

**BİLİM SANAYİ VE TEKNOLOJİ BAKANLIĞI**  
**Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü**

Ankara Üniversitesinin, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk Engin tarafından hazırlanan, “**Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi**” başlıklı proje, üniversitemizde yüksek lisans tez konusu olarak çalışılmak üzere belirlenmiş olup, söz konusu projenin San-Tez Programı kapsamında değerlendirilmeye alınması hususunda bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Doç. Dr. Sümer Aras  
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji  
Enstitüsü Müdürü V.

Proje Yürütücüsünün

Adı, Soyadı : Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk Engin

İmza :

SIRA NO	İÇİNDEKİLER	FORM NO	SAYFA NO
1	Proje Başvuru Sayfası	-	
2	Projeyi Destekleyen Firmanın Kabul ve Taahhüt Beyanları	FORM 1	
3	San-Tez Proje Bilgileri	FORM 2	
4	Proje Personeline Ait Bilgiler	FORM 3	
5	Proje Ekibinin Kabul ve Taahhüt Beyanları	FORM 4	
6	Proje Özeti	FORM 5	
7	Abstract	FORM 6	
8	Literatür Özeti	FORM 7	
9	Projenin Amacı	FORM 8	
10	Projenin Gerekçesi ve Hedefleri	FORM 9	
11	Projenin Ar-Ge Niteliği ve Teknolojik Yönü	FORM 10	
12	Projenin Ekonomik Katkısı ve Yaygın Etkisi	FORM 11	
13	Proje Sonucu Ortaya Çıkacak Ürüne Yönelik Pazar Araştırması Sonuçları ve Firmanın Projeden Beklentileri	FORM 12	
14	İzlenecek Yöntem	FORM 13	
15	Proje Ekibi ve Yönetim Düzeni	FORM 14	
16	Araştırma Olanakları	FORM 15	
17	Proje Süresi ve İş Planı	FORM 16	
18	Alternatif İş Planı (B Planı)	FORM 17	
19	İş Paketi Tanımlama Formu	FORM 18	
20	İş Paketleri ve Proje Personeli Çalışma Planı	FORM 19	
21	Bütçe Detayı Formu	FORM 20	
22	Makina – Donanım Bütçe Kalemi Ayrıntıları ve Gerekçeleri	FORM 21	
23	Sarf Malzemeleri Kalemi Ayrıntıları ve Gerekçeleri	FORM 22	
24	Hizmet Alımı Kalemi Ayrıntıları ve Gerekçeleri	FORM 23	
25	Seyahat Gideri Kalemi Ayrıntıları ve Gerekçeleri	FORM 24	
26	Proje Personeli Ayrıntılı Ödeme Tablosu	FORM 25	
27	Dönemsel Harcama Kalemleri Dağılımı Tablosu	FORM 26	
28	Bakanlık ve Firma Dönemsel Ödeme Planı Tablosu	FORM 27	
29	Firma Bilgileri Formu	FORM 28	
30	Ekler		

**PROJEYİ DESTEKLEYEN FİRMANIN KABUL VE TAAHHÜT  
BEYANLARI**

**FORM NO: 1**

San-Tez Programı kapsamında başvurusu yapılan “Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi” başlıklı Proje desteklenmeye uygun bulunması halinde, Destekleme Programında belirtilen bütün kural, şart ve düzenlemelere uyacağımızı ve uyulmasını sağlayacağımızı,

Proje sözleşmesinde kabul edildiği şekilde yürütülmesi ve sonuçlanması için azami özeni göstereceğimizi, ortaya çıkabilecek menfaat ihlallerini engelleyecek önlemleri alacağımızı,

Bu menfaat ihlallerini belirleyecek mali açıklamaların gerektiğinde proje önerisinde görev alan ve/veya projeyle ilgili diğer kuruluş çalışanları tarafından yapılacağını ve gelişecek menfaat ihlallerini, verilen proje desteğinin kullanımından önce, önleyecek veya kontrol edecek tedbirleri alacağımızı,

Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından gerekli denetim ve izlemelerin yapılabilmesi için gerekli ortam ve imkânları sağlayacağımızı,

Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından verilen destek tutarının hızlı, etkin ve verimli kullanılmasını sağlayacağımızı,

Projenin ortağı olarak projenin toplam bedelinin %25’lik kısmını nakdi olarak proje sözleşmesinde belirtilen dönemlerde proje özel hesabına yatıracacağımızı,

Tüm bu işlemler sırasında Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, Bilim ve Teknoloji Genel Müdürlüğü’ne gerekli bildirimleri zamanında yapacağımızı,

Aksi takdirde Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı’nın uygun gördüğü önlem ve yaptırımları uygulamaya yetkili olduğunu, bu durumda herhangi bir hak talebinde bulunmayacağımızı kabul ve taahhüt ederiz.

**PROJE ORTAĞI FİRMA**

Firma Ünvanı:  
**ABA Ankara Biyoteknoloji Araştırma San. Tic.  
Ltd. Şti.  
Kaşe**

**FİRMA TEMSİLCİSİ**

Adı Soyadı  
**Abdurrahman Kafas**

**İmza-kaşe**

Not :1) Bu form, proje ortağı olarak projeye katkı sağlayan firma tarafından imzalanacaktır  
2) Proje birden fazla kuruluş tarafından destekleniyorsa aynı bilgileri diğer kuruluşlar doldurunuz.

SAN-TEZ PROJE BİLGİLERİ			FORM NO:2
<b>PROJENİN ADI :</b>			
<b>Proje Başvuru Bilgisi</b> <input checked="" type="checkbox"/> İlk Başvuru <input type="checkbox"/> Revize <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans tezi <input type="checkbox"/> Doktora Tezi	<b>Proje Başka Bir Kuruluşa Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Hayır <input checked="" type="checkbox"/>	<b>Araştırmanın Yapılacağı Yer :</b> <input type="checkbox"/> Üniversite <input type="checkbox"/> Kuruluş <input checked="" type="checkbox"/> Her İkisi	<b>ETİK KURUL BELGESİ</b> VAR <input type="checkbox"/> GEREK YOK <input checked="" type="checkbox"/> BAŞVURUSU YAPILDI <input type="checkbox"/>
<b>Proje Bütçesi (TL)</b> Destek Talebi : 461,078.62 TL Firma Katkısı : 155,000.00 TL Proje Toplam Bedeli : 616,078.00 TL	<b>Proje Süresi</b> 24 Ay	<b>Proje Başlama Tarihi</b> 01/01/2012	<b>Projenin Teknoloji Alanı</b> Bu forma yazılacak teknoloji alanı .....formdaki alanlardan seçilecektir. [ 40-10, 40-32 ]
<b>PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ YÜKSEK ÖĞRENİM KURUMU</b> Adı : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Telefon No : +90 312 600 01 49-50 Faks No : +90 312 600 01 51 Vergi Dair. ve Vergi No: 0010498413 Adresi : Gölbaşı 50.Yıl Yerleşkesi, Bahçelievler Mahallesi, Kaymakamlık Arkası, L Blok 2. Kat 06830 Gölbaşı -ANKARA Web sitesi : http://biotek.ankara.edu.tr/index.php?p=1&l=1			
<b>PROJE ORTAĞI FİRMANIN</b> Firma Ünvanı : ABA Ankara Biyoteknoloji Araştırma San. Tic. Ltd. Şti. Adresi : Ank. Üniv. Teknoloji Geliştirme Böl. Bahçelievler mah. D Blok no 7 Gölbaşı Ankara Telefon No : 0312 4851688 Faks No : 0312 4847662 Web adresi : www.ababiotech.com e-mail adresi : info@ababiotech.com Vergi Dair. ve Vergi No:Gölbaşı V.D. 0010690903			
<b>PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN</b> Adı Soyadı : Evren Doruk Engin Görevi/Ünvanı : Yrd. Doç. Dr. Telefon No : +90 312 222 58 26 / 200 Faks No : +90 312 222 58 72 GSM No : +90 532 227 39 23 E-Posta : edoruk@gmail.com T.C. Kimlik No: 15532006260 Adresi : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarları Tandoğan Yerleşkesi (Rektörlük Yanı) 06110 Beşevler /ANKARA			

**PROJE PERSONELİNE AİT BİLGİLER****FORM NO: 3****TEZ ÖĞRENCİSİ**

Adı Soyadı : Didem Molla  
Bölümü : Temel Biyoteknoloji  
Akademik Derecesi : Biyolog  
Akademik Alanı : Biyoloji  
Telefon : +90 312 222 58 26  
GSM No : +90 544 254 05 57  
Faks Numarası : +90 312 222 58 72  
E-Posta : didemolla@gmail.com  
TC Kimlik No : 20371075780

(Not : Eger Projede birden fazla tez öğrencisi gerekiyorsa ilgiliye ait bilgileri ekleyiniz.)

**YARDIMCI ARAŞTIRMACI**

Adı Soyadı : Sertaç Özdemir  
Çalıştığı Kurum/Kuruluş: -  
Akademik Derecesi : Doktora  
Akademik Alanı:Fizyoloji  
Telefon : 0312 4851688  
GSM No : 05323368460  
Faks Numarası : 03124847662  
E-Posta : drsertacozdemir@gmail.com  
**TC Kimlik No :13277325998**

(Not : Eger Projede birden fazla yardımcı araştırmacı çalışıyorsa ilgiliye ait bilgileri ekleyiniz.)

**YARDIMCI ARAŞTIRMACI**

Adı Soyadı : ORHAN KİREMİTÇİ  
Çalıştığı Kurum/Kuruluş: ABA ANKARA BİYOTEKNOLOJİ SAN.TİC. LTD. ŞTİ.  
Akademik Derecesi : UZMAN  
Akademik Alanı :ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
Telefon : 0312 4851688  
GSM No : 05068101049  
Faks Numarası : 03124847662  
E-Posta : drkiremitci@yahoo.com  
**TC Kimlik No :15457453576**

**YARDIMCI PERSONEL**

Adı Soyadı :Uzm. Bio. Ayşe Yeşbek Kaymaz  
Çalıştığı Kurum/Kuruluş :ABA ANKARA BİYOTEKNOLOJİ Araştırma San. ve Tic. Ltd. Şti  
Akademik Derecesi :Yüksek Lisans  
Akademik Alanı :Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Telefon :0312 485 16 88  
GSM No :0541 312 35 01

Faks Numarası	:0312 484 76 62
E-Posta	:ayseyesbek@gmail.com
<b>TC Kimlik No</b>	<b>:17923096546</b>
(Not : Eger Projede birden fazla yardımcı araştırmacı çalışıyorsa ilgiliye ait bilgileri ekleyiniz.)	
<b>YARDIMCI PERSONEL</b>	
Adı Soyadı	:Uzm. Bio. Sezen Bolat Songur
Çalıştığı Kurum/Kuruluş	:ABA ANKARA BİYOTEKNOLOJİ Araştırma San. ve Tic. Ltd. Şti
Akademik Derecesi	:Yüksek Lisans
Akademik Alanı	:Tıbbi Mikrobiyoloji/Mikrobiyoloji Uzmanı
Telefon	:0312 485 16 88
GSM No	:0532 635 96 57
Faks Numarası	:0312 484 76 62
E-Posta	:sezenbolat@gmail.com
<b>TC Kimlik No</b>	<b>:18230240448</b>
<b>FİRMA TEMSİLCİSİ</b>	
Adı Soyadı	: Abdurrahman Kafas
Mesleği	: Matematikçi
Firmadaki Görevi	: Müdür
Telefon	: 0312 4851688
GSM No	: 532 6208672
Faks Numarası	: 03124847662
E-Posta	: abdkafas@gmail.com
T.C. Kimlik No	:
(Not : Eger Projede birden fazla firma varsa gerekli bilgileri ekleyiniz.)	

**ÖNEMLİ NOT:** Lütfen Bakanlık veri tabanımızda kaydınız yoksa, Proje yürütücüsü dahil olmak üzere projede görev alacak Yrd. Doç. ve üzeri proje personelinin ekli akademisyen bilgi formunu doldurarak [mnedim.dardagan@sanayi.gov.tr](mailto:mnedim.dardagan@sanayi.gov.tr) adresine gönderiniz.

Bu başvuru formunda verilen bilimsel varsayım ve düşünceler dışındaki bütün bilgilerin doğru ve eksiksiz olduğunu;

Aksini açıkça belirtmediğim/belirtmediğimiz takdirde, bu formla yapılan proje önerisinde yer alan tüm resim ve ekli belge ile yayınların özgün olduğunu,

Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'nın bu form ile yaptığım/yaptığımız proje önerisini kabul etmek zorunda olmadığını,

Türkiye Cumhuriyeti Kanunlarına ve sair mevzuat hükümleri ile Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı San-Tez Proje değerlendirme ve destekleme kural ve usullerini bildiğimi/bildiğimizi ve bu hükümlere uygun hareket edeceğimi/edeceğimizi;

Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'nın yukarıda anılan kural ve usullerine ilişkin düzenlemelerini gerekli gördüğünde değiştirebileceğini ve yapılacak bu değişikliklere de uymak zorunda olduğumu/olduğumuzu kabul ve taahhüt ederim/ederiz.

Yukarıda uymayı kabul ve taahhüt ettiğim/ettiğimiz kurallara uymadığımızın ve/veya verdiğim/verdiğimiz bilgilerde gerçeğe aykırı beyanda bulunduğumun/bulunduğumuzun Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'nca tespit edilmesi halinde, Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından alınacak karar ve uygulanacak yaptırımlara uyacağımı/uyacağımızı kabul ve taahhüt ederim/ederiz.

<b>Adı Soyadı</b>	<b>İmzası</b>
<b>Proje Yürütücüsü</b>	
<b>Tez Öğrencisi</b>	
<b>Yardımcı Araştırmacı</b>	
<b>Yardımcı Personel</b>	

*Not: Eğer birden fazla Tez Öğrencisi, Yardımcı Araştırmacı veya Yardımcı Personel varsa tebloya ekleyiniz.*

PROJE ÖZETİ	FORM NO: 5
<p>Hepatit B, hepatit B virusu tarafından oluşturulan bir enfeksiyon hastalığıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, tüm dünyada iki milyar insan enfeksiyona yakalandığı, 350 milyon insanda enfeksiyonun kronikleştiği düşünülmektedir. HBV enfeksiyonunun komplikasyonu olarak siroz ve karaciğer kanserinden ölen insan sayısının 600,000 dolaylarında olduğu tahmin edilmektedir. Hepatit B'nin böylesine büyük bir küresel halk sağlığı sorunu olması şaşırtıcı değildir. HBV'nun HIV'den 50 – 100 kat daha bulaşıcı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle HBV enfeksiyonunun tanısının konulması için duyarlılığı yüksek testlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Kitlesel taramalarda ve hastalığın takibinde kullanılan en önemli testler, HBV yüzey antijeni (HBsAg, HBVgp2) ile bu antijene karşı oluşan antikor yanıtının ölçülmesini sağlayan ELISA tabanlı kalitatif ve kantitatif testlerdir. RNA aracılı bir replikasyon döngüsüne sahip olan HBV'nun tüm genomunda ve özellikle HBVgp2 geninde mutasyonlar belirli bir hızda oluşmakta ve konakçıda seçilime uğramaktadır. HBsAg majör hidrofilik bölgesi başta olmak üzere, tüm HBVgp2 peptidi boyunca mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların HBsAg ve anti-HBsAg antikorını saptamada ve düzeylerinin ölçümünde kullanılan tanısal testlerin duyarlılıklarını etkilediği bir çok çalışma grubu tarafından bildirilmektedir. Bu durumda, hepatit B tanısında kullanılacak testlerin geliştirilme süreci, majör HBsAg serotiplerini duyarlı şekilde tanımanın yanı sıra, yeni tanımlanacak olan mutasyonların oluşturacağı yeni serotipleri de kapsayacak şekilde revize edilmesini de içermektedir.</p> <p>Bu projede HBsAg ve anti-HBsAg antikoru ELISA testlerinin geliştirilmesinde kullanılacak rekombinant HBVgp2 proteinin sentezi ve saflaştırılması için süreç kurulacaktır. HBV enfekte hücre hatlarından elde edilecek HBVgp2 kalıbı üzerinde yönlendirilmiş mutagenез teknikleri uygulanarak HBsAg genotipleri oluşturulacaktır. Bakteriyel ve maya ekspresyon sistemleri kullanılarak elde edilen rekombinant HBsAg'nin immünoreaktif konformasyonda elde edilmesi için ifadelendirme ve saflaştırma basamakları optimize edilecektir.</p>	
<p style="text-align: center;"><b>Anahtar Sözcükler</b></p> <p><b>Hepatit B yüzey antijeni, rekombinant protein üretimi, ELISA</b></p>	



<b>ABSTRACT</b>	<b>FORM NO: 6</b>
<p>Hepatitis B is an infectious disease caused by hepatitis B virus. According to World Health Organization, 2 billion of people has been infected with HBV, 350 million has acquired chronic infection. It has been estimated that, 600,000 people die annually, who has developed complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It is not surprising that hepatitis B is a global health problem, as HBV is 50 – 100 times more infectious than HIV. For this reason, highly sensitive diagnostic tests are needed. ELISA based tests targeting the detection and quantitation of both hepatitis B surface antigen (HBsAg, HBVgp2) and anti-HBsAg antibodies are widely used for screening of the population and for monitoring the follow up patients. RNA mediated replication cycle of HBV enhance the mutation rate in HBV genome and especially in HBVgp2 under selective pressure. There are numerous reports of HBVgp2 mutations, particularly affecting the major hydrophilic loop of HBsAg, that hinder the sensitivity of diagnostic tests. Therefore, diagnostic HBV test development is a ceaseless process as one should consider to revise and cover newly defined mutations along with the well known genotypes to the test system.</p> <p>In this project, we aim to produce recombinant HBVgp2 protein that is intended to be used in the development of HBsAg and anti-HBsAg antibody ELISA tests. HBV infected hepatoma cell lines will be used as source for HBVgp2 template. Once HBVgp2 cloned, HBsAg genotypes will be constructed by using multiple rounds of site directed mutagenesis experiments. These constructed HBVgp2 genes will be expressed in bacterial and yeast systems. Whole process will be optimized in order to obtain immunoreactive recombinant HBsAg protein.</p>	
<p><b>Keywords</b></p> <p><b>Hepatitis B surface antigen, recombinant protein production, ELISA</b></p>	

<b>LİTERATUR ÖZETİ</b>	<b>FORM NO:7</b>
Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Projenin AR-GE niteliğine uygun olarak doldurunuz	

### *Hepatit B virusunun genel özellikleri*

Hepatit B virusu (HBV), akut ve kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma yol açan küresel bir halk sağlığı sorunudur (1). Hepadnaviridae ailesinin bir üyesi olan HBV, zarflı bir virustur. Kor proteinlerinden oluşan kapsidin içinde DNA yapısında viral genom ve viral polimeraz enzimi yer almaktadır. Yaklaşık 3200 nükleotid uzunluğundaki viral DNA, çembersel yapıda ve kısmen çift ipliklidir (1; 2). Tam uzunluktaki DNA iplikliği 3020 - 3320, diğer iplikçik ise 1700 - 2800 baz çifti uzunluğundadır (3). Viral genom birbiri ile örtüşen dört açık okuyan çerçeveye sahiptir.

HBV karmaşık bir replikasyon döngüsüne sahiptir. Replikasyonunda ters transkriptaz enzimini kullanan bilinen az sayıdaki non-retroviral viruslardan biridir (4; 5) DNA virusu olmasına rağmen HBV genomu önemli ölçüde varyasyon göstermektedir. Akut enfeksiyon sırasında virionlara günde  $10^{10}$  hatalı sentezlenmiş nükleotid girdiği bildirilmektedir (6). HBV genomu için hesaplanan mutasyon hızının  $1.4 - 3.2 \times 10^{-5}$  substitüsyon/nokta/yıl düzeyinde olduğu, bu hızın yüzey antijeni için daha da yüksek olduğu bildirilmektedir (7).

### *HBV zarf proteinleri*

Hepatit B virusu zarf proteinleri E açık okuyan çerçevesinde kodlanmaktadır. İnsan HBV genomunda üç farklı transkripsiyon başlangıç noktası bulunmaktadır. Pre-S1, Pre-S2 ve S transkripsiyon başlangıç noktalarının kullanılmasına göre sırası ile 400, 281 ve 226 amino asit uzunluğunda zarf proteinleri üretilmektedir. Bu proteinler sırası ile L, M ve S zarf glikoproteinleri olarak adlandırılmaktadır (5; 8; 9).

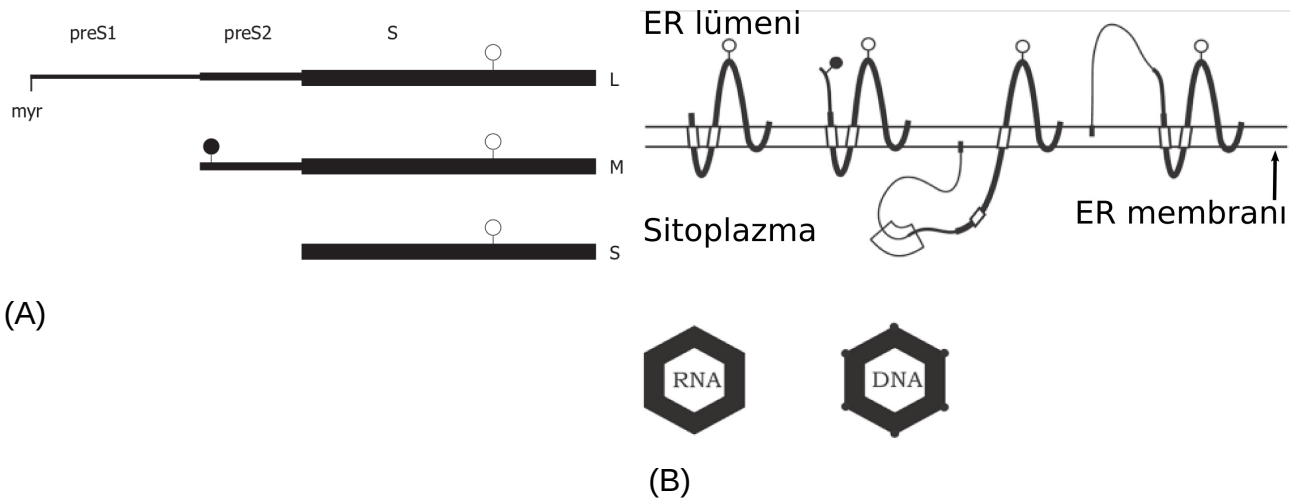
HbsAg'nin üç boyutlu yapısını incelemek mümkün olmamıştır. Nativ HbsAg izole edilemediği için proteinin tersiyer yapısı ile ilgili bilgilerimiz daha çok diziyi oluşturan amino asitlerin fizikokimyasal özelliklerini kullanarak gerçekleştirdiğimiz hesaplamalara ve mutagenез çalışmalarına dayanmaktadır (9–13). Buna göre HbsAg (hepatit B virusu glikoprotein 2: HBVgp2), dört transmembran heliksin oluşturduğu çerçeve yapının desteklediği viral zarf yüzeyinde yükselen majör hidrofilik bölgeden (ilmek) oluşmaktadır (4; 9; 13)

HBV zarf proteinleri de diğer proteinler gibi endoplazmik retikulumda sentezlenmektedir. S peptidinin 8 ile 22'nci amino asitleri endoplazmik retikulum (ER) zarına insersiyon için gerekli sinyal motifini içerdiği bildirilmektedir. Peptidin 80 ile 98'inci amino asitleri arasında

bulunan ikinci bir sinyal bölgesi ise S proteininin C-terminalinin ER lümenine doğru oriyante olmasını sağladığı düşünülmektedir. Peptidin son 57 amino asiti ise endoplazmik retikulum membranına yerleştiği düşünülen hidrofobik aminoasitlerden oluşmaktadır. ER lümeninde yer alan protein ilmeğinde bir adet N-glikozilasyon bölgesi bulunduğu öngörülmektedir (4; 14).

