

**phPAH 247 cDNA PROBUNUN pBR322 PLAZMİDİNDEN MİNİ-PREP
YÖNTEMİ İLE İZOLASYONU**

**THE ISOLATION OF phPAH 247 cDNA PROBE FROM pBR322
PLASMID BY MINI-PREP TECHNIQUE**

Hayat ERDEM* , Engin YILMAZ**

Özet: Bu çalışmada, E.coli HB101 suşları phPAH 247 cDNA probunu taşıyan pBR322 plazmidini ile transforme edilmiş, çoğaltılan prob mini-prep metodu ile izole edilmiş ve radyoaktif işaretleme çalışmalarında kullanılmıştır.

Summary: In this study, after the transformation of E.coli HB101 strain with pBR322 plasmid which carries the phPAH 247 cDNA probe, we have isolated the probe by using mini-prep method.

G İ R İ Ő

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisi temel bilimler, tıp ve endüstri alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Moleküler düzeydeki çalışmaların ilerlemesi ile, birçok genetik, bakteriyel ve viral hastalık "Southern Blot" (1), "Northern Blot" (2), in-situ hibridizasyon (3), ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) (4) gibi teknikler ile teşhis edilebilmektedir. Moleküler biyoloji dalında kullanılan tekniklerin çoğunda, radyoaktif veya non-radyoaktif izotoplar ile işaretlenebilen ilgili gene komplementer bir DNA fragmenti olan "prob"a ihtiyaç duyulmaktadır (5). Klinik laboratuvarlarda bu DNA problemlerinin kullanımı ile genetik hastalıkların antenatal ve postnatal tanısı hızlı bir şekilde koyulabilmekte ve yine bu problemler ile bakteriyel ve viral genler tanımlanabilmektedir (6).

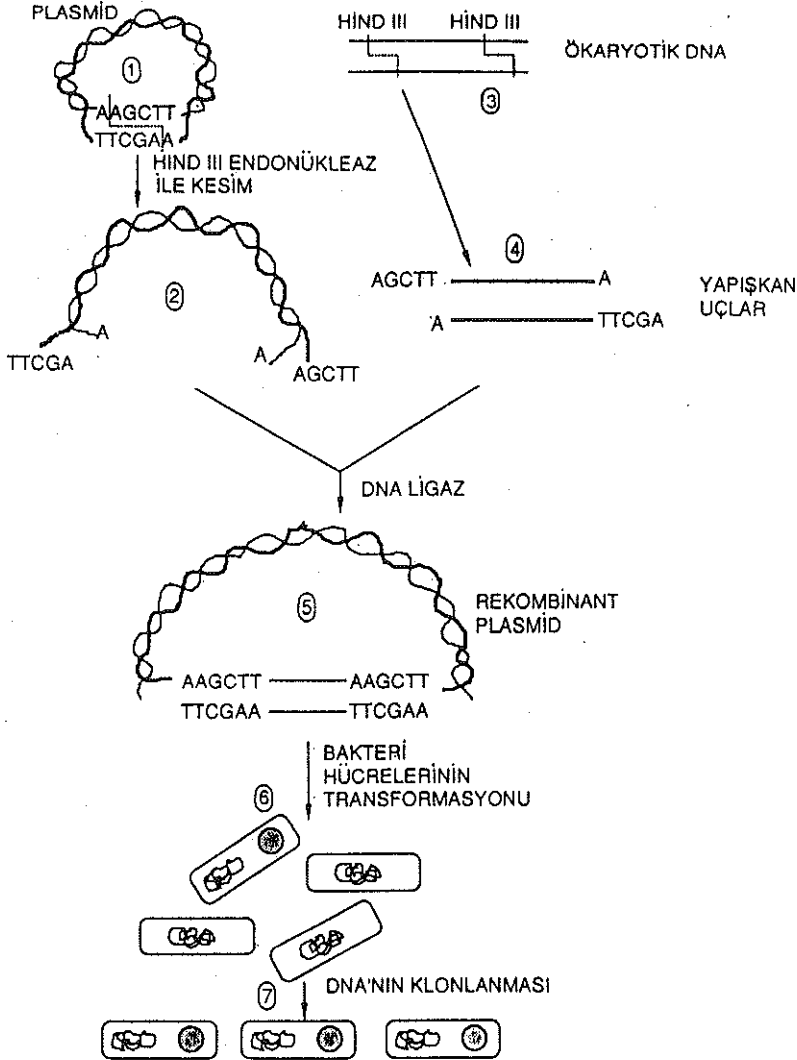
Rekombinant DNA teknolojisinin temeli, restriksiyon endonükleaz enzimler ile kesilen DNA örneğinin baz dizisi bilinen işaretli cDNA problemler ile hibridizasyona sokulmasıdır (5). Bu teknolojinin getirdiği en büyük yeniliklerden bir tanesi de, bir organizmadan alınan gen parçasının veya genin tümünün değişik bir organizmaya aktarılarak çoğaltılması ve böylece klonlanmasıdır (7). Bu yöntem ile ökaryotik gen parçalarının vektörler aracılığı ile bakteri hücrelerinde sayısı artırılabilir.

