kanıt düzeyi 4'e ait olduğu, veritabanı aracılığıyla tespit edilmiştir. Sekansların son 400 baz çifti, primer tasarımında kullanılmıştır. Genlere ait tam sekans dizilimleri EK 1'de verilmiştir.

Bu aşamadan sonra, elde edilen gen sekanslarının NCBI Blast veritabanında mevcut olan diğer *S. thermophilus* suşları ile hizalanması gerçekleştirilmiştir.

4.1.3. Seçilen Cas9 ve Csn2 Genlerinin Hizalanması

Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'na ait *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin tespiti amacıyla qPCR uygulamasında kullanılacak olan primerlerin dizaynı öncesi, gen sekanslarının NCBI veritabanında tam genom sekansları mevcut olan *S. thermophilus* suşları ile hizalanması hedeflenmiştir. Burada NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılmıştır.

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genleri ve Tip II-C bölgesine ait Cas9 genlerine ait sekansların, NCBI BLAST veritabanına kayıtlı *S. thermophilus* suşları ile hizalanması amacıyla, 3.2.1.1. başlığı altında belirtilen adımlar izlenmiştir. BLAST hizalanması sonucu elde edilen sonuçlar, EK 2'de verilmiştir.

BLAST ile yapılan hizalamalar, hizalama puanı ile değerlendirilir. Bir hizalamanın puanı, her hizalanmış baz çifti için tanımlanan ikame puanları ve bir segmentteki boş karakterlerle diğerine eklenen her harf dizisi için boşluk puanları toplanarak hesaplanır [93].

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin ve Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin benzerlik oranlarına ait hizalamanın sonuç tabloları EK 2’de verilmiştir. Grafiklerde kırmızı ile işaretli bölgelerin hizalanma puanı >200 , pembe ile işaretli bölgelerin hizalanma puanı ile 80-200 aralığındadır. Hizalama sonucu elde edilen benzerlik oranının >70 oranında olması beklenmektedir [92].

200 baz çifti boyutundaki karşılaştırmalar için hizalama puanı en az 28, 800 baz çifti boyutundaki karşılaştırmalardan elde edilen optimal hizalama puanları en az 31, 1200 baz çifti boyutundaki karşılaştırmalardan elde edilen optimal hizalama puanları en az 34 olmalıdır. BLASTn ile yapılan hizalamaların sonuçlarını bu bilgiler doğrultusunda değerlendirilmiştir.

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 65 tekrar ile Blast Hit dağılımı sonuçları Şekil 10’da gösterilmiştir.



Şekil 10. CRISPR-Cas Tip II-A Cas9 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 65 tekrar ile Blast Hit dağılımı.

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geni, NCBI BLASTn veritabanı kullanılarak *S. thermophilus* suşları ile hizalanmış ve 65 tekrar ile yapılan hizalama sonucu, hizalama puanının >200 olduğu saptanmıştır. Şekil 10'da gösterilen hizalama haritası Çizelge 18'de özetlenmiştir.

Çizelge 18. CRISPR-Cas Tip II-A Cas9 geni BLAST hizalaması özeti.

Tür	Hizalama Puanı	Hit Sayısı
<i>Streptococcus</i>		65
<i>Streptococcus thermophilus</i>	739	58
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	739	2
<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002	739	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03	739	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ASCC 1275	728	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	686	2

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geni için BLAST hizalaması, NCBI veritabanına kayıtlı 65 tekrar ile gerçekleştirilmiş ve sekans benzerlik oranının >98,75 olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, yüksek oranda nükleotit sekans benzerliğinin olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

400 baz çifti ile yapılan hizalama sonucu CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait olan Cas9 geninin hizalama puanının uygun değere sahip olduğu saptanmıştır.

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 63 tekrar ile Blast Hit dağılımı Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. CRISPR-Cas Tip II-A Csn2 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 63 tekrar ile Blast Hit dağılımı.

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geni, NCBI BLASTn veritabanı kullanılarak *S. thermophilus* suşları ile hizalanmış ve 63 tekrar ile yapılan hizalama sonucu, hizalama puanının >200 olduğu saptanmıştır. Şekil 11’de gösterilen hizalama haritası Çizelge 19’da özetlenmiştir.

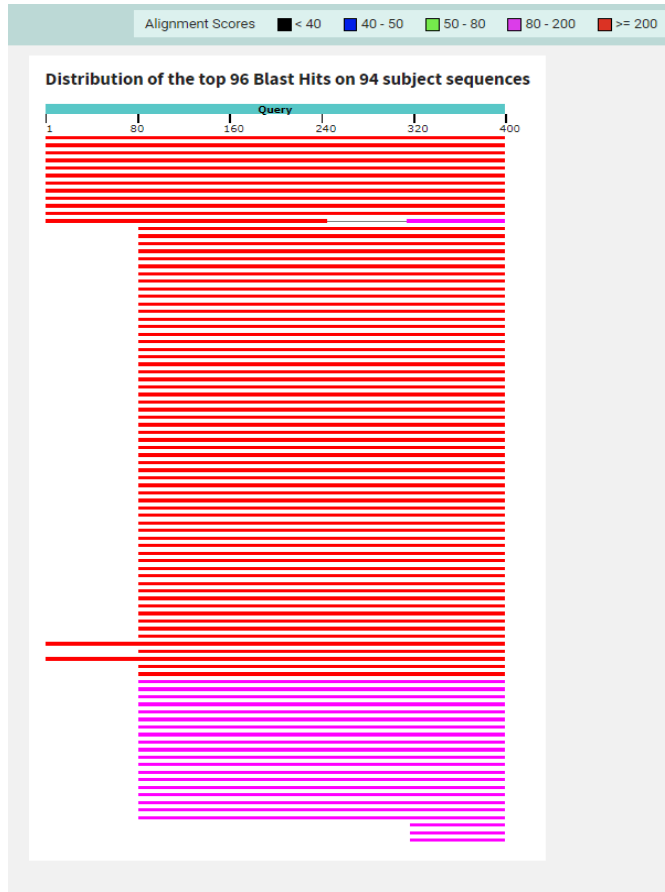
Çizelge 19. CRISPR-Cas Tip II-A Csn2 geni BLAST hizalaması özeti.

Tür	Hizalama Puanı	Hit Sayısı
<i>Streptococcus</i>		63
<i>Streptococcus thermophilus</i>	739	58
<i>Streptococcus thermophilus</i> ASCC 1275	739	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	739	2
<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002	739	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03	739	1

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geni için BLAST hizalaması, NCBI veritabanına kayıtlı 63 tekrar ile gerçekleştirilmiş ve sekans benzerlik oranının >98,25 olduğu saptanmıştır. Bu sonuç da yüksek oranda nükleotit sekans benzerliğinin olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

400 baz çifti ile yapılan hizalama sonucu CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait olan Csn2 geninin hizalama puanının uygun değere sahip olduğu saptanmıştır.

CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 94 tekrar ile Blast Hit dağılımı Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. CRISPR-Cas Tip II-C Cas9 geninin, NCBI veritabanına kayıtlı 94 tekrar ile Blast Hit dağılımı.

CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geni, NCBI BLASTn veritabanı kullanılarak *S. thermophilus* suşları ile hizalanmış ve 94 tekrar ile yapılan hizalama sonucu, hizalama puanının 80-200 aralığında ve >200 olduğu saptanmıştır. Şekil 12’de gösterilen hizalama haritası Çizelge 20’de özetlenmiştir.

Çizelge 20. CRISPR-Cas Tip II-C Cas9 geni BLAST hizalaması özeti.

Tür	Hizalama Puanı	Hit Sayısı
<i>Streptococcus</i>		94
<i>Streptococcus thermophilus</i>	739	86
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	739	2
<i>Streptococcus thermophilus</i> CNRZ1066	248	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ASCC 1275	243	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002	243	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> JIM 8232	243	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03	243	1
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 18311	193	1

CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geni için BLAST hizalaması, NCBI veritabanına kayıtlı 65 tekrar ile gerçekleştirilmiş ve sekans benzerlik oranının >77,28 olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, >%70 nükleotit sekans benzerliğine sahip olması doğrultusunda uygun değerde olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

400 baz çifti ile yapılan hizalama sonucu CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait olan Cas9 geninin hizalama puanının uygun değere sahip olduğu saptanmıştır. Bu durumda suşların hizalama puanlarının uygun değerlere sahip olduğuna ulaşılmıştır.

BLAST hizalaması sonucu kontrol edilen benzerlik oranları ve hizalama puanlarının uygunluğuna karar verilmesinin ardından, Primer3 ile primerlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. Primer Tasarımı

S. thermophilus suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C sisteminin tespiti için uygulanacak qPCR primerleri, Primer3 kullanılarak tasarlanmıştır.

Primer3 programı ile primer tasarımı amacıyla 3.2.1.1. başlığı altında belirtilen adımlar izlenmiştir. İleri (forward) primer 5'-3' yönünde, geri (reverse) primer 3'-5' yönündedir. Primer3 ile elde edilen oligo primerler ise EK 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 21. CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait primerler.

Gen	Primer	%GC	Tm	Uzunluk (bp)
Cas9	F: TCTTCCTTCTGCTGTGATTCC	47,62	57,66	21
	R: ACGAATAGTGTTGGATGGGC	50,00	57,96	20
Csn2	F: TCAGGTTTATCATTCAACTGGCT	39,13	58,08	23
	R: TGAGGATGTGAGTGTGTTTGC	47,63	58,78	21

Çizelge 21, CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait olan Cas9 ve Csn2 genlerinin, Primer3 ile tasarlanan ve qPCR analizinde kullanılan primer dizilerini göstermektedir.

Buna göre CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin ileri (F) primer dizisinin %GC oranı 47,62, Tm sıcaklığı 57,66, baz çifti uzunluğu 21 ve geri (R) primer dizisinin %GC oranı 50, Tm sıcaklığı 57,96, baz çifti uzunluğu 20'dir. Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin ileri (F) primer dizisinin %GC oranı 39,13, Tm sıcaklığı 58,08, baz çifti uzunluğu 23 ve geri (R) primer dizisinin %GC oranı 47,63, Tm sıcaklığı 58,78, baz çifti uzunluğu 21'dir.

İdeal primerlerin %GC içeriğinin %40-60 aralığında olması, Tm değerlerinin 45°C ila 65°C arasında olması ve 18-26 bazdan oluşması önerilmektedir. Bu kriterlere göre CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geni için tasarlanan primerler bu kriterlere uymaktadır.

Csn2 geni için Primer3 programı ile tasarlanan primerler (EK 3), ideal primer özelliklerini tam olarak karşılamamaktadır. İdeal primer için belirtilen kriterlerin birlikte değerlendirilmesi ile primer seçimi gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan primerlerin uzunlukları uygun aralıktadır. Bu durumda primerlerin %GC içeriği ile birlikte Tm sıcaklıkları birlikte değerlendirilmiştir. Tm sıcaklığı daha yüksek ve primerler (ileri ve geri) arasında minimum fark bulunan primer, tez çalışmasının qPCR analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 22, CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait olan seçilen genlerin, Primer3 ile tasarlanan ve qPCR analizinde kullanılan primer dizilerini göstermektedir.

Çizelge 22. CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait primerler.

Gen	Primer	%GC	Tm	Uzunluk (bp)
Cas9	F: TTCCGAAAATGGCGAGCAAA	45,00	59,04	20
	R: GCATTGACCTCCTTTGGCAA	50,00	59,03	20

Buna göre CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin ileri (F) primer dizisinin %GC oranı 45,00, Tm sıcaklığı 59,04, baz çifti uzunluğu 20 ve geri (R) primer dizisinin %GC oranı 50, Tm sıcaklığı 59,03, baz çifti uzunluğu 20'dir. CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geni için tasarlanan bu primer uygun %GC içeriğine, Tm değerine ve baz uzunluğuna sahiptir ve qPCR uygulamasında kullanılmak üzere seçilmiştir.

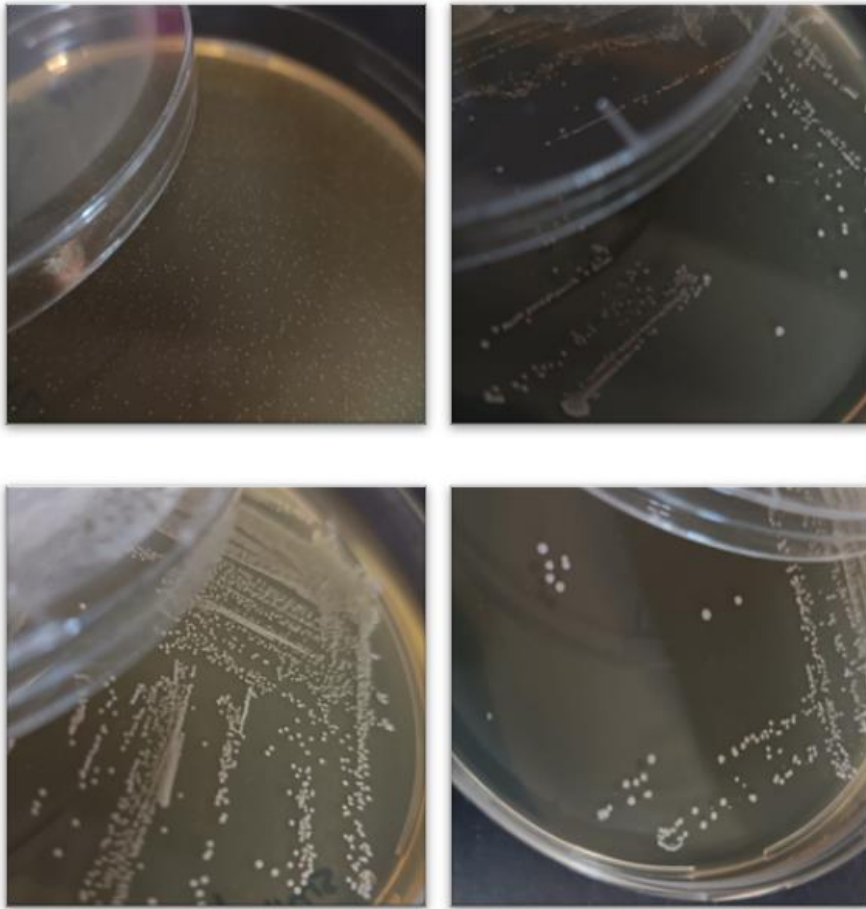
Tasarlanan primerler sentezlendikten sonra, *in vitro* analizlerde kullanılmak üzere Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Laboratuvarı'nda -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2. *in vitro* Analizler

4.2.1. FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'na ait olan *Streptococcus thermophilus* Suşlarının Canlandırılması

FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'na ait olan *S. thermophilus* suşlarının canlandırılması, 3.2.2.1. başlığında belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.

Buna göre *S. thermophilus* suşlarının makroskobik morfolojilerine ait tipik koloni görüntüsü Şekil 13'de verilmiştir.



Şekil 13. Makroskobik inceleme sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; *S. thermophilus* ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, *S. thermophilus* HUF22BDT2034.

S. thermophilus suşları M17 Agar besiyerinde geliştiğinde dairesel, beyaz, parlak veya opak olmak üzere tipik gelişim özelliklerini göstermiştir.