S peptidinden 165 nükleotid geride transkripsiyon başlangıç noktasına sahip M proteini, 281 amino asitten oluşmaktadır. N-terminalde yer alan ekstra amino asitler, sentez sonrasında endoplazmik retikulum lümenine doğru oryante olduğu bildirilmektedir. Bu bölgede, S peptidindekine ek olarak bir adet daha N-glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır (4; 14).

L peptidi 1203 nükleotid tarafından kodlanmakta ve 400 amino asitten oluşmaktadır. Transkripsiyon başlangıç noktası, M proteinininkinden 357 nükleotid geride yer almaktadır. L peptidinin N-terminalinde yer alan ikinci amino asit glisin, miristoyile olarak endoplazmik retikulum membranına girmektedir. Sentezden sonraki ilk katlanmada, proteinin miristoyile olarak membrana tutunan N-terminali ile S-peptidi ikinci ER insersiyon sinyal bölgesi arasında kalan protein ilmeğinin sitoplazma tarafında yerleştiği düşünülmektedir. L peptidinin bu konfigürasyonu i-preS olarak adlandırılmaktadır. S peptidi birinci sinyal bölgesinin ER membranına insersiyonu ile L peptidi yeniden katlanma geçirmekte, miristoyile olmuş uç ile S birinci sinyal bölgesi arasında kalan protein ilmeği, ER lümenine doğru oryante olarak e-preS konfigürasyonuna gelmektedir. Bu konformasyonlardan i-preS, kapsid proteinleri ile etkileşime girerken, e-preS'in viral zarfın dışında yer alarak enfekte edilecek hücrelere girişte rol oynadığı düşünülmektedir. L peptidi N-terminal kısmında öncekilere ek olarak bir adet daha potansiyen N-glikozilasyon noktası bulunmaktadır (10; 13; 14).



**Şekil 1.** L, M ve S peptidlerin lineer haritaları (A) myr: L peptidi miristoyilasyon bölgesi, açık ve kapalı yuvarlaklar: N-glikozilasyon noktaları. Peptidlerin sentez sonrası ER membranında katlanmaları (B) (4).

S peptidinin ER lümeninde bulunan ilmeğinde sistein amino asitleri disülfid köprüleri yapmaktadır (15).

S peptidi üzerinde bulunan a – determinantı, HBV enfeksiyonu tanısında kullanılan antikor tabanlı testlerde kullanılan bölge olmasının yanı sıra, HBV aşılıları için de en önemli hedefi oluşturmaktadır (16–21).

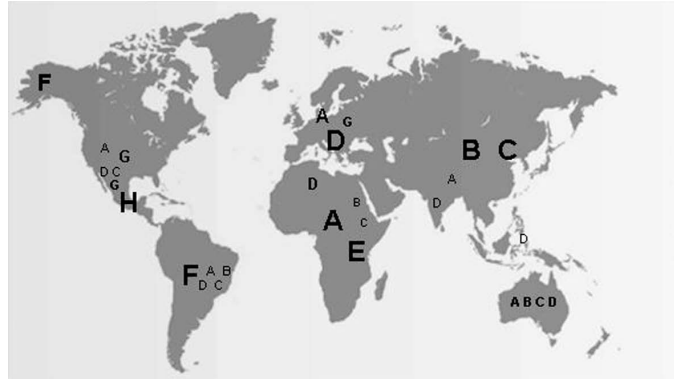
HBV enfeksiyonunun tanısında yararlanılan iki önemli test, serumda HBsAg'nin ve anti-HBsAg antikorlarının saptanmasıdır (22; 23). Gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonu prevalansının %8 düzeyinde bulunması ve bu bireylerin %80'inin hiçbir belirti göstermeksizin virüsü taşıyor olmaları, duyarlı test sistemlerinin kullanılmasının önemini göstermektedir (24). Testlerin duyarlılığı, enfeksiyonu saptanmasını güçleştiren pencere aralığının da daralmasını sağlayarak tanısal süreci hızlandırmaktadır. RNA aracılı bir replikasyon döngüsüne sahip olan HBV'nun genomunda ve özellikle yüzey antijeni HBVgp2 geninde oluşan mutasyonlar, HBsAg'ine yönelik duyarlı tanısal testlerin geliştirilmesinde önemli zorlukları da beraberinde getirmektedir (9). HBV suşları, S peptidinin zarftan dışarı doğru çıkan ve hepatositlerdeki reseptöre bağlanmada rol oynayan majör hidrofilik bölgesinde yer alan a – determinantı dizisine göre genotiplendirilmektedir (25). S peptidi 122, 127 ve 160 numaralı amino asitlerine göre belirlenen a - determinantı genotiplerinin HBV genotiplerine dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Tablo 2'de ise, a - determinantı genotiplerini oluşturan amino asit kombinasyonları sıralanmıştır (25–28).

**Tablo 1.** HBV genotipleri ile a – determinantı genotipleri (17; 18; 25; 27; 28).

<b>HBV Genotipi</b>	<b>a – determinantı genotipleri</b>
A	adw2 (nadiren ayw1)
B	adw2, ayw1
C	adw2, ayr, adrq-
D	ayw2, ayw3, ayw4
E	ayw4 (nadiren adw2)
F	adw4q-
G	adw2
H	adw4

**Tablo 2. a – determinantı genotipleri (25–28)**

S peptidi amino asit HBVgp2 geni S fragmentindeki Genotip	pozisyonu ve amino asit	nükleotid pozisyonu ve nükleotid	
122: Lys		365: A	d
122: Arg		365: G	y
127: Pro			w1
127: Pro			w2
127: Thr			w3
127: Leu / Ile			w4
160: Lys		479: A	w
160: Arg		479: G	r



**Şekil 2. HBV genotiplerinin coğrafi dağılımı (25).**

HBV genotipleri ile kronikleşme ve hepatoselüler kanser gelişimi arasında ilişki olduğuna ilişkin veriler bulunmaktadır (18; 29–31). A – H genotipleri ile birlikte bulunması olası HBVgp2 (HBsAg) a – determinantı genotipleri Tablo 2'de sıralanmıştır. Ancak, serolojik yönden öneme sahip majör hidrofilik bölge mutasyonları bunlar ile sınırlı değildir. Majör hidrofilik bölgenin 107 – 138 ve 139 – 147 amino asit pozisyonları ile belirlenen ilmeklerinde yer alan bir çok mutasyon rapor edilmiştir (17; 18; 26; 30–36). HBV'nun halk sağlığı yönünden önemi düşünüldüğünde, bu mutasyonların tanısal kitlerin duyarlılıkları üzerindeki etkileri ve bu kitlerde yapılması gereken revizyonlar süreklilik gösteren bir araştırma ve geliştirme alanını oluşturmaktadır (37–40). HBV genotiplerinin ve bununla paralellik gösteren HBsAg serotipleri coğrafi dağılım gösteriyor olsa da, ulaşım olanaklarının ve ticari ilişkilerin çok arttığı küreselleşmiş modern dünyada, tanısal kitlerin dağılımdan bağımsız olarak duyarlılık ve özgüllük göstermesi gerekliliği bulunmaktadır (25). Türkiye'de yapılan çalışmalarda, diğer genotipler ile ilgili vaka raporları bulunmakla

birlikte, D genotipinin baskın tip olduğu bildirilmektedir (33; 34). Leblebicioğlu ve ark., Hepatit Çalışma Grubu'nun verilerini sundukları çalışmalarında test ettikleri 147 HBV pozitif hastanın 129'unun D genotipinde, bunların da 122'sinin D2 alt tipinde olduğunu bildirmiştir (33).

Yuan ve ark. HBsAg PreS1 ve kor antijenlerini kombine olarak test etmek üzere geliştirdikleri ELISA testinin duyarlılığının HBV DNA saptanması ile aynı olduğunu, ancak test edilen 271 hastadan birinin a – determinantında bulunan bir mutasyon nedeni ile negatif sonuç verdiğini bildirmektedir (41). Yedi ticari HBsAg saptamaya yönelik ELISA kitini değerlendiren Deguchi ve ark., HBsAg genotiplerinin kitlerin saptama alt sınırlarını etkileyebildiğini ve bazı kitlerin belirli genotipleri tanıyamayarak yalancı negatif sonuç verdiğini göstermiştir (42). Otomatize sistemlerin kullanıldığı IMMULITE HBsAg, IMMULITE HBsAg 2000, Elecsys HBsAg, Auszyme Monoclonal, IMx HBsAg, AxSYM HBsAg ve PRISM HBsAg testlerini karşılaştıran Weber ve ark., sistemler arasındaki duyarlılık farklarının mutantlara karşı duyarlılık farklarından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (43; 44). Ali ve ark., dokuz majör HBsAg a – determinantı tipinden başka, çoğu majör hidrofilikilmek üzerinde oluşmuş mutantların otomatize HBsAg testlerinin duyarlılıklarını etkilediğini göstermişlerdir (45). Onyedici CE belgeli HBsAg saptama kitini karşılaştıran Scheiblauer ve ark., test edilen HBV'nun serotipine bağlı olarak test sistemlerinin saptama alt sınırlarının 5 – 10 kat farklı olduğunu saptamışlardır (46; 47).

### **Kaynaklar:**

1. Tan J, Lok AS. Update on viral hepatitis: 2006. Curr. Opin. Gastroenterol. 2007 May;23(3):263-267.[cited 2011 Sep 2 ]
2. Rodríguez-Frias F, Jardi R. [Molecular virology of the hepatitis B virus]. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2008 May;26 Suppl 7:2-10.[cited 2011 Sep 2 ]
3. Kay A, Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution. Virus Research 2007 Aug;127(2):164-176.[cited 2011 Sep 2 ]
4. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. World J. Gastroenterol. 2007 Jan;13(1):65-73.[cited 2011 Sep 3 ]
5. Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. World J. Gastroenterol. 2007 Jan;13(1):48-64.[cited 2011 Sep 3 ]
6. Doo E, Liang TJ. Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drug resistance in hepatitis B virus infection. Gastroenterology 2001 Mar;120(4):1000-1008. [cited 2011 Sep 2 ]
7. Zaaijer HL, Bouter S, Boot HJ. Substitution rate of the hepatitis B virus surface gene. J. Viral Hepat. 2008 Apr;15(4):239-245.[cited 2011 Sep 4 ]

8. Samuel Baron AJZ. Hepatitis Viruses [Internet]. 1996;[cited 2011 Sep 2] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7864/>
9. Ie SI, Thedja MD, Roni M, Muljono DH. Prediction of conformational changes by single mutation in the hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) identified in HBsAg-negative blood donors. *Virol J* [date unknown];7:326-326.
10. Urban S, Gripon P. Inhibition of Duck Hepatitis B Virus Infection by a Myristoylated Pre-S Peptide of the Large Viral Surface Protein. *J. Virol.* 2002 Feb;76(4):1986-1990.[cited 2011 Sep 4 ]
11. Engelke M, Mills K, Seitz S, Simon P, Gripon P, Schnölzer M, Urban S. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology* 2006 Apr;43(4):750-760.[cited 2011 Sep 4 ]
12. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* 2007 Dec;46(6):1759-1768.[cited 2011 Sep 4 ]
13. Peterson DL, Nath N, Gavilanes F. Structure of hepatitis B surface antigen. Correlation of subtype with amino acid sequence and location of the carbohydrate moiety. *J. Biol. Chem.* 1982 Sep;257(17):10414-10420.[cited 2011 Sep 4 ]
14. Eble BE, MacRae DR, Lingappa VR, Ganem D. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Mol. Cell. Biol.* 1987 Oct;7(10):3591-3601.[cited 2011 Sep 4 ]
15. Xiong S, Wang Y-F, Ren X-R, Li B, Zhang M-Y, Luo Y, Zhang L, Xie Q-L, Su K-Y. Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its "oxidizing" mutant. *World J. Gastroenterol.* 2005 Feb;11(7):1077-1082.[cited 2011 Sep 2 ]
16. Carman WF, Trautwein C, van Deursen FJ, Colman K, Dornan E, McIntyre G, Waters J, Kliem V, Müller R, Thomas HC, Manns MP. Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 1996 Sep;24(3):489-493.[cited 2011 Sep 4 ]
17. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of "a" determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn. J. Infect. Dis* 2008 Jan;61(1):73-76.[cited 2011 Aug 17 ]
18. Ruiz-Tachiquín M-E, Valdez-Salazar H-A, Juárez-Barreto V, Dehesa-Violante M, Torres J, Muñoz-Hernández O, Alvarez-Muñoz M-T. Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virol J* [date unknown];4:6-6.
19. Bo H, Minjian L, Guoqiang H, Zhaoxia L, Zhenyu Z, Lin L. Expression of hepatitis B

- virus S gene in *Pichia pastoris* and application of the product for detection of anti-HBs antibody. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005 Nov;38(6):683-689.[cited 2011 Sep 2 ]
20. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 1984 Jan;307(5947):178-180. [cited 2011 Sep 4 ]
21. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. 1984. *Biotechnology* 1992;24:500-502.[cited 2011 Sep 4 ]
22. Odinsen O, Owusu-Ofori S, Dompok A, Sarkodie F, Opare-Sem O, Parker D, Allain J-P. Antibody Detection and Kinetics of Antibody Production during Early Stages of Immunization with Hepatitis B Virus Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007 Dec;14(12):1623-1628.[cited 2011 Sep 2 ]
23. Cambron P, Jacquet J-M, Hoet B, Lievens M. Development and Technical and Clinical Validation of a Quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Human Antibodies to Hepatitis B Surface Antigen in Recipients of Recombinant Hepatitis B Virus Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009 Aug;16(8):1236-1246.[cited 2011 Sep 2 ]
24. Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010 Aug;58(4):258-266.
25. Pujol FH, Navas M-C, Hainaut P, Chemin I. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2009 Dec;286(1):80-88. [cited 2011 Aug 16 ]
26. Chotiyaputta W, Lok ASF. Hepatitis B virus variants. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009 Aug;6(8):453-462.[cited 2011 Sep 2 ]
27. Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J. Med. Virol.* 2006;78 Suppl 1:S36-42.[cited 2011 Sep 2 ]
28. Ohnuma H, Machida A, Okamoto H, Tsuda F, Sakamoto M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y or w/r. *J Virol* 1993 Feb;67(2):927-932.
29. Tong W, Sun L, He J, He S, Du F. A novel nucleotide insertion in S gene of hepatitis B virus in a chronic carrier. *Virol J* [date unknown];7:104-104.
30. Zekri A-RN, Hafez MM, Mohamed NI, Hassan ZK, El-Sayed MH, Khaled MM, Mansour T. Hepatitis B virus (HBV) genotypes in Egyptian pediatric cancer patients with acute and chronic active HBV infection. *Virol J* [date unknown];4:74-74.
31. Huy TT-T, Ushijima H, Win KM, Luengrojanakul P, Shrestha PK, Zhong Z-H, Smirnov AV, Taltavull TC, Sata T, Abe K. High Prevalence of Hepatitis B Virus Pre-S



Mutant in Countries Where It Is Endemic and Its Relationship with Genotype and Chronicity. *J. Clin. Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5449-5455.[cited 2011 Sep 2 ]

32. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *Journal of General Virology* 2000 May;81(5):1165 -1174.[cited 2011 Aug 16 ]

33. Leblebicioglu H, Eroglu C. Acute hepatitis B virus infection in Turkey: epidemiology and genotype distribution. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004 Jun;10(6):537-541.[cited 2011 Sep 2 ]

34. Sayan M, Akhan S, Bozdayı M. Genotype A2/adw2 Strain of Hepatitis B Virus in Turkey: A Case Report. *Hepatits Monthly* 2010;10(4):302-305.

35. Güven R, Ozcebe H, Cakir B. Hepatitis B prevalence among workers in Turkey at low risk for hepatitis B exposure. *East. Mediterr. Health J.* 2006 Nov;12(6):749-757.[cited 2011 Sep 2 ]

36. Değertekin H, Yalçın K, Yakut M. The prevalence of hepatitis delta virus infection in acute and chronic liver diseases in Turkey: an analysis of clinical studies. *Turk J Gastroenterol* 2006 Mar;17(1):25-34.[cited 2011 Sep 2 ]

37. Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Ferey M-P, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso A-M. Sensitivities of Four New Commercial Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Assays in Detection of HBsAg Mutant Forms. *J. Clin. Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2321-2326.[cited 2011 Sep 2 ]

38. Scheiblauer H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert H -P, Prince A. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes. *Vox Sanguinis* 2010 Apr;98(3p2):403-414.[cited 2011 Sep 2 ]

39. Ismail N, Fish GE, Smith MB. Laboratory Evaluation of a Fully Automated Chemiluminescence Immunoassay for Rapid Detection of HBsAg, Antibodies to HBsAg, and Antibodies to Hepatitis C Virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004 Feb;42(2):610-617.[cited 2011 Sep 2 ]

40. Wolters G, Nelissen P, Kuijpers L. Improved ELISA for the detection of HBsAg. *Journal of Virological Methods* 1985 Apr;10(4):299-305.[cited 2011 Aug 18 ]

41. Yuan Q, Ge S-xiang, Yan Q, Zhao Y, Xiong J-hui, Zhang J, Xia N-shao. [Establishment of a new combined enzyme immunoassay for detection of HBV preS1 and core antigens and the consistency with HBV DNA test]. *Bing Du Xue Bao* 2007 Jul;23(4):252-257.[cited 2011 Aug 30 ]

42. Deguchi M, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tsuchida T, Iinuma K, Sanborn M.

[Evaluation of seven immunological assay reagents for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) in the sensitivity and the detection of HBsAg mutants]. Kansenshōgaku Zasshi 2005 Feb;79(2):138-142.[cited 2011 Aug 17 ]

43. Weber B, Bayer A, Kirch P, Schluter V, Schlieper D, Melchior W. Improved Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by a New Rapid Automated Assay. J. Clin. Microbiol. 1999 Aug;37(8):2639-2647.[cited 2011 Sep 2 ]

44. Weber B, Dengler T, Berger A, Doerr HW, Rabenau H. Evaluation of Two New Automated Assays for Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Detection: IMMULITE HBsAg and IMMULITE 2000 HBsAg. J. Clin. Microbiol. 2003 Jan;41(1):135-143.[cited 2011 Sep 2 ]

45. Ali A, Pearce S, Coleman P. Factors affecting immunodetection of hepatitis B surface antigen recombinant mutants. Journal of Medical Virology 2007 Jan;79(S1):S47-S51.[cited 2011 Aug 17 ]

46. Scheiblaue H, Soboll H, Nick S. Evaluation of 17 CE-marked HBsAg assays with respect to clinical sensitivity, analytical sensitivity, and hepatitis B virus mutant detection. J. Med. Virol. 2006;78 Suppl 1:S66-70.[cited 2011 Sep 5 ]

47. Dufour DR. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Assays--Are They Good Enough for Their Current Uses? Clin Chem 2006 Aug;52(8):1457-1459.[cited 2011 Aug 17 ]

PROJENİN AMACI	FORM NO:8
<p>Bu proje kapsamında, HBsAg ELISA ve anti-HBsAg ELISA testlerinin geliştirilmesinde kullanılacak rekombinant HBVgp2 proteinin sentezi gerçekleştirilecektir. Bu amaçla, bakteriyel ve maya ekspresyon sistemleri kullanılacaktır. Ekspresyon vektörlerine klonlanacak referans HBVgp2 mutant dizilerinin elde edilmesi için, genomuna entegre durumda HBV genomu taşıyan hepatoselüler karsinom hücre hatlarından elde edilen transkriptlerden yararlanılacaktır. Bu transkriptlerden elde edilecek genetik materyale yönlendirilmiş mutagenез yöntemleri kullanılarak istenilen genotip kazandırılacaktır. Proteinlerin nativ ve immünoreaktif şekilde eksprese edilmesi ve saflaştırılması için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilecektir.</p>	

PROJENİN GEREKÇESİ VE HEDEFLERİ	FORM NO:9
<p>Ülkemizde tahmini verilere göre, her yıl en az yüz milyon dolar seviyesinde kaynak tanı kiti ithalatına aktarılmaktadır ve bu alanda rekabet edebilecek yerli bir firma bulunmamaktadır. Mevcut firmalardaki önemli bir kısmının bilimsel alt yapısı ar-ge projeleri yapmaya müsait değildir ya da düşünsel bazda ar-ge için hazır değildir. Ülkemizde tahminlerin çok ötesinde eğitilmiş, kabiliyetleri tartışılma götürmez ama biyoteknolojik bir ürünü kullanmaya göre kodlanmış insan kaynağı bulunmaktadır.</p> <p>Tanısal ELISA kitlerinin, yurtdışından alınan bileşenlerin bir araya getirilmesi yolu ile üretilmesi yerine bu bileşenlerin ülkemizde üretilmesine yönelik araştırma ve geliştirme çalışmalarının yapılması bu projenin temel gerekçesini oluşturmaktadır. Proje sonucu elde edilecek rekombinant proteinler, saf antijen gerek ELISA kiti üretiminde kullanılacak, gerekse bu ürünleri ara mamul olarak kullanacak başka firmalara pazarlanacaktır.</p> <p>Projenin konusunu oluşturan hepatit B yüzey antijenlerinin üretimi, rekombinant protein üretimi için bir model oluşturarak biyoteknoloji alanında faaliyet gösteren proje ortağı firmanın bu “know – how” edinerek benzer teknolojilere dayanan ürün ve yenilik geliştirme potansiyeline katkıda bulunacaktır. Bu da toplamda dışa bağımlı olduğumuz biyoteknolojik ürünler konusundaki bu bağımlılığımızı azaltmak ve hatta durumu tersine döndürerek Türkiye'nin teknolojik ürün ihraç eden ülke konumuna gelmesine katkıda bulunacaktır.</p> <p>Bir ELISA test sisteminde çeşitli bileşenler bulunmaktadır. Bunların en önemli ikisi, belirli özgüllüğü ve duyarlılığı olan, saf, çapraz reaksiyon vermeyen (yanlışlıkla benzer başka antikor ya da antijenle bağlanmayan) antikor ve antijendir. Bu proje kapsamında bu iki önemli bileşenden saf antijenin üretimi başarılabacaktır. Bilimsel alt yapımız bütün bunları geliştirmeye yeterli olmakla birlikte üretim maliyeti ve patent zorunlulukları gibi gerekçelerle bu aşamada diğer önemli bileşen olan poliklonal ve monoklonal anti HBs antikorları bu aşamada dış alımla sağlanacaktır.</p> <p>Önemli bir halk sağlığı sorunu olan HBV enfeksiyonunun yaygınlığı ve kronikleşerek oluşturduğu komplikasyonlar düşünüldüğünde insan serumunda HBsAg'nin ve buna karşı oluşan antikorların saptanmasını sağlayan kitler sağlık alanında vazgeçilemez bir gider kalemini oluşturmaktadır. Hepatit B tanısal kitlerinde kullanılacak HBsAg'inin üretimi, biyoteknoloji alanında ithalata dayalı olarak giderilen bu önemli gereksinimin yerli alternatifini ortaya koyacaktır. HBsAg ve anti-HBsAg antikor saptanması tüm dünyada gereksinim duyulan bir teknolojidir. Teknolojik parçaları dış alımla sağlayan ve bunları birleştiren üretici konumundan teknolojik ürünü kendisi üreten firma / ülke konumuna gelmesi dünya pazarlarındaki rekabet gücümüzü artıracaktır.</p>	
<p><i>Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan amaç ve hedefleri göz önüne alarak doldurunuz.</i></p>	

*a. Projenin Ar-Ge niteliği,*

Proje kapsamında, endüstriyel ölçekte bir rekombinant protein üretim süreci oluşturulacaktır. Üretmeyi hedeflediğimiz protein, hepatit B virusunun değişkenlik gösterdiği bilinen yüzey proteinidir. Global ölçekte kullanılabilecek tanısal kit sisteminin bileşeni olmasını hedeflediğimiz rekombinant ürünlerimizin belli başlı genotiplerin peptid dizisine sahip olmasını sağlamak amacı ile yönlendirilmiş mutagenез tekniklerinden yararlanılarak, hedeflenen peptid dizilerini ifadeleyebilecek DNA konstraktlar oluşturulacaktır. Buna ek olarak bu proteinlerin ekspresyon konağında sentezlenmesinde ve bakteri ve maya hücrelerinden saflaştırılmasında uygun antijenik konformasyonda bulunmaları için süreç optimize edilecektir.