* Dr., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.

** Araş. Gör., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı.

PLAZMİDEN PROB İZOLASYONU

Bir ökaryotik gen parçasını vektörler aracılığı ile klonlayabilmek için restriksiyon endonükleaz enzimlerinden yararlanır. DNA'yı özgül baz dizilerinden tanıyan ve kesen restriksiyon endonükleaz enzimleri, hem vektörü hem de klonlanacak yabancı DNA'yı komplementer yapışkan uçlar oluşturacak şekilde kesebilir. Bu yapışkan uçlar DNA ligaz enzimi ile enzimatik olarak bağlanır ve bir rekombinant plazmid oluşur (Şekil 1).



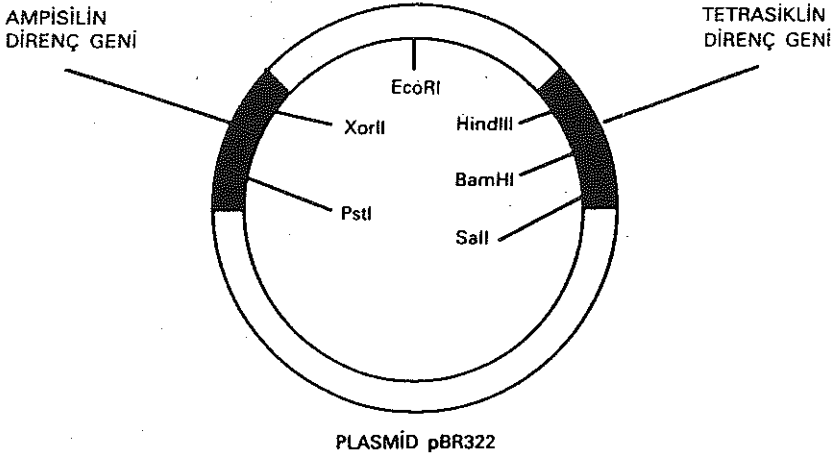
Şekil 1

Klonlama. 1-2: Plazmid DNA'sında yapışkan uçların oluşumu, 3-4: Ökaryotik DNA'da yapışkan uçların oluşumu, 5: Rekombinant plazmid oluşumu, 6: Bakteri hücrelerinin rekombinant plazmid ile transformasyonu, 7: Ökaryotik DNA'nın klonlanması.

Rekombinant plazmidin E.coli hücresinde 50-200 kez çoğalması ile klonlanan ökaryotik DNA bölgesi de çoğaltılmış olur. Çoğaltılan gen parçasının (insert) plazmidten kesilmesi yine aynı restriksiyon endonükleaz enziminin kullanılması ile gerçekleşir.