S. thermophilus suşlarının mikroskopik morfolojilerinin belirlenmesi, M17 Agar besiyerinde gelişim gösteren tipik kolonilerin basit boyanma yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. *S. thermophilus* suşlarının boyanmasının ardından, basit ışık mikroskopunda 100X merceği ile incelenmesi sonucu elde edilen görüntüleri göstermektedir. Bu görüntüler, *S. thermophilus* suşlarının standart bir görünümü olan kok şekilli ve zincir halindeki koloniler olarak gözlenmiştir.

Çizelge 23'de *S. thermophilus* suşlarının gelişme özellikleri ve makroskopik, mikroskopik morfolojileri ayrı ayrı verilmiştir.

Çizelge 23. *S. thermophilus* suşlarının gelişme özellikleri ve makroskopik, mikroskopik morfolojileri.

Mikroorganizma Kodu	Suş	Kaynağı	Gelişme	Makroskopik Morfoloji	Mikroskopik Morfoloji
ATCC 19258	<i>S. thermophilus</i>	Pastörize süt	İyi	Beyaz, parlak, pürüzsüz	Zincir halinde koklar, tipik
HUF19ZN2M1012	<i>S. thermophilus</i>	Starter kültür eklenmiş süt	Çok iyi	Beyaz, parlak, pürüzsüz	Zincir halinde koklar, tipik
HUF19ZN7M1039	<i>S. thermophilus</i>	Tekne yüzeyi	Çok iyi	Beyaz, parlak, pürüzsüz	Zincir halinde koklar, tipik
HUF22BDT2034	<i>S. thermophilus</i>	Ticari yoğurt starter kültürü	Çok iyi	Beyaz, parlak, pürüzsüz	Zincir halinde koklar, tipik

Buna göre gelişme durumları iyi ya da çok iyi, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri *S. thermophilus* ile uygun olan suşların biyokimyasal testlerle kontrol edilmesi planlanmıştır.

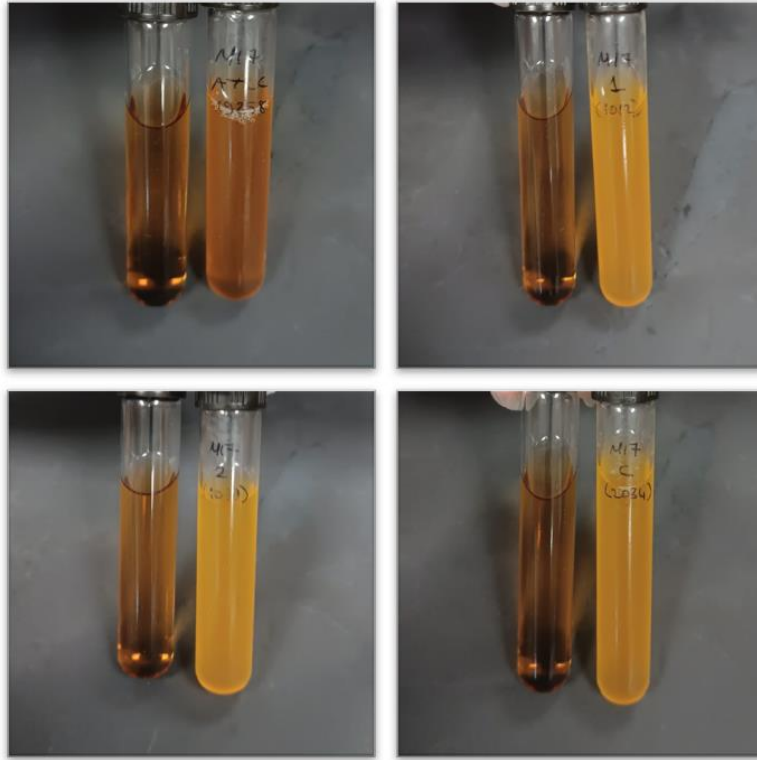
4.2.2. Biyokimyasal Testler ile Önceden Tanımlanmış Suşların Kontrolü

S. thermophilus izolatlarının saflığının doğrulanması amacıyla bazı biyokimyasal testler uygulanmıştır.

S. thermophilus izolatlarının biyokimyasal olarak tanımlanma doğrulanması için uygulanan testler 3.2.2.3. başlığı altında bulunan Çizelge 11’de verilmiştir.

37°C’de Gelişim Testi

Mikroorganizmaların 37°C’de gelişim testinin gerçekleştirilmesi amacıyla *S. thermophilus* suşları, M17 Broth besiyerinde 16-24 saat süreyle aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.



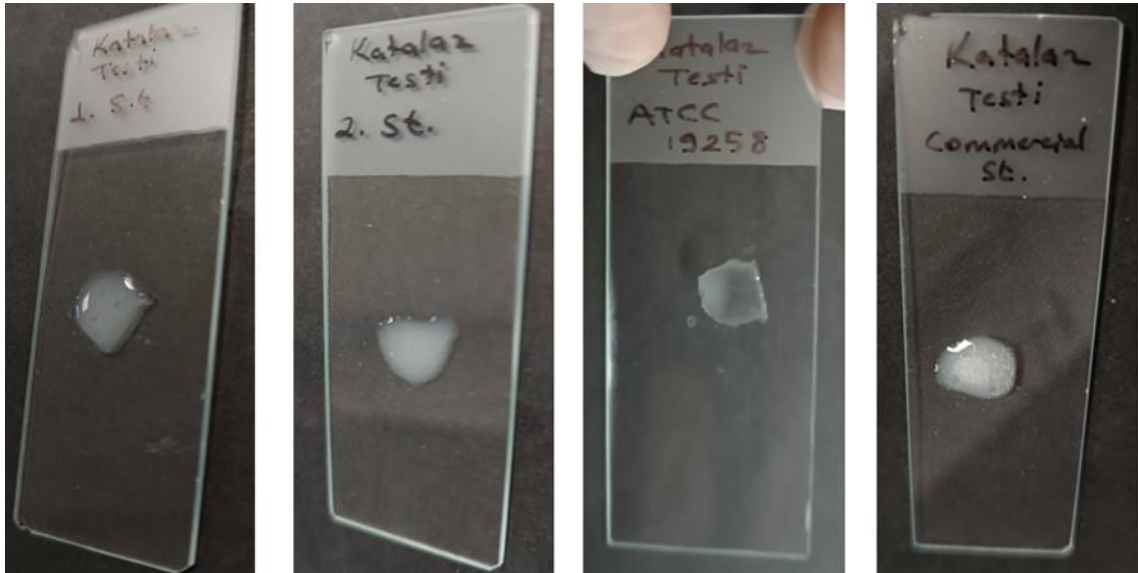
Şekil 14. Mikroorganizmaların 37°C’de gelişim testi sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; *S. thermophilus* ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, *S. thermophilus* HUF22BDT2034.

Şekil 14, *S. thermophilus* suşlarının M17 Broth besiyerinde 37°C’de aerobik koşullardaki gelişimini göstermektedir. Şekilde; solda bulunan şeffaf tüp,

mikroorganizma inokülasyonu yapılmamış besiyerini, sağdaki tüp ise mikroorganizma inokülasyonu yapılmış besiyerini göstermektedir. Mikroorganizma inokülasyonu yapılmış ve inkübasyonu tamamlanmış tüplerde üreyen mikroorganizmaların, steril M17 Broth besiyerinin şeffaf kahverengi rengini turuncu renge çevirdiği gözlenmiştir. Testin sonucu, tüm *S. thermophilus* suşları için pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Katalaz Testi

Katalaz testi, bakterilerde katalaz enziminin saptanmasını amacıyla gerçekleştirilmiştir. *S. thermophilus* suşlarına uygulanan katalaz testi, 3.2.2.3.2. nolu başlıkta belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.

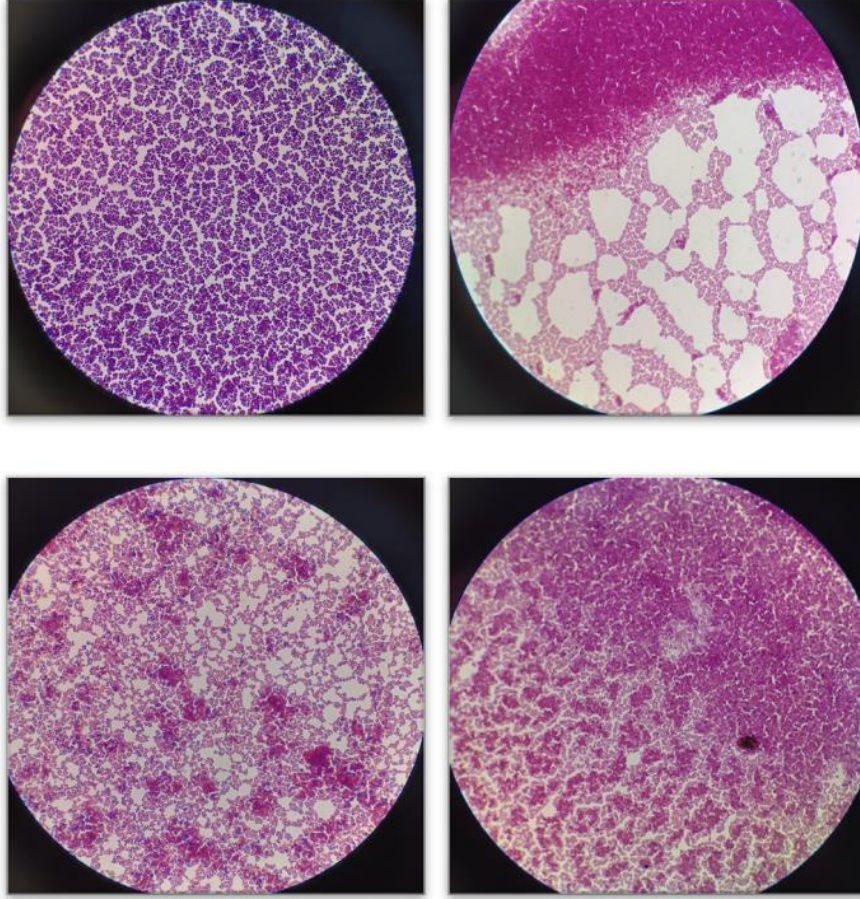


Şekil 15. Mikroorganizmaların katalaz testi sonuçları. Soldan sağa olmak üzere; *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, *S. thermophilus* ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF22BDT2034.

Şekil 15, M17 Agar besiyerinde gelişim gösteren ve spesifik koloni oluşumu gösteren *S. thermophilus* suşlarının seçilmesiyle hazırlanan preparatlar üzerinde uygulanan katalaz testi sonuçlarını göstermektedir. Katalaz enzimine sahip olan mikroorganizmalar, preparat üzerinde mikroorganizma üzerine damlatılan H_2O_2 ile reaksiyona girdiğinde gaz oluşumu (O_2) gözlenir. Katalaz enzimine sahip olmayan mikroorganizmalarda gaz oluşumu gözlenmez. Katalaz testi uygulanan *S. thermophilus* suşlarında gaz oluşumu beklenmemektedir ve test sonucunda da herhangi bir gaz oluşumu gözlenmemiştir. Dolayısıyla test sonucu, tüm suşlar için negatif olarak değerlendirilmiştir.

Gram Reaksiyonları

S. thermophilus suşlarının Gram reaksiyonlarının incelenmesi testi, deneysel çalışmalar 3.2.2.3.3. başlığında belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.

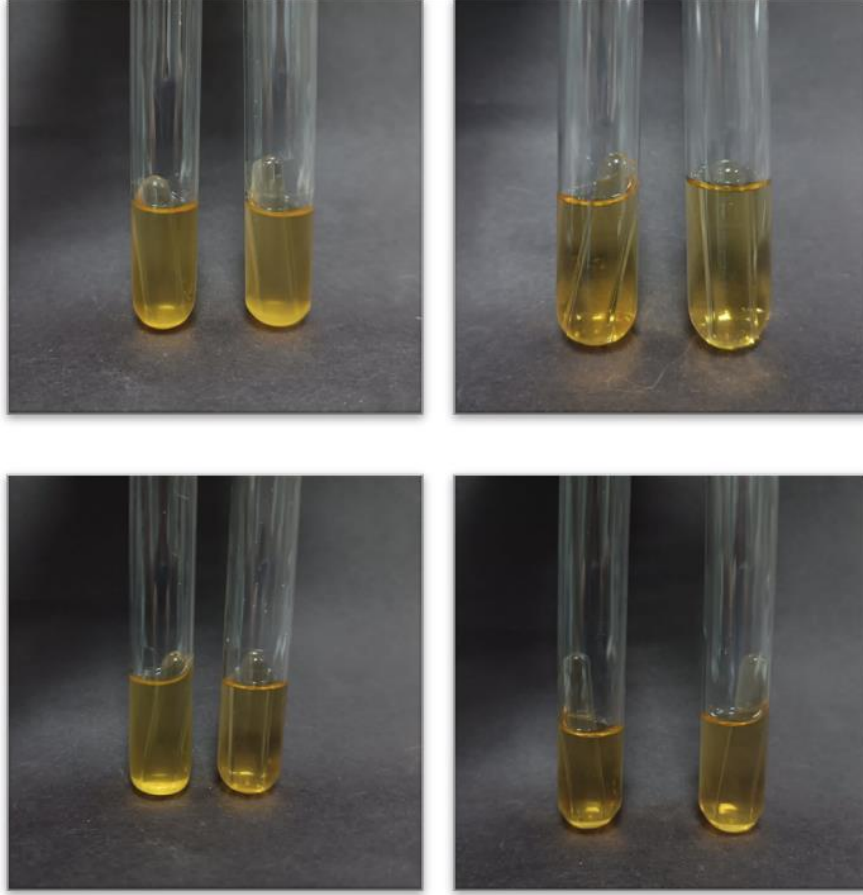


Şekil 16. Mikroorganizmaların Gram reaksiyonu sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; *S. thermophilus* ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, *S. thermophilus* HUF22BDT2034.

Şekil 16, *S. thermophilus* suşlarının, Gram boyama tekniği ile boyanması sonrası, basit ışık mikroskopunun 100X merceği ile görüntülenmesi sonucu elde edilen sonuçları göstermektedir. Gram pozitif bakterilerin Gram reaksiyonu sonucu mor-menekşe rengi görüntü gözlenmesi beklenmektedir. Bu doğrultuda *S. thermophilus* suşlarının test sonucu Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Glukozdan Gaz Oluşturma Testi

S. thermophilus suşlarının glukozdan gaz oluşturma testi, deneysel çalışmalar 3.2.2.3.4. başlığında belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.



Şekil 17. Mikroorganizmaların glukozdan gaz oluşturma testi sonuçları. Soldan sağa ve yukarıdan aşağı olmak üzere; *S. thermophilus* ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039, HUF22BDT2034.

Şekil 17, mikroorganizmaların içerisinde Durham tüpü bulunan Nutrient Broth besiyerindeki gelişimini göstermektedir. Besiyeri bileşimine, tez çalışması kapsamında kullanılan metotta belirtilen oranda glukoz ve indikatör eklenmiştir. Test sonucunda besiyerinin renginin değişmesi ve Durham tüpünde gaz oluşumun gözlenmesi test sonucunun pozitif olduğunu, renk değişimi ve gaz oluşumu gözlenmemesi ise test sonucunun negatif olduğunu göstermektedir. Çoğu *Streptococcus thermophilus* suşu glukozu metabolize etmez veya zayıf bir Şekilde metabolize ederken [112], çalışma kapsamında yer alan suşların glukozu fermente etmediği saptanmıştır.