*b. Projenin yeni bir ürün ve/veya üretim yöntemi, mevcut ürün ve/veya üretim yöntemlerinde yenilik geliştirmeye yönelik olup olmadığı,*

Türkiye'de bildiğimiz kadarı ile endüstriyel ölçekte rekombinant protein sentezi yapılmamaktadır. Rekombinant protein üretim teknolojisi, katma değeri yüksek biyoteknolojik ürünlerin oluşturulmasında kilit öneme sahiptir.

*c. Sanayide karşılaşılan teknolojik veya teknik bir sorunun giderilmesine nasıl bir katkı sağlayacağı,*

Proje böyle bir sorunla ilgili değildir.

*d. Proje konusu ile ilgili olarak mevcut çalışmalar ve kısıtlar,*

Projemiz kapsamında üreteceğimiz rekombinant HBsAg'nin üretimine dair biyoteknolojide ileri ülkelerde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. HBsAg'nin farklı genotiplerinin uygun moleküler konformasyonda sentezlenmesi en büyük zorluğu oluşturmaktadır. Ayrıca, HBV'nun doğası gereği, virus genomu ve HBsAg mutasyon geçirmeye açık bir proteindir. Tanısal kit geliştirmek için yapılacak üretimde, zaman içinde toplumda yaygınlık kazanan yeni mutantların da genotip kütüphanesine eklenmesi ve ürün olarak sentezlenmesi gerekecektir.

*e. Projenin Ar-Ge aşamaları, (tasarım ve tasarım doğrulama, prototip/modelleme gibi),*

Rekombinant HBsAg üretimi süreci, aşağıdaki basamaklar ile gerçekleştirilecektir:

- HBsAg geninin HBV ile enfekte hücre hatlarından çoğaltılarak klonlanması ve DNA dizi analizi ile doğrulanması.
- Bu dizinin yönlendirilmiş mutagenез teknikleri ile “mutasyon” a uğratılması ile farklı HBsAg genotipleri için eksprese edilebilir durumda referans dizi kütüphanesinin oluşturulması.
- Öncelikle seçilmiş bir genotipe ait HBsAg gen dizisinin ekspresyon vektörlerine aktararak bakteri ve maya ekspresyon sistemlerinde ifadeleneşinin optimizasyonu.
- İfadelenen ürünün antijenik etkinliğinin belirlenmesi için western blot ve ELISA deneyleri
- Oluşturulan genotip kütüphanesindeki diğer genotiplere ait genlerin de ekspresyon vektörüne klonlanması ve ifadeleneşinin sağlanması
- Elde edilen rekombinant proteinlerin saflaştırılması için kromatografik seperasyon sürecinin optimizasyonu

*f. Hedeflenen proje çıktısının ulusal veya uluslararası pazarlarda üretilen benzerleri ile üretim yöntemi veya teknolojiler açısından kıyaslamaları,*

Ülkemiz in vitro diyagnostik kit alanında önemli bir ithalat ülkesi ve büyük bir pazardır.Çok uluslu büyük firmaların tamamı ülkemizde hiçbir yerli rekabetle karşılaşmadan mal ve hizmet satışı yapabilmektedir.Bazen aralarında anlaşarak bazı ürünlerin pazarlamasında rekabet yapıp fiyatı düşürmek yerine işbirliği halinde yüksek fiyatla ürün satabilmektedir.Bunun yanı sıra, tanınmış büyük firmaların bile ellerindeki stabilitesi bozulmuş veya sensitivitesi düşük ürünleri ülkemizde sattığı tarafımızdan birçok kere saptanmıştır.

Diğer önemli bir nokta ise, hepatit B virusunun geçirdiği mutasyonlar sonucu tanısal kitlerin yeni mutantları saptamada yetersiz kalabileceği gerçeğidir. Özellikle, kendi coğrafi bölgemizde tanımlanan yeni mutasyonların tanısal kit içeriğine en hızlı şekilde dahil edilmesi olanağı projenin önemli bir çıktısı olacaktır.

*g. Proje ortakları arasında kurulan işbirliğinin kalıcı ve sürekli olması yönündeki eğilimler,*

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nün 2011 yılında T.C. Kalkınma Bakanlığı'na önermiş olduğu "Sistem Biyolojisi Mükemmeliyet Merkezi ve Ulusal Sistem Biyolojisi Ağı" projesi, Enstitümüz bünyesinde gerçekleştirilen ArGe etkinliklerinin sonuçlarının sanayiye aktarılması için önemli bir platform oluşturulmasını ve somut işbirliklerinin kurulmasını içermektedir. Aba Biyoteknoloji Araştırma Sanayi ve Ticaret Ltd Şti, biyoteknolojik ürünler geliştirmek için önemli ArGe yatırımları gerçekleştirmiş olan bir firmadır. Firma, Enstitümüzde geliştirilen ve geliştirilecek biyoteknolojik ürün ve süreçlerin katma değere dönüştürülmesinde önemli bir partner olma potansiyeline sahiptir.

*h. Fikri ve sınai mülkiyet hakları ile ilgili olarak bu konuda daha önce alınan patent v.b. olup olmadığı ve projenin yeni patentler için potansiyel vaad edip etmediği,*

Üretmeyi planladığımız rekombinant antijenler ve ana mamul olacak test kitlerinin çeşitli dizaynları ileri dönemlerde patent için potansiyel oluşturmaktadır.

*Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Projenin Teknolojik Yönünü göz önüne alarak doldurunuz.*

**Proje ile önerilen ürün veya üretim yönteminin ticarileştirilme stratejilerini ve ticari getirilerinin ne kadar sürede gerçekleşebileceği,**

Proje ortağı firma Aba Biyoteknoloji, halihazırda HBs Ag ve Anti HBs tanı kitleri üretimi yapmaktadır. Bu nedenle üretilmesi düşünülen rekombinant antijenler yurt dışından yüksek bedeller ödenerek satın almaktadır. Bu projedeki amacımız bu rekombinant antijenlerin üretimini başarmak ve bu alandaki dışa bağımlılığa son vermektir. Üretilen antijenler hazır olur olmaz kitlerdeki yerini alacaktır.

Rekombinant HBsAg ülkemizde üretiminin bir diğer getirisi ise, Türkiye toplumunu enfekte eden HBV suşlarının spesifik yüzey antijeni mutantlarının tanınması için sistemine dahil edilmesi için gerekli alt yapı ve know how'ın kazanılmasıdır.

Proje çıktısının katma değer, verimlilik ve rekabet gücü açısından beklenen katkıları, İthal ham made kullanımı ile bir kutu 96 testlik HBs Ag elisa kiti vergiler tanıtım işletme giderleri vb harcamalar hariç 15-17 \$ dolara mal olmaktadır. Recombinant antijenlerin kullanımı ile üretim maliyeti en az % 30 azalacaktır. Buda tahminen ürün kutu (96 test) maliyetini 10-12 \$ seviyesine indirecektir. Bu durumda ürünümüzün rekabet gücü çok yükselecektir. Piyasanın en ucuzu olan Çin firmalarının bile çok altında mal satma şansı olabilecektir.

Burada önemli bir diğer konuda bu tür ürünlerin nakliyesi sırasında yaşanan sorunlar nedeniyle ürün kalitesinde de bir hayli kötüleşmeler olmaktadır. Bu üretim aynı zamanda ürettiğimiz ürünün kalitesini de artıracaktır.

**Proje sonuçlarının yeni bir Ar-Ge projesi başlatma veya diğer teknoloji alanlarında yeni ürün, üretim yöntemi geliştirme etkisi,**

Bu teknolojiye firmamızın sahip olması bu alanda başka ürünlerinde örneğin (HIV, HCV ) gibi pek çok hastalığa karşı gerek elisa ve benzeri test kitlerinin üretimi gerekse geleceğe yönelik planladığımız başta hepatit B aşısı olmak üzere recombinant aşı üretiminin alt yapısını kurmak olacaktır. Türkiye'nin bu alanlardaki ithalat rakamları göz önüne alındığında yapılması planlanan işin önemi bir kez daha ortaya çıkacaktır.

**Bu proje tamamlandığında, proje çıktısının yaygın bir kullanım alanı,**

Tüm Türkiye'nin ELISA test kiti ihtiyacını karşılamak ana hedeftir. Ayrıca proje ortağı firmanın Ortadoğu ve Afrikadaki bağlantıları nedeniyle çok kuvvetli bir ihracat kalemi geliştirilebileceği düşünülmektedir.

**Ulusal kaynakların ortaya çıkarılması ya da işlenmesine bir katkısı,**

Bu tür rekombinant antijen üreten hücrelerin ülkemizde geliştiriyor olması başlı başına bir milli kaynak üretiminin başarılmasıdır. Bu hücreler iyi korunursa bu alanda yüzyıllar boyu ülkemizi bu alanda dışa bağımlılıktan kurtarır. Tamamen yerli ve milli bir kaynak olarak ülkemize hizmet eder. İthalata gerek kalmaz.

**Konularına açıklık getirecek bilgiler yer almalıdır.**

*Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Projenin Projenin Ekonomik Katkısı ve Yaygın Etkisini Göz önüne alarak doldurunuz.*

**PROJE SONUCU ORTAYA ÇIKACAK ÜRÜNE YÖNELİK PAZAR  
ARAŞTIRMASI SONUÇLARI VE FİRMANIN PROJEDEN  
BEKLENTİLERİ**

**FORM NO: 12**

**Projede hedeflenen çıktı ile ilgili olarak yurt içi ve yurt dışı pazar araştırması,**

Ülkemizde çok sağlıklı istatistiki veri olmamasına rağmen bu alanda yaptığımız uzun yıllara dayalı gözlem sonucu ELISA ve benzeri tanı kitleri ithalatına yaklaşık 100 milyon dolar para harcamaktayız. Bu rakamın son kullanıcıya maliyeti açısından bakılınca ise 400 milyon dolarlık bir Pazar olduğunu tahmin etmekteyiz. Bu pazarın % 60-70 kadarını HBs Ag, anti HBs, HIV, HCV kitleri oluşturmaktadır. Bizim ilgilendiğimiz Ortadoğu ve Afrika pazarı ise tahminen Türkiye pazarının 10 katı kadardır. Bu rakamlar sadece ELISA testleri açısından değil de aslında benzer antijen ve antikorlarında kullanıldığı rapit (kaset) testler vb. testler açısından da düşünülünce rakam gerçekten çok büyük miktarlara ulaşmaktadır.

**Proje sonucunda ortaya çıkacak ürünün pazarlama hedefi,**

Başlangıçta (ilk yıl) ürünümüzün Türkiye Pazar payının %3- 4 seviyesinde olacağını düşünmekteyiz. İlerleyen yıllarda bu payın her yıl düzenli olarak artacağını tahmin etmekteyiz.

**Hedeflenen çıktının proje ortağı firmaya herhangi bir rekabet üstünlüğü sağlayıp sağlamadığı,**

Hedeflenen çıktılar proje ortağı firmaya ürün bazında önemli katkılar sağlamaktadır. Hem üretilecek kitlerin kalitesi açısından hem maliyeti açısından önemli bir katkı söz konusudur. Bu tür ürünlerin geliştirilmesi firma açısından hem mamul madde hem ham madde satışı konusunda bir üstünlük sağlayacaktır.

**Bu proje çıktısının firmaya katkısı,**

Firmanı rekabet gücü artacaktır çünkü bu ürünün geliştirilmesi kit başına tahminen 5-7 \$ katkı sağlayacaktır.

Ürün kalitesini artıracaktır: Ham maddeler gümrük nakliye vb. işlemler sırasında hassasiyetlerini yitirmektedir.

İhracat yaptığı bölgeye özgü viral antijenlerin kullanılacağı kitler geliştirme şansı olacaktır. Buda uluslararası rekabette büyük bir üstünlük sağlayacaktır. Ürün satıldığı ülkede rakiplerinden daha başarılı olacaktır.

**Projede hedeflenen çıktının iç ve dış pazarlar açısından ülkeye ne gibi olanaklar sağlayacağını;**

Ülkenin genel ihracatına katkı sağlayacaktır.

Bu alanda ilk yerli firma olmamız nedeniyle iç piyasada bu tür kitlerin fiyatları ucuzlayacaktır.

Ülke içinde nitelikli iş gücü istihdamı artışına katkı sağlayacaktır.

Ülke vergi gelirlerinde artış olacaktır.

Devlet ve özel hastanelerde rekabetin artması devletin ürün satın alma maliyetlerini düşürecektir.

**Pazara çıkış süresi,**

Biz halihazırda firma olarak HBs Ag kitleri pazarlaması yapmaktayız. Yapacağımız şey kısaca yurt dışından satın aldığımız HBs Ag rekombinant antijeni ithalatına son vermek yerine kendi ürünümüzü koymak olacaktır. Belki kalite kontrol ve optimizasyon testleri bir miktar zaman alacaktır ama kabaca



rekombinant antijenlerin üretilmesinden sonra 2 ay içinde bütün optimizasyon testlerinin tamamlanacağını düşünmekteyiz.

**Satış hasılatında beklenen artış,**

Ürün maliyetini %30 azalması satış hasılatımızın en az % 100 artıracığını düşünmekteyiz.

**Pazar payında beklenen artış,**

Başlangıç için Pazar payımızın %6-8 seviyesine çıkacağını ilerleyen yıllarda pazarlama alt yapımızın güçlenmesiyle Türkiye pazarının en az % 20 sini ele geçirmeyi hedeflemekteyiz.

**Kara geçiş noktası,**

Bizim şu anki üretimimizde de yeterli olmasada bir karlılıktan söz edilebilir. Ama bu projeye harcayacağımız rakamın. Bize kar olarak dönmesi en fazla iki yılımızı alacaktır. Ama uzun vadede örneğin 5 yıllık bir süre içerisinde bu proje için harcanan rakamların yapmayı planladığımız ihracatın da katkısıyla çok sembolik kalacağını düşünüyoruz.

**Sağlayacağı ithal ikamesi,**

HBsag ve anti HBs kitleri ithalatı açısından pazar payının 25-30 milyon dolar olduğunu düşünürsek, bizim bu pazardaki payımız %6-8 oranında olsa; bizim ürün pazarlama kabiliyetimiz 1.5-2.4 milyon dolar arasında olacak. Bu rakamın % 30 u kadar bir maliyet azalması olacağını düşünürsek yıllık 450,000.00\$ ile 720,000.00\$ arasında bir maliyet azalmasından bahsedilebilir.

Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Proje sonucu ortaya çıkan ürün ile ilgili gerçekleştirilen Pazar araştırmasından beklenen açıklamalara göre doldurulacaktır.

İZLENECEK YÖNTEM	FORM NO: 13
Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Projenin yürütülmesinde izlenecek yöntemi göz önüne alarak doldurunuz.	

Tanısal ELISA kitlerinde kullanılmak üzere hepatit B virusu yüzey antijenlerinin rekombinant olarak elde edilmesini hedeflediğimiz bu projede, Escherichia coli ekspresyon konağı olarak kullanılacaktır.

### ***HBV ile enfekte hücre hatlarının üretilmesi***

Projemizde HBV yüzey antijeninin pre-S1/preS2/S bölgelerini kodlayan HBVgp2 geni, HBV ile enfekte durumda bulunan ve genomlarına entegre halde HBV genom kopyaları taşıyan PLC/PRF/5 hücre hattı (ATCC CRL-8024, HBV alttip adw2 genom entegre hücre hattı) ve Hep3B hücre hattından (ATCC HB-8064, HBV genom entegre hücre hattı) elde edilecektir (1-3).

Hücre hattı stokları %10 fetal sığır serumu içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılarak açılacaktır. Kültür şişelerinin taban yüzeyi yapışan hücreler tarafından yaklaşık %70 kaplandığında RNA izolasyonu gerçekleştirilecektir.

### ***Hücre kültürlerinden total RNA izolasyonu***

Hepatoma hücre hattı kültürlerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilecektir. Bu amaçla tek tabaka halindeki hücrelerin üzerindeki besiyeri alınarak yerine guanidyum içeren parçalama tamponu konulacaktır. Elde edilen lizat asit fenol kloroform ile ekstrakte edilecektir. Sıvı faz alınarak sırası ile %99 ve %70 etanol ile yıkanacaktır. Elde edilen pellet kurutulduktan sonra RNaz içermeyen su ile çözülecektir. Saflaştırılmış RNA örnekleri kullanılabilecek kadar -80 °C sıcaklıkta saklanacaktır (4).

### ***HBVgp2 transkriptlerinin klonlama vektörüne aktarılması***

HBV enfekte hepatoma hücre hatlarından elde edilen total RNA'nın ters transkripsiyonu oligo-dT24 primer ve MuMLV ters transkriptaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilecektir. İkincil iplikcik sentezi ve HBVgp2 çoğaltılması polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT) ile gerçekleştirilecektir. Çoğaltma için kullanılacak primerlerin 5' uçlarına EcoRI ve HindIII gibi hedef gen üzerinde kesim yapmadığı bilinen bir enzim çiftinin kesim motifleri eklenecektir. Yapılacak çoğaltmalarda 3' - 5' eksonükleaz aktivitesi ile "proof-reading" yapabilen enzim ya da enzim karışımları kullanılacaktır (5).

Çoğaltma ürünü, silika matriksli kolon sistemine dayanan bir PZT temizleme kiti kullanılarak saflaştırılacaktır. PZT ile başarılı bir çoğaltma yapıp yapılamadığını ve ürünün

saflık durumunun kontrolü için %2 yoğunluğunda TBE tampon ile hazırlanmış agaroz jel ile elektroforez yapılacaktır. Etidyum bromür ile boyamanın ardından jeller UV transillüminatör ile incelenecektir. Yaklaşık 1200 baz çifti uzunluğunda bir ürün elde edilmesi hedeflenecektir (5).

Saflaştırılmış ürün EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilecektir. pGEM-3Zf(+) klonlama vektörü de aynı enzimler ile kesilerek yapışkan uçlu hale getirilecektir. PZT ürünü ve plazmid vektör saflaştırılarak kesim enzimleri uzaklaştırılacaktır (6; 7). Saflaştırılmış ürünler jelde yürütülerek kontrol edilecektir. Spektrometrik olarak kantite edilen saflaştırma ürünleri ligasyona alınacaktır. T4 DNA ligaz ile gerçekleştirilecek klonlama için uygun oranlarda plazmid ve PZT ürünü karıştırılacaktır (5).

Ligasyon ürünlerinin Escherichia coli K12 JM109 hücrelerine aktarılması için polietilen glikol - DMSO karışımı ve ısı şoku kullanılacaktır (8). Transformantların seçimi 100 µg/ml ampisilin içeren SOC agarlarda yapılacaktır. pGEM-3Zf(+) plazmid JM109 hücrelerinde kullanıldığında "insert" almış plazmidlerin seçimini kolaylaştıran mavi - beyaz koloni seçimine olanak sağladığından SOB agar yüzeyine ekim yapılmadan önce 5-bromo-4-kloro-3-indolil- beta-D-galaktopiranozid (X-gal) ve izopropil β-D-1-tiyogalaktopiranozid (IPTG) çözeltileri sürülecektir. Kültürler 35 °C'de bir gece inkübasyonun ardından değerlendirilecektir. Beyaz renkli koloniler M13-20 ve M13-26 primerlerinin kullanıldığı PZT ile "insert" durumları yönünden kontrol edilecektir. Yaklaşık 1450 baz çiftlik ürün elde edilen koloniler sekans analizine alınacaktır (5).

### ***DNA dizi analizi ile klonlanan HBVgp2'nin kontrol edilmesi***

pGEM-3Zf(+) plazmidleri üzerine klonlanmış HBVgp2 segmentlerinin kontrolü DNA dizi analiz yöntemi ile yapılacaktır. Bu amaçla, 1203 baz çiftlik HBVgp2'nin uzunluğu boyunca bir biri ile çakışan bölgeleri bulunan 450 - 500 baz çiftlik çoğaltma ürünlerinin elde edileceği PZT'leri tasarlarak gerçekleştirilecektir. PZT ürünleri saflaştırılarak DNA sekanslama tepkimesine hazırlanacaktır (7).

Sekanslama işlemi için Beckman Coulter CEQ 8000 ile uyumlu floresan işaretli dideoksiterminatör sekanslama kitleri kullanılacaktır. Elde edilen döngü - sekanslama ürünleri sodyum asetat - etanol yöntemi ile çöktürülerek kapiller jel elektroforezine hazırlanacaktır. Elde edilen kromatogramların redaksiyonu ve birleştirilmesinin ardından ekspresyonda hataya yol açabilecek bir mutasyona sahip olup olmadıkları kontrol edilecektir.

