

İNSAN BETA-GLOBİN GENİ TAKILI PLAZMİD ÇOĞALTIMI
VE İNSAN HÜCRESİNDEN BETA-GLOBİN DNA AYRILMASI

TERZİOĞLU, O.

ÖZET: Gelişen moleküler biyolojik tekniklerin tıbbi alanda kullanılması, birçok hastalığın moleküler temelinin anlaşılmamasını sağlamaktadır. Bu çalışma DNA ayrılması ve incelenmesi ile ilgili metodlar uygulanarak, beta-thalassemisin moleküler genetik seviyede anlaşılması amacıyla yürütülmüştür.

Beta-globin geni bulunduran R plazmidii Escherichia coli bakterisinde havalanırmalı ortamda çoğaltıldı. Bakterilerden plazmidler ayrıldı ve ^{203}Hg ile cıva takıldı. Cıva yüklü plazmidler sulfidril-Sephadex G-50 üzerine kolonda adsorbe edildi.

İnsan hücrelerinden elde edilen DNA dan ultrasonikasyonla 550+50 baz çiftlik DNA parçaları elde edildi. Ölçümler poliakrilimid jel elektroforezinde kontrol edildi. Karışık DNA parçaları kolona yüklenip beta-globin DNA'sı tutundurulmuş plazmidle hibridizasyona bırakıldı. Hibridize olmayan DNA yıkandı ve uzaklaştırıldı. İnsan beta-globin DNA'sı da kolon izitilerek elde edildi.

ABSTRACT: Orhan TERZİOĞLU Dokuz Eylül University Medical Faculty, Medical Biology Dept. Production of Human Beta-Globin Gene Attached Plasmid and Separation of Beta-Globin DNA From Human Cell.

Using improved molecular biologic methods in medicine, makes possible the understanding of molecular basis of several illnesses. In the research it's aimed to establish DNA separation and investigation methods to understand beta-thalassemia at the molecular genetic level.

R plasmid beta-globin gene was replicated in *Escherichia coli* bacterium grown in aerated culture conditions. The plasmids were separated from the bacteria and mercurated by ^{203}Hg . The mercurated plasmid was adsorbed on a sulphydryl-Sephadex G-50 column.

DNA was isolated from human cells, ultrasonicated and 650±50 base pair DNA pieces obtained. The measurement was controlled by polyacrylamide gel electrophoresis. DNA mixed with DNA pieces was placed on column and allowed to hybridise with plasmid attached beta-globin DNA. Nonhybridised DNA was washed out from the column. Hybridised human beta-globin DNA was separated by heating the column.

Anah ar sözcükler: Beta-globin, gen izolasyonu, DNA.
Key words: Beta-globin, gene Isolation, DNA.

GİRİŞ: Talasemi, hemoglobin yapısı ve sentezi ile ilgili oldukça farklı grupları kapsayan kalitsal bir hastalığıdır. Akdeniz Ülkeleri, Orta Doğu, Hindistan'ın bazı bölgeleri Burma, Güneydoğu Asya'da oldukça yaygın görülmektedir. Hematoloji laböratuvarları temel tanımlama ve grup belirlemede giderek daha başarılı olmaktadır (1). Erişkin hemoglobini (Hb A) iki alfa ve iki beta globin zinciri ile bunların bağlı olduğu "hem" gruplarından oluşmaktadır. Alfa zinciri ile ilgili olmayan globin gen dizilimlerinin beta globin de dahil olmak üzere 11 numaralı koromozonda yerlestiği saptanmıştır (2). Beta zincirinin sentez düzeyi veya hantanın bulunduğu yere bağlı olarak farklı beta talasemi tipleri tanımlanmıştır (3).

Beta talasemide genetik temel çalışmaların yürütülebilmesi için, beta geninin elde edilmesi gerekmektedir. İnsan gen havuzundan belirli DNA dizilimlerinin eldeinde değişik metodlar geliştirildi (4-6). Elde edilen DNA dizilimleri radyoaktif işaretlemelerle "probe" olarak kullanılır hale gelmiştir. Ayrıca genetik mihendislikte plazmid içerişine yerleştirilen önseden etiketlenmiş gen dizileri kontrol bölgeleri ile birlikte cogaltılabilirler (4).

Yürüttülen bu çalışmada beta-globin geni tokilmiş plazmid ve hibridizasyon yöntemlerinden yararlanılarak insan gen havuzundan beta-genin DNA'sı ayrılmaya çalışıldı. Ülkemizde de üçüncü sağlık sorunu olan kalitsal hastalıklar arasında geni olan beta talasemi geni izole edilerek moleküler düzeyede kalitim bozukluğu nedenlerine ulaşmadır birinci basamak yöntemleri yerleştirilmesi gereklidir.

GERÇEK VE YÖNTEMLER: Beta globin yüksü pCR plazmid taşıyan Escherichia coli