Plazmidlere 1-6 kilobazlık (kb) DNA fragmentleri klonlanabilirken, daha büyük DNA fragmentlerini klonlamak için bakteriyofaj "cosmid" vektörler kullanılır. Bakteriyofajlar yaklaşık 29 kb'lık DNA fragmentlerini, lambda fajının "cos" (yapışkan) uçlarını ve plazmid DNA'sının bir kısmını içeren kosmid vektörler ise, yaklaşık 20-45 kb'lık DNA fragmentlerini taşıyabilirler (8).

Rekombinant DNA teknolojisinde en sık kullanılan vektör pBR322 plazmididir (Şekil 2). Bu plazmidin ampisilin ve tetrasikline dirençli iki geni ve çeşitli restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgeleri vardır. Direnç genleri içerisinde yer alan restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgeleri kullanılarak yabancı DNA parçası plazmide takılınca direnç geni inaktif hale gelir. Bu plazmidler ile transforme edilen bakteriler, plazmidin hala dirençli olduğu diğer antibiyotik varlığında üretilerek transforme olmuş hücrelerin seçimi yapılabilir.



Şekil 2

pBR322 plazmidinde antibiyotik direnç genleri ve restriksiyon endonükleaz enzim bölgeleri.

Biz bu çalışmamızda, phPAH 247 cDNA (fenilalanin) genini taşıyan pBR322 plazmidinin E.coli bakteri suşlarına transformasyonunu ve amplifikasyon sonrası genin izolasyonunu amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Transformasyon: phPAH 247 cDNA taşıyan plazmidi, konakçı hücre olan E.coli HB101 suşuna aktarabilmek için, bakteriler 50 mM CaCl₂ ile +4 °C'de bir gece inkübe edilerek kompetan hücreler elde edildi. 0.2 ml kompetan hücre için 0.1 µg plazmid DNA'sı eklenerek 30 dk. buz inkübasyonu ile, prob taşıyan plazmidler bakteri hücrelerine aktarıldılar. Plazmidin taşıdığı antibiyotik direnç genleri yardımı ile besiyerinde üreyen transforme bakteri hücreleri seçildi ve 12.5 µg/ml tetrasiklin, 50 ug/ml ampisilin içeren 5 ml sıvı LB (Luria-Bertani; 10 gr. Bakto Tripton, 5 gr. Yeast Extract, 19 gr. NaCl ph: 7.4) içerisinde 1.5X10⁹ hücre/ml olacak şekilde çoğaltıldı (9).

Mini-prep yöntemi ile plazmid DNA'sının izolasyonu: LB ortam içerisinde çoğalan transforme bakteri hücreleri 1500 RPM'de 15 dk. santrifüj edilerek toplandı ve +4 °C'de hücreler üzerine solüsyon A'dan (0.5 M EDTA pH: 8.0, 1M Tris HCl pH: 8.0, % 20 glukoz, 10 mg/ml lizozim) 0.1 ml koyulup buz içinde 30 dk. inkübe edilerek lizat hazırlandı. Hücre lizatı üzerine 0.15 ml solüsyon B (5 M NaOH, % 20 SDS) eklenip 60 dk'lık buz inkübasyonundan sonra, +4 °C'de 10.000 RPM'de 15 dk. santrifüj edilerek plazmid DNA'sı ile bakteriyel DNA birbirlerinden ayrıldılar. Toplanan süpernatant üzerine 0.4 ml soğuk etanol eklenip tüpler hafifçe karıştırıldı ve -20 °C'de bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tüpler 12.000 RPM'de +4 °C'de 20 dk. santrifüj edildi, süpernatant atılıp pellet oda sıcaklığında kurutuldu, üzerine 0.02 ml 3 M NaCl ve 0.38 ml distile su eklenerek karıştırıldı. Üzerine 1 ml soğuk etanol eklenen tüpler bir gece daha -20 °C'de inkübasyona bırakıldılar. Üçüncü gün tüpler 12.000 RPM'de +4 °C'de 20 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atılıp pellet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra üzerine 0.02 ml TE tampon (10 mM Tris HCl pH: 7.4, 1 mM EDTA pH: 8.0) eklenerek plazmid DNA'sı solüsyon haline getirildi (9).