Şekil 17, 2 paralel olarak gerçekleştirilen testin sonucunu göstermektedir. Burada, Nutrient Broth besiyerinin şeffaf sarı renginin bulanıklaştığı, ancak indikatör kaynaklı herhangi bir renk değişimi veya Durham tüplerinde gaz oluşumu gözlenmemiştir. Dolayısıyla testin sonucu tüm *Streptococcus thermophilus* suşları için negatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 24, *S. thermophilus* suşlarının saflığının kontrolü amacıyla gerçekleştirilen biyokimyasal testlerin sonucunu özetlemektedir.

Çizelge 24. Mikroorganizmaların biyokimyasal testlerle saflığının doğrulanması testlerinin sonuçları.

Suşlar	37°C'de Gelişim Testi	Katalaz Testi	Gram Reaksiyonları	Glukozdan Gaz Oluşturma Testi
ATCC 19258	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
HUF19ZN2M1012	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
HUF19ZN7M1039	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
HUF22BDT2034	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif

Referans suş ATCC 19258 ile FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan *S. thermophilus* suşları, biyokimyasal doğrulamalarda beklenen sonuçları göstermiştir.

4.2.3. DNA İzolasyonu

S. thermophilus suşlarından genomik DNA izolasyonu, deneysel çalışmalar 3.2.2.5. başlığında belirtilen metoda göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 25, tez çalışması kapsamında qPCR analizi gerçekleştirilecek olan tüm *S. thermophilus* suşları için gerçekleştirilen genomik DNA izolasyonu sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 25. Tüm mikroorganizmalar ve tüm genler için qPCR analizinde kullanılan DNA izolatları.

Suşlar	DNA Konsantrasyonu (ng/µL)	Ortalama DNA Konsantrasyonu +SD (ng/µL)	DNA Saflığı (A260/A280)
ATCC 19258	108,50	114,75 ± 8,84 ^a	1,89
	121,00		1,89
HUF19ZN2M1012	106,50	107,75 ± 1,77 ^a	1,88
	109,00		1,87
HUF19ZN7M1039	113,90	117,95 ± 5,73 ^a	1,86
	122,00		1,86
HUF22BDT2034	122,30	122,95 ± 0,92 ^a	1,86
	123,60		1,87
Ortalama	114,90		

S. thermophilus ATCC 19258, *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012, *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039 VE *S. thermophilus* HUF22BDT2034 suşlarına ait DNA konsantrasyonları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır ($p < 0.05$).

Mikroorganizmaların genomik DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA konsantrasyon değerlerine göre bir grup içerisinde karşılaştırıldığında, aynı harflere sahip değerler (ortalama ± SD, n=2) nedeniyle Tukey testine göre aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p < 0.05$). Bu çalışmada qPCR protokolüne göre, kullanılacak DNA

konsantrasyonun 50-100 ng/ μ L olması gerekmektedir. Dolayısıyla genomik DNA izolatlarının konsantrasyon değerleri, qPCR analizinde kullanılmaya uygun niteliktedir.

Genomik DNA izolatlarının saflığının kontrolü için A260/280 oranınının 1.8-2.0 aralığında olması gerekmektedir [113]. Bu kriter göz önünde bulundurulduğunda, izolatların saflığı belirtilen aralıkta olduğundan dolayı ileri analizler için kullanılabilir durumdadır.

Elde edilen uygun miktar ve saflık değerlerine sahip genomik DNA izolatları, qPCR uygulaması geręekleřtirilene kadar Eppendorf tüplerinde -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.4. *Streptococcus thermophilus* İzolatlarında CRISPR-Cas Tip II Bölgesinin Tespiti Amacıyla qPCR Uygulaması

S. thermophilus izolatlarının CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti; Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genlerinin ve Tip II-C sistemine ait olan Cas9 geninin 4.1.4. Primer Tasarımı başlığında tasarlanan qPCR primerleri ile geręekleřtirilmiřtir.

S. thermophilus suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin tespiti amacıyla uygulanan qPCR analizi sonucu elde edilen verilerin Cq değerleri ve Tm sıcaklıkları, referans suş ile karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.2.4.1. CRISPR-Cas Tip II-A Bölgesi Cas9 Geni için qPCR Analizi

S. thermophilus suşlarının CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti amacıyla ilk olarak, CRISPR-Cas Tip II bölgesine ait Tip II-A alt tipine ait Cas9 geninin qPCR analizi geręekleřtirilmiřtir.

Çizelge 26, *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 24. *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçları (16.05.2023)

Suşlar	Cq	Ortalama Cq + SD	Tm	Ortalama Tm + SD	Sonuç
NTC	-	-	-	-	Negatif
	33,45		76,18		
ATCC 19258	32,94	33,06 ± 0,35	76,18	76,19 ± 0,01	Pozitif
	32,79		76,20		
	34,21		76,18		
HUF19ZN2M1012	33,95	34,20 ± 0,25	76,15	76,16 ± 0,02	Pozitif
	34,20		76,16		
	33,85		76,19		
HUF19ZN7M1039	33,44	33,90 ± 0,49	76,18	76,12 ± 0,10	Pozitif
	34,41		75,99		
	32,87		76,17		
HUF22BDT2034	32,99	32,21 ± 0,59	76,17	75,99 ± 0,20	Pozitif
	31,77		75,92		

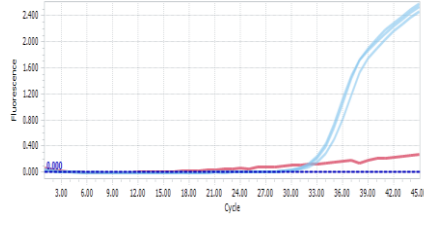
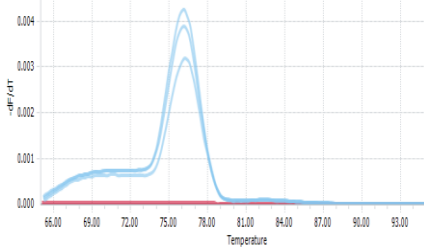
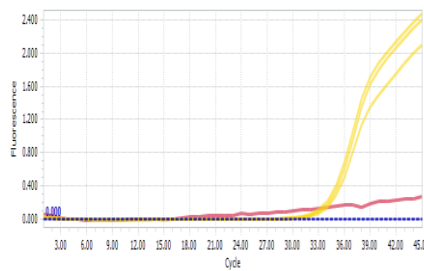
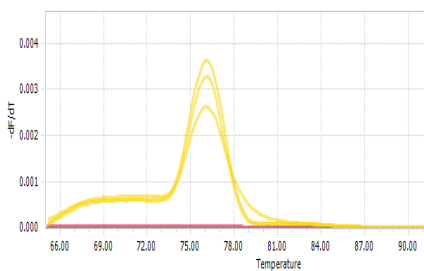
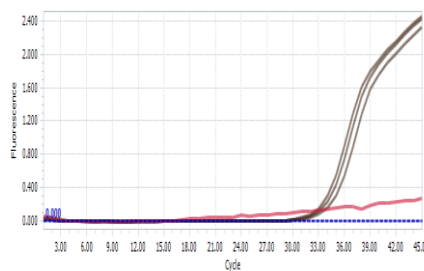
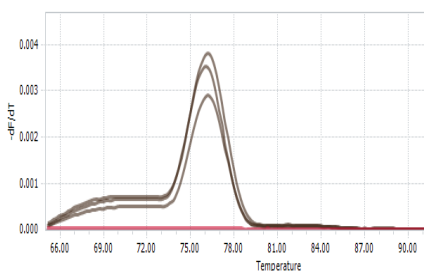
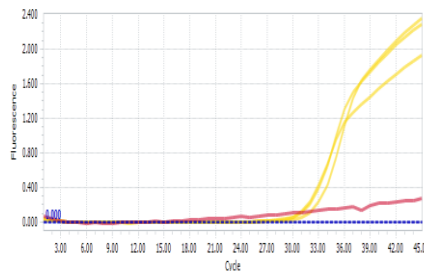
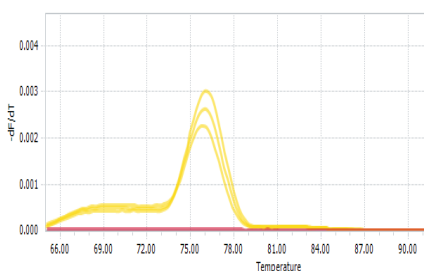
Çizelge 26, aynı tarihte ve bir operatör tarafından yapılan analizin sonuçlarını göstermektedir. Elde edilen Cq değerlerinin ve Tm sıcaklıklarının grafikleri incelenmiştir.

Çizelge 26'ya göre CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine Cas9 geninin qPCR analizi sonucunda; ATCC 19258 *S. thermophilus* suşunun ortalama Cq değeri $33,06 \pm 0,35$, HUF19ZN2M1012 suşunun ortalama Cq değeri $34,20 \pm 0,25$, HUF19ZN7M1039 suşunun ortalama Cq değeri $33,90 \pm 0,49$ ve HUF22BDT2034 *S. thermophilus* suşunun ortalama Cq değeri $32,21 \pm 0,59$ olarak elde edilmiştir. Çizelge 27'de bu sonuçlara ilişkin amplifikasyon eğrileri görülmektedir.

Yine Çizelge 26'ya göre CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine Cas9 geninin qPCR analizi sonucunda; ATCC 19258 suşunun ortalama Tm değeri $76,19 \pm 0,01$, HUF19ZN2M1012 suşunun ortalama Tm değeri $76,60 \pm 0,02$, HUF19ZN7M1039 suşunun ortalama Tm değeri $76,12 \pm 0,10$ ve HUF22BDT2034 suşunun ortalama Tm değeri $75,99 \pm 0,20$ olarak elde edilmiştir. Çizelge 27'de bu sonuçlara ilişkin erime eğrileri görülmektedir.

Mikroorganizmaların qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerine göre bir grup içerisinde referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile karşılaştırıldığında, diğer suşlar ile arasında fark bulunmamaktadır.

Çizelge 25. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 genine ait qPCR amplifikasyon ve erime eğrileri

Suşlar	Amplifikasyon Eğrisi	Erime Eğrisi
ATCC 19258		
HUF19ZN2M1012		
HUF19ZN7M1039		
HUF22BDT2034		
NTC	-	-

4.2.4.2. CRISPR-Cas Tip II-A Bölgesi Csn2 Geni için qPCR Analizi

S. thermophilus suşlarının CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespitinin ikinci adımı olarak, CRISPR-Cas Tip II bölgesine ait Tip II-A alt tipine ait Csn2 geninin qPCR analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 28, CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 geni için qPCR analizi sonuçlarını, qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerini ve bu değerlerin ortalamalarını göstermektedir.

Çizelge 26. *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 geni için qPCR analizi sonuçları. Analiz tarihi 16.05.2023.

Suşlar	Cq	Ortalama Cq + SD	Tm	Ortalama Tm + SD	Sonuç
NTC	-	-	-	-	Negatif
	38,18		77,37		
ATCC 19258	39,51	38,72 ± 0,70	75,76	76,30 ± 0,92	Pozitif
	38,48		75,78		
	37,05		75,59		
HUF19ZN2M1012	37,71	37,65 ± 0,57	75,78	75,69 ± 0,10	Pozitif
	38,18		75,72		
	35,83		75,74		
HUF19ZN7M1039	37,95	36,81 ± 1,07	75,32	75,53 ± 0,21	Pozitif
	36,66		75,53		
	37,24		75,53		
HUF22BDT2034	36,13	36,25 ± 0,94	75,7	75,63 ± 0,09	Pozitif
	35,37		75,67		

Çizelge 28, *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 geni için qPCR analizi sonuçlarını göstermektedir. Çizelge, aynı tarihte ve aynı anda yapılan analizin sonuçlarını göstermektedir. Elde edilen Cq değerlerinin ve Tm sıcaklıklarının grafikleri incelenmiştir.

Çizelge 28'e CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine Csn2 geninin qPCR analizi sonucunda; ATCC 19258 suşunun ortalama Cq değeri $38,72 \pm 0,70$, HUF19ZN2M1012 suşunun ortalama Cq değeri $37,65 \pm 0,57$, HUF19ZN7M1039 suşunun ortalama Cq değeri $36,81 \pm 1,07$ ve HUF22BDT2034 suşunun ortalama Cq değeri $36,25 \pm 0,94$ olarak elde edilmiştir.

Yine Çizelge 28'e göre CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine Csn2 geninin qPCR analizi sonucunda; ATCC 19258 suşunun ortalama Tm değeri $76,30 \pm 0,92$, HUF19ZN2M1012 suşunun ortalama Tm değeri $75,69 \pm 0,10$, HUF19ZN7M1039 suşunun ortalama Tm değeri $75,53 \pm 0,21$ ve HUF22BDT2034 suşunun ortalama Tm değeri $75,63 \pm 0,09$ olarak elde edilmiştir.

Çizelge 27, CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 genine ait qPCR amplifikasyon ve erime eğrilerini göstermektedir. Mikroorganizmaların qPCR analizi sonucu elde edilen Cq değerleri, referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile karşılaştırıldığında, kendi içlerinde fark bulunmamaktadır. Tm değerlerine göre de referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile çalışmada kullanılan diğer suşlar karşılaştırıldığında, bir fark gözlenmemiştir.

Çizelge 28. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 genine ait qPCR amplifikasyon ve erime eğrileri.

Suşlar	Amplifikasyon Eğrisi	Erime Eğrisi
ATCC 19258		
HUF19ZN2M1012		
HUF19ZN7M1039		
HUF22BDT2034		
NTC	-	-

4.2.4.3. CRISPR-Cas Tip II-C Bölgesi Cas9 Geni için qPCR Analizi

S. thermophilus suşlarının CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespitinin son adımı olarak, CRISPR-Cas Tip II bölgesine ait Tip II-C alt tipine ait Cas9 geninin qPCR analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 30, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçlarını göstermektedir. Çizelge, qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerini ve bu değerlerin ortalamalarını göstermektedir.

Çizelge 31, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni amplifikasyon ve erime eğrileri göstermektedir. Suşların qPCR analiz sonuçlarını değerlendirmek için bu tabloda eğrileri verilen değerlerden yararlanılmıştır.

Çizelge 30. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçları. Analiz tarihi 16.05.2023.

Suş No	Cq	Ortalama Cq + SD	Tm	Ortalama Tm + SD	Sonuç
NTC	-	-	-	-	Negatif
	34,27		76,33		
ATCC 19258	33,94	34,19 ± 0,23	76,30	76,25 ± 0,12	Pozitif
	34,37		76,11		
	37,40		76,14		
HUF19ZN2M1012	34,54	35,60 ± 1,57	76,14	76,13 ± 0,02	Pozitif
	34,85		76,11		
	34,74		76,35		
HUF19ZN7M1039	33,89	34,09 ± 0,57	76,13	76,20 ± 0,13	Pozitif
	33,65		76,13		
	32,12		75,8	-	
HUF22BDT2034	32,78	32,55 ± 0,37	75,78	78,60	Şüpheli
	32,75		75,74	78,77	Pozitif

Çizelge 30, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için qPCR analizi sonuçlarını göstermektedir. Çizelge, aynı tarihte ve aynı anda yapılan analizin sonuçlarını göstermektedir. Elde edilen Cq değerlerinin ve Tm sıcaklıklarının grafikleri incelenmiştir.