### ***HBVgp2 genotiplerinin oluşturulması***

PLC/PRF/5 ve Hep3B hücre genomlarına entegre durumdaki HBVgp2 transkriptleri temel alınarak yönlendirilmiş mutagenез teknikleri kullanılarak hepatit B virusu yüzey antijeni

genotiplerini kodlayan standart diziler oluşturulacaktır (9-12).

Elde edilmesi hedeflenen genotipler için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?db=2> adresinden ulaşılabilen A - H genotiplerindeki referans HBV genomlarından ve diğer protein veritabanlarından yararlanılacaktır (13-15).

Genotipler	Referans genom dizilerinin genbankası numaraları	İncelenen genbankası "accession" S antijeni peptid kayıt numaraları
A	X02763, X51970, AF090842	BAF44867, BAF44868, BAF44869, BAF44877, BAF44879, BAF44884, BAF44900, BAF44910, BAF44882, BAF44896, ABI49966, ABI49967, ABI49969
B	D00329, AF100309, AB033554	BAF44870, BAF44871, BAF44886, BAF44905, BAF44911, BAF44885, BAF44890, BAF44891, BAF44897, BAF44902, AAU05982, ABI49972
C	X04615, AY123041, AB014381	AAA62814, AAT45898, CAG37970, BAF44872, BAF44873, BAF44874, BAF44875, BAF44876, BAF44878, BAF44880, BAF44881, BAF44883, BAF44887, BAF44888, BAF44889, BAF44892
D	X65259, M32138, X85254	BAC77642, BAC77643, BAC77644, BAC77645, BAC77646, BAC77647, ABI49968, ABI49970, ABI49971, ABI49974, ABI49975, ABI49976, ABI49977, ABI49978, ABI49979, ABI49980, ABI49981, ABI49982, ABI49983, ABI49984, ABI49985, ABI49986, ABI49987, ABI49988, ABI49989, ABI49990
E	X75657, AB032431	ABI49961, ABI49962, ABI49963, ABI49964, ABI49965
F	AB036910, X69798, AF223965	AAU05983, AAU05984, AAU05985, AAU05987, AAU05988, AAU05989, AAU05991, AAU05992, AAU05993, AAU05994, AAU05995, AAU05996, AAU05997, AAU05998, AAU05999, AAU06000
G	AF160501, AF405706	AB064310,
H	AY090454, AY090460	AY090457,

NCBI bünyesinde yer alan protein veritabanında HBV Pre-S1/Pre-S2/S peptidi için 2800'den fazla kayıt bulunmaktadır. Bu kayıtların da incelenmesine devam edilmektedir. Böylece farklı genotipteki HBV ile enfekte bireylerde tarafından oluşturulmuş anti-HBsAg antikorları ile birleşme özelliğine sahip rekombinant HBVgp2 dizileri üretilecektir (16-19; 14; 20-22)

pGEM-3Zf(+) plazmid vektör üzerine klonlanmış olan HBVgp2 dizine yönlendirilmiş mutagenез uygulanacaktır. Bu amaç için kullanılacak plazmid konstraktlar dam metilasyon Projenin Adı: Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi Sayfa 28 / 77

yapabilen E. coli K12 JM109 suşundan izole edilecektir. Kısaca, HBVgp2 dizisi üzerinde yapılmak istenilen amino asit değişikliğini sağlayacak 1, 2 ya da 3 nükleotidlik mutasyonu içeren ve tüm plazmidi çoğaltacak şekilde tasarlanmış primerler ile 15 - 20 tur PZT yapılacaktır. Bu tepkimede, 5' - 3' ekzonükleaz aktivitesi bulunmayan Pfu ya da Phusion gibi enzimler kullanılacak, böylece mutajenik primerlerin yıkılması önlenecektir. PZT sonrasında orijinal plazmidi ortamdan uzaklaştırmak tepkime karışımı için DpnI enzimi ile 2 - 3 saat inkübe edilecektir. Bu sayede dam metile edilmiş olan orijinal plazmid DNA'sı yıkılarak yalnızca PZT ürününün ortamda kalması sağlanacaktır. Bu ürünün elektroporasyon ya da daha önce açıklanan PEG-DMSO yöntemleri kullanılarak E. coli hücrelerine aktarılması sağlanacaktır. Ampisilinli SOB plaklarında seçilen transformantların kontrol edilmesi aşamasına geçilecektir (23-26).

Açıklanan yöntem kullanılarak hücre hatlarından elde edilen HBVgp2 dizileri adım adım istenilen genotipler elde edilecek şekilde değiştirilecektir. Ayrıca, hedef amino asit değişiklikleri yapılırken E. coli kodon tercihleri gözetilerek ekspresyon aşamasında ortaya çıkması muhtemel sorunların önüne geçilmeye çalışılacaktır (27).

Elde edilen konstraktlar tekrar sekanslanarak genotipler doğrulanacaktır.

### ***Genotiplerin ekspresyon vektörlerine klonlanması***

Yönlendirilmiş mutagenез teknikleri kullanılarak oluşturulmuş ve doğrulanmış farklı HBVgp2 genotiplerine sahip konstraktlar kalıp DNA olarak kullanılacaktır. Bu plazmidlerden PZT yöntemi kullanılarak çoğaltılacak HBVgp2 segmentleri ekspresyon vektörüne klonlanacaktır. Bu amaçla kullanılacak PZT primerlerinin 5' uçlarında uygun birer tip 2 restriksiyon endonükleaz kesim motifi bulunacaktır (5). PZT sonrası saflaştırma yapılacaktır (28; 29). Saflaştırılmış PZT ürünü ve plazmid vektör kesime konulacak ve tekrar saflaştırılacaktır. Kesim sonrası yapılan saflaştırmanın ardından DNA kantitasyonu yapılarak ligasyona uygun miktar ve oranda vektör ve insert konulması sağlanacaktır (5). T4 DNA ligaz kullanılarak yapılacak ligasyon ardından PEG-DMSO çözeltisi ile kompetan hale getirilmiş E. coli K12 JM109 ya da E. coli K12 DH5α hücrelerine transformasyon gerçekleştirilecektir (8; 30). Antibiyotikli plaklara yapılan ekimin ardından seçilen transformant kolonilerin insert alıp almadıkları PZT yöntemi ile kontrol edilecektir. Insert alan koloniler ile ekspresyon denemesine geçilecektir. Kullanılacak ekspresyon konağı hücrenin seçiminde ekspresyon vektörü plazmidin indüklenabilir promotorunun tipi etkili olacaktır. Klonlanan genin önünde lac ya da tac promotoru içeren vektörler için JM109 ve DH5α hücreleri ile devam edilecektir. Ancak, T7 promotor sistemi içeren vektörler için T7 DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi taşıyan (DE3 bakteriyofaj genom kopyası içeren) ekspresyon konakları tercih edilecektir. Ayrıca, ekspresyonun optimizasyonunda proteaz defektif olan E. coli B suşları kullanılacaktır. Bunun için ligasyon ürünleri ile transforme

Projenin Adı: Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi Sayfa 29 / 77

edilmiş ve insert taşıyan plazmide sahip oldukları gösterilen kolonilerden mini prep plazmid izolasyonu yapılacaktır. Ekspresyon konağı hedef hücreler bu plazmidler ile transforme edilerek ekspresyon çalışmalarına geçilecektir (31).

Maya ekspresyon sistemleri için ise *S. cerevisiae* hücrelerine pYES2C/T omurgası üzerine oluşturulmuş konstraktlar elektroporasyon ile aktarılacak, Transformantların seçimi urasil oksotrofluğuna göre yapılacaktır.

### ***Pilot ekspresyon çalışmaları ve HBVgp2 ekspresyonunun saptanması***

HBVgp2 ekspresyonunun optimizasyonunda denenecek vektörler T7-lac hibrid promotor, triptofan-lac hibrid promotor, lacUV5 promotoru, cspA soğuk şok proteini promotoru ile arabinoz operonu promotoru olacaktır. Kullanılacak ticari sistemler pET28a ve çalışma grubumuz tarafından yapılmış olan varyantları, pCold (Takara-Bio, Japonya), pBAD/His Kit (Invitrogen, ABD), pET-SUMO (Invitrogen) olarak sayılabilir.

Kültürler indüklenmeden önce her sistem için önerilen bulanıklığa kadar üretilecektir. Uygun konsantrasyonda indükleyicinin (IPTG, arabinoz) yapılmasının ardından 6 ve 18 saatlik süre ile indüksiyon gerçekleştirilecektir. Pilot ekspresyon çalışmaları için mikrokuyucuklu plakalar ve küçük hacimli erlen-mayerler kullanılacaktır. İndüksiyon sonunda kültürler santrifüj ile pellet edilecektir. Bakteri pellet alikotları Laemmli tamponu ile süspanse edilecek, 95 °C'de 5 dakika inkübe edilerek yeterli parçalanma gerçekleştirilecektir. DNA açığa çıkmasından kaynaklanan viskozite sorunlarına karşı sonikasyon uygulanacaktır. Elde edilen lizatlar %12 - 15 yoğunluğunda hazırlanmış SDS-PAGE jellerine yüklenecektir. 10 x 10 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlığında hazırlanmış mini jeller 20 mA sabit akım ile yürütülecektir. Yeterli açılmanın sağlanmasının ardından jeller önce fikse edilecek, ardından Coomassie mavisini ile boyanacaktır. Tam uzunluk (Pre-S1/Pre-S2/S) HBVgp2 için yaklaşık 43.7 kDa, M için 31.2 kDa ve S için 25.5 kDa ( + ekspresyon vektörüne ait "tag"ler) moleküler ağırlığa uygun yerde rekombinant ürüne ait protein bantları gözlenmesi beklenecektir (32).

Uygun moleküler ağırlığa sahip protein bantlarının HBVgp2'ye ait olup olmadığı western blot yöntemi kullanılarak doğrulacaktır. Bu amaçla HBVgp2 eksprese ettiği düşünülen kültür pelletleri SDS-PAGE ile yürütülecektir. Elektroforez sonrası proteinlerin PVDF membrana transferi sağlanacaktır. Transferin başarı ile gerçekleşip gerçekleşmediği PVDF membranın Ponceau S boyaması ile test edilecektir. Membran dekolore edildikten sonra bloklanacaktır. Bloklamanın ardından poliklonal primer HBVgp2 antikorları ile inkübe edilecektir. Yıkama ve tekrar bloklamanın ardından HRP işaeretli sekonder antikor ile inkübasyon yapılacaktır. Luminol eklenmesinin ardından uzun pozlama ile görüntüleme gerçekleştirilecektir (32).

## ***Ekspresyon koşullarının optimizasyonu ve ölçeklendirme***

Uygun molekül ağırlıkta anti-HBsAg reaktif rekombinant protein üreten bakteri kültürleri için ekspresyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Besiyerine katılacak karbon kaynakları, indüksiyon öncesi ve sırasındaki inkübasyon sıcaklığı, indükleyici konsantrasyonu, süre gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Ekspresyon ölçeği büyütülerek çok miktarda protein elde edilecektir (31).

## ***Rekombinant proteinlerin saflaştırılması***

Rekombinant proteinlerin saf olarak elde edilmesi için ilk basamak olarak indüklenmiş kültürlerden lizat hazırlama ve mümkün olan en yüksek miktarda çözünmüş protein eldesi optimize edilecektir. Bu amaçla lizis tamponu bileşiminde yer alan tuz miktarları ayarlanarak kromatografik yöntemleri olumsuz etkilemeyen deterjanlar denenecektir. Dondurma - çözme ve sonikasyon gibi fiziksel yöntemlerin çözünmüş protein eldesine ve deterjan kullanımını önlemeye katkısı araştırılacaktır. Böylece, en düşük maliyetli ve en etkin lizat hazırlama yöntemi oluşturulacaktır.

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması için afinite tabanlı teknikler öncelikle tercih edilecektir. Bu amaçla immobilize metal afinite kromatografisi kullanılacaktır. Nikel (ya da çinko, bakır,...) yüklenmiş ve şartlandırılmış kolondan süzölmüş hücre lizatı geçirilecektir (33-35). Düşük miktarda imidazol içeren tampon ile yapılacak yıkamanın ardından imidazol konsantrasyon gradiyenti ya da sabit konsantrasyonda imidazol ile elüsyon gerçekleştirilecektir. Toplanan fraksiyonlardan en yüksek protein içerenleri birleştirilerek jel filtrasyon kolonuna enjekte edilecektir. Kesim noktası 5 kDa dolaylarında olan bir grup seperasyon jeli ile tampon değiştirme işlemi uygulanacak, imidazol uzaklaştırılacaktır.

İmmobilize metal afinite kromatografisinin uygun olmadığı ya da yetersiz kaldığı durumda ise iyon değiştirme, hidrofobik etkileşim ve jel filtrasyon kromatografi yöntemleri kullanılacaktır.

Kromatografik saflaştırmanın ardından elde edilen proteinler SDS-PAGE ve western blot ile analiz edilecektir (32).

Elde edilen rekombinant proteinlerin HBVgp2'ye ait olmayan ve ekspresyon vektöründen kaynaklanan ekstra bölgeleri ("tag"ler) kullanılan vektöre göre trombin, aktive faktör X ya da enterokinaz kullanılarak kesilecektir. Saflaştırma işlemi benzamidin sefaroze kolon ve diğer kromatografik teknikler kullanılarak gerçekleştirilecektir.

## ***Kaynaklar:***

1. Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 1979 Dec;282(5739):615-616. [cited 2011 Aug 19 ]
2. Twist EM, Clark HF, Aden DP, Knowles BB, Plotkin SA. Integration pattern of hepatitis B Projenin Adı: Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi Sayfa 31 / 77

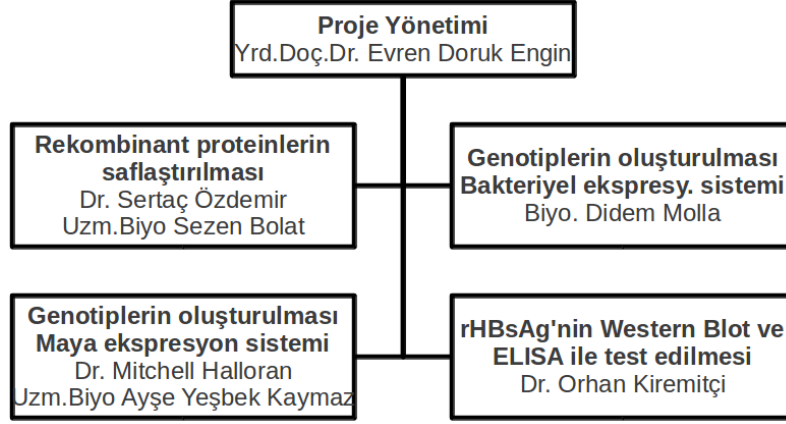
virus DNA sequences in human hepatoma cell lines. J Virol 1981 Jan;37(1):239-243.

3. Darlington GJ, Kelly JH, Buffone GJ. Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. In Vitro Cell. Dev. Biol 1987 May;23(5):349-354.[cited 2011 Aug 19 ]
4. Kaabache T, Barraud B, Feldmann G, Bernuau D, Lardeux B. Direct solution hybridization of guanidine thiocyanate-solubilized cells for quantitation of mRNAs in hepatocytes. Anal. Biochem 1995 Dec;232(2):225-230.[cited 2011 Aug 31 ]
5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. CSHL Press; 2001.
6. Boom R, Sol C, Beld M, Weel J, Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P. Improved Silica-Guanidiniumthiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of Bovine Alpha-Casein to Silica Particles. J. Clin. Microbiol. 1999 Mar;37(3):615-619.[cited 2011 Aug 10 ]
7. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. [Internet]. 1997;[cited 2011 Aug 10] Available from: <http://pubget.com/paper/9067025>
8. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Apr;86(7):2172-2175.
9. Shamay M, Agami R, Shaul Y. HBV integrants of hepatocellular carcinoma cell lines contain an active enhancer. Oncogene 2001 Oct;20(47):6811-6819.[cited 2011 Aug 31 ]
10. Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science 1980 Jul;209(4455):497-499. [cited 2011 Aug 19 ]
11. Hsu IC, Tokiwa T, Bennett W, Metcalf RA, Welsh JA, Sun T, Harris CC. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. Carcinogenesis 1993 May;14(5):987-992.[cited 2011 Aug 31 ]
12. Saito H, Morizane T, Watanabe T, Kagawa T, Miyaguchi S, Kumagai N, Tsuchimoto K, Tsuchiya M. Proto-oncogene expression in three human hepatoma cell lines, HCC-M, HCC-T and PLC/PRF/5. Keio J Med 1991 Sep;40(3):139-145.[cited 2011 Aug 31 ]
13. Pujol FH, Navas M-C, Hainaut P, Chemin I. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. Cancer Letters 2009 Dec;286(1):80-88.[cited 2011 Aug 16 ]
14. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. Journal of General Virology 2000 May;81(5):1165 -1174.[cited 2011 Aug 16 ]
15. Ohnuma H, Machida A, Okamoto H, Tsuda F, Sakamoto M, Tanaka T, Miyakawa Y, Mayumi M. Allelic subtypic determinants of hepatitis B surface antigen (i and t) that are distinct from d/y or w/r. J Virol 1993 Feb;67(2):927-932.
16. Geretti AM, Patel M, Sarfo FS, Chadwick D, Verheyen J, Fraune M, Garcia A, Phillips RO. Detection of Highly Prevalent Hepatitis B Virus Coinfection among HIV-Seropositive Persons in Ghana. J. Clin. Microbiol. 2010 Sep;48(9):3223-3230.[cited 2011 Aug 17 ]



17. Deguchi M, Kagita M, Asari S, Iwatani Y, Tuchida T, Iinuma K, Sanborn M. [Evaluation of seven immunological assay reagents for hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) in the sensitivity and the detection of HBsAg mutants]. *Kansenshōgaku Zasshi* 2005 Feb;79(2):138-142.[cited 2011 Aug 17 ]
18. Ali A, Pearce S, Coleman P. Factors affecting immunodetection of hepatitis B surface antigen recombinant mutants. *Journal of Medical Virology* 2007 Jan;79(S1):S47-S51.[cited 2011 Aug 17 ]
19. Dufour DR. Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Assays--Are They Good Enough for Their Current Uses? *Clin Chem* 2006 Aug;52(8):1457-1459.[cited 2011 Aug 17 ]
20. Wolters G, Nelissen P, Kuijpers L. Improved ELISA for the detection of HBsAg. *Journal of Virological Methods* 1985 Apr;10(4):299-305.[cited 2011 Aug 18 ]
21. Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey M-P, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso A-M. Sensitivities of Four New Commercial Hepatitis B Virus Surface Antigen (HBsAg) Assays in Detection of HBsAg Mutant Forms. *J Clin Microbiol* 2006 Jul;44(7):2321-2326.
22. Velu V, Saravanan S, Nandakumar S, Dhevahi E, Shankar EM, Murugavel KG, Kumarasamy T, Thyagarajan SP. Transmission of “a” determinant variants of hepatitis B virus in immunized babies born to HBsAg carrier mothers. *Jpn. J. Infect. Dis* 2008 Jan;61(1):73-76.[cited 2011 Aug 17 ]
23. Tian J, Liu Q, Dong S, Qiao X, Ni J. A new method for multi-site-directed mutagenesis. *Analytical Biochemistry* 2010 Nov;406(1):83-85.[cited 2011 Aug 31 ]
24. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* 2009;9:61.[cited 2011 Aug 31 ]
25. Li J, Li C, Xiao W, Yuan D, Wan G, Ma L. Site-directed mutagenesis by combination of homologous recombination and DpnI digestion of the plasmid template in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry* 2008 Feb;373(2):389-391.[cited 2011 Aug 31 ]
26. Shenoy AR, Visweswariah SS. Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Analytical Biochemistry* 2003 Aug;319(2):335-336.[cited 2011 Aug 31 ]
27. Rosano G, Ceccarelli E. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories* 2009;8(1):41.[cited 2011 Jan 11 ]
28. Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res* 1991 Mar;19(6):1346.[cited 2011 Aug 31 ]
29. Lis JT. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Meth. Enzymol* 1980;65(1):347-353.[cited 2011 Aug 31 ]
30. Chung CT, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Apr;16(8):3580.[cited 2010 Mar 14 ]
31. Vaillancourt PE. *E. coli Gene Expression Protocols*. Softcover reprint of hardcover 1st ed. 2003 ed. Humana Press; 2011.

32. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons; 1993.
33. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC. Engineering Escherichia coli BL21(DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. Appl. Environ. Microbiol 2011 Jul;77(13):4634-4646.[cited 2011 Aug 31 ]
34. Zhao C, Hellman LM, Zhan X, Bowman WS, Whiteheart SW, Fried MG. Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. Anal. Biochem 2010 Apr;399(2):237-245.[cited 2011 Aug 31 ]
35. Abe R, Kudou M, Tanaka Y, Arakawa T, Tsumoto K. Immobilized metal affinity chromatography in the presence of arginine. Biochem. Biophys. Res. Commun 2009 Apr;381(3):306-310.[cited 2011 Aug 31 ]
36. Jacinto-Loeza E, Vivanco-Domínguez S, Guarneros G, Hernández-Sánchez J. Minigene-like inhibition of protein synthesis mediated by hungry codons near the start codon. Nucleic Acids Research 2008;36(13):4233 -4241.[cited 2011 Jan 11 ]
37. Vernet E, Kotzsch A, Voldborg B, Sundström M. Screening of genetic parameters for soluble protein expression in Escherichia coli [Internet]. Protein Expression and Purification [date unknown];In Press, Corrected Proof[cited 2011 Jan 22] Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WPJ-51M0NBJ-1/2/3f0773f7284f67c2afc31bbda615f4c2>
38. Otto CM, Niagro F, Su X, Rawlings CA. Expression of recombinant feline tumor necrosis factor is toxic to Escherichia coli. Clin. Diagn. Lab. Immunol 1995 Nov;2(6):740-746.[cited 2011 Aug 31 ]
39. Ciampi MS. Rho-dependent terminators and transcription termination. Microbiology 2006 Sep;152(9):2515-2528.[cited 2011 Jan 17 ]
40. Calik P, Orman MA, Celik E, Halloran SM, Calik G, Ozdamar TH. Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in Pichia pastoris and structural analysis by MALDI-ToF Mass Spectrometry. Biotechnol. Prog 2008 Feb;24(1):221-226.[cited 2011 Aug 31 ]
41. Celik E, Calik P, Halloran SM, Oliver SG. Production of recombinant human erythropoietin from Pichia pastoris and its structural analysis. J. Appl. Microbiol 2007 Dec;103(6):2084-2094.[cited 2011 Aug 31 ]
42. Hadiji-Abbes N, Borchani-Chabchoub I, Triki H, Ellouz R, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Expression of HBsAg and preS2-S protein in different yeast based system: a comparative analysis. Protein Expr. Purif 2009 Aug;66(2):131-137.[cited 2011 Aug 31 ]
43. Kim E-J, Park Y-K, Lim H-K, Park Y-C, Seo J-H. Expression of hepatitis B surface antigen S domain in recombinant Saccharomyces cerevisiae using GAL1 promoter. J. Biotechnol 2009 May;141(3-4):155-159.[cited 2011 Aug 31 ]



**Şekil 1.** Proje organizasyon şeması.

Proje yönetim düzeni, proje organizasyon şemasında belirtildiği gibi gerçekleştirilecektir.

Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk Engin: proje yönetiminden sorumlu olacaktır. Tanısal olarak önemli HBsAg genotiplerinin yönlendirilmiş mutagenез teknikleri ile konstrüksiyonu işlemi Dr. Mitchell Halloran, Biyo. Didem Molla ve Uzm. Biyo. Ayşe Yeşbek Kaymaz tarafından gerçekleştirilecektir. Bakteriyel ekspresyon sistemlerinde rekombinant protein elde edilmesi Biyo. Didem Molla tarafından yapılacaktır. Maya sistemlerinde protein sentezi ise Dr. Mitchell Halloran ve Uzm. Biyo. Ayşe Yeşbek Kaymaz tarafından gerçekleştirilecektir. Proteinlerin saflaştırılmasından Dr. Sertaç Özdemir ve Uzm. Biyo Sezen Bolat sorumlu olacaktır. Elde edilecek proteinlerin Western Blot ile kontrol edilmesi ve ELISA ile antijen olarak performanslarının denetlenmesi Dr. Orhan Kiremitçi tarafından gerçekleştirilecektir.

*Not : Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Proje Ekibi veYönetim Düzeni gözönüne alarak doldurunuz.*

**ARAşTIRMA OLANAKLARI****FORM NO: 15**

Araştırmanın sürdürülebilmesi için yapılacak deneyler, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda ve Aba Ankara Biyoteknoloji Araştırma San. ve Tic. Ltd. Şirketi'nin Ankara Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi'nde yer alan laboratuvarında gerçekleştirilecektir.

*Not :Bu Formu, Proje Başvuru Klavuzunda tanımlanan Araştırma Olanaklarını göz önüne alarak doldurunuz.*

Proje süresi, 24 ay olarak belirlenmiştir.

Projenin yürütülmesinde aşağıdaki iş paketleri gerçekleştirilecektir.

**İş paketi 1:** HBVgp2 genotipleri için referans amino asit dizisini kodlayan plazmid konstraktlarının oluşturulması projenin ilk adımını oluşturmaktadır. İlk konstraktların oluşturulması ile, tümünün tamamlanması beklenmeden sırası ile rekombinant protein ekspresyonu (İş paketi 2 ve 3), üretilen proteinlerin saflaştırılması (İş paketi 4) ve bu proteinlerin antijen antikor birleşmesi deneylerindeki performansının test edilmesi (iş paketi 5) deneyleri de başlatılacaktır. Bu aşamanın başarıya ulaşmış olması yapılacak DNA dizi analizleri ile saptanacaktır.

**İş paketi 2:** Bakteriyel ekspresyon sistemlerinde rekombinant HBsAg eldesi. Bakteriyel ekspresyon vektörüne aktarılan HBVgp2 dizilerinin optimal koşullarda eksprese edilmesine çalışılacaktır. Farklı ekspresyon sistemleri, protein uçlarında modifikasyon, şaperonlar ile koekspresyon, besi yeri koşulları, ekspresyon sıcaklığı ve süresi gibi parametreler optimize edilecektir. Başarılı ekspresyon, bakteri hücre lizatlarından elde edilen proteinlerin elektroforetik analizi ve blotlama işlemleri ile saptanacaktır.

**İş paketi 3:** Maya ekspresyon sistemlerinde rekombinant HBsAg eldesi. Maya ekspresyon vektörüne aktarılan HBVgp2 dizilerinin ekspresyonu sağlanacaktır. Bu amaçla bakteri ekspresyon sistemlerinde olduğu gibi fiziksel ve besiyeri koşulları optimize edilecektir. Ekspresyon sisteminin başarısı maya lizatlarından elde edilecek proteinlerin elektroforetik analizi ve blotlama deneyleri ile saptanacaktır.

**İş paketi 4:** Rekombinant proteinlerin saflaştırılması. Bu aşamada, Afinite, iyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografi sistemleri ile çöktürme ve ultrafiltrasyon gibi teknikleri kullanılarak bakteri ve maya hücre lizatlarından mümkün olan en yüksek verim ve saflıkta protein eldesi için süreç optimize edilecektir. Bu basamakta değerlendirme, fraksiyonların saflık derecesinin protein elektroforezi ve western blot teknikleri ile kontrol edilmesi ve protein kantitasyonu yapılması ile gerçekleştirilecektir.

**İş paketi 5:** Western blot yöntemi ile proteinlerin gösterilmesi, ELISA deneylerindeki performansının denetlenmesi. Proje kapsamında üretilen rekombinant HBsAg'nin ELISA test sistemindeki performansı, ticari antijen ile karşılaştırılacaktır. Üretilen antijenler için saptama alt sınırı belirlenecektir.

*Not : Proje Süresi ve İş Planı hakkında bilgi veriniz.*

Projenin gerçekleşmesindeki paketlere göre başarı ölçütleri aşağıda sıralanmıştır:

**İş paketi 1:** DNA dizi analizi ile uygun genotipleri kodlayan dizilerin saptanması

**İş paketi 2:** Protein elektroforezi ve Western blot yöntemi bakteriyel ekspresyon sisteminde ile optimal protein eldesinin saptanması

**İş paketi 3:** Protein elektroforezi ve Western blot yöntemi maya ekspresyon sisteminde ile optimal protein eldesinin saptanması

**İş paketi 4:** Elde edilen saf proteinin elektroforez ve blotlama ile kontrolü, protein kantitasyonu

**İş paketi 5:** Elde edilen rekombinant HBsAg'nin western blot ile kontrolü, ELISA test sistemindeki performansının ticari HBsAg'e eşit ya da üstün olması.

Bu başarı kriterlerinin sağlanamaması durumunda maya ve bakteri için alternatif ekspresyon sistemleri denenecektir. Daha saf protein eldesi için yüksek basınçlı kromatografi sistemleri denenecektir. İş paketi 5'te yer alan, üretilecek HBsAg'nin ELISA test sistemindeki performansının test edilmesi iş paketi ise projenin başarısını belirleyecektir. Bu aşamada elde edilecek sonuçlara göre ELISA sisteminde kullanılacak antijenin bakteri ya da maya kaynaklı olmasına karar verilecektir.

Bakteriyel ekspresyon sistemleri kullanılarak rekombinant protein üretiminde başarısızlık sıklıkla karşılaşılabilen bir durumdur. Bunun da en sık nedenleri olarak eksprese edilmek istenen proteinin bakteri hücresi üzerindeki toksik etkileri ve ekspresyon konağı olarak seçilen hücrenin kodon tercihi gösterilmektedir (36; 27; 37).

Diğer bir sorun ise, ifadelendirilecek genin güçlü promotorların arkasına yerleştirilmesi sonucunda hızla üretilen proteinlerin bakteri hücresi içinde çözünürlüklerini kaybederek inklüzyon cisimleri oluşturmalarıdır. Inklüzyon cisimciklerinden proteinlerin çözünür hale getirilerek ekstrakte edilmesi ve fonksiyonel konformasyona getirilmesi bazen mümkün olamamaktadır (38).

Rekombinant HBsAg üretiminde karşılaşılabilecek muhtemel sorunlar için alternatif çözüm yolları da planlanmıştır. Kodon tercihindan kaynaklanabilecek ekspresyon sorunları için E. coli nadir kodonlarına yönelik tRNA havuzunun genişletilmesi için tRNA genleri klonlanmış plazmid kullanılacaktır (27; 39). Toksik etkinin giderilmesine yönelik olarak eksprese edilecek proteinlerin, N-terminal bir tag ile kimerik olarak sentezlettilmesi denenecektir. Çalışma grubumuzun halen kullanmakta olduğu glutathion-S-transferaz ya da "small ubiquitin related modifier" (SUMO) tag kullanılacaktır (Invitrogen, ABD). Soğukta ekspresyon için geliştirilmiş olan pCold I (Takara-Bio, Japonya) ise ekspresyon optimizasyonu deneylerine dahil

edilmiştir.

Bakteri hücresinde çözünür halde ve anti-HBsAg antikorları ile immünoreaktif özellikte rekombinant HBVgp2 ekspresyonu mümkün olmazsa maya ekspresyon sistemleri denenecektir. Bu amaçla *Saccharomyces cerevisiae* pYES sistemi ile *Pichia pastoris* pPIC-Z sistemi denenecektir (40-43). *S. cerevisiae* pYES2-C/T plazmidine HBVgp2 genlerinin klonlanmasının ardından elde edilecek konstrakt, bakteri hücresinde çoğaltılacaktır. Bakteri konaktan izole edilecek plazmidler urasil oksotrofu *S. cerevisiae* hücrelerine (INVSc1 ) elektroporasyon yöntemi ile aktarılacaktır. Transformantlar urasil(-) plaklarda seçilecektir.

*Not : Proje Süresi ve İş Planı hakkında bilgi veriniz.*

<b>İŞ PAKETİ TANIMLAMA FORMU</b> (Çalışma planında gösterilen her iş Paketi için ayrı doldurulacaktır)			<b>FORM NO: 18</b>
<b>İş Paketi No/Adı:</b>	1 / Referans HBVgp2 genotip dizilerinin oluşturulması	<b>Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)</b>	1 - 18
<p>HBVgp2 genotipleri için referans amino asit dizisini kodlayan plazmid konstraktlarının oluşturulması projenin ilk adımını oluşturmaktadır. İlk konstraktların oluşturulması ile, tümünün tamamlanması beklenmeden sırası ile rekombinant protein ekspresyonu (İş paketi 2 ve 3), üretilen proteinlerin saflaştırılması (İş paketi 4) ve bu proteinlerin antijen antikor birleşmesi deneylerindeki performansının test edilmesi (iş paketi 5) deneyleri de başlatılacaktır.</p>			
<p>Kullanılacak malzemeler:</p> <p>DNA ve RNA saflaştırma kitleri ve kimyasalları, PCR ile ilgili malzemeler (Enzim, tampon ve substratlar) ile PCR cihazı (termal döngü cihazı) Agaroz jel elektroforezi ile ilgili donanım ve kimyasallar Klonlama için gerekli vektör, restriksiyon enzimleri, ligaz Elektroporasyon cihazı Çalkalamalı etüv DNA dizi analiz kitleri</p>			
<p>İş Paketi çıktılarını ve başarı ölçütlerini belirtiniz</p> <p>Bu aşamanın başarıya ulaşip ulaşmadığı yapılacak DNA dizi analizleri ile saptanacaktır.</p>			
<p>Bu iş paketi çıktısının diğer iş paketlerine etkisini açıklayınız.(Bu iş paketinin başarıyla tamamlanmaması durumunda diğer iş paketlerine etkisi, diğer iş paketlerinin bu iş paketinden etkilenme oranı v.b.)</p> <p>Bu iş paketinde bakteriyel ve maya ekspresyon sistemlerinde üretilcek proteinleri kodlayan dizilerin konstrüksiyonu yapılacaktır. Diğer tüm iş paketlerinin gerçekleştirilebilmesi bu paketin başarısına bağlıdır.</p>			



<b>İŞ PAKETİ TANIMLAMA FORMU</b> (Çalışma planında gösterilen her iş Paketi için ayrı doldurulacaktır)		<b>FORM NO: 18</b>
<b>İş Paketi No/Adı:</b>	2 / Bakteriyel ekspresyon sisteminde rekombinant HBsAg üretimi	<b>Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)</b> 3 - 20
<p>Bakteriyel ekspresyon sistemlerinde rekombinant HBsAg eldesi. Bakteriyel ekspresyon vektörüne aktarılabilecek HBVgp2 dizilerinin optimal koşullarda eksprese edilmesine çalışılacaktır. Farklı ekspresyon sistemleri, protein uçlarında modifikasyon, şaperonlar ile koekspresyon, besi yeri koşulları, ekspresyon sıcaklığı ve süresi gibi parametreler optimize edilecektir.</p>		
<p>Kullanılacak malzemeler:</p> <p>DNA ve RNA saflaştırma kitleri ve kimyasalları, PCR ile ilgili malzemeler (Enzim, tampon ve substratlar) ile PCR cihazı (termal döngü cihazı) Agaroz jel elektroforezi ile ilgili donanım ve kimyasallar Klonlama için gerekli vektör, restriksiyon enzimleri, ligaz Elektroporasyon cihazı Çalkalamalı etüv Besiyeri kimyasalları Protein elektroforezinde ve blotlama işlemlerinde kullanılacak donanım ve kimyasallar Jel görüntüleme sistemi</p>		
<p>İş Paketi çıktılarını ve başarı ölçütlerini belirtiniz</p> <p>Başarılı ekspresyon, bakteri hücre lizatlarından elde edilen proteinlerin elektroforetik analizi ve blotlama işlemleri ile saptanacaktır.</p>		
<p>Bu iş paketi çıktısının diğer iş paketlerine etkisini açıklayınız.(Bu iş paketinin başarıyla tamamlanmaması durumunda diğer iş paketlerine etkisi, diğer iş paketlerinin bu iş paketinden etkilenme oranı v.b.)</p> <p>Bu iş paketinde elde edilecek proteinler İş paketi 4'te saflaştırılacak, İş paketi 5'te ise ELISA testindeki performansı değerlendirilecektir. Bu aşamalarda karşılaşılabilecek sorunların çözümü için İş paketi 2'de optimizasyon ve değişikliklere gidilebilecektir.</p>		

İŞ PAKETİ TANIMLAMA FORMU (Çalışma planında gösterilen her iş Paketi için ayrı doldurulacaktır)			FORM NO: 18
İş Paketi No/Adı:	3 / Maya ekspresyon sisteminde rekombinant HBsAg üretimi	Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)	6 - 20
<p>Maya ekspresyon sistemlerinde rekombinant HBsAg eldesi. Maya ekspresyon vektörüne aktarılabilecek HBVgp2 dizilerinin ekspresyonu sağlanacaktır. Bu amaçla bakteri ekspresyon sistemlerinde olduğu gibi fiziksel ve besiyeri koşulları optimize edilecektir.</p>			
<p>Kullanılacak malzemeler:</p> <p>DNA ve RNA saflaştırma kitleri ve kimyasalları, PCR ile ilgili malzemeler (Enzim, tampon ve substratlar) ile PCR cihazı (termal döngü cihazı) Agaroz jel elektroforezi ile ilgili donanım ve kimyasallar Klonlama için gerekli vektör, restriksiyon enzimleri, ligaz Elektroporasyon cihazı Çalkalamalı etüv Besiyeri kimyasalları Protein elektroforezinde ve blotlama işlemlerinde kullanılacak donanım ve kimyasallar Jel görüntüleme sistemi</p>			
<p>İş Paketi çıktılarını ve başarı ölçütlerini belirtiniz</p> <p>Ekspresyon sisteminin başarısı maya lizatlarından elde edilecek proteinlerin elektroforetik analizi ve blotlama deneyleri ile saptanacaktır..</p>			
<p>Bu iş paketi çıktısının diğer iş paketlerine etkisini açıklayınız.(Bu iş paketinin başarıyla tamamlanmaması durumunda diğer iş paketlerine etkisi, diğer iş paketlerinin bu iş paketinden etkilenme oranı v.b.)</p> <p>Bu iş paketinde elde edilecek proteinler İş paketi 4'te saflaştırılacak, İş paketi 5'te ise ELISA testindeki performansı değerlendirilecektir. Bu aşamalarda karşılaşılabilecek sorunların çözümü için İş paketi 3'te optimizasyon ve değişikliklere gidilebilecektir.</p>			

İŞ PAKETİ TANIMLAMA FORMU (Çalışma planında gösterilen her iş Paketi için ayrı doldurulacaktır)			FORM NO: 18
İş Paketi No/Adı:	4 / Rekombinant HBsAg'nin saflaştırılması	Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)	10 - 22
<p>Western blot yöntemi ile proteinlerin gösterilmesi, ELISA deneylerindeki performansının denetlenmesi. Proje kapsamında üretilcek rekombinant HBsAg'nin ELISA test sistemindeki performansı, ticari antijen ile karşılaştırılacaktır. Üretilen antijenler için saptama alt sınırı belirlenecektir.</p>			
<p>Kullanılacak malzemeler:</p> <p>ELISA için gerekli plastik malzeme ve kimyasallar Ticari rekombinant antijen Mikroplaka sıvı yönetim sistemi (Sistem hali hazırda bulunmaktadır) Mikroplaka okuyucu ( Sistem hali hazırda bulunmaktadır) Elektroblotlama cihazı, güç kaynağı Blotlama membranları ve kimyasallar.</p>			
<p>İş Paketi çıktılarını ve başarı ölçütlerini belirtiniz</p> <p>Üretilen HBsAg'nin ELISA ile duyarlı bir şekilde saptanabilmesi.</p>			
<p>Bu iş paketi çıktısının diğer iş paketlerine etkisini açıklayınız.(Bu iş paketinin başarıyla tamamlanmaması durumunda diğer iş paketlerine etkisi, diğer iş paketlerinin bu iş paketinden etkilenme oranı v.b.)</p> <p>Bu iş paketinin çıktısı, üretilcek rekombinant HBsAg'nin ELISA test sisteminde kullanılmaya uygun antijenik yapıda olduğunun gösterilmesidir. Bu aşamada elde edilecek olumsuz sonuçlar İş paketleri 2, 3 ve kısmen 4'te yapılacak optimizasyonlar ile düzeltilenecektir.</p>			

<b>İŞ PAKETİ TANIMLAMA FORMU</b> (Çalışma planında gösterilen her iş Paketi için ayrı doldurulacaktır)		<b>FORM NO: 18</b>
<b>İş Paketi No/Adı:</b>	5 / Rekombinant antijenin ELISA ile test edilmesi	<b>Başlama-Bitiş Tarihi ve Süresi (ay)</b> 12 - 24
<p>HBVgp2 genotipleri için referans amino asit dizisini kodlayan plazmid konstraktlarının oluşturulması projenin ilk adımını oluşturmaktadır. İlk konstraktların oluşturulması ile, tümünün tamamlanması beklenmeden sırası ile rekombinant protein ekspresyonu (İş paketi 2 ve 3), üretilen proteinlerin saflaştırılması (İş paketi 4) ve bu proteinlerin antijen antikor birleşmesi deneylerindeki performansının test edilmesi (iş paketi 5) deneyleri de başlatılacaktır.</p>		
<p>Kullanılacak malzemeler:</p> <p>DNA ve RNA saflaştırma kitleri ve kimyasalları, PCR ile ilgili malzemeler (Enzim, tampon ve substratlar) ile PCR cihazı (termal döngü cihazı) Agaroz jel elektroforezi ile ilgili donanım ve kimyasallar Klonlama için gerekli vektör, restriksiyon enzimleri, ligaz Elektroporasyon cihazı Çalkalamalı etüv DNA dizi analiz kitleri</p>		
<p>İş Paketi çıktılarını ve başarı ölçütlerini belirtiniz</p> <p>Bu aşamanın başarıya ulaşip ulaşmadığı yapılacak DNA dizi analizleri ile saptanacaktır.</p>		
<p>Bu iş paketi çıktısının diğer iş paketlerine etkisini açıklayınız.(Bu iş paketinin başarıyla tamamlanmaması durumunda diğer iş paketlerine etkisi, diğer iş paketlerinin bu iş paketinden etkilenme oranı v.b.)</p> <p>Bu iş paketinde bakteriyel ve maya ekspresyon sistemlerinde üretilcek proteinleri kodlayan dizilerin konstrüksiyonu yapılacaktır. Diğer tüm iş paketlerinin gerçekleştirilebilmesi bu paketin başarısına bağlıdır.</p>		



## İŞ PAKETLERİ VE PROJE PERSONELİ ÇALIŞMA PLANI

“Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi” Projesi																											FORM 19						
Proje personeli çalışma planı (adam/Ay)			2012												2013												20--						
EEKAİş Paketleri	Sorumlu Personel		O	Ş	M	N	M	H	T	A	E	E	K	A	O	Ş	M	N	M	H	T	A	E	E	K	A	O	Ş	M	N	M	H	T
1 - Referans HBVgp2 genotip dizilerinin oluşturulması	Dr. Mitchell Halloran Uzm.Biy.Ayşe Yeşbek Kaymaz Biyo. Didem Molla	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
2 - Bakteriyel ekspresyon sisteminde rekombinant HBsAg üretimi	Biyo. Didem Molla					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
3 - Maya ekspresyon sisteminde rekombinant HBsAg üretimi	Dr. Mitchell Halloran Uzm.Biy.Ayşe Yeşbek Kaymaz							x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
4 - Rekombinant HBsAg'nin saflaştırılması	Dr. Sertaç Özdemir Uzm. Biyo. Sezen Bolat											x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
5 - Rekombinant antijenin ELISA ile test edilmesi	Dr. Orhan Kiremitçi												x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							

\* Personel ödeme planı ile uyumlu olacak şekilde hazırlanmalıdır

\*\* Proje başlama tarihini Yönetmelikte belirtilen süreleri göz önüne alarak belirleyiniz.