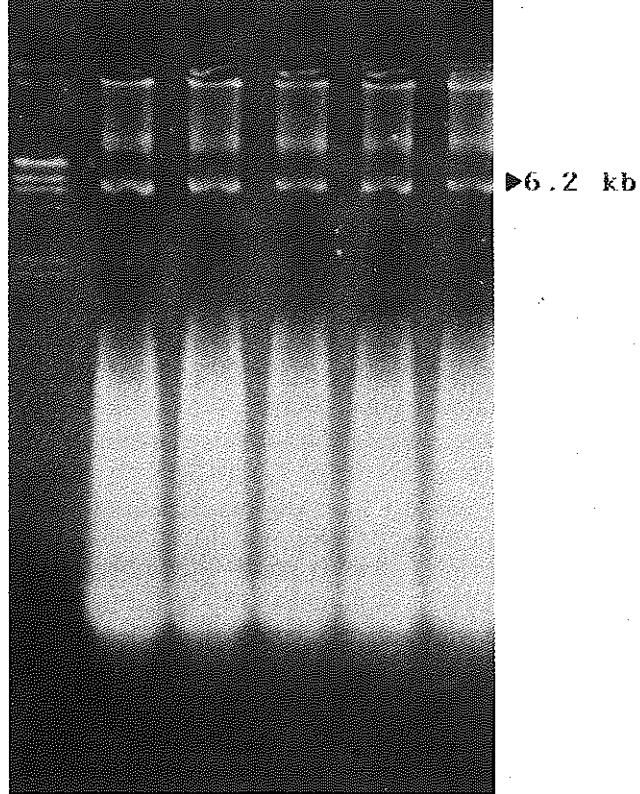
phPAH 247 cDNA probunun plazmidten izolasyonu: Prob izolasyonu için 10 µg plazmid DNA'sı 30 ünite ECO RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile 37 °C'de 4 saat inkübe edilerek kesildi. Örnekler 1X TAE (1 M Tris baz, 0.5 M EDTA pH: 8.0, 1 M asetik asit) ile hazırlanan % 6'lık low melting agaroz jel elektroforezinde yürütülerek prob ve plazmid DNA'ları birbirlerinden ayrıldılar. Ultraviyole (312 nm) altında jeldeki phPAH 247 cDNA bandı kesilip çıkartıldı ve moleküler çalışmalarda prob olarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı (9).

B U L G U L A R

Ampisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerine duyarlı olan *E.coli* HB101 suşuna probumuzu taşıyan plazmidin transformasyonunun doğruluğu, bakterilerin her iki antibiyotiğin bulunduğu LB agarda üretilmesi ile kanıtlanmıştır.