Mikroorganizmaların qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerine göre referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile diğer suşlar karşılaştırıldığında *S. thermophilus* HUF19ZN2M1012 ve *S. thermophilus* HUF19ZN7M1039 aralarında bir fark olmadığı söylenebilir. *S. thermophilus* HUF22BDT2034 suşu ise erime eğrisi profili bakımından diğerlerinden farklı görünmektedir. Daha önceden yapılmış olan bir tez çalışmasına göre [114] CRISPR lokusları buldukları mikroorganizmalarda polimorfizm göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan primer ile *S. thermophilus* HUF22BDT2034 suşu için iki farklı bölgede amplifikasyon olduğu ve bunun olası polimorfizme dayandığı düşünülebilir. Ancak bu suşun 75,8 °C'de bir Tm vermesi nedeniyle erime eğrisi sonuçları şüpheli pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 31. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni amplifikasyon ve erime eğrileri.

Suşlar	Amplifikasyon Eğrisi	Erime Eğrisi
ATCC 19258		
HUF19ZN2M1012		
HUF19ZN7M1039		
HUF22BDT2034		
NTC		

4.3. *Streptococcus thermophilus* İzolatlarında CRISPR-Cas Tip II Bölgesinin Tespiti Amacıyla Uygulanan qPCR Analizinin Doğrulanması

S. thermophilus suşlarında CRISPR-Cas Tip-II bölgesinin tespiti amacıyla uygulanan qPCR analiz sonuçlarının doğrulanması amaçlanmıştır. Çizelge 32, *S. thermophilus* suşlarında qPCR analizinin doğrulanması amacıyla farklı tarihlerde uygulanan analizleri göstermektedir.

Çizelge 32. *S. thermophilus* suşlarında qPCR analizinin doğrulanması amacıyla uygulanan analizler.

Suşlar	Çizelge 21 ve 22’de verilen primerler kullanılarak qPCR uygulama tekrarı	
	Tip II-A Cas9 tarama	Tip II-C Cas9
ATCC 19258		
HUF19ZN2M1012	Tip II-A Csn2	Tip II-C Cas9
HUF19ZN7M1039	-	-
HUF22BDT2034	-	Tip II-C Cas9

Çizelgeye göre *S. thermophilus* qPCR analizinin doğrulanması amacıyla ATCC 19258 ve HUF19ZN2M1012 suşlarında Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genleri ile; HUF19ZN2M1039 suşunda Tip II-A bölgesi Cas9 geni ile, HUF22BDT2034 suşunda Tip II-A bölgesi Cas9 geni ve Tip II-C bölgesi Cas9 geni ile doğrulama analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 33, CRISPR-Cas Tip II- A Bölgesi Cas9 geninin qPCR analizinin doğrulanması için farklı tarihlerde tekrarlanan analizleri göstermektedir. Bu doğrultuda CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin varlığının doğrulanması amacıyla tüm suşlarda doğrulama analizi gerçekleştirilmiştir. CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin varlığının doğrulanması amacıyla ATCC 19258 ve HUF19ZN2M1012 suşlarında; CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin varlığının doğrulanması amacıyla ATCC 19258, HUF19ZN2M1012 ve HUF22BDT2034 suşlarında doğrulama analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 33. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II- A Bölgesi Cas9 geninin qPCR analizinin doğrulaması.

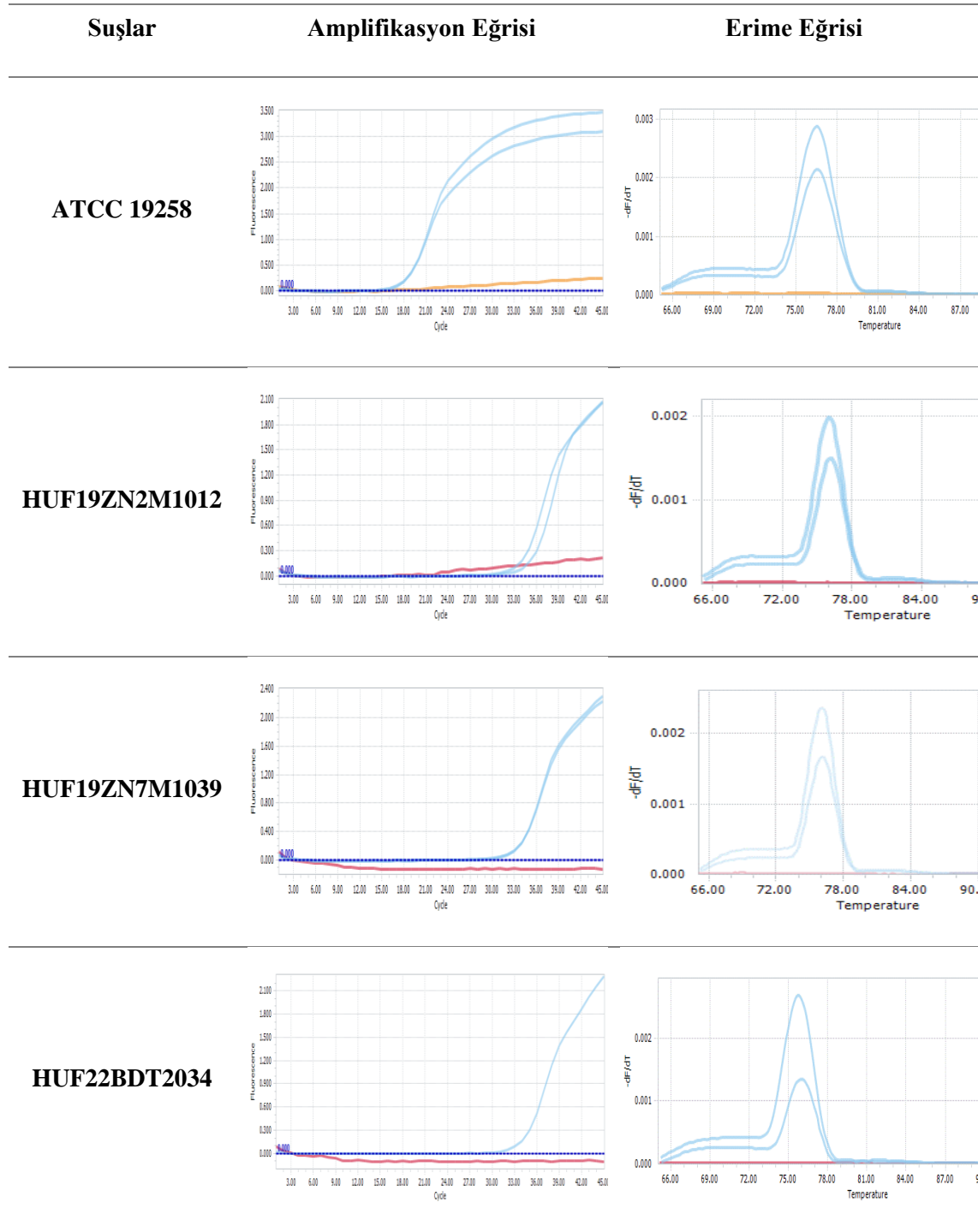
Suş No	Cq	Ortalama Cq + SD	Tm	Ortalama Tm + SD	Sonuç
ATCC 19258	18,24	18,24 ± 0	76,58	76,59 ± 0,7	Pozitif
	18,24		76,59		
HUF19ZN2M1012	35,37	34,79 ± 0,83	76,18	76,09 ± 0,13	Pozitif
	34,20		76,00		
HUF19ZN7M1039	33,65	33,67 ± 0,03	76,18	76,10 ± 0,12	Pozitif
	33,69		76,01		
HUF22BDT2034	39,53	36,95 ± 3,66	75,99	75,90 ± 0,13	Pozitif
	34,36		75,80		

*Farklı tarihlerde gerçekleştirilne doğrulama analizlerinin tamamında NTC kullanılmış ve negatif sonuç elde edilmiştir.

Mikroorganizmaların qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerine göre referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile diğer suşlar karşılaştırılmış, ve aralarında kalitatif analiz uygulanması bakımından bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 34, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 geninin analizinin doğrulanmasına ait amplifikasyon ve erime eğrilerini göstermektedir.

Çizelge 34. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Cas9 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrileri.



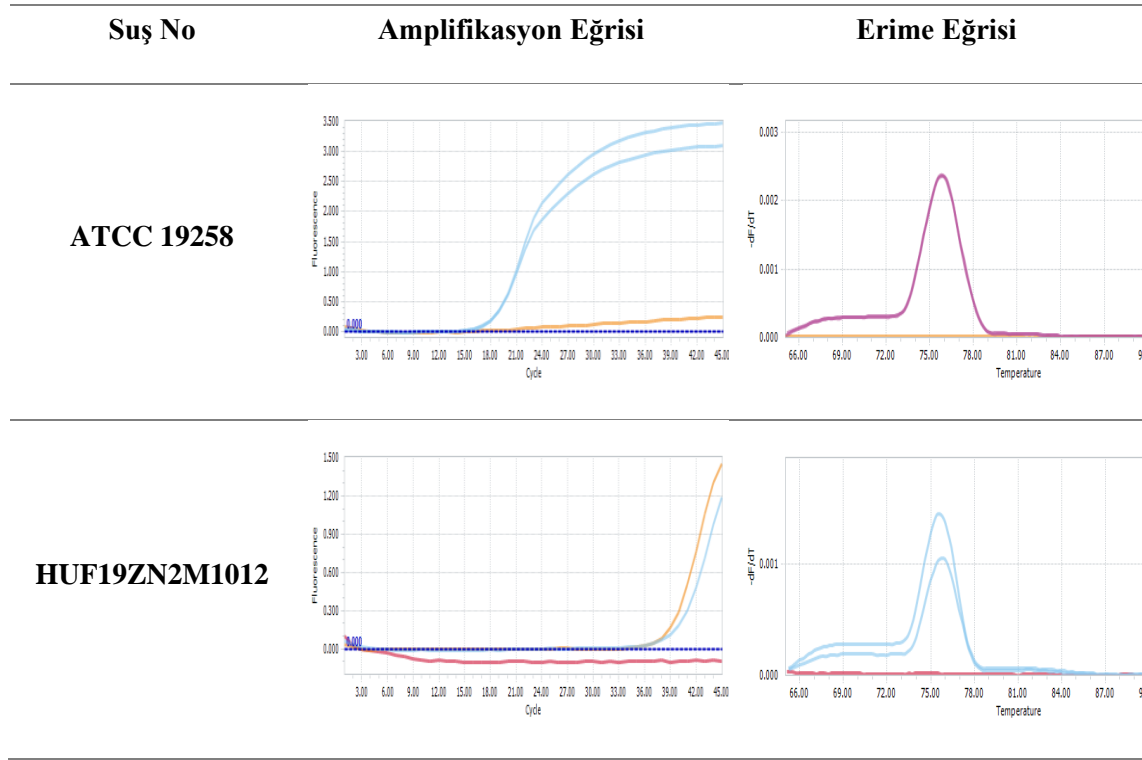
Çizelge 35, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II- A Bölgesi Csn2 geninin farklı tarihlerde uygulanan qPCR analizinin doğrulama sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 35. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II- A Bölgesi Csn2 geninin qPCR analizinin doğrulaması.

Suş No	Cq	Ortalama Cq + SD	Tm	Ortalama Tm + SD	Sonuç
ATCC 19258	20,21	20,25 ± 0,05	75,76	75,85 ± 0,12	Pozitif
	20,28		75,93		
HUF19ZN2M1012	40,11	39,74 ± 0,53	75,78	75,70 ± 0,11	Pozitif
	39,36		75,62		
NTC	-	-	-	-	-

Mikroorganizmalar için tekrarlanan qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerine göre referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile diğer suşlar karşılaştırılmış, ve aralarında kalitatif analiz uygulanması bakımından bir fark olmadığı gözlenmiştir. Çizelge 36'da ise çalışmada elde edilen amplifikasyon ve erime eğrileri verilmiştir.

Çizelge 29. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A bölgesi Csn2 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrileri.



Çizelge 37, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C Bölgesi Cas9 geninin farklı tarihlerde uygulanan qPCR analizinin doğrulamasına ait sonuçları göstermektedir.

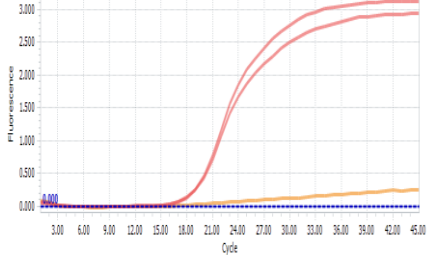
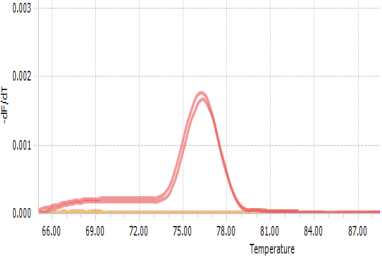
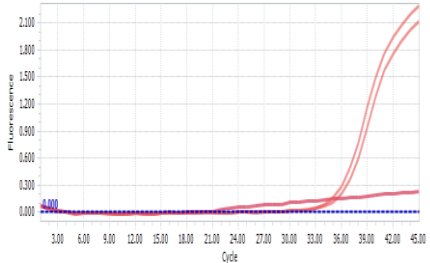
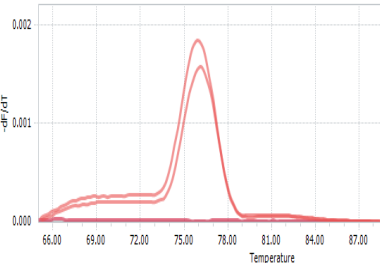
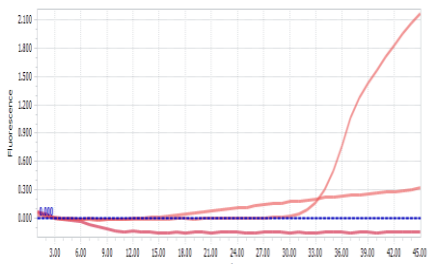
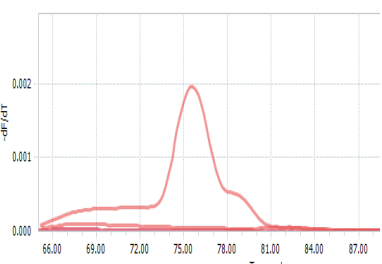
Çizelge 30. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C Bölgesi Cas9 geninin qPCR analizinin doğrulaması.