BÜTÇE DETAY FORMU				FORM NO: 20
BÜTÇE KALEMLERİ	Miktarı	Talep Edilen (KDV Dahil)	Dönemi	Onaylanan
<b>Makina – Donanım</b>				
1- Elektroforez güç kaynağı 300 V, 2 A	2	7,080.00	1-24 aylar	
2- Yarı kuru blotlayıcı	1	2,920.50	1-24 aylar	
3- Dikey elektroforez sistemi	2	3,917.60	1-24 aylar	
4- Gradyent jel dökme sistemi	1	920.40	1-24 aylar	
5- Yatay elektroforez tankı	2	1,888.00	1-24 aylar	
6- Spektrofotometre	1	35,577.00	1-24 aylar	
7- Termal döngü cihazı	1	34,272.07	1-24 aylar	
8- Jel görüntüleme sistemi	1	35,137.80	1-24 aylar	
9- Elektroporasyon sistemi	1	28,796.37	1-24 aylar	
10- Çalkalayıcı etüv, ve klipsleri	1	17,306.88	1-24 aylar	
11- Problu homojenizatör	1	8,614.00	1-24 aylar	
12- Liyofilizatör	1	25,370.00	1-24 aylar	
13- Kromatografi sistemi	1	112,439.25	1-24 aylar	
14- Fraksiyon toplayıcı	1	10,513.80	1-24 aylar	
<b>Ara Toplam</b>		<b>324,753.67</b>		
<b>Sarf Malzemesi</b>				
1- Balonjoje, volumetrik 10 ml, plastik kapaklı (1 adet)	4	28.32	1-24 aylar	
2- Balonjoje, volumetrik 100 ml, plastik kapaklı (1 adet)	4	23.60	1-24 aylar	
3- Balonjoje, volumetrik 25 ml, plastik kapaklı (1 adet)	4	23.60	1-24 aylar	
4- Balonjoje, volumetrik 250 ml, plastik kapaklı (1 adet)	4	35.40	1-24 aylar	
5- Balonjoje, volumetrik 50 ml, plastik kapaklı (1 adet)	4	23.60	1-24 aylar	
6- Cam pastör pipeti (230mm, 250 adet/kutu) (250 adet/kutu)	2	51.92	1-24 aylar	
7- Cam petri kutusu (120 x 20 mm) (1 adet)	10	35.40	1-24 aylar	
8- Cam petri kutusu (150 x 25 mm) (1 adet)	10	47.20	1-24 aylar	
9- Erlen Mayer dar boyunlu 100 ml (1 adet)	40	70.80	1-24 aylar	
10- Erlen Mayer dar boyunlu 1000 ml (1 adet)	10	82.60	1-24 aylar	
11- Erlen Mayer dar boyunlu 25 ml (1 adet)	40	70.80	1-24 aylar	
12- Erlen Mayer dar boyunlu 250 ml (1 adet)	20	59.00	1-24 aylar	
13- Erlen Mayer dar boyunlu 50 ml (1 adet)	40	70.80	1-24 aylar	
14- Erlen Mayer dar boyunlu 500 ml (1 adet)	10	47.20	1-24 aylar	
15- Otoklav bandı 19 mm x 50 m (50 m )	20	188.80	1-24 aylar	
16- Taksimatlı pipet 1 ml (1 adet)	40	59.00	1-24 aylar	
17- Taksimatlı pipet 10 ml (1 adet)	40	94.40	1-24 aylar	
18- Taksimatlı pipet 2 ml (1 adet)	50	73.75	1-24 aylar	
19- Taksimatlı pipet 25 ml (1 adet)	10	35.40	1-24 aylar	
20- Taksimatlı pipet 5 ml (1 adet)	40	59.00	1-24 aylar	

21- Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 100 ml (1 adet)	40	283.20	1-24 aylar	
22- Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 1000 ml (1 adet)	20	236.00	1-24 aylar	
23- Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 2000 ml (1 adet)	10	295.00	1-24 aylar	
24- Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 250 ml (1 adet)	40	330.40	1-24 aylar	
25- Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 500 ml (1 adet)	30	283.20	1-24 aylar	
26- Sargı bezi (1 m x 50 m) (50 m )	2	165.20	1-24 aylar	
27- Tek kullanımlık nitril eldiven (S/M/L) (100 adet/kutu)	50	413.00	1-24 aylar	
28- Foetal Bovine (Calf) Serum (100 ml)	4	473.27	1-24 aylar	
29- L-Glutamin çözeltisi (100 ml)	4	91.90	1-24 aylar	
30- RPMI Medium 1640 w/o L-Glutamine (500 ml)	10	467.63	1-24 aylar	
31- Hep3B hücre hattı (1 adet)	1	4,428.00	1-24 aylar	
32- PCL/PRF/5 hücre hattı (1 adet)	1	4,428.00	1-24 aylar	
33- [Glu1] fibrinopeptide B human (HPLC Grade) (0.1 mg)	1	319.34	1-24 aylar	
34- 2-Mercaptoethanol (Biotechnology Grade) (250 ml)	2	161.90	1-24 aylar	
35- Acetamide (>99% GC) (250 g)	2	253.82	1-24 aylar	
36- Acetonitrile (HPLC Grade) (1 l)	2	809.48	1-24 aylar	
37- Acrylamide (Ultra pure grade) (500 g)	2	584.57	1-24 aylar	
38- Adenine sulfate, dihydrate (High Purity Grade) (50 g)	2	276.07	1-24 aylar	
39- adipic acid (1 kg)	2	200.13	1-24 aylar	
40- Agar, Bacteriological (Bacteriological Grade) (1 kg)	2	1,090.74	1-24 aylar	
41- Agaroz LE, Low EEO (Molecular Biology Grade) (500 g)	2	1,344.63	1-24 aylar	
42- Albumin, Bovine, Fraction V (Biyoteknoloji saflığında) (100 g)	2	628.87	1-24 aylar	
43- Ammonium bicarbonate (500 g)	1	146.28	1-24 aylar	
44- Ammonium hydroxide (ACS Grade) (500 ml)	1	142.59	1-24 aylar	
45- Ammonium persulfate (Proteomic grade) (25 g)	2	69.86	1-24 aylar	
46- Ammonium sulfate (%99+, for analysis ACS) (500 g)	4	495.60	1-24 aylar	
47- Angiotensin (HPLC Grade) (1 mg)	1	108.91	1-24 aylar	
48- Beef extract (Meat extract) (500 g)	2	436.60	1-24 aylar	
49- Bis-acrylamide (Ultra pure grade) (100 g)	2	208.77	1-24 aylar	
50- Borik asit (ACS Grade) (1 kg)	2	183.21	1-24 aylar	
51- Bromophenol blue (ACS Grade) (25 g)	2	201.10	1-24 aylar	
52- Chloroform (extra pure ) (2.5 lt)	2	306.80	1-24 aylar	
53- Citric Acid (99.5%, for analysis) (500 g)	2	441.32	1-24 aylar	



54- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Proteomic grade) (50 g)	2	366.41	1-24 aylar	
55- CTAB (High Purity Grade) (500 g)	2	319.54	1-24 aylar	
56- Cyanogen bromide (100 g)	2	887.88	1-24 aylar	
57- Dietilpirokarbonat (DEPC) (5 g)	2	266.68	1-24 aylar	
58- Dithiothreitol (>99%) (5 g)	2	844.50	1-24 aylar	
59- DMSO (ACS Grade) (500 ml)	2	166.17	1-24 aylar	
60- EDTA-disodyum tuzu dihidrat (Biyoteknoloji saflığında) (1 kg)	2	450.78	1-24 aylar	
61- EGTA (25 g)	2	1,024.48	1-24 aylar	
62- Ethanol (%99,5 HPLC Grade) (2.5 lt)	4	708.00	1-24 aylar	
63- Ethanol (masa alkolü) (%96) (5 lt)	10	295.00	1-24 aylar	
64- Etidyum bromür (High Purity Grade) (5 g)	2	349.37	1-24 aylar	
65- Formic acid (ACS grade) (500 ml)	1	119.06	1-24 aylar	
66- Glacial Acetic Acid (ACS Grade) (2.5 l)	4	1,438.37	1-24 aylar	
67- Glycerol (Biotechnology Grade) (1 l)	2	227.50	1-24 aylar	
68- Glycine (Proteomic grade) (1 kg)	4	807.78	1-24 aylar	
69- Guanidine Thiocyanate (Biotechnology Grade) (250 g)	2	486.56	1-24 aylar	
70- HPLC grade su (2.5 l)	2	316.57	1-24 aylar	
71- Hydrochloric acid (ca.%37 ) (2.5 lt)	2	165.20	1-24 aylar	
72- Iodoacetamide (BioUltra) (5 g)	1	265.35	1-24 aylar	
73- IPTG (High Purity Grade) (1 g)	4	478.89	1-24 aylar	
74- Isopropanol (%100) (1 lt)	2	219.48	1-24 aylar	
75- L-arjinin monohidroklorür (USP Grade) (100 g)	2	126.09	1-24 aylar	
76- L-Aspartik asit (High Purity Grade) (500 g)	2	144.86	1-24 aylar	
77- L-Cysteine hydrochloride, non-animal source (USP Grade) (100 g)	2	312.72	1-24 aylar	
78- L-Histidine (High Purity Grade) (100 g)	2	129.52	1-24 aylar	
79- L-Isoleucine (USP Grade) (25 g)	2	237.75	1-24 aylar	
80- L-Leucine (USP Grade) (25 g)	2	78.19	1-24 aylar	
81- L-lizin (USP Grade) (100 g)	2	96.29	1-24 aylar	
82- L-Methionine (USP Grade) (25 g)	2	115.17	1-24 aylar	
83- L-Phenylalanine (USP Grade) (100 g)	2	212.16	1-24 aylar	
84- L-Proline (USP Grade) (25 g)	2	108.21	1-24 aylar	
85- L-Serine (USP Grade) (25 g)	2	161.90	1-24 aylar	
86- L-Threonine (USP Grade) (25 g)	2	193.43	1-24 aylar	
87- L-Tryptophan (USP Grade) (100 g)	2	366.41	1-24 aylar	
88- L-Tyrosine (USP Grade) (25 g)	2	89.47	1-24 aylar	
89- L-Valine (USP Grade) (25 g)	2	101.39	1-24 aylar	
90- Lactose monohydrate (for analysis ) (500 g)	2	396.48	1-24 aylar	
91- LB Broth (Tissue Culture Grade) (1 kg)	2	558.14	1-24 aylar	
92- Lithium acetate () (250 g)	2	984.12	1-24 aylar	
93- Lithium chloride (Anhydrous 98+%) (100 g)	2	401.20	1-24 aylar	
94- Magnesium chloride.6H2O (%99+, for	2	415.36	1-24 aylar	

analysis ACS) (500 g)				
95- Magnesium sulfate.7H2O (%99,5 , for analysis) (500 g)	2	306.80	1-24 aylar	
96- Malt extract (500 g)	2	240.30	1-24 aylar	
97- Methanol (Extra pure) (2.5 lt)	4	401.20	1-24 aylar	
98- Orange G (25 g)	1	287.92	1-24 aylar	
99- PEG 6000 (Molecular Biology Grade) (500 g)	2	211.03	1-24 aylar	
100- Peptone (Bacteriological Grade) (1 kg)	2	796.74	1-24 aylar	
101- Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol (Biotechnology Grade) (100 ml)	3	405.19	1-24 aylar	
102- PONCEAU S STAIN (Proteomic grade) (50 ml)	4	151.65	1-24 aylar	
103- Potassium chloride () (500 g)	2	297.36	1-24 aylar	
104- Potasyum asetat (500 g)	1	617.34	1-24 aylar	
105- Potasyum fosfat, dibazik (1 kg)	1	430.43	1-24 aylar	
106- Potasyum fosfat, monobazik (2.5 kg)	1	534.54	1-24 aylar	
107- Potasyum klorür (500 g)	1	252.27	1-24 aylar	
108- SDS (Biotechnology Grade) (250 g)	2	407.31	1-24 aylar	
109- Sodium chloride () (1 kg)	4	637.20	1-24 aylar	
110- Sodium hydroxide () (500 g)	2	283.20	1-24 aylar	
111- Sodium phosphate, dibasic (ACS Grade) (1 kg)	2	317.84	1-24 aylar	
112- Sodyum fosfat, monobazik (1 kg)	1	298.54	1-24 aylar	
113- Sodium sulfate, granular ACS 99+% (1 kg)	3	371.70	1-24 aylar	
114- Substance P (HPLC Grade) (1 mg)	1	292.12	1-24 aylar	
115- Sucrose (for analysis ACS) (1 kg)	2	476.72	1-24 aylar	
116- TEMED (Proteomic grade) (25 ml)	2	106.51	1-24 aylar	
117- Thimerosal (10 g)	2	775.28	1-24 aylar	
118- Tris-baz (Ultra pure grade) (1 kg)	4	654.43	1-24 aylar	
119- Tris-hidroklorür (Ultra pure grade) (1 kg)	2	758.41	1-24 aylar	
120- Triton X-100 (Reagent Grade) (1 l)	2	130.37	1-24 aylar	
121- Triton X-114 (Proteomics grade) (1 l)	2	162.75	1-24 aylar	
122- Trypsin (Protein Sequencing Grade) (100 ug)	1	489.17	1-24 aylar	
123- Tryptone (Bacteriological Grade) (1 kg)	2	910.94	1-24 aylar	
124- Tween-20 (Reagent Grade) (1 l)	2	181.51	1-24 aylar	
125- Uracil (Ultra pure grade) (250 g)	2	355.35	1-24 aylar	
126- Üre (Moleküler biyoloji saflığında) (1 kg)	1	353.75	1-24 aylar	
127- X-gal (1 g)	4	1,458.86	1-24 aylar	
128- Yeast Carbon Base (100 g)	2	745.76	1-24 aylar	
129- Yeast Extract (Bacteriological Grade) (1 kg)	2	573.48	1-24 aylar	
130- Yeast Nitrogen Base (Bacteriological Grade) (100 g)	2	393.67	1-24 aylar	
131- α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HPLC grade) (250 mg)	1	89.53	1-24 aylar	

132- Rekombinant HBsAg (1 mg)	10	25,105.68	1-24 aylar	
133- C18 packing (10 g)	2	759.59	1-24 aylar	
134- IMAC select affinity gel (5 ml)	2	1,024.48	1-24 aylar	
135- Octyl-Sepharose (10 ml)	2	578.70	1-24 aylar	
136- Octyl-Sepharose® CL-4B (50 ml)	1	902.32	1-24 aylar	
137- Phenyl-Sepharose (10 ml)	2	511.32	1-24 aylar	
138- Sephadex G-10 (50 g)	1	662.98	1-24 aylar	
139- Sepharose(R) 4B (100 ml)	1	616.08	1-24 aylar	
140- Superdex 200 prep grade (150 ml)	2	4,956.00	1-24 aylar	
141- Superdex 75 prep grade (150 ml)	2	4,956.00	1-24 aylar	
142- Capto S (25 ml)	1	590.00	1-24 aylar	
143- Capto Q (25 ml)	1	590.00	1-24 aylar	
144- Con A sepharose 4B (1 adet)	1	2,596.00	1-24 aylar	
145- Protein G sepharose 4 fast flow (1 adet)	1	7,080.00	1-24 aylar	
146- Cam kolon 10 mm iç çap, 20 cm uzunlu (C10/20) (1 adet)	2	1,463.20	1-24 aylar	
147- Cam kromatografi kolonu adaptör AC10 (1 adet)	2	1,180.00	1-24 aylar	
148- Cam kromatografi kolonu 16 mm iç çap, 20 cm uzunluk (XK16/20) (1 adet)	2	4,484.00	1-24 aylar	
149- Cam kromatografi kolonu 16 mm iç çap, 70 cm uzunluk(XK 16/70) (1 adet)	2	5,428.00	1-24 aylar	
150- DFS-Taq DNA polymerase (DNA-tested) (500 u)	40	5,475.20	1-24 aylar	
151- dNTP set 100 mM each ( ) (800 ul)	2	368.16	1-24 aylar	
152- LongAmp Taq DNA polimeraz (500 u)	2	795.32	1-24 aylar	
153- Stream Polymerase ( ) (1000 u)	5	5,472.25	1-24 aylar	
154- T4 DNA ligase (1000 u)	6	1,451.40	1-24 aylar	
155- T4 DNA ligase (High Concentration) (5000 u)	3	2,885.10	1-24 aylar	
156- Taq DNA ligaz (10000 u)	2	3,186.00	1-24 aylar	
157- Oligonükleotid primer (HPLC saflaştırılmış) (1 baz)	5600	20,673.60	1-24 aylar	
158- GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit (100 test)	2	3,398.40	1-24 aylar	
159- Capillary Array, DNA Separation, GenomeLab™, 33 cm x 75 µm (100 test)	1	3,304.00	1-24 aylar	
160- PageRuler Prestained Protein Ladder (100 applic)	5	1,298.00	1-24 aylar	
161- PVDF blotlama membranı 0.2 µm, 7 x 8.4 cm, 10 tabaka (10 sayfa)	2	764.64	1-24 aylar	
162- PVDF blotlama membranı 0.45 µm, 26.5 cm x 3.75 m (1 rulo)	2	2,775.36	1-24 aylar	
163- ApaI (3000 u)	2	295.00	1-24 aylar	
164- AseI (1000 u)	2	259.60	1-24 aylar	
165- BamHI (4000 u)	2	200.60	1-24 aylar	
166- BglII (500 u)	2	200.60	1-24 aylar	
167- BstEII (1000 u)	2	236.00	1-24 aylar	
168- BstXI (2500 u)	2	908.60	1-24 aylar	
169- DpnI (1000 u)	4	944.00	1-24 aylar	

170- DraI (1500 u)	2	259.60	1-24 aylar	
171- Eco147I (StuI) (1000 u)	2	342.20	1-24 aylar	
172- EcoRI (5000 u)	2	200.60	1-24 aylar	
173- EcoRV (2000 u)	2	259.60	1-24 aylar	
174- HaeIII (3000 u)	2	212.40	1-24 aylar	
175- HincII (500 u)	2	259.60	1-24 aylar	
176- HindIII (5000 u)	2	200.60	1-24 aylar	
177- HinfI (2000 u)	2	236.00	1-24 aylar	
178- KpnI (4000 u)	2	389.40	1-24 aylar	
179- MluI (1000 u)	2	330.40	1-24 aylar	
180- MspI (3000 u)	2	283.20	1-24 aylar	
181- MssI (PmeI) (250 u)	2	354.00	1-24 aylar	
182- NcoI (500 u)	2	448.40	1-24 aylar	
183- NdeI (500 u)	2	212.40	1-24 aylar	
184- NheI (1000 u)	2	283.20	1-24 aylar	
185- NotI (300 u)	2	354.00	1-24 aylar	
186- PaeI (SphI) (500 u)	2	507.40	1-24 aylar	
187- PstI (3000 u)	2	200.60	1-24 aylar	
188- PvuII (2500 u)	2	224.20	1-24 aylar	
189- SacI (1200 u)	2	259.60	1-24 aylar	
190- SacII (1200 u)	2	259.60	1-24 aylar	
191- SalI (1500 u)	2	295.00	1-24 aylar	
192- SmaI (1200 u)	2	259.60	1-24 aylar	
193- XbaI (1500 u)	2	259.60	1-24 aylar	
194- XhoI (2000 u)	2	236.00	1-24 aylar	
195- XmiI (AccI) (400 u)	2	413.00	1-24 aylar	
196- EZ-RNA Total RNA isolation Kit ( ) (100 ml)	5	1,355.47	1-24 aylar	
197- M-MuLV Reverse Transcriptase (1000 u)	4	1,014.80	1-24 aylar	
198- RevertAid H-Minus Reverse Transcriptase (10000 u)	4	1,982.40	1-24 aylar	
199- 0.2 ml 8 tüp PCR strip kapağı (120 adet)	4	944.00	1-24 aylar	
200- 0.2 ml 8 tüp PCR stripi (120 adet)	4	944.00	1-24 aylar	
201- 0.2 ml PCR tüpü (1000 adet)	4	377.60	1-24 aylar	
202- 0.22 µm steril filtre (50 adet)	8	2,076.80	1-24 aylar	
203- 96x0.2 ml PCR plate (25 adet)	2	523.92	1-24 aylar	
204- Dar boyunlu plastik piset (250 ml) (1 adet)	10	35.40	1-24 aylar	
205- Filtreli pipet ucu 0.1 – 10 µl (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	
206- Filtreli pipet ucu 0.5 – 20 µl (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	
207- Filtreli pipet ucu 2 – 120 µl (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	
208- Filtreli pipet ucu 5 – 200 µl (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	
209- Filtreli pipet ucu 50 – 1000 µl (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	
210- Filtresiz pipet ucu 0.1 – 10 µl non-steril refill pack (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	
211- Filtresiz pipet ucu 0.1 – 10 µl uzun, non-steril, refill pack (960 adet)	6	920.40	1-24 aylar	

212- Filtresiz pipet ucu 0.5 – 300 µl, non-steril, bulk (1000 adet)	6	389.40	1-24 aylar	
213- Filtresiz pipet ucu 10 – 1000 µl, non-steril, bulk (1000 adet)	6	389.40	1-24 aylar	
214- Konik tabanlı polipropilen tüp (15 ml) (50 adet)	20	590.00	1-24 aylar	
215- Konik tabanlı polipropilen tüp (50 ml) (25 adet)	20	424.80	1-24 aylar	
216- Mavi pipet ucu (1000 adet)	30	1,168.20	1-24 aylar	
217- Mikrosantrifüj tüpü (1.5 ml) (1000 adet)	10	212.40	1-24 aylar	
218- Millipore ZipTip C18 (96 adet)	1	1,274.14	1-24 aylar	
219- PCR plate seal (100 adet)	2	849.60	1-24 aylar	
220- Sarı pipet ucu (1000 adet)	15	462.15	1-24 aylar	
221- Lam (26x75 mm, tek yüzü 1/3 buzlu, 50 adet/paket) (50 adet)	4	14.16	1-24 aylar	
222- Lamel (24x24 mm, 100 adet/paket) (100 adet)	4	23.60	1-24 aylar	
223- Lamel (24x60 mm, 100 adet/paket) (100 adet)	2	28.32	1-24 aylar	
224- Parafilm (38 m x 100 mm rulo) (1 adet)	4	202.96	1-24 aylar	
225- Plastik pastör pipeti (1 ml hacim, 500 adet/ambalaj) (500 adet)	5	177.00	1-24 aylar	
226- Plastik steril petri kutusu (90x17mm, 500 adet/ambalaj) (500 adet)	5	501.50	1-24 aylar	
227- Champion pET SUMO Expression System (1 adet)	1	3,309.90	1-24 aylar	
228- pCold I (1 adet)	1	1,575.91	1-24 aylar	
229- pKLAC2 vektör (1 adet)	1	1,587.10	1-24 aylar	
230- pTEF1/Zeo (20 µg)	1	2,253.80	1-24 aylar	
231- pYC2/CT (20 µg)	1	2,802.50	1-24 aylar	
232- pYES3/CT, 20 ug (20 µg)	1	2,802.50	1-24 aylar	
233- Tek kanallı ayarlanabilir hacimli otomatik pipet 100-1000 µl (1 adet)	1	141.60	1-24 aylar	
234- Tek kanallı ayarlanabilir hacimli otomatik pipet 2-20 µl (1 adet)	1	141.60	1-24 aylar	
235- Tek kanallı ayarlanabilir hacimli otomatik pipet 20-200 µl (1 adet)	1	141.60	1-24 aylar	
<b>Ara Toplam</b>		<b>216,153.27</b>		
<b>Hizmet Alımı</b>				
<b>Ara Toplam</b>				
<b>Seyahat Giderleri</b>				
<b>Ara Toplam</b>				
<b>Personel Giderleri</b>				
Proje Yürütücüsü: Yrd. Doç. Dr. Doruk Engin	1	21,600.00	1 - 24 aylar	

Tez Öğrencisi (çalışan): Biyolog Didem Molla	1	12,000.00	1 - 20 aylar	
Yardımcı Araştırmacı: Dr. Sertaç Özdemir	1	7,800.00	10 - 22 aylar	
Yardımcı Araştırmacı: Dr. Orhan Kiremitçi	1	7,800.00	12 - 24 aylar	
Yardımcı Araştırmacı: Dr. Stephen Mitchell Halloran	1	12,000.00	1 - 20 aylar	
Yardımcı Personel: Uzm. Biyolog Ayşe Yeşbek Kaymaz	1	7,500.00	6 - 20 aylar	
Yardımcı Personel: Uzm. Biyolog Sezen Songur Bolat	1	6,500.00	10 - 22 aylar	
<b>Ara Toplam</b>		<b>75,200.00</b>		
<b>GENEL TOPLAM</b>		<b>616,078.62</b>		

**ÖNEMLİ NOT:** 1) Birden Fazla Tez öğrencisi, Yrd. Araştırmacı, Yardımcı personel varsa ilave yapınız.

2) Tüm alımlar için **KDV dahil tutar yazılacaktır. KDV hariç bedel verilmesi halinde daha sonra KDV için ayrıca ödeme yapılmayacaktır.**