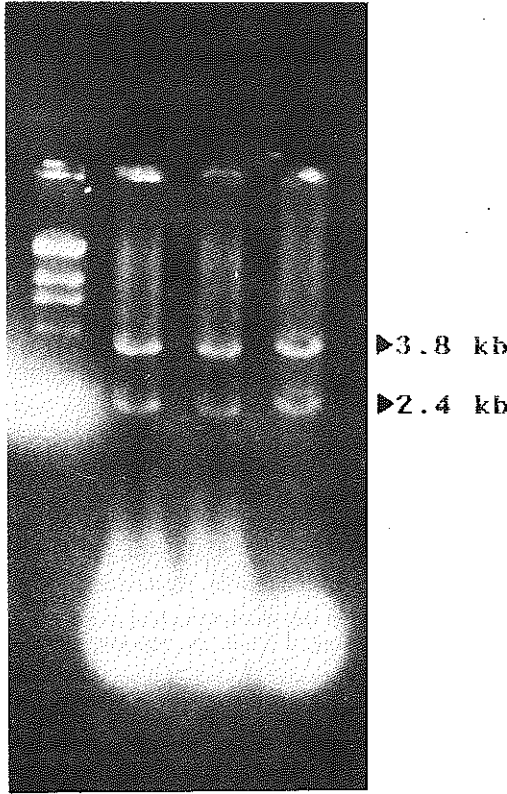
Transforme bakterilerin LB ortamlarda bir gece kültüre alınarak çoğaltılması ile probumuzu taşıyan plazmid DNA'ları mini-prep yöntemi ile izole edildi. Plazmid DNA'sının izolasyonu 1xTAE tampon ile hazırlanan % 0.8'lik agaroz jel elektroforezi ile gösterildi (Şekil 3).

Probumuzun, plazmidten Eco RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek çıkartıldığı % 0.6'lık Low Melting Agaroz Jel elektroforezi ile gösterildi (Şekil 4).



Şekil 3

phPAH247 cDNA probunu taşıyan pBR322 plazmid DNA'sı. 1: Lambda-Hind III marker DNA, 2-6: Rekombinant plazmid DNA'sı.



Şekil 4

Eco RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen rekombinant plazmidten phPAH247 cDNA probunun çıkartılması. 1: Lambda-Hind III marker DNA, 2-4: Plazmid ve prob DNA'ları.

T A R T I Ş M A

Moleküler biyolojide hibridizasyon çalışmalarında DNA'nın ilgilenilen bölgesine komplementer olan problemlerin kullanılması zorunludur. Sentetik olarak prob üretiminin zorluğu, sentezlenen problemlerin vektörlere klonlanarak çoğaltılmasını gerektirmektedir.

Bu çalışmada, pBR322 plazmidine klonlanmış olan phPAH247 cDNA probunu çoğaltmak ve moleküler hibridizasyon çalışmalarında kullanabilmek amacıyla mini-prep yöntemini uyguladık. Bu yöntemle elde edilen problemler, low melting agarozdan kesilip çıkartılarak radyoaktif veya nonradyoaktif işaretlemeyle hibridizasyon için uygun hale getirilebilirler (5).

Plazmid izolasyonu için mini-prep, alkalin lizis ve rapid boiling gibi birçok metod geliştirilmesine rağmen, yapılan çalışmalar, transforme olmuş

konakçı hücrelerden mini-prep metodu ile plazmid DNA'sının izolasyonunu diğer metotlara göre daha hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirdiğini göstermektedir (10, 11).

KAYNAKLAR

1. Cooper DN, Schmidtke J: Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. *Hum Genet*, 73: 1-11, 1986.
2. Thomas PS: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 5201-5208, 1980.
3. Harper ME, Ulrich A, Sounders GF: Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma*, 83: 431-439, 1983.
4. Lynch JL, Brown JM: The polimerase chain reaction: Current and future clinical applications. *J Med Genet*, 27: 2-20, 1990.
5. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high spesific activity. *Anal Biochem*, 132: 6-13, 1983.
6. Weller IUD, Fowler MJF, Monjardino J, Thomas HC: The detection of HBV-DNA in serum by molecular hybridization. *J Med Virol*, 9: 273-280, 1982.
7. Cederbaum SD: Introduction to recombinant DNA. *Pediatrics*, 74: 408-411, 1984.
8. Williams BG, Blattner FR: Construction and characterisation of the hybrid bacteriophage lambda charon vectors for DNA cloning. *J Virol*, 29: 555-559, 1979.
9. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, 1982.
10. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkalen extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acid Res*, 7: 1513-1518, 1979.
11. Holmes DS, Quingley M: A rapid boiling metod for the preperation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*, 114: 193-197, 1981.