Suş No	Cq	Ortalama Cq + SD	Tm	Ortalama Tm + SD	Sonuç
ATCC 19258	18,76	18,75 ± 0,02	76,39	76,27 ± 0,17	Pozitif
	18,73		76,15		
HUF19ZN2M1012	35,42	35,68 ± 0,37	76,19	76,08 ± 0,16	Pozitif
	35,94		75,97		
HUF22BDT2034	-	33,31 ± 0	-	75,57 ± 0	Pozitif
	33,31		75,57		
NTC					

Mikroorganizmalar için tekrarlanan qPCR analizi sonucu elde edilen Cq ve Tm değerlerine göre referans suş *S. thermophilus* ATCC 19258 ile diğer suşlar karşılaştırılmış, ve aralarında kalitatif analiz uygulanması bakımından bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 38, *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrilerini göstermektedir.

Çizelge 31. *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesi Cas9 geni için doğrulama analizinin amplifikasyon ve erime eğrileri

Suş No	Amplifikasyon Eğrisi	Erime Eğrisi
ATCC 19258		
HUF19ZN2M1012		
HUF22BDT2034		

Bu bölümde elde edilen doğrulama analiz sonuçları değerlendirildiğinde aşağıda sıralandığı biçimde özetlenebilir:

- HUF19ZN2M1012, HUF19ZN2M1039 ve HUF22BDT2034 suşları, CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin qPCR doğrulama analizi sonucunda elde edilen hem Cq hem de Tm değerleri, referans suş ATCC 19258 ile karşılaştırıldığında, aralarında fark bulunmamaktadır. Doğrulama analizleri aynı zamanda 16.05.2023 tarihinde gerçekleştirilen qPCR analizi ile de karşılaştırılmış, sonuçların birbirleri ile tutarlı ve pozitif oldukları söylenebilir.

- HUF19ZN2M1012 suşu, CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin qPCR doğrulama analizi sonucunda elde edilen hem Cq hem de Tm değerleri, referans suş ATCC 19258 ile karşılaştırıldığında, aralarında fark bulunmamaktadır. Doğrulama analizleri aynı zamanda 16.05.2023 tarihinde gerçekleştirilen qPCR analizi ile de karşılaştırılmış, sonuçların birbirleri ile tutarlı ve pozitif oldukları sonucuna varılmıştır.
- HUF19ZN2M1012, HUF19ZN2M1039 ve HUF22BDT2034 suşları, CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin qPCR doğrulama analizi sonucunda elde edilen hem Cq hem de Tm değerleri, referans suş ATCC 19258 ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu HUF19ZN2M1012 ve HUF19ZN2M1039 suşlarına ait değerler ile referans suş ATCC 19258 arasında fark bulunmamaktadır. HUF22BDT2034 suşu ile ATCC 19258 suşuna ait Tm değerleri arasında belirgin bir fark olduğu görülmektedir. Doğrulama analizleri 16.05.2023 tarihinde gerçekleştirilen qPCR analizi ile de karşılaştırılmış, sonuçların birbirleri ile tutarlı, HUF19ZN2M1012 ve HUF19ZN2M1039 suşlarının pozitif oldukları, HUF22BDT2034 suşunun ile şüpheli pozitif olduğu sonucuna varılmıştır.

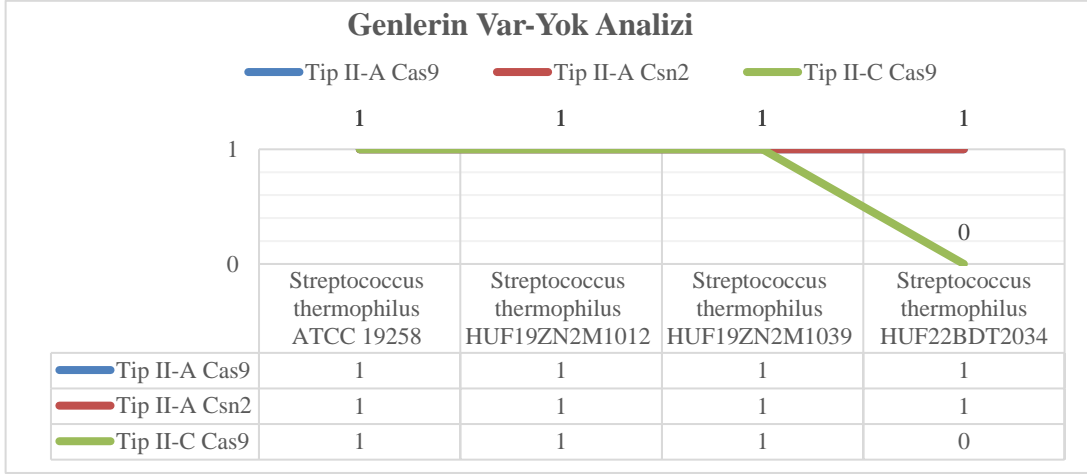
5. YORUM

Bu çalışma, yerel bir süt işletmesinden izole edilen ve endüstriyel süt ürünlerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan *S. thermophilus* suşlarının bakteriyofaj direnç genlerine sahip olup olmadıklarının tespiti ile ilgili bir bakış açısı sunmaktadır. Gıda endüstrisinde kullanılacak olan mikroorganizmalardan uygun suşların belirlenmesinde CRISPR-Cas sistemlerinin tespitinin, gıda kayıplarının önlenmesi ve fermantasyon prosesinin kesintisiz sürebilmesi açısından önemli olabileceğini düşünülmektedir.

Tez çalışmasının sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

1. Çalışmanın *in silico* kısmı ile, referans olarak seçilen *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunun, kanıt düzeyi 4 olan CRISPR-Cas genlerine sahip olduğunun tespit edilmesinin ardından, CRISPR-Cas Tip II sistemlerinin tespiti amacıyla Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genleri, Tip II-C bölgesinin tespiti için ise Cas9 genlerinin sekansları elde edilmiştir. Genlere ait sekanslar NCBI veritabanına kayıtlı *S. thermophilus* suşları ile hizalanmış ve en uygun özelliğe sahip qPCR primerleri tasarlanarak *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere sentezlenmiştir.
2. Çalışmanın *in vitro* kısmında ise, Hacettepe Üniversitesi FoodOmics Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda yer alan ve yerel bir süt işletmesinden izole edilen *S. thermophilus* suşlarının canlandırılmasının ardından, tanımlanmalarının doğrulanması amacıyla biyokimyasal testler uygulanmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, suşların *S. thermophilus*'un spesifik özellikleri ile örtüştüğü tespit edilmiştir.
3. Biyokimyasal testler ile tanımlaması doğrulanmış suşlardan uygun saflık ve nükleik asit değerlerine sahip genomik DNA izolatları, qPCR uygulamasının gerçekleştirilmesi amacıyla elde edilmiştir.
4. *S. thermophilus* suşlarının CRISPR-Cas Tip II-A bölgesinin tespiti amacıyla seçilen Cas9 ve Csn2 genleri ve Tip II-C bölgesi için seçilen Cas9 genlerinin var-yok analizinin sağlanması amacıyla qPCR uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucu genlerin var-yok analizinin özeti Şekil 18'de gösterilmiştir. HUF22BDT2034

suşu için elde edilen sonuçlar şüpheli pozitif durumu işaret ettiğinden bu tabloda negatif olarak değerlendirmeye alınmıştır.



Şekil 18. *S. thermophilus* suşları için CRISPR-Cas Tip II bölgesine ait seçilen genlerin var-yok analizi.

S. thermophilus suşlarında CRISPR-Cas Tip II sistemlerinin tespiti amacıyla uygulanan qPCR analizi sonucunda; *S. thermophilus* ATCC 19258 suşunda CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C sistemlerinin varlığı; *in silico* olarak veritabanları aracılığıyla, *in vitro* olarak ise seçilen genlerin qPCR analizinin pozitif sonuç göstermiştir. HUF19ZN2M1012 ve HUF19ZN2M1039 kodlu *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin varlığı, seçilen primerler ve qPCR analiz sonuçları ile kanıtlanmıştır. *S. thermophilus* HUF22BDT2034 suşu için CRISPR-Cas Tip II-C bölgesinin tespiti amacıyla seçilen Cas9 geninin amplifikasyon ve erime eğrileri referans suş ile karşılaştırıldığında, Tm sıcaklıkları arasında bir fark olduğu, ayrıca suşa ait erime eğrisinin de omuz yaptığı gözlemlenmiştir. HUF22BDT2034 suşunda bu bölgenin tespiti için şüpheli pozitif sonucu elde edilmiştir.

Bu çalışmada CRISPR-Cas Tip II sistemlerinin tespit edilmesinde burada tanımlanan primer tasarlama metodolojisi ve bu primerlerin qPCR metodu ile *S. thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-A ve Tip II-C bölgelerinin varlığını kanıtlamak için kullanılabilirliği ve etkinliği gösterilmiştir.

Bunun yanısıra ileri çalışmalar için CRISPR haritalarının ve lokuslarının tespit edilmesinde yeni jenerasyon dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) yapılması önem arz etmektedir. NGS ve biyoinformatik analizler ile CRISPR-Cas sistemlerinin ayrıntılı dağılım ve tespitinin gerçekleştirilmesi, adaptif bağışıklık sistemlerinin varlığı doğrulanan suşlara bakteriyofaj muamelesinin uygulanması ile direnç genlerinin aktifliğinin test edilmesi nerilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] A. Endo, Y. Tanizawa, M. Arita, Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples, *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols*, (2019) 3-13.
- [2] J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti, C.M.A.P. Franz, H.M.B. Harris, P. Mattarelli, P.W. O'toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70 (2020) 2782-2858.
- [3] Z.G. Cerit, Beyaz Peynir ve Süt İşleme Tesisinden İzole Edilen Mikrobiyotanın Karakterizasyonu, (2020).
- [4] P. Horvath, A.-C. Coûté-Monvoisin, D.A. Romero, P. Boyaval, C. Fremaux, R. Barrangou, Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes, *International journal of food microbiology*, 131 (2009) 62-70.
- [5] L. Ruiz-Rodríguez, J. Bleckwedel, M. Eugenia Ortiz, M. Pescuma, F. Mozzi, Lactic acid bacteria, *industrial biotechnology: microorganisms*, 1 (2017) 395-451.
- [6] D. Das, A. Goyal, Lactic acid bacteria in food industry, *Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology*, (2012) 757-772.
- [7] Z. Cerit, M.C. Baloglu, R. Yilmaz, BEYAZ PEYNİR MİKROBİYOTASINDA KÜLTÜROMİK VE SHOTGUN METAGENOMİK TEKNOLOJİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ, *Gıda*, 46 (2021) 566-582.
- [8] C. Söhngen, B. Bunk, A. Podstawka, D. Gleim, J. Overmann, BacDive—the bacterial diversity metadatabase, *Nucleic acids research*, 42 (2014) D592-D599.
- [9] J.M. Sherman, The streptococci, *Bacteriological reviews*, 1 (1937) 3-97.
- [10] J. Harnett, G. Davey, A. Patrick, C. Caddick, L. Pearce, Lactic Acid Bacteria | *Streptococcus thermophilus*, in: J.W. Fuquay (Ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), Academic Press, San Diego, 2011, pp. 143-148.
- [11] W.M.A. Mullan, STARTER CULTURES | Importance of Selected Genera, in: C.A. Batt, M.L. Tortorello (Eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), Academic Press, Oxford, 2014, pp. 515-521.

- [12] A. Holding, J. Collee, Chapter I Routine biochemical tests, *Methods in microbiology*, Elsevier 1971, pp. 1-32.
- [13] A.E. Yousef, C. Carlstrom, *Food microbiology: A laboratory manual*, John Wiley & Sons 2003.
- [14] M.A. Hayat, *Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications*, Edward Arnold. 1981.
- [15] U. Kubitscheck, *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*, John Wiley & Sons 2017.
- [16] L.M. De la Maza, M.T. Pezzlo, C.E. Bittencourt, E.M. Peterson, *Color atlas of medical bacteriology*, John Wiley & Sons 2020.
- [17] S.T. Cowan, *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, Cambridge university press 1993.
- [18] L. Cocolin, D. Ercolini, *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*, Springer Science & Business Media 2007.
- [19] *S. thermophilus Growth Test Procedure*, Culture Collection University of Gothenburg, 2023.
- [20] W.F. Harrigan, M.E. McCance, *Laboratory methods in microbiology*, Academic press 2014.
- [21] T. Hu, Y. Cui, X. Qu, Characterization and comparison of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*, *Archives of microbiology*, 202 (2020) 695-710.
- [22] K.S. Makarova, D.H. Haft, R. Barrangou, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, Y.I. Wolf, A.F. Yakunin, Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems, *Nature Reviews Microbiology*, 9 (2011) 467-477.
- [23] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, 315 (2007) 1709-1712.
- [24] R. Barrangou, L.A. Marraffini, CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity, *Molecular cell*, 54 (2014) 234-244.
- [25] E.V. Koonin, K.S. Makarova, Origins and evolution of CRISPR-Cas systems, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 374 (2019) 20180087.

- [26] E.V. Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Current opinion in microbiology*, 37 (2017) 67-78.
- [27] Ö. Kılıç Tosun, Z. Kesmen, CRISPR-Cas uygulamaları, potansiyel riskler ve yasal düzenlemeler, *Helal ve Etik Araştırmalar Dergisi* | *Journal of Halal and Ethical Research*, (2022).
- [28] Z. Khan, Z. Ali, A.A. Khan, T. Sattar, A. Zeshan, T. Saboor, B. Binyamin, History and Classification of CRISPR/Cas System, *The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing*, (2022) 29-52.
- [29] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, J. Iranzo, S.A. Shmakov, O.S. Alkhnbashi, S.J. Brouns, E. Charpentier, D. Cheng, D.H. Haft, P. Horvath, Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nature Reviews Microbiology*, 18 (2020) 67-83.
- [30] R. Barrangou, J. Van Der Oost, CRISPR-Cas systems, RNA-Mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea. 1010079783642346576th ed. Heidelberg SVB, editor, (2013).
- [31] S. Shmakov, A. Smargon, D. Scott, D. Cox, N. Pyzocha, W. Yan, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, K.S. Makarova, Y.I. Wolf, Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems, *Nature reviews microbiology*, 15 (2017) 169-182.
- [32] R. Jansen, J.D.A.v. Embden, W. Gaastra, L.M. Schouls, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Molecular microbiology*, 43 (2002) 1565-1575.
- [33] P. Horvath, R. Barrangou, CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea, *Science*, 327 (2010) 167-170.
- [34] A. Roberts, R. Barrangou, Applications of CRISPR-Cas systems in lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 44 (2020) 523-537.
- [35] A.E. Briner, G.A. Lugli, C. Milani, S. Duranti, F. Turrone, M. Gueimonde, A. Margolles, D. Van Sinderen, M. Ventura, R. Barrangou, Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *Bifidobacterium*, *PloS one*, 10 (2015) e0133661.
- [36] X. Song, H. Huang, Z. Xiong, L. Ai, S. Yang, CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted genome editing in *Lactobacillus casei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (2017) e01259-01217.