3) Dış alımlar için **CİF ve alınan malın teslim alınacak gümrüğe kadar olan taşıma bedeli dahil değer verilecektir.**

**MAKİNA – DONANIM BÜTÇE KALEMİ AYRINTILARI VE GEREKÇELERİ**
**FORM 21**

	MAKİNE-DONANIMIN ADI	TEKNİK ÖZELLİKLERİ	MODELİ	PROJEDE KULLANILACAĞI DÖNEM VE KULLANIM SÜRESİ (GÜN)	PROJE SÜRESİNCE KULLANILA CAĞI YER (FİRMA/ÜNİ VERSİTE)	GEREKÇESİ	PROFORMA FATURA BEDELİ (TL)
1	Elektroforez güç kaynağı 300 V, 2 A	0 – 300 V, 2 A akım verebilen elektroforez uygulamaları için güç kaynağı	Consort EV202	1-24 aylar	FİRMA	Protein ve nükleik asit elektroforez deneyleri	7,080.00
2	Yarı kuru blotlayıcı	10 x 10 cm jelleri blotlayabilecek yarı kuru işletmeye uygun	Scie-Plas V20-SBD	1-24 aylar	FİRMA	Western blot deneyleri	2,920.50
3	Dikey elektroforez sistemi	10 x 10 cm jelleri dökmeye ve yürütmeye uygun tank	Scie-Plas TV100YK	1-24 aylar	FİRMA	Protein elektroforezi deneyleri	3,917.60
4	Gradyent jel dökme sistemi	10 x 10 cm x 1 mm'lik jellerde gradiyent yapabilen	Scie-Plas GM25	1-24 aylar	FİRMA	Protein elektroforezi deneyleri	920.40
5	Yatay elektroforez tankı	15 x 15 cm büyüklüğünde yatay jelleri dökmeye ve yürütmeye uygun	Scie-Plas HU10W	1-24 aylar	FİRMA	PCR ürünü ve plazmidlerin analizi	1,888.00
6	Spektrofotometre	1 – 2 ul hacimde spektrometrik ölçüm yapmaya elverişli	Nanodrop ND2000c	1-24 aylar	FİRMA	Nükleik asit ve proteinlerin analizi ve kantitasyonu	35,577.00
7	Termal döngü cihazı	2 adet 48 kuyucuklu bloğu olan PCR yapmaya uygun cihaz	Biorad C1000	1-24 aylar	FİRMA	PCR ve ligasyon deneyleri	34,272.07

8	Jel görüntüleme sistemi	Nükleik asit, protein ve ECL uygulamalarına uygun	CellBiosciences Alpha	1-24 aylar	FİRMA	Protein ve nükleik asit elektroforez sonuçları ile western blot deneylerinin analizi	35,137.80
9	Elektroporasyon sistemi	Maya ve bakteri hücrelerinin DNA ile transformasyonunu yapmaya elverişli	BTX ECM830	1-24 aylar	FİRMA	Maya ve bakteri hücrelerine gen aktarımı	28,796.37
10	Çalkalayıcı etüv, ve klipsleri	7 l kültürü 1 – 2000 RPM hızda ve istenilen sıcaklıkta çalkalamaya uygun	Jeiotech SI-300	1-24 aylar	FİRMA	Maya ve bakteri hücrelerinin inkübasyonu	17,306.88
11	Probu homojenizatör	Sürekli ve kesikli çalışmaya uygun 100 W gücünde	Bandelin SONOPULS HD	1-24 aylar	FİRMA	Protein izolasyonu	8,614.00
12	Liyofilizatör	-55 C sıcaklıkta çalışan, vial kapama sistemi bulunan	Lyoquest-55	1-24 aylar	FİRMA	Proteinlerin uzun süreli saklanması amacı ile	25,370.00
13	Kromatografi sistemi	10 ml/dak akım hızında gradiyen yapan 2 pompası bulunan	Akta UPC-10	1-24 aylar	FİRMA	Protein saflaştırması	112,439.25
14	Fraksiyon toplayıcı	Kromatografi cihazı ile uyumlu olmalıdır	Akta FRAC-920	1-24 aylar	FİRMA	Protein saflaştırması	10,513.80
<b>TOPLAM</b>							324,753.67



## SARF MALZEMELERİ KALEMİ AYRINTILARI VE GEREKÇELERİ

FORM 22

	SARF MALZEMESİ ADI	BİRİMİ (GR-LT, VS)	ADEDİ	BİRİM FİYATI (TL)	DÖNEMİ	GEREKÇESİ	TOPLAM MALZEME BEDELİ (YTL)
1	Balonjoje, volumetrik 10 ml, plastik kapaklı	1 adet	4	7.08	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	28.32
2	Balonjoje, volumetrik 100 ml, plastik kapaklı	1 adet	4	5.90	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	23.60
3	Balonjoje, volumetrik 25 ml, plastik kapaklı	1 adet	4	5.90	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	23.60
4	Balonjoje, volumetrik 250 ml, plastik kapaklı	1 adet	4	8.85	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	35.40
5	Balonjoje, volumetrik 50 ml, plastik kapaklı	1 adet	4	5.90	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	23.60
6	Cam pastör pipeti (230mm, 250 adet/kutu)	250 adet/kutu	2	25.96	1-24 aylar	Örnek hazırlama	51.92
7	Cam petri kutusu (120 x 20 mm)	1 adet	10	3.54	1-24 aylar	Boyama ve tamponda bekletme işlemleri	35.40
8	Cam petri kutusu (150 x 25 mm)	1 adet	10	4.72	1-24 aylar	Boyama ve tamponda bekletme işlemleri	47.20
9	Erlen Mayer dar boyunlu 100 ml	1 adet	40	1.77	1-24 aylar	Çözelti hazırlama, kültür	70.80
10	Erlen Mayer dar boyunlu 1000 ml	1 adet	10	8.26	1-24 aylar	Çözelti hazırlama, kültür	82.60
11	Erlen Mayer dar boyunlu 25 ml	1 adet	40	1.77	1-24 aylar	Çözelti hazırlama, kültür	70.80
12	Erlen Mayer dar boyunlu 250 ml	1 adet	20	2.95	1-24 aylar	Çözelti hazırlama, kültür	59.00
13	Erlen Mayer dar boyunlu 50 ml	1 adet	40	1.77	1-24 aylar	Çözelti hazırlama, kültür	70.80
14	Erlen Mayer dar boyunlu 500 ml	1 adet	10	4.72	1-24 aylar	Çözelti hazırlama, kültür	47.20
15	Otoklav bandı 19 mm x 50 m	50 m	20	9.44	1-24 aylar	Sterilizasyon kontrolü	188.80
16	Taksimatlı pipet 1 ml	1 adet	40	1.48	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	59.00
17	Taksimatlı pipet 10 ml	1 adet	40	2.36	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	94.40
18	Taksimatlı pipet 2 ml	1 adet	50	1.48	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	73.75
19	Taksimatlı pipet 25 ml	1 adet	10	3.54	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	35.40
20	Taksimatlı pipet 5 ml	1 adet	40	1.48	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	59.00
21	Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 100 ml	1 adet	40	7.08	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması, saklanması	283.20
22	Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 1000 ml	1 adet	20	11.80	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması, saklanması	236.00

23	Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 2000 ml	1 adet	10	29.50	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması, saklanması	295.00
24	Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 250 ml	1 adet	40	8.26	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması, saklanması	330.40
25	Vidalı kapaklı şeffaf laboratuvar şişesi 500 ml	1 adet	30	9.44	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması, saklanması	283.20
26	Sargı bezi (1 m x 50 m)	50 m	2	82.60	1-24 aylar	Sterilizasyon işlemleri	165.20
27	Tek kullanımlık nitril eldiven (S/M/L)	100 adet/kutu	50	8.26	1-24 aylar	Genel laboratuvar kullanımı	413.00
28	Foetal Bovine (Calf) Serum	100 ml	4	118.32	1-24 aylar	Hücre kültürü	473.27
29	L-Glutamin çözeltisi	100 ml	4	22.97	1-24 aylar	Hücre kültürü	91.90
30	RPMI Medium 1640 w/o L-Glutamine	500 ml	10	46.76	1-24 aylar	Hücre kültürü	467.63
31	Hep3B hücre hattı	1 adet	1	4,838.00	1-24 aylar	HBV genomunun çoğaltılması	4,428.00
32	PCL/PRF/5 hücre hattı	1 adet	1	4,838.00	1-24 aylar	HBV genomunun çoğaltılması	4,428.00
33	[Glu1] fibrinopeptide B human (HPLC Grade)	0.1 mg	1	319.34	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	319.34
34	2-Mercaptoethanol (Biotechnology Grade)	250 ml	2	80.95	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	161.90
35	Acetamide (>99% GC)	250 g	2	126.91	1-24 aylar	Çözelti hazırlama	253.82
36	Acetonitrile (HPLC Grade)	1 l	2	404.74	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	809.48
37	Acrylamide (Ultra pure grade)	500 g	2	292.29	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	584.57
38	Adenine sulfate, dihydrate (High Purity Grade)	50 g	2	138.04	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	276.07
39	adipic acid	1 kg	2	100.06	1-24 aylar	PBR kromatografik saflaştırması	200.13
40	Agar, Bacteriological (Bacteriological Grade)	1 kg	2	545.37	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	1,090.74
41	Agaroz LE, Low EEO (Molecular Biology Grade)	500 g	2	672.32	1-24 aylar	DNA örneklerinin elektroforetik analizi	1,344.63
42	Albumin, Bovine, Fraction V (Biyoteknoloji saflığında)	100 g	2	314.43	1-24 aylar	Protein kantitasyonu	628.87
43	Ammonium bicarbonate	500 g	1	146.28	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	146.28
44	Ammonium hydroxide (ACS Grade)	500 ml	1	142.59	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	142.59
45	Ammonium persulfate (Proteomic grade)	25 g	2	34.93	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	69.86
46	Ammonium sulfate (%99+, for analysis ACS)	500 g	4	123.90	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	495.60

47	Angiotensin (HPLC Grade)	1 mg	1	108.91	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	108.91
48	Beef extract (Meat extract)	500 g	2	218.30	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	436.60
49	Bis-acrylamide (Ultra pure grade)	100 g	2	104.38	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	208.77
50	Borik asit (ACS Grade)	1 kg	2	91.60	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	183.21
51	Bromophenol blue (ACS Grade)	25 g	2	100.55	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	201.10
52	Chloroform (extra pure )	2.5 lt	2	153.40	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	306.80
53	Citric Acid (99.5%, for analysis)	500 g	2	220.66	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	441.32
54	Coomassie Brilliant Blue R-250 (Proteomic grade)	50 g	2	183.21	1-24 aylar	Protein elektroforezi deneyleri	366.41
55	CTAB (High Purity Grade)	500 g	2	159.77	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	319.54
56	Cyanogen bromide	100 g	2	443.94	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	887.88
57	Dietilpirokarbonat (DEPC)	5 g	2	133.34	1-24 aylar	RNA manipölasyonlarında	266.68
58	Dithiothreitol (>99%)	5 g	2	422.25	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	844.50
59	DMSO (ACS Grade)	500 ml	2	83.08	1-24 aylar	Genetik transformasyon deneyleri, kriyoprezervasyon	166.17
60	EDTA-disodyum tuzu dihidrat (Biyoteknoloji saflığında)	1 kg	2	225.39	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	450.78
61	EGTA	25 g	2	512.24	1-24 aylar	Tampon hazırlanması	1,024.48
62	Ethanol (%99,5 HPLC Grade)	2.5 lt	4	177.00	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	708.00
63	Ethanol (masa alkoli) (%96)	5 lt	10	29.50	1-24 aylar	Dezenfeksiyon, sterilizasyon	295.00
64	Etidyum bromür (High Purity Grade)	5 g	2	174.69	1-24 aylar	DNA örneklerinin elektroforetik analizi	349.37
65	Formic acid (ACS grade)	500 ml	1	119.06	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	119.06
66	Glacial Acetic Acid (ACS Grade)	2.5 l	4	359.59	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	1,438.37
67	Glycerol (Biotechnology Grade)	1 l	2	113.75	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	227.50
68	Glycine (Proteomic grade)	1 kg	4	201.95	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	807.78
69	Guanidine Thiocyanate (Biotechnology Grade)	250 g	2	243.28	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	486.56
70	HPLC grade su	2.5 l	2	158.29	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	316.57
71	Hydrochloric acid (ca.%37 )	2.5 lt	2	82.60	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	165.20
72	Iodoacetamide (BioUltra)	5 g	1	265.35	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	265.35
73	IPTG (High Purity Grade)	1 g	4	119.72	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	478.89
74	Isopropanol (%100)	1 lt	2	109.74	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	219.48
75	L-arjinin monohidroklorür (USP Grade)	100 g	2	63.05	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	126.09
76	L-Aspartik asit (High Purity Grade)	500 g	2	72.43	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	144.86

77	L-Cysteine hydrochloride, non-animal source (USP Grade)	100 g	2	156.36	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	312.72
78	L-Histidine (High Purity Grade)	100 g	2	64.76	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	129.52
79	L-Isoleucine (USP Grade)	25 g	2	118.87	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	237.75
80	L-Leucine (USP Grade)	25 g	2	39.09	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	78.19
81	L-lizin (USP Grade)	100 g	2	48.14	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	96.29
82	L-Methionine (USP Grade)	25 g	2	57.58	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	115.17
83	L-Phenylalanine (USP Grade)	100 g	2	106.08	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	212.16
84	L-Proline (USP Grade)	25 g	2	54.10	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	108.21
85	L-Serine (USP Grade)	25 g	2	80.95	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	161.90
86	L-Threonine (USP Grade)	25 g	2	96.71	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	193.43
87	L-Tryptophan (USP Grade)	100 g	2	183.21	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	366.41
88	L-Tyrosine (USP Grade)	25 g	2	44.73	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	89.47
89	L-Valine (USP Grade)	25 g	2	50.69	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	101.39
90	Lactose monohydrate (for analysis )	500 g	2	198.24	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	396.48
91	LB Broth (Tissue Culture Grade)	1 kg	2	279.07	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	558.14
92	Lithium acetate ()	250 g	2	492.06	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	984.12
93	Lithium chloride (Anhydrous 98+ %)	100 g	2	200.60	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	401.20
94	Magnesium chloride.6H2O (%99+, for analysis ACS)	500 g	2	207.68	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	415.36
95	Magnesium sulfate.7H2O (%99,5 , for analysis)	500 g	2	153.40	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	306.80
96	Malt extract	500 g	2	120.15	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	240.30
97	Methanol (Extra pure)	2.5 lt	4	100.30	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	401.20
98	Orange G	25 g	1	287.92	1-24 aylar	Yükleme tamponu	287.92
99	PEG 6000 (Molecular Biology Grade)	500 g	2	105.52	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	211.03
100	Peptone (Bacteriological Grade)	1 kg	2	398.37	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	796.74
101	Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol (Biotechnology Grade)	100 ml	3	135.06	1-24 aylar	DNA saflaştırması	405.19
102	PONCEAU S STAIN (Proteomic grade)	50 ml	4	37.91	1-24 aylar	Protein elektroforezi ve blotlanması deneyleri	151.65
103	Potassium chloride ()	500 g	2	148.68	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	297.36
104	Potasyum asetat	500 g	1	617.34	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	617.34

105	Potasyum fosfat, dibazik	1 kg	1	430.43	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	430.43
106	Potasyum fosfat, monobazik	2.5 kg	1	534.54	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	534.54
107	Potasyum klorür	500 g	1	252.27	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	252.27
108	SDS (Biotechnology Grade)	250 g	2	203.66	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	407.31
109	Sodium chloride ( )	1 kg	4	159.30	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	637.20
110	Sodium hydroxide ( )	500 g	2	141.60	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	283.20
111	Sodium phosphate, dibasic (ACS Grade)	1 kg	2	158.92	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	317.84
112	Sodyum fosfat, monobazik	1 kg	1	298.54	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	298.54
113	Sodium sulfate, granular ACS 99+ %	1 kg	3	123.90	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	371.70
114	Substance P (HPLC Grade)	1 mg	1	292.12	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	292.12
115	Sucrose (for analysis ACS)	1 kg	2	238.36	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	476.72
116	TEMED (Proteomic grade)	25 ml	2	53.25	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	106.51
117	Thimerosal	10 g	2	387.64	1-24 aylar	Tampon hazırlanması	775.28
118	Tris-baz (Ultra pure grade)	1 kg	4	163.61	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	654.43
119	Tris-hidroklorür (Ultra pure grade)	1 kg	2	379.20	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	758.41
120	Triton X-100 (Reagent Grade)	1 l	2	65.18	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	130.37
121	Triton X-114 (Proteomics grade)	1 l	2	81.37	1-24 aylar	Çözelti hazırlama	162.75
122	Trypsin (Protein Sequencing Grade)	100 ug	1	489.17	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	489.17
123	Tryptone (Bacteriological Grade)	1 kg	2	455.47	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	910.94
124	Tween-20 (Reagent Grade)	1 l	2	90.75	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	181.51
125	Uracil (Ultra pure grade)	250 g	2	177.67	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	355.35
126	Üre (Moleküler biyoloji saflığında)	1 kg	1	353.75	1-24 aylar	Çözelti ve tampon hazırlanması	353.75
127	X-gal	1 g	4	364.71	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	1,458.86
128	Yeast Carbon Base	100 g	2	372.88	1-24 aylar	Maya transformantlarının seçimi	745.76
129	Yeast Extract (Bacteriological Grade)	1 kg	2	286.74	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	573.48
130	Yeast Nitrogen Base (Bacteriological Grade)	100 g	2	196.84	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	393.67
131	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HPLC grade)	250 mg	1	89.53	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	89.53
132	Rekombinant HBsAg	1 mg	10	2,510.57	1-24 aylar	ELISA deneylerinin standardizasyonu	25,105.68

133	C18 packing	10 g	2	379.79	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	759.59
134	IMAC select affinity gel	5 ml	2	512.24	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	1,024.48
135	Octyl-Sepharose	10 ml	2	289.35	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	578.70
136	Octyl-Sepharose® CL-4B	50 ml	1	902.32	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	902.32
137	Phenyl-Sepharose	10 ml	2	255.66	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	511.32
138	Sepahdex G-10	50 g	1	662.98	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	662.98
139	Sepharose(R) 4B	100 ml	1	616.08	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	616.08
140	Superdex 200 prep grade	150 ml	2	2,478.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	4,956.00
141	Superdex 75 prep grade	150 ml	2	2,478.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	4,956.00
142	Capto S	25 ml	1	590.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	590.00
143	Capto Q	25 ml	1	590.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	590.00
144	Con A sepharose 4B	1 adet	1	2,596.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	2,596.00
145	Protein G sepharose 4 fast flow	1 adet	1	7,080.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	7,080.00
146	Cam kolon 10 mm iç çap, 20 cm uzunlu (C10/20)	1 adet	2	731.60	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	1,463.20
147	Cam kromatografi kolonu adaptör AC10	1 adet	2	590.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	1,180.00
148	Cam kromatografi kolonu 16 mm iç çap, 20 cm uzunluk (XK16/20)	1 adet	2	2,242.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	4,484.00
149	Cam kromatografi kolonu 16 mm iç çap, 70 cm uzunluk(XK 16/70)	1 adet	2	2,714.00	1-24 aylar	Kromatografik protein seperasyonu	5,428.00
150	DFS-Taq DNA polymerase (DNA-tested)	500 u	40	136.88	1-24 aylar	Gen klonlama, gen ekspresyonu ve genetik analiz deneyleri	5,475.20
151	dNTP set 100 mM each ()	800 ul	2	184.08	1-24 aylar	Gen klonlama, gen ekspresyonu ve genetik analiz deneyleri	368.16
152	LongAmp Taq DNA polimeraz	500 u	2	397.66	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	795.32
153	Stream Polymerase ()	1000 u	5	1,094.45	1-24 aylar	Gen klonlama, gen ekspresyonu ve genetik analiz deneyleri	5,472.25
154	T4 DNA ligase	1000 u	6	241.90	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	1,451.40
155	T4 DNA ligase (High Concentration)	5000 u	3	961.70	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	2,885.10
156	Taq DNA ligaz	10000 u	2	1,593.00	1-24 aylar	Yönlendirilmiş mutageniz deneyleri	3,186.00
157	Oligonükleotid primer (HPLC saflaştırılmış)	1 baz	5600	3.69	1-24 aylar	PCR deneyleri	20,673.60
158	GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	100 test	2	1,699.20	1-24 aylar	HBsAg konstraktlarının kontrolü	3,398.40
159	Capillary Array, DNA Separation, GenomeLab™, 33 cm x 75 µm	100 test	1	3,304.00	1-24 aylar	HBsAg konstraktlarının kontrolü	3,304.00
160	PageRuler Prestained Protein	100 applic	5	259.60	1-24 aylar	Protein elektroforezi deneyleri	1,298.00

	Ladder						
161	PVDF blotlama membranı 0.2 µm, 7 x 8.4 cm, 10 tabaka	10 sayfa	2	382.32	1-24 aylar	Protein blotlama deneyleri	764.64
162	PVDF blotlama membranı 0.45 µm, 26.5 cm x 3.75 m	1 rulo	2	1,387.68	1-24 aylar	Protein blotlama deneyleri	2,775.36
163	ApaI	3000 u	2	147.50	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	295.00
164	AseI	1000 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
165	BamHI	4000 u	2	100.30	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	200.60
166	BglII	500 u	2	100.30	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	200.60
167	BstEII	1000 u	2	118.00	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	236.00
168	BstXI	2500 u	2	454.30	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	908.60
169	DpnI	1000 u	4	236.00	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	944.00
170	DraI	1500 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
171	Eco147I (StuI)	1000 u	2	171.10	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	342.20
172	EcoRI	5000 u	2	100.30	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	200.60
173	EcoRV	2000 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
174	HaeIII	3000 u	2	106.20	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	212.40
175	HincII	500 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
176	HindIII	5000 u	2	100.30	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	200.60
177	HinfI	2000 u	2	118.00	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	236.00
178	KpnI	4000 u	2	194.70	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	389.40
179	MluI	1000 u	2	165.20	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	330.40
180	MspI	3000 u	2	141.60	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	283.20
181	MssI (PmeI)	250 u	2	177.00	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	354.00
182	NcoI	500 u	2	224.20	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	448.40
183	NdeI	500 u	2	106.20	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	212.40
184	NheI	1000 u	2	141.60	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	283.20
185	NotI	300 u	2	177.00	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	354.00
186	PaeI (SphI)	500 u	2	253.70	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	507.40
187	PstI	3000 u	2	100.30	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	200.60
188	PvuII	2500 u	2	112.10	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	224.20
189	SacI	1200 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
190	SacII	1200 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
191	SalI	1500 u	2	147.50	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	295.00
192	SmaI	1200 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60