- [37] C. Hidalgo-Cantabrana, Y.J. Goh, M. Pan, R. Sanozky-Dawes, R. Barrangou, Genome editing using the endogenous type I CRISPR-Cas system in *Lactobacillus crispatus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (2019) 15774-15783.
- [38] A.B. Crawley, E.D. Henriksen, E. Stout, K. Brandt, R. Barrangou, Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in lactobacilli, *Scientific reports*, 8 (2018) 11544.
- [39] H. Huang, X. Song, S. Yang, Development of a RecE/T-assisted CRISPR–Cas9 toolbox for *Lactobacillus*, *Biotechnology Journal*, 14 (2019) 1800690.
- [40] I.S. Myrbråten, K. Wiull, Z. Salehian, L.S. Håvarstein, D. Straume, G. Mathiesen, M. Kjos, CRISPR interference for rapid knockdown of essential cell cycle genes in *Lactobacillus plantarum*, *Msphere*, 4 (2019) e00007-00019.
- [41] R.T. Leenay, J.M. Vento, M. Shah, M.E. Martino, F. Leulier, C.L. Beisel, Genome editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* revealed that editing outcomes can vary across strains and between methods, *Biotechnology Journal*, 14 (2019) 1700583.
- [42] D. Zhou, Z. Jiang, Q. Pang, Y. Zhu, Q. Wang, Q. Qi, CRISPR/Cas9-assisted seamless genome editing in *Lactobacillus plantarum* and its application in N-acetylglucosamine production, *Applied and Environmental Microbiology*, 85 (2019) e01367-01319.
- [43] J.-H. Oh, J.-P. van Pijkeren, CRISPR–Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*, *Nucleic acids research*, 42 (2014) e131-e131.
- [44] T. Guo, Y. Xin, Y. Zhang, X. Gu, J. Kong, A rapid and versatile tool for genomic engineering in *Lactococcus lactis*, *Microbial Cell Factories*, 18 (2019) 1-12.
- [45] M.-L. Lemay, A. Otto, S. Maaß, K. Plate, D. Becher, S. Moineau, Investigating *Lactococcus lactis* MG1363 Response to Phage p2 Infection at the Proteome Level*[S], *Molecular & Cellular Proteomics*, 18 (2019) 704-714.
- [46] S. van der Els, J.K. James, M. Kleerebezem, P.A. Bron, Versatile Cas9-driven subpopulation selection toolbox for *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (2018) e02752-02717.
- [47] K. Selle, T.R. Klaenhammer, R. Barrangou, CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (2015) 8076-8081.

- [48] B. Martel, S. Moineau, CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages, *Nucleic acids research*, 42 (2014) 9504-9513.
- [49] A. Goma, H. Klumpe, M. Luo, K. Selle, R. Barrangou, C. Beisel, Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *MBio* 5, e00928–00913, 2014.
- [50] T. Gong, B. Tang, X. Zhou, J. Zeng, M. Lu, X. Guo, X. Peng, L. Lei, B. Gong, Y. Li, Genome editing in *Streptococcus mutans* through self-targeting CRISPR arrays, *Molecular Oral Microbiology*, 33 (2018) 440-449.
- [51] Ö.K. Ilikan, Laktik Asit Bakterilerinde CRISPR/Cas Sisteminin Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliğinde Kullanımı, *Akademik Gıda*, 18 (2020) 303-311.
- [52] N.H.G.R. Institue, KNOCKOUT, Web Page, 2023.
- [53] S. Sulaiman, N.S. Yusoff, N.S. Mun, H. Makmur, M. Firdaus-Raih, Inference of horizontal gene transfer: Gaining insights into evolution via lateral acquisition of genetic material, (2019).
- [54] K. Chylinski, K.S. Makarova, E. Charpentier, E.V. Koonin, Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems, *Nucleic acids research*, 42 (2014) 6091-6105.
- [55] R. Shah, R.J. Bennett, S.C. West, Genetic recombination in *E. coli*: RuvC protein cleaves Holliday junctions at resolution hotspots in vitro, *Cell*, 79 (1994) 853-864.
- [56] L. Zhang, D. Xu, Y. Huang, X. Zhu, M. Rui, T. Wan, X. Zheng, Y. Shen, X. Chen, K. Ma, Structural and functional characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease, *Scientific Reports*, 7 (2017) 42542.
- [57] M. Dsouza, N. Larsen, R. Overbeek, Searching for patterns in genomic data, *Trends in Genetics*, 13 (1997) 497-498.
- [58] I. Grissa, G. Vergnaud, C. Pourcel, CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats, *Nucleic acids research*, 35 (2007) W52-W57.
- [59] R.C. Edgar, PILER-CR: fast and accurate identification of CRISPR repeats, *BMC bioinformatics*, 8 (2007) 1-6.

- [60] C. Bland, T.L. Ramsey, F. Sabree, M. Lowe, K. Brown, N.C. Kyrpides, P. Hugenholtz, CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats, *BMC bioinformatics*, 8 (2007) 1-8.
- [61] A. Biswas, R.H. Staals, S.E. Morales, P.C. Fineran, C.M. Brown, CRISPRDetect: a flexible algorithm to define CRISPR arrays, *BMC genomics*, 17 (2016) 1-14.
- [62] Y. Zhang, G. Zhao, F.Y.H. Ahmed, T. Yi, S. Hu, T. Cai, Q. Liao, In silico method in CRISPR/Cas system: an expedite and powerful booster, *Frontiers in Oncology*, 10 (2020) 584404.
- [63] C.T. Skennerton, *MinCED: Mining CRISPRs in Environmental Datasets.*, 2016.
- [64] A.G. Moller, C. Liang, MetaCRASST: reference-guided extraction of CRISPR spacers from unassembled metagenomes, *PeerJ*, 5 (2017) e3788.
- [65] C.T. Skennerton, M. Imelfort, G.W. Tyson, Crass: identification and reconstruction of CRISPR from unassembled metagenomic data, *Nucleic acids research*, 41 (2013) e105-e105.
- [66] M. Rho, Y.-W. Wu, H. Tang, T.G. Doak, Y. Ye, Diverse CRISPRs evolving in human microbiomes, *PLoS genetics*, 8 (2012) e1002441.
- [67] I. Grissa, G. Vergnaud, C. Pourcel, CRISPRcompar: a website to compare clustered regularly interspaced short palindromic repeats, *Nucleic acids research*, 36 (2008) W145-W148.
- [68] K. Wang, C. Liang, CRF: detection of CRISPR arrays using random forest, *PeerJ*, 5 (2017) e3219.
- [69] O.S. Alkhnbashi, F. Costa, S.A. Shah, R.A. Garrett, S.J. Saunders, R. Backofen, CRISPRstrand: predicting repeat orientations to determine the crRNA-encoding strand at CRISPR loci, *Bioinformatics*, 30 (2014) i489-i496.
- [70] Y. Naito, K. Hino, H. Bono, K. Ui-Tei, CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites, *Bioinformatics*, 31 (2015) 1120-1123.
- [71] O.S. Alkhnbashi, S.A. Shah, R.A. Garrett, S.J. Saunders, F. Costa, R. Backofen, Characterizing leader sequences of CRISPR loci, *Bioinformatics*, 32 (2016) i576-i585.

- [72] A.B. Crawley, J.R. Henriksen, R. Barrangou, CRISPRdisco: an automated pipeline for the discovery and analysis of CRISPR-Cas systems, *The CRISPR Journal*, 1 (2018) 171-181.
- [73] D. Couvin, A. Bernheim, C. Toffano-Nioche, M. Touchon, J. Michalik, B. Néron, E.P. Rocha, G. Vergnaud, D. Gautheret, C. Pourcel, CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins, *Nucleic acids research*, 46 (2018) W246-W251.
- [74] S.J. Lange, O.S. Alkhnbashi, D. Rose, S. Will, R. Backofen, CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems, *Nucleic acids research*, 41 (2013) 8034-8044.
- [75] Q. Zhang, Y. Ye, Not all predicted CRISPR–Cas systems are equal: isolated cas genes and classes of CRISPR like elements, *BMC bioinformatics*, 18 (2017) 1-12.
- [76] C. Pourcel, M. Touchon, N. Villeriot, J.-P. Vernadet, D. Couvin, C. Toffano-Nioche, G. Vergnaud, CRISPRCasdb a successor of CRISPRdb containing CRISPR arrays and cas genes from complete genome sequences, and tools to download and query lists of repeats and spacers, *Nucleic acids research*, 48 (2020) D535-D544.
- [77] CRISPRCas++, in: U.P.-S. Institut Pasteur (Ed.) <https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/> 2021.
- [78] A.G. Portal, ATCC Genome Portal User Guide, <https://www.atcc.org/-/media/resources/instruction-guides/genome-portal-user-guide.pdf?rev=adbd956e7e6e48da9d8d961df7c50c2a>, 2022.
- [79] A.G. Portal, Standards for Next Generation Sequencing Applications, <https://www.atcc.org/-/media/resources/instruction-guides/genome-portal-user-guide.pdf?rev=adbd956e7e6e48da9d8d961df7c50c2a>, 2022.
- [80] E.W. Sayers, M. Cavanaugh, K. Clark, K.D. Pruitt, S.T. Sherry, L. Yankie, I. Karsch-Mizrachi, GenBank 2023 update, *Nucleic acids research*, 51 (2023) D141-D144.
- [81] NCBI Blast, in: N.L.o.M. National Center for Biotechnology Information (Ed.) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2023.
- [82] J. Beal, A. Clore, J. Manthey, Studying pathogens degrades BLAST-based pathogen identification, *Scientific Reports*, 13 (2023) 5390.

- [83] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, J.A. Leunissen, Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3, *Nucleic acids research*, 35 (2007) W71-W74.
- [84] K. Becker, D. Pan, C.B. Whitley, Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer, *Human gene therapy*, 10 (1999) 2559-2566.
- [85] D. Kim, Real time quantitative PCR, *Experimental & molecular medicine*, 33 (2001) 101-109.
- [86] X. Wang, X. Shang, X. Huang, Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods, *Emerging microbes & infections*, 9 (2020) 1682-1691.
- [87] M. Yuan, R. Ding, S. Chen, G. Duan, Advances in field detection based on crispr/cas system, *ACS Synthetic Biology*, 10 (2021) 2824-2832.
- [88] B. Yilmaz, Retrieved and created from <https://www.biorender.com/>, 2023, pp. <https://www.biorender.com/>.
- [89] B. Benton, S. King, S.R. Greenfield, N. Puthuveetil, A.L. Reese, J. Duncan, R. Marlow, C. Tabron, A.E. Pierola, D.A. Yarmosh Jr, The ATCC Genome Portal: microbial genome reference standards with data provenance, *Microbiology Resource Announcements*, 10 (2021) e00818-00821.
- [90] ATCC Genome Portal, in: A.T.C.C.A.W. Page (Ed.) <https://genomes.atcc.org/>, 2023.
- [91] J.A. Schuster, R.F. Vogel, M.A. Ehrmann, Characterization and distribution of CRISPR–Cas systems in *Lactobacillus sakei*, *Archives of microbiology*, 201 (2019) 337-347.
- [92] D.R. Arahal, Whole-genome analyses: average nucleotide identity, *Methods in microbiology*, Elsevier2014, pp. 103-122.
- [93] S.F. Altschul, R. Bundschuh, R. Olsen, T. Hwa, The estimation of statistical parameters for local alignment score distributions, *Nucleic Acids Research*, 29 (2001) 351-361.
- [94] Primer3web, in: E.M.o.E.a.R.a.b.C.o.E.i.G.a.T.M.a.U.o. Tartu (Ed.) <https://primer3.ut.ee/>, 2019.
- [95] J.M. Bartlett, D. Stirling, *PCR protocols*, Springer2003.

- [96] E. ULU, C. CACINA, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, ÜCD Güncelleme Serileri, 37.
- [97] T.B.T.B. Staff, PCR Primer Design Tips, ThermoFisher SCIENTIFIC, <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>, 2019.
- [98] Instructions for use - microbiologics, https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=516&c=915960&h=be1fe2eebf3be3ec26d4&_xt=.pdf.
- [99] L. Ruangpan, E. Tendencia, Bacterial isolation, identification and storage, Laboratory manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center 2004, pp. 3-11.
- [100] S. Rybka, K. Kailasapathy, Media for the enumeration of yoghurt bacteria, International Dairy Journal, 6 (1996) 839-850.
- [101] R.B. Guevarra, V.L. Barraquio, Viable counts of lactic acid bacteria in Philippine commercial yogurts, Int J Dairy Sci Process, 2 (2015) 24-28.
- [102] T.J. Beveridge, J.R. Lawrence, R.G. Murray, Sampling and staining for light microscopy, Methods for general and molecular microbiology, (2007) 19-33.
- [103] D. Roychowdhury, M. Paul, S. Kumar Banerjee, Isolation identification and characterization of phosphate solubilising bacteria from soil and the production of biofertilizer, Int J Curr Microbiol App Sci, 4 (2015) 808-815.
- [104] K. Reiner, Catalase test protocol, American society for microbiology, (2010) 1-6.
- [105] T.J. Beveridge, Use of the Gram stain in microbiology, Biotechnic & Histochemistry, 76 (2001) 111-118.
- [106] K. Reiner, Carbohydrate fermentation protocol, Energy, 11 (2012) 12.
- [107] A. Temiz, Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri, Hatiboğlu Yayınevi 2010.
- [108] EURX GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit, <https://eurx.com.pl/docs/manuals/en/e3580.pdf>, 2019.
- [109] Roche FastStart Essential DNA Green Master, <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/faststart-essential-dna-green-master-381632.html>.

[110] W. Teng, B. Liao, M. Chen, W. Shu, Genomic legacies of ancient adaptation illuminate GC-content evolution in bacteria, *Microbiology Spectrum*, 11 (2023) e02145-02122.

[111] M.-S. Kim, B. Min, I. Kim, Y.-J. Kwon, S.-Y. Park, B.-Y. Kim, B.-K. Kim, S.S. Park, Complete genome sequencing and comparative genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* CKDB027, a promising probiotic bacterial strain, *Food Supplements and Biomaterials for Health*, 1 (2021).

[112] A. Cochu, C. Vadeboncoeur, S. Moineau, M. Frenette, Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate: glucose/mannose phosphotransferase system of *Streptococcus thermophilus*, *Applied and environmental microbiology*, 69 (2003) 5423-5432.

[113] S. Florczak, K. Kempka, K. Hołderna, E. Stanek, J. Baszyński, P. Kamiński, M. Bogdzińska, DNA isolation method from human blood with MasterPure DNA Purification Kit™—review article, *World Scientific News*, (2017) 69-76.

[114] A.E. Eren, *Lactobacillus plantarum*'un moleküler yöntemler ile tanılanması ve genomik anti-faj sistemleri, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2019.

EKLER

EK 1 – Referans suş *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258’e ait primer tasarımında kullanılan gen sekansları

FoodOmics Laboratuvarı Laktik Asit Bakteri Kültür Koleksiyonu’na ait *Streptococcus thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II bölgesinin tespiti amacıyla Tip II-A bölgesine ait Cas9 ve Csn2 genleri ile Tip II-C bölgesine ait Cas9 geni, analiz edilmek üzere seçilmiştir. Referans olarak seçilen *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258’e ait olan bu genlerin CRISPRCasdb-Taxo veritabanından elde edilen gen sekansları aşağıda verilmiştir.

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin sekansı:

```
CTCCAACCTGCCATTAACCCTCTCCTAGTTTGGCAAGGTCTATTCGTGTTTCA
TAGAGGCCTGTAACAGATTGATGAATAAGTGTGGCATCTTTTAATAGGGAT
GATGGGGTATAGTCTCTATACCTTGGAATTTTAACACCTAAAAATTCAAAT
CAGCAGCACTTCCACGAGAGGTTAATTCAAATAGCCCCTTTCTTTCACTTCC
GGTAGGTCCTATAAACTACTACAGAGTTCATCTATACTATGATTTTGCCAA
GATTGAAAGGCAGAGTTTAAAAGTTTACCATTCTTTTTAGCTCCAACATAAT
TCTCATTAACTCAAGAATGTAGTAAAATAATTCTTCAAACCTTTTTTTATG
GTTCTCAACATATTTTCTATGATTCTCATTAAATTGTGTTACTTATTCTCTTAG
CATGATAAAGTAATTTACAAACTTCTGTGAAAGAAAATCTGATTTCCCTTT
GTGAATCTCTCCCCTCTTATTATTCGTTGACAAAATACTAGCCAACATACGA
CGTGAACCATCTGAAAGTTCAAATAAACTATATTTAGGTAGTTCAATAATTA
ACTCAATATCTTTATAACCTTTTTCAAGTAAAAAATTAAGTTTATCTTTTCTA
TAATTAATCCTATCTAAAATAGAAATACCTTGAAATTCTAGTACATTTGTTA
TTTTTTTCTTAGCACCTTTTTCAATTGTCCCTTTAACAAGAACAGCAAAGA
ATTAGAAATTCCAGCATACCCCCATACTTTTTGGGGTCAAGATACTCTTTA
GCACCTACTAAATTTTCATTACTATTTGGTTTTGGCTTTGAGGAAAGATTTCC
ATTAACAATCCCTTTGGTTTTCTCTATCCAATCCGTGATTCTGTTCCCTCAA
CTTTTTTCACAACATTTACTTGC GGATAAGAGAGTACTCTCCTTACAGTTGCT
AAATCAGATTCTTTATTCCAAACGGATTCGCCGGTCTCCTCATTTACCTCAA
TAAGTGGTCTTTCAATAACTCTACCATCAGCTAAAGAAATAGATTTTTTAAA
GATATTCATGATATTTGAATAGAAATATACCTTTTCTGTAGCGGACTTTCTTT
```

CTCTAAAAC TATTGTATTTTGGATAATCACCGTACACAAATTCTGGCTCTAG
TTTAGGGTATTTCTTAAGTAAAGCACTTGCTATAACGGCATTCAAGTAAGCA
TCATGAGCATGATGAAAATCATTGATTTACGAACTTTATAAAGTTCAAAT
CCTTACGAAATTGAGAACTAAGGTAGATTTCAAGGTAATAATTTTTACTGT
TCGTACCGCTCTATTATTTTCATCTTTTTTATTATTAATTTCTCATCAAGTA
AACGAGCTACATGTTTTGTTATTTGACGTGTTTCAACCAACTGGCGTTGAAT
AAAACCAGCTTTGTCCTCAGGTAACAATCCTCCCCGTTTCAGCTTTTGTGAGA
TTATCAAATTTTCGTTGAGAAATTAATTTTGATTTCAATAATTGATACCAA
ATGTCTTTCTTTTTTTGACAACCTCTAAACTTGGAAAATCATCTGATTTACCA
CGGTTACTAGCAGATGAAACAAGTACTTTATTGTCAATAGAATTATCTTTCA
AAAAAGCTTGAGGAATAATATGATCAATATCATAATTACTTAATCTATCAAT
ATCTAAATCATCTCCGGTATACATATCTTTTCCATTTTGAAGATAGTATAAG
TAAAGTCGATCATTTTGAAGTGCGTTATTGTCTATTTTAGAAAGTTTTGCAG
GAATATTTTCCTTAAGTATCTTACTACCTAACTCTTTGAGAGATTTTCTAAA
CGTTTCAAGCGTTGTTGGGAATTAGACTTACCTTGATTGGTATATTGATTTT
ACGAGCCATCTCAACAACAATTGACTCGGGTTTTCTTCCTCCCATTACTTTG
ACCAATTCATCTACAATTTTTATGCTTTGTAAAATACCTTTTTTAATCGCAGG
ACTACCTGGCAAAGACTTAACGACCTCTTAAATATTACCTTTATCTTCGTCA
CCAATAATTTGTGCTTTCTGTATCTTCTTTTTAAAAGAAAGAGCATCATCGT
GAATAAGTTGCATGAAATTACGGTTAGAAATACCATCATCAATTAAGTAAT
CAAGAATAGTATTACCAGATTTTTTCATCTCGAATACCATTAATAAGCTTAGC
AGATAACTTACCCAGCCAGTGTAATGTCTACGAGATAACTTTTTCAAACG
GATTTATCGAATATATTCTCAAATTTTGAAGACGTTGTTTTATCATCTCTCT
ATCTTCAAAAATTGTCAAAGTATGGATAATTTCTTCGATAATCGCTTCATTT
GAACTATCATCCAAAACCTCTTATCATTAAATAATTTAAAAGATCGTGAT
AAGTAGATAAACTAGAAATTAACCTGTTTCTCTATGCCTTTTAATTCAATTC
ATCATACCCATAAATTGCATGTAAATATTCAATAATATCCTTATCAGTAACT
TTCCTTTTATCTTTAAAATAAAGTCTAACAATATCTTTCTTCTGCTTACTATC
TAAAAATTGATAATCTCTCATACTTTTCGGCAATAAATCTAACTTTTGTAAAT
CATTATATACATTAAGTTTCGTATAAGAGACTATGCTTTGGAAGTACCTT
CTCTTCTGGCAAATACAAATCAAACCTAGTCATTCGATTAATGAAAGCCTCT
GCCGAAGATTCTTTGTCAATAACGTCTCAAATTCGAAGGTGTAATTTTTT
CATTTTCGTTTTCTTATTGACCAGGCAAATCACTATTCCTCTCGCAAGTGG
ACCTACATAATAAGGAATTCGGAAGGTTAAAATCTTCTCGATTCTTTCTTTA

TTTTAGCCAAGAAAGGATAAAAATTTAGCTTGCTTATCAAGAATTGCTCTCA
TTTCTTGAAGATGAATCTGATATGGTATCGAACCATTTGTCAAATGTACGTTG
CTTTCTCAAAAAATCTTCTCGATCAATTTTTTCAAGAAAATAATCCGCACCT
TCAAATTCAGCCAATAGGTTTTTTAGATATACGTAGAAAATCTTCCTGATTIG
TTTTTCCATCAATATAACCAGCATAACCATTTTTGGTGTGCATCTTTAAATACT
TCATTATACGTTTTTTAGTGAAATATTTCTTATATATTCCTTTAGTAACGCTAA
ATCTTCTTTGTGTTTATTATATCGCTTTATCATAGCAGAAGAGAGAGGTGCT
TCTGTCTCATTATCAGTTACAGTCAGAAAACCCGATAAAAAGAATAGCATCAT
AAAGTTTCTTTGCTTTGAGAAAGACATCACTGTAATCATCTCCAATATAACC
TAACAAAGTCTCTAAATCTTCATCATAGCTTTCTTTGGAAAAATGTAAGGAG
GCTTTTTTCGTCTAAATTAACATTTCCCTAAAATCAGCTTGATTTCCCTACAAT
CAACTTTAGAACTCTGAAAAAATCCCCGAATTCTTCTCCCCAGGGAAGAG
TTTTAAAATACGATCTTTCTTTTCTAATTTACTAATCTTATCTTTAACAATTTT
CTCAAGTTGTTTACTATTCTCAAGTGATAAATCCGATTCAAAAATAGCATT
TAAGTGTCCAAAAAGTCTTGAAAATTTCTTCTGAATATCATTATTTTTTTGAATT
AACTCTCCTTCAATTAAGAAGTGACCTCTATATTTAATCATATGAGCCAAT
GCAAGATAAACTAGACGCAAATCTGCTTTTTTTAGTACTATCTGCTAAATATT
TCCTTAAATGATAGATAGTTGGAAATTCATCATGATAGGCTTTTTTCTTCTACT
AAGTTTCCAAATATCGGATACTTACTATCACGTTTATCATCAGGAACTAAAA
ACGAATCGTCAAGTCTTTGAAAGAAAGCATCATCTAATGTAGCCATCTCTGT
GCTAAAAATTTCTGCAAATAAAGGATACGATTACGGCGTCTAGTATAACG
TCTTCTTGACGTACGCTTCAATCTTCTTCTTCTGCTGTGATTCCAGAGTCAA
AGAGTAATACACCTAACAGGTTCTTTTTGATATACTTTTTACTCGTATTTCT
AAGACTTTCATTTTTTTAGACGGAACCTTGTAATTATCAGTTATTACAGCCC
ATCCAACACTATTCGTTCCAATATCAAGTCCAATTGA

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin sekansı:

TATTAATAATTTACTAGTTATTATAGGGCATCAAAAATAAATCCTTGTCTAA
AATAAATTGTTGAATCCCTTCAATCTGTCTAGGTTCCAAAAATAATACATCA
GCTTGTGATAACTTTGTATATTCCAAGATTTGATAAATTCATCTTTAGAAA
AATACGACAAGCTATTGACGAATACTAAAATTTCTTTTTTAATAAATTTT
AAAAATCTGTAAAATCTCAAATATTTTTTCAAAAACCGTACAAGACTTAGTT
TCGATTCTGACACCTAATGCTTTAATTAGTTCTAAAAGTGTAATCTCATCAT
ACTCTATATCTAGTTCATTTTCTATACACTCTGCCATTATAAATATCAGTAATT

AATGATACCAAAGAATCTATTTCTGATCTAACTTCAGGTTTATCATTCAACT
GGCTTACAATATCTGTGTGAAGCAACTTTAATACCTGAGAAGTATTAATATC
GTAACCTAAAATATCCGTTATTA AAAAGTAATTCAGAGGACCTTATACTCCTT
ATTTTACTATCAAATATTGTTAAATTCGATTGTTTCATCATACTGATAGAATTC
CTTGACTAACTGAGCAAACACACTCACATCCTCAATTACGAGA ACTGTCCCC
AGATTAACCTCCATAGGCTCATCCAAAAGTGA

CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin sekansı:

AGGGGATTATTAATGAGTGACTTAGTTTTAGGACTTGATATCGGTATAGGT
TCTGTTGGTGTAGGTATCCTTAACAAAGTGACAGGAGAAATTATCCATAAA
AACTCACGCATCTTCCCAGCAGCTCAAGCGGAAAATAACCTAGTACGTAGA
ACGAATCGTCAAGGAAGACGCTTGACACGACGTAAAAAACATCGTATAGTT
CGTTTAAATCGTCTATTTGAGGAAAGTGGATTAATCACCGATTTTACGAAGA
TTTCAATTAATCTTAACCCATATCAATTACGAGTTAAGGGCTTGACCGATGA
ATTGTCTAATGAAGAACTGTTTATCGCTCTTAAAAATATGGTGAAACACCGT
GGGATTAGTTACCTCGATGATGCTAGTGATGACGGAAATTCATCAGTAGGA
GACTATGCACAAATTGTTAAGGAAAATAGTAAACAATTAGAACTAAGACA
CCGGGACAGATACAGTTGGAACGCTACCAAACATATGGTCAATTACGTGGT
GATTTTACTGTTGAGAAAGATGGCAAAAAACATCGCTTGATTAATGTCTTTC
CAACATCAGCTTATCGTTCAGAAGCCTTAAGGATACTGCAA ACTCAACAAG
AATTTAATCCACAGATTACAGATGAATTTGTTAATCGTTATCTCGAAATTTT
AACTGGAAAACGGAAATATTATCATGGACCCGGAAATGAAAAGTCACGGA
CTGATTATGGTTCGTTACAGAACGAATGGAGAACTTTAGACAATATTTTTGG
AATTCTAATTGGGAAATGTACATTTTATCCAGAAGAGTTTAGAGCAGCAAA
AGCTTCCTACATGGCTCAAGAATTCAATTTGCTAAATGATTTGAACAACCTA
ACAGTTCCTACTGAAACCAAAAAGTTGAGCAAAGAACAGAAGAATCAAATC
ATTAATTATGTCAAAAATGAAAAGGCAATGGGGCCAGCGAAACTTTTTAAA
TATATCGCTAAGTTACTTTCTTGTGATGTTGCAGATATCAAGGGATACCGTA
TCGACAAATCAGGTAAGGCTGAGATTCATACTTTCGAAGCCTATCGAAAAA
TGAAAACGCTTGAAACCTTAGATATTGAGCAAATGGATAGAGAAACGCTTG
ATAAATTAGCCTATGTCTTAACATTAACACTGAGAGGGAAGGTATTCAAG
AAGCCTTAGAACATGAATTTGCTGATGGTAGCTTTAGCCAGAAGCAAGTTG
ACGAATTGGTTCAATTCCGCAAAGCAAATAGTTCCATTTTTGGAAAAGGAT
GGCATAATTTTTCTGTCAA ACTGATGATGGAGTTAATTCAGAATTGTATGA

GACGTCAGAAGAGCAAATGACTATCCTGACACGACTTGGAAAACAAAAA
CGACCTCGTCTTCAAATAAAACAAAATATATAGATGAGAACTATTA
AAGAAATCTATAATCCTGTTGTTGCTAAGTCTATTCGCCAGGCTATA
CGTAAATGCGGCGATTAAAGAATACGGGAGACTTTGACAATATTGTC
AATGGCTCGTGAAACAAATGAAGATGATGAAAAGAAAGCTATTCAA
TTCAAAAAGCCAACAAAGATGAAAAAGATGCAGCAATGCTTAAGGCT
ACCAATATAATGGAAAGGCTGAATTACCACATAGTGTTTTCCACGGT
AGCAATTAGCGACTAAAATCCGCCTTTGGCATCAGCAAGGAGAACG
TTTATACTGGTAAGACAATCTCAATCCATGATTTGATAAATAATCCT
GTTTGAAGTAGATCATATTTTACCTCTTTCTATCACATTCGATGATA
CAAATAAGGTTTTGGTTTTATGCAACTGCTAACCAAGAAAAAGGACA
CACCTTATCAGGCTTTAGATAGTATGGATGATGCGTGGTCTTTCCG
AAAAGCTTTTGTACGTGAGTCAAAAACACTTTCGAACAAGAAAAAGA
ACCTCCTCACAGAAGAAGATATTTCAAAGTTTGATGTTTCGAAAGAA
TGAACGAAATCTTGTAGATACAAGATACGCTTCAAGAGTTGTCCTCA
CTTCAAGAACACTTTAGAGCTCACAAGATTGATACAAAAGTTTCCGT
GTGGCCAATTTACATCTCAATTGAGACGCCATTGGGGAATTGAGAAG
GTGATACTTATCATCACCATGCTGTCGATGCATTGATTATTGCCGCCT
TCAGTTGAATTTGTGGAAAAACAAAAGAATACCTTTGTAAGTTATTC
AGATCAACTCCTTGATATTGAAACAGGTGAACTTATTAGTGATGATG
AAGGAATCTGTGTTCAAAGCCCCTTATCAACATTTTGTTGATACATT
GTAAAGAATTTGAAGACAGTATCTTATTCTCATATCAAGTGGATTCT
TAATCGTAAAATATCAGATGCCACTATTTATGCGACAAGACAGGCTAA
AGGAAAAGATAAGGCGGATGAACTTATGTCTTAGGGAAAATCAAAGAT
TTATACTCAGGATGGTTATGATGCCTTTATGAAGATTTATAAGAAGG
TCAAAATTCCTCATGTATCGTCACGACCCACAAACCTTTGAGAAAGT
AGCCAATTTTAGAGAACTATCCTAATAAGCAAATGAATGAAAAGGGAA
AGGTACCATGTAATCCTTTCTAAAATATAAAGAAGAACATGGCTATAT
TAAATATAGTAAAAAAGGCAATGGTCCTGAAATCAAGAGTCTTAAATA
TGATAGTAAGCTAGGCAATCATATTGATATTACTCCGAAGGATAGTAA
TAAAGTTGTCTTACAGTCATTAACCTTGGAGAACAGATGTCTATTTCA
AAAATACTGGTAAATATGAAATTTTAGGACTGAAATATTCTGATATGC
TTCGAGAAAGGTAAGTACTCTATTTCAAAGAACAATATGAAAT
ATTAAGGTTAGAGAGGGTGTAGATGAAAATTCTGAATTTAAGTTTACA

ATAAAAACGATTTATTACTGCTTAAGGATTCCGAAAATGGCGAGCAAATCC
TATTGAGGTTCACTTCTCGAAATGATACTTCTAAACATTATGTGGAATAAA
ACCTTATAATAGACAGAAATTTGAAGGAAGTGAATATCTGATTAAATCATT
AGGGACTGTTGCCAAAGGAGGTCAATGCATAAAAGGGCTAGGAAAATCAA
ATATTTCTATTTATAAAGTAAGAACGGATGTTCTAGGAAATCAGCATATCAT
CAAAAATGAGGGTGATAAGCCT

EK 2 – NCBI BLAST ile genlerin *Streptococcus thermophilus* suşlarına ait sekanslar hizalaması

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin BLAST sonucu. Tabloda benzerlik oranı %100 olan hizalamalara yer verilmiştir. BLAST hizalaması sonucu benzerlik oranları %98,75 ile %100 arasındadır.