193	XbaI	1500 u	2	129.80	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	259.60
194	XhoI	2000 u	2	118.00	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	236.00
195	XmiI (AccI)	400 u	2	206.50	1-24 aylar	Rekombinant DNA teknolojisi	413.00
196	EZ-RNA Total RNA isolation Kit ( )	100 ml	5	271.09	1-24 aylar	RNA, DNA ve protein izolasyonu	1,355.47
197	M-MuLV Reverse Transcriptase	1000 u	4	253.70	1-24 aylar	Ekspresyon analizi, rekombinant DNA teknolojisi	1,014.80
198	RevertAid H-Minus Reverse Transcriptase	10000 u	4	495.60	1-24 aylar	Ekspresyon analizi, rekombinant DNA teknolojisi	1,982.40
199	0.2 ml 8 tüp PCR strip kapağı	120 adet	4	236.00	1-24 aylar	PCR deneyleri	944.00
200	0.2 ml 8 tüp PCR stripi	120 adet	4	236.00	1-24 aylar	PCR deneyleri	944.00
201	0.2 ml PCR tüpü	1000 adet	4	94.40	1-24 aylar	PCR deneyleri	377.60
202	0.22 µm steril filtre	50 adet	8	259.60	1-24 aylar	Besiyeri ve çözelti hazırlama	2,076.80
203	96x0.2 ml PCR plate	25 adet	2	261.96	1-24 aylar	PCR deneyleri	523.92
204	Dar boyunlu plastik piset (250 ml)	1 adet	10	3.54	1-24 aylar	Örnek hazırlama	35.40
205	Filtreli pipet ucu 0.1 – 10 µl	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
206	Filtreli pipet ucu 0.5 – 20 µl	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
207	Filtreli pipet ucu 2 – 120 µl	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
208	Filtreli pipet ucu 5 – 200 µl	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
209	Filtreli pipet ucu 50 – 1000 µl	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
210	Filtresiz pipet ucu 0.1 – 10 µl non-steril refill pack	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
211	Filtresiz pipet ucu 0.1 – 10 µl uzun, non-steril, refill pack	960 adet	6	153.40	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	920.40
212	Filtresiz pipet ucu 0.5 – 300 µl, non-steril, bulk	1000 adet	6	64.90	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	389.40
213	Filtresiz pipet ucu 10 – 1000 µl, non-steril, bulk	1000 adet	6	64.90	1-24 aylar	Tampon, çözelti ve örnek hazırlanması	389.40
214	Konik tabanlı polipropilen tüp (15 ml)	50 adet	20	29.50	1-24 aylar	Örnek hazırlama	590.00
215	Konik tabanlı polipropilen tüp (50 ml)	25 adet	20	21.24	1-24 aylar	Örnek hazırlama	424.80
216	Mavi pipet ucu	1000 adet	30	38.94	1-24 aylar	Örnek hazırlama	1,168.20
217	Mikrosantrifüj tüpü (1.5 ml)	1000 adet	10	21.24	1-24 aylar	Örnek hazırlama	212.40
218	Millipore ZipTip C18	96 adet	1	1,274.14	1-24 aylar	MALDI-TOF-MS deneyleri	1,274.14
219	PCR plate seal	100 adet	2	424.80	1-24 aylar	PCR deneyleri	849.60
220	Sarı pipet ucu	1000 adet	15	30.81	1-24 aylar	Örnek hazırlama	462.15



221	Lam (26x75 mm, tek yüzü 1/3 buzlu, 50 adet/paket)	50 adet	4	3.54	1-24 aylar	Mikroskopik analiz	14.16
222	Lamel (24x24 mm, 100 adet/paket)	100 adet	4	5.90	1-24 aylar	Mikroskopik analiz	23.60
223	Lamel (24x60 mm, 100 adet/paket)	100 adet	2	14.16	1-24 aylar	Mikroskopik analiz	28.32
224	Parafilm (38 m x 100 mm rulo)	1 adet	4	50.74	1-24 aylar	Genel kullanım	202.96
225	Plastik pastör pipeti (1 ml hacim, 500 adet/ambalaj)	500 adet	5	35.40	1-24 aylar	Örnek hazırlama	177.00
226	Plastik steril petri kutusu (90x17mm, 500 adet/ambalaj)	500 adet	5	100.30	1-24 aylar	Besiyeri hazırlama	501.50
227	Champion pET SUMO Expression System	1 adet	1	3,309.90	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	3,309.90
228	pCold I	1 adet	1	1,575.91	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	1,575.91
229	pKLAC2 vektör	1 adet	1	1,587.10	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	1,587.10
230	pTEF1/Zeo	20 µg	1	2,253.80	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	2,253.80
231	pYC2/CT	20 µg	1	2,802.50	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	2,802.50
232	pYES3/CT, 20 ug	20 µg	1	2,802.50	1-24 aylar	Klonlama işlemleri	2,802.50
233	Tek kanallı ayarlanabilir hacimli otomatik pipet 100-1000 µl	1 adet	1	141.60	1-24 aylar	Genel kullanım	141.60
234	Tek kanallı ayarlanabilir hacimli otomatik pipet 2-20 µl	1 adet	1	141.60	1-24 aylar	Genel kullanım	141.60
235	Tek kanallı ayarlanabilir hacimli otomatik pipet 20-200 µl	1 adet	1	141.60	1-24 aylar	Genel kullanım	141.60
<b>TOPLAM</b>							<b>216,153.27</b>

**HİZMET ALIM KALEMİ AYRINTILARI VE GEREKÇELERİ****FORM 23**

	HİZMETİN ADI	HİZMET HAKKINDA AYRINTILI BİLGİ	DÖNEMİ VE SÜRESİ (AY)	GEREKÇESİ	TEKLİF ALINAN HİZMET BEDELİ (YTL)
1					
2					
3					
4					
TOPLAM					

**SEYAHAT GİDERİ KALEMİ AYRINTILARI VE GEREKÇELERİ****FORM 24**

	SEYAHAT TÜRÜ (YURTIÇİ/ YURTDIŞI)	DÖNEMİ	SEYAHATIN YAPILACAK AĞI YER	BİRİM SEYAHAT GİDERİ (YTL)	SEYAHAT SAYISI	SEYAHAT YAPACAK KİŞİ (PROJE PERSONELİN DEN)	GEREKÇESİ	SEYAHAT TUTARI (YTL)
1								
2								
3								
TOPLAM								

PROJE PERSONELİ AYRINTILI ÖDEME TABLOSU								FORM NO:25	
Adı Soyadı	Proje Yürüt.	Tez Öğr.	Yrd. Araş.	Yrd. Araş.	Yrd. Araş.	Yrd. Per.	Yrd. Per.		
Aylık Birim Ücreti	Evren Doruk Engin	Didem Molla	Sertaç Özdemir	Orhan Kiremitçi	Mitchell Halloran	Ayşe Yeşbek Kaymaz	Sezen Bolat Sungur		
Çalışacağı Ay	24	20	13	13	20	15	13		
Toplam Ücret	21,600.00	12,000.00	7,800.00	7,800.00	12,000.00	7,500.00	6,500.00		
Ödeme Tarih									
1. dönem	01/01/2012 - 31/01/2012	900.00	600.00		600.00				
	01/02/2012 - 29/02/2012	900.00	600.00		600.00				
	01/03/2012 - 31/03/2012	900.00	600.00		600.00				
2. dönem	01/04/2012 - 30/04/2012	900.00	600.00		600.00				
	01/05/2012 - 31/05/2012	900.00	600.00		600.00				
	01/06/2012 - 30/06/2012	900.00	600.00		600.00	500.00			
3. dönem	01/07/2012 - 31/07/2012	900.00	600.00		600.00	500.00			
	01/08/2012 - 31/08/2012	900.00	600.00		600.00	500.00			
	01/09/2012 - 30/09/2012	900.00	600.00		600.00	500.00			
4. dönem	01/10/2012 - 31/10/2012	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/11/2012 - 30/11/2012	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/12/2012 - 31/12/2012	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
5. dönem	01/01/2013 - 31/01/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/02/2013 - 28/02/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/03/2013 - 31/03/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
6. dönem	01/04/2013 - 30/04/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/05/2013 - 31/05/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/06/2013 - 30/06/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
7. dönem	01/07/2013 - 31/07/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/08/2013 - 31/08/2013	900.00	600.00	600.00	600.00	500.00	500.00		
	01/09/2013 - 30/09/2013	900.00		600.00	600.00		500.00		
8. dönem	01/10/2013 - 31/10/2013	900.00		600.00	600.00		500.00		
	01/11/2013 - 30/11/2013	900.00			600.00				
	01/12/2013 - 31/12/2013	900.00			600.00				

Not 1: Yukarıdaki Form 24 aya göre düzenlenmiştir Projenizin süresi 24 aydan fazla olması halinde tabloya satır ilave ediniz

2. Birden fazla Yardımcı Araştırmacı, Yardımcı Personel ve Tez öğrencisi olması halinde Forma ilave ediniz.

3. Proje personeli hangi aylarda çalışacaksa o aya ait kutuya aylık birim ücretini yazarak işaretleyiniz. (bu bölümü teknik ve mali kılavuza bakarak doldurunuz; ancak kılavuzda belirtilen ücretler tavan

Projenin Adı : Hepatit B Virüsü Yüzey Antijenlerinin Rekombinant Olarak Eldesi.

Sayfa 67 / 77

*Ücretler olup istenildiğinde düşürülebilir. Yardımcı Araştırmacı/Araştırmacılar ve Yardımcı Personel/Personellere hazırlık döneminde ücret ödenmez.*

DÖNEMSEL HARCAMA KALEMLERİ DAĞILIMI TABLOSU								FORM NO: 26	
Dönemi	Makine-Donanım	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Seyahat	Proje Yürütücüsü	Tez Öğrencisi	Yardımcı Araştırmacı	Yardımcı Personel	Toplam
1	142,751.24	134,015.88	0.00	0.00	2,700.00	1,800.00	1,800.00	0.00	283,067.12
2	182,002.43	82,137.38	0.00	0.00	2,700.00	1,800.00	1,800.00	1,000.00	271,439.82
3	0.00	0.00	0.00	0.00	2,700.00	1,800.00	1,800.00	1,500.00	7,800.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	2,700.00	1,800.00	4,200.00	3,000.00	11,700.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	2,700.00	1,800.00	5,400.00	3,000.00	12,900.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00	2,700.00	1,800.00	5,400.00	3,000.00	12,900.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	2,700.00	1,200.00	4,800.00	2,000.00	10,700.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00	2,700.00	0.00	2,400.00	500.00	5,600.00
9									
10									
11									
12									
TOPLAM	324,753.67	216,153.27	0.00	0.00	21,600.00	12,000.00	27,600.00	14,000.00	616,106.94

NOT: Bu tablo bütçe detayı formu ve dönemsel harcama kalemleri dağılımı tablosuna göre doldurulacaktır.

- Her dönem 3'er aylıktır.

BAKANLIK VE FİRMA DÖNEMSEL ÖDEME PLANI TABLOSU					FORM NO: 27
DÖNEMİ	ÖDEME TARİHİ	BAKANLIK KATKISI	FİRMA KATKISI	DİĞER KATKILAR (VARSA)	TOPLAM
1	01/01/2012	212,300.34	70,766.78		283,067.12
2	01/04/2012	203,579.86	67,859.95		271,439.82
3	01/07/2012	5,850.00	1,950.00		7,800.00
4	01/10/2012	8,775.00	2,925.00		11,700.00
5	01/01/2013	9,675.00	3,225.00		12,900.00
6	01/04/2013	9,675.00	3,225.00		12,900.00
7	01/07/2013	8,025.00	2,675.00		10,700.00
8	01/10/2013	4,200.00	1,400.00		5,600.00
9					
10					
11					
12					
TOPLAM		462,080.20	154,026.73		616,106.94

FİRMA BİLGİLERİ FORMU		FORM NO: 28
Ünvanı		
Adresi		
İlçe/Şehir		
Telefon Numarası		
Faks Numarası		
Kuruluş Tarihi		
Sermayesi (YTL)		
Vergi No		
Vergi Dairesi		
Ticaret Sicil Numarası		
Son Yıla ait Toplam Ciro		
Toplam Cirodan AR-GE'ye Ayrılan Pay (%)		
Sanayi Sicil Belge Numarası		
Kayıtlı Olduğu Oda		
Oda Sicil Numarası		
SSK Sicil Numarası		
Faaliyet Gösterdiği Sektör		
Faaliyet Alanı		
Toplam Çalışan Sayısı		
WEB sayfası		
e-mail adresi		
AR-GE Birimi var mı?		
AR-GE deki Personel Sayısı		
Yürütülen AR-GE Projesi var mı?		
Firmanın aldığı Patent var mı?		
Patent Başvurusu var mı?		

NOT: Bu tablo bütçe detayı formu ve dönemsel harcama kalemleri dağılımı formuna göre doldurulacaktır.

- Her dönem 3'er aylıktır.Firmanın son yıla ait onaylı bilançosu eklenecektir.

**Firma Yetkilisi,  
İmza- Kaşe-Tarih**

**PROJE İLE İLGİLİ UZMANLIK ALANINA SAHİP AKADEMİSYEN ÖNERİSİ:**

(Lütfen başvurusunu yapmış olduğunuz projenin değerlendirilmesinde dikkate alınmak üzere kendi üniversiteniz dışından olmak ve aynı üniversiteden olmamak şartı ile proje başvuru konusunda uzman 10 akademisyen adı yazınız.)

Ünvanı- Adı Soyadı	Görevli Olduğu Üniversite	Bölümü	Uzmanlık Alanı	İş Telefonu Cep Telefonu	e-posta Adresi	Adresi

-



**AR-GE MERKEZLERİ VE REKABET ÖNCESİ İŞBİRLİĞİ PROJELERİ  
DEĞERLENDİRME VE DENETLEME KOMİSYONLARI**

**AKADEMİSYEN BİLGİ FORMU**

Adı Soyadı	Evren Doruk Engin
Üniversitesi	Ankara Üniversitesi
Ünvanı	Yrd. Doç. Dr.
Fakülte-Bölüm	Biyoteknoloji Enstitüsü
Görevi	Öğretim Üyesi
İş Telefonu	+90 312 222 58 26 / 200
Cep Telefonu	+90 532 2273923
Faks No	+90 312 222 58 72
Adresi	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarları Tandoğan Yerleşkesi (Rektörlük Yanı) 06110 Beşevler /ANKARA
e-posta	edoruk@gmail.com
Banka Şubesi ve Banka Hesap Numarası	İş Bankası 4367-0031008
Banka Hesap IBAN Numarası	TR720006400000143670031008
TC Kimlik No	15532006260
Vergi Numarası-Vergi Dairesi	Ankara Çankaya VD 335-018-0844
Uzman olduğu sektör (Lütfen Sektörü listeden seçerek adını yazınız.)	Medikal
Uzmanı Olduğu Teknoloji Alanı- Teknoloji Alt Alanı (Lütfen Teknoloji alanının adını yazınız.)	BIYO/AGROTEKNOLOJİ (40) - BIYOTEKNOLOJİ (10) BIYO/AGROTEKNOLOJİ(40) - MIKROBIYOLOJİ TEKNOLOJİSİ (32)

Varsa, yurt içi veya yurt dışında görev aldığı Ar-Ge Merkezi veya Enstitüler ve Görevi	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü – Öğretim Üyesi
<ul style="list-style-type: none"> <li>• En son tamamladığınız proje</li> <li>• Destekleyen kurum</li> <li>• Bütçesi,</li> <li>• Projedeki göreviniz</li> <li>• Proje süresi</li> </ul> (En az 10 proje)	
Son beş yılda Ar-Ge projelerinde veya Ar-Ge Merkezleri değerlendirmelerinde aldığınız hakem veya komisyon üyeliği görevi varsa sıra ile yazınız.	
Sanayi kuruluşlarıyla yürütmüş ve tamamlamış olduğunuz projeleri yazınız.	
Danışmanlık yaptığınız bir sanayi kuruluşu varmı? Adı ve danışmanlık süresini yazınız.	
Almış olduğunuz, alınmasında çalıştığınız veya başvurusunu yaptığınız Patentleri yazınız.	TR 2004 02876 A2 Helicobacter pylori DNA'sının ve makrolid dirençli genotiplerin tava probolar kullanılarak polimeraz zincirleme tepkimesi ile saptanması
Yayınlarınız (En son yayınlarınız olmak üzere en az 10 adet )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anlar B, Pinar A, Yasar Anlar F, Engin D, Ustacelebi S, Kocagoz T, Us D, Akduman D, Yalaz K. Viral studies in the cerebrospinal fluid in subacute sclerosing panencephalitis. J Infect. 2002 Apr;44(3):176-80</li> <li>• Anlar B, Ayhan A, Hotta H, Itoh M, Engin D, Barun S, Koseoglu O. Measles virus RNA in tonsils of asymptomatic children. J Paediatr Child Health. 2002 Aug;38(4):424-5.</li> <li>• Yalcin E, Ozcelik U, Engin D, Dogru D, Kiper N, Hascelik G. Does Helicobacter pylori cause bronchiectasis? Acta Paediatr. 2002;91(12):1403.</li> <li>• Saltik IN, Demir H, Engin D, Ertunc OD, Akyon Y, Kocak N. The cagA status of Helicobacter pylori isolates from dyspeptic children in Turkey. FEMS Immunol Med Microbiol. 2003 May 25;36(3):147-9</li> <li>• Aksoy DY, Aybar M, Ozaslan E, Kav T, Engin D, Ercis S, Altinok G, Hascelik G, Uzunalimoglu B, Arslan S. Evaluation of the Helicobacter pylori stool antigen test (HpSA) for the detection of Helicobacter pylori infection and comparison with other methods. Hepato-gastroenterology. 2003 Jul-Aug;50(52):1047-9</li> <li>• Unaldi, O; Engin, D; Cirak, MY. Comparison of agar screening plates and double disk synergy method in detection of extended-spectrum beta-lactamase production. Mikrobiyol</li> </ul>

	<p>Bul 2007: 41; 369-376.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kurukahvecioglu O, Koksa H, Gulbahar O, Erdem O, Engin D, Yazicioglu O, Kerem M, Taneri F. Infliximab "TNF-alpha antagonist" decreases intraabdominal adhesions. Saudi Med J 2007; 28(12); 1830-1835.</li> <li>• Iriz E, Cirak MY, Engin ED, Zor MH, Erer D, Imren Y, Turet S, Halit V. Effects of atypical pneumonia agents on progression of atherosclerosis and acute coronary syndrome. Acta Cardiol 2007; 62(6); 593-598.</li> <li>• Cindoruk M, Cirak MY, Unal S, Karakan T, Erkan G, Engin D, Dumlu S, Turet S. Identification of Helicobacter species by 16S rDNA PCR and sequence analysis in human liver samples from patients with various etiologies of benign liver diseases. Eur J Gastroenterol Hepatol 2008; 20(1); 33-36.</li> <li>• Iriz E, Cirak MY, Engin ED, Zor MH, Erer D, Ozdogan ME, Turet S, Yener A. Detection of Helicobacter pylori DNA in aortic and left internal mammary artery biopsies. Texas Hearth Inst J 2008; 35(2); 130-135.</li> <li>• Ozdemir E, Karabacak NI, Degertekin B, Cirak M, Dursun A, Engin D, Unal S, Unlu M. Could the simplified C-14 urea breath test be a new standard in noninvasive diagnosis of Helicobacter pylori infection? Annals Nuc Med 2008; 22(7); 611-616.</li> <li>• Noral MY, Dogruman-Al F, Engin ED, Kustimur S, Babur C, Poyraz A. The Comparison of Polymerase Chain Reaction Directed to the 529 bp Gene and the B1 Gene in the Detection of Experimental Mouse Toxoplasmosis. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2009; 29(1); 48-56.</li> <li>• Urgancioglu B, Bilgihan K, Engin D, Cirak MY, Hondur A, Hasanreisoglu B. Topical N-acetylcysteine reduces interleukin-1-alpha in tear fluid after laser subepithelial keratectomy. Eur J Ophthalmol. 2009 Jul-Aug;19(4):554-9.</li> <li>• Altinova AE, Engin D, Akbay E, Akturk M, Toruner F, Ersoy R, Yetkin I, Arslan M. Association of polymorphisms in the IL-18 and IL-12 genes with susceptibility to Type 1 diabetes in Turkish patients. J. Endocrinol. Invest 2010 Aug;33(7):451-454.</li> <li>• Salihoglu U, Boynuegri D, Engin D, Duman AN, Gokalp P, Balos K. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study. Int J Oral Maxillofac Implants 2011 Feb;26(1):101-107.</li> <li>• Diğer indeksler tarafından taranan dergilerde yapılan yayınlar</li> <li>• Us D, Engin D, Hascelik G. [Evaluation of western blot methods for serologic diagnosis of Helicobacter pylori infections] Mikrobiyol Bul. 2002 Apr;36(2):153-60.</li> <li>• Ulusal hakemli dergilerde tam metni basılmış yayınlar</li> <li>• Ustaçelebi Ş, Engin D. HIV enfeksiyonu immünopatogenezi ve tanıda kullanılan yöntemler. Modern Tıp Seminerleri 2000;10:11-26</li> <li>• Engin D. Hydrogen gas enhances the in vitro growth of Helicobacter pylori. Gazi Medical Journal 2003;14(2):63-66.</li> <li>• Engin A, Engin D. İntraabdominal sepsiste reaktif oksijen radikallerine konakçı ve bakterinin yanıtı. Ankara Cerrahi Dergisi 2003;20:174-180</li> <li>• Doğan Ö, Çırak MY, Engin D, Turet S. Klinik örneklerden</li> </ul>
--	--

	izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2005;19(1):39-42
--	---

**(\*) Sektör listesi (EK1.) ve Teknoloji alanı bilgisi (EK2.) deki listelerden seçilerek doldurulacak ve ilgili kısma sektör veya alan adı yazılacaktır. Sektörün veya araştırma alanının numarası yazılmayacaktır.**

**(\*\*)Doldurduğunuz bu formu akademisyen veri tabanına kayıt edilmek üzere aşağıda verilen e-posta adresine gönderiniz.**

Elektronik posta Adresi :  
[mnedim.dardagan@sanayi.gov.tr](mailto:mnedim.dardagan@sanayi.gov.tr)

#### **EKLER :**

1. Proje yürütücü özgeçmişi
2. Tez öğrencisi özgeçmişi
3. Yardımcı araştırmacı özgeçmişi
4. Yardımcı personel bilgisi (uzmanlık alanı veya mesleği)
5. Firma hakkında kısa bilgi (en fazla 1 sayfa veya varsa tanıtım cd'si eklenecektir.)
6. Firmanın projeyi destekleme nedeni
7. Makine-donanım için proforma fatura
8. Hizmet alımı ve bu hizmet alımına ait teklif mektubu
9. Projede prototip cihaz veya makine tasarımı varsa teknik ve basit çizimi
10. Firmanın son yıla ait onaylı bilançosu.
11. Proje ortağı firmanın ve proje yürütücüsünün varsa diğer kurumlardan desteklenen ve devam etmekte olan projeleri

Not: Yukarıda adı geçen dokümanlar proje başvurusuna ilave edilmelidir.