Tanım	Bilimsel Ad	Benzerlik (%)	Erişim Uzunluğu	Erişim Numarası
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CS9 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860988	CP030927.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ATCC 19258 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	2102268	CP038020.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür EU01 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1948689	CP047191.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST109 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1788866	CP031545.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür N4L genom derlemesi, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1831756	LS974444.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür NCTC12958 genom derlemesi, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	2102271	LS483339.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür GABA kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1857468	CP025399.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST3 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1865056	CP017064.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür APC151, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1839134	CP019935.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür EG007, kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860782	CP069275.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CNRZ385 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1897009	CP065495.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST057 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1831529	CP102797.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür VHProbi R08 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1848461	CP094945.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 4078 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1837840	CP065477.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9 FDAARDOS 1574 kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	100	2125064	CP086001.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür Moz109 kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1807478	CP075363.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür DMST-H2 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1879014	CP063275.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 24740 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1880058	CP061020.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 24739 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1934999	CP061021.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 24738 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1885982	CP061022.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 13499 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1885735	CP061023.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 12496 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1895875	CP061025.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002	100	1848520	CP003499.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1055 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1839159	LR822036.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1051 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1857575	LR822035.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1049 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1865349	LR822034.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1048 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1865360	LR822033.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1046 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1889796	LR822030.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1035 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1819445	LR822029.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_32 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860069	LR822013.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_18 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860070	LR822008.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03 tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03	100	1831949	CP002340.1

CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin BLAST hizalaması sonucu. CRISPR-Cas Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin BLAST sonucu. Tabloda benzerlik oranı %100 olan hizalamalara yer verilmiştir. BLAST hizalaması sonucu benzerlik oranları %98,25 ile %100 arasındadır.

Tanım	Bilimsel Ad	Benzerlik (%)	Erişim Uzunluğu	Erişim Numarası
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CS18 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1858890	CP030928.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CS5 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1857164	CP028896.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST64987 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1831074	CP049053.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ATCC 19258 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	2102268	CP038020.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür EU01 genom derlemesi, kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1948689	CP047191.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür IDCC2201 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1794836	CP035306.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST109 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1788866	CP031545.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür N4L genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1831756	LS974444.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür NCTC12958 genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	2102271	LS483339.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür GABA, kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1857468	CP025399.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür DGCC 7710 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1851207	CP025216.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST3 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1865056	CP017064.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür APC151, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1839134	CP019935.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ND07 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1869510	CP016394.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CICC 20372 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1852351	CP132900.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1856787	CP016026.1

KLDS_SM kromozom, genom derleme				
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür DGCC7710 kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1865206	CP123436.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür MN-BM-A01, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1876516	CP012588.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür EG007 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860782	CP069275.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür MN-BM-A02, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1850434	CP010999.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CNRZ385 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1897009	CP065495.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür UCCSt95 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1794115	CP101646.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ST057-1 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1831529	CP102797.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür VHProbi R08 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1848461	CP094945.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür CS6 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1856658	CP050870.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ASCC_1275, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i> ASCC_1275	100	1845495	CP006819.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 4078 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1837840	CP065477.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9, FDAARGOS_1574 kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	100	2125064	CP086001.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür Moz109 kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1807478	CP075363.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 24740 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1880058	CP061020.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 24739 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1934999	CP061021.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 24738 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1885982	CP061022.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 13499 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1885735	CP061023.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür 13496 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1895875	CP061025.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i> MN-ZLW-002	100	1848520	CP003499.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1055 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1839159	LR822036.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1051 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1857575	LR822035.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_1046 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1889796	LR822030.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_32 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860069	LR822013.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür STH_CIRM_18 izolatu, genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	1860070	LR822008.1

<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür DGCC 7710 SerB (serB) geni, kısmi kodlama sekanları, CRISPR3 gen lokusu, tam sekans ve olası protein geni	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100	7655	HQ712120.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i> ND03	100	1831949	CP002340.1

CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin BLAST hizalaması sonucu. Tabloda benzerlik oranı %100 olan hizalamalara yer verilmiştir. BLAST hizalaması sonucu benzerlik oranları %77,28 ile %100 arasındadır.

Tanım	Bilimsel Ad	Benzerlik (%)	Erişim Uzunluğu	Erişim Numarası
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür ATCC 19258 kromozom, tam genom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100,00	2102268	CP038020.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür NCTC12958 genom derleme, kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i> LMD-9	100,00	2102271	LS483339.1
<i>Streptococcus thermophilus</i> , tür LMD-9 FDAARGOS_1574 kromozom	<i>Streptococcus thermophilus</i>	100,00	2125064	CP086001.1

EK 3 – Primer3 ile tasarlanan oligo primerler

Tip II-A bölgesine ait Cas9 geninin oligo primerleri

Primerler	%GC	Tm	Baz Sayısı	Baz Dizilimi
İleri	43,48	59,00	23	ACGCTTCAATCTTCTTCCTTCTG
Geri	47,62	58,00	21	GAATAGTGTTGGATGGGCTGT
İleri	43,48	58,68	23	CAATCTTCTTCCTTCTGCTGTGA
Geri	43,48	58,73	23	AGTGTTGGATGGGCTGTAATAAC
İleri	45,45	57,67	22	TCTAATGTAGCCATCTCTGTGC
Geri	43,48	58,48	23	GTTGGATGGGCTGTAATAACTGA
İleri	43,48	58,50	23	CAGTACGCTTCAATCTTCTTCCT
Geri	40,91	57,20	22	ATAGTGTTGGATGGGCTGTAAT

Tip II-A bölgesine ait Csn2 geninin oligo primerleri

Primerler	%GC	Tm	Baz Sayısı	Baz Dizilimi
İleri	50,00	57,86	22	CCCTTCAATCTGTCTAGGTTC
Geri	40,91	57,53	22	AGCATTAGGTGTCAGAATCGAA
İleri	40,91	57,53	22	TCGATTCTGACACCTAATGCTT
Geri	39,13	58,08	23	AGCCAGTTGAATGATAAACCTGA
İleri	43,48	57,38	23	GAATCCCTTCAATCTGTCTAGGT
Geri	40,91	57,16	22	TCGAAACTAAGTCTTGTACGGT
İleri	40,91	57,16	22	ACCGTACAAGACTTAGTTTCGA
Geri	47,62	57,40	21	GGGGACAGTTCTCGTAATTGA

Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin oligo primerleri

Primerler	%GC	Tm	Baz Sayısı	Baz Dizilimi
İleri	50,00	58,45	20	CGAAAATGGCGAGCAAATCC
Geri	45,45	58,97	22	AGCCCTTTTATGCATTGACCTC
İleri	50,00	58,33	20	AGGATTCCGAAAATGGCGAG
Geri	45,45	58,20	22	TGCTGATTTCTAGAACATCCG
İleri	40,91	57,53	22	TGATATGCAGTTCGAGAAAGGT
Geri	45,00	59,04	20	TTTGCTCGCCATTTTCGGAA
İleri	45,45	58,29	22	GCTTAAGGATTCCGAAAATGGC
Geri	43,48	58,97	23	CCCTTTTATGCATTGACCTCCTT

EK 4 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. Uluslararası Biyoteknoloji Çalışmaları Kongresi (1st International Congress On Biotech Studies)

November 9-11, 2022

Abstract E-Book of the 1st International Congress on Biotech Studies

In Silico CRISPR-Cas Based Screening of *Lactococcus lactis* ASM2046375v1

Bilge Yılmaz¹, Remziye Yılmaz¹

¹Hacettepe University, Ankara, TÜRKİYE

It is of great importance to ensure the quality of food, which has become one of the most important factors in the food industry today, and to prevent both food and raw material losses. Considering lactic acid bacteria such as *Lactococcus lactis*, which is frequently used in the cheese industry, it is very important to eliminate the bacteriophage problem. The bacteriophages to which bacteria can be exposed are one of the biggest problems in the industry and directly affects the use of bacteria in the food production process. For this reason, CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas (CRISPR-related endonuclease protein) technology, which was developed based on the autoimmune system developed by bacteria against bacteriophages, has gained great importance, especially in recent years. The detection of CRISPR-cas loci that affect the phage immunity of bacteria that are frequently used in the industry plays a critical role in the selection of cultures used in the production process, the control of the fermentation process, and the prevention of food losses. It aimed to perform an analysis of the formation of CRISPR-Cas systems in the genomes of *L.lactis* ASM2046375v1 (NZ_CP059048.1) bacteria in silico phase of this study. As a result of the study, it is important to determine the Endonuclease Cas9 gene regions which are unique for CRISPR Type II-A systems. For this purpose, various databases such as NCBI (US National Biotechnology Information Center) and CRISPRCasFinder were used in this study. Thanks to the databases; whole genome sequences, spacers, and Cas contents of bacteria can be obtained easily. For further study, it will be possible to investigate the CRISPR-Cas loci of lactic acid bacteria with instrumental studies to be carried out following DNA isolation and a comparative analysis of the obtained information on the database.

***Streptococcus thermophilus* Suşlarında Crispr-cas Tip 2-c Alt Tipine Ait Cas9 Geninin Rt-qpcr ile Tespiti**

Bilge Yılmaz^{1,2}, Remziye Yılmaz^{1,3}

¹Foodomics Laboratuvarı, Gıda Mühendisliği Bölümü, Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

²Gıda Mühendisliği Bölümü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

³Uluslararası Gıda Biyogüvenlik ve Biyoteknoloji Araştırma ve Yayın Merkezi (ifbbc), Hacettepe Üniversitesi, 06800, Ankara, Türkiye

remziye@hacettepe.edu.tr

Giriş

Bakterilerin bakteriyofajlara karşı geliştirdiği otoimmün sistem temel alınarak geliştirilen CRISPR (Düzenli Aralıklı Palindromik Tekrar Kümeleri)-Cas (CRISPR ile ilişkili endonükleaz protein) teknolojisi son yıllarda gıda ve hammadde kayıplarının önlenmesi açısından büyük önem kazanmıştır. Bakterilerin maruz kalabileceği bakteriyofajlar, bakterilerin kullanımını doğrudan etkiler. *Streptococcus thermophilus* (*S.thermophilus*)'ta keşfedilen CRISPR-Cas Tip-II bölgesinin tespiti; gıda üretim ve fermentasyon sürecinde kullanılan suşların seçiminde ve kontrolünde kritik rol oynar. Bu çalışmada *S.thermophilus* suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C alt tipinin varlığına dair bir kanıt olan Cas9 geninin var-yok analizini gerçekleştirmeyi amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntemler

in silico: Referans olarak seçilen *S.thermophilus* ATCC 19258 suşunun tam genom sekansı ATCC Genome Portal veritabanından elde edilmiştir. Tam genom sekansı elde edilen suşun sahip olduğu Cas, aralayıcı ve tekrar genleri CRISPRCasFinder ile tespit edilmiştir. CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait seçilen Cas9 geninin sekansı CRISPRCasdb-Taxo veritabanı kullanılarak elde edilmiştir. Sekans verileri kullanılarak Primer3 ile RT-qPCR primerleri dizayn edilmiştir. Primerler NCBI BLAST kullanılarak diğer *S.thermophilus* sekansları ile hizalanmıştır. *in vitro*: Önceden tanımlanmış *S.thermophilus* suşları, M17 Broth ve agar besiyerlerinde canlandırılmış ve genomik DNA izolasyonları EURX GeneMATRIX Bacterial kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından *in silico* analizlerin sonucu olarak tasarlanan primerler ile RT-qPCR analizi, Roche FastStart Essential DNA Green Master kiti kullanılarak suşların CRISPR-Cas Tip II-C bölgesine ait Cas9 geninin tespiti gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

Streptococcus thermophilus suşlarında CRISPR-Cas Tip II-C bölgesinin tespiti amacıyla uygulanan RT-qPCR analizinde amplifikasyon eğrilerinden elde edilen Cq değerleri ve erime eğrilerinden elde edilen Tm değerleri tespit edilmiştir. RT-qPCR analizi sonucunda *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258, HUF19ZN2M1012 ve HUF19ZN7M1039 kodlu suşları pozitif sonuç vermiştir. HUF22BDT2034 kodlu suşun ise erime eğrisinin omuz yaptığı gözlenmiş, bu sebeple bu suşa ait sonuç şüpheli pozitif olarak değerlendirilmiştir. Dolayısıyla CRISPR-Cas Tip II-C bölgesinin tespiti amacıyla birden fazla gen bölgesi seçilmesinin, potansiyel şüpheli pozitif sonuçların ortadan kaldırılmasında önemli bir kriter olduğunu göstermiştir.

Sonuç ve Tartışma

Bu çalışmanın sonucunda, *Streptococcus thermophilus* suşlarında pozitif ve şüpheli pozitif sonuç veren suşların, Tip II-C bölgesine ait Cas, aralayıcı veya tekrar genleri ile doğrulanması gerektiği yorumu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus thermophilus*, CRISPR-Cas, Cas9, RT-qPCR.

Teşekkür: Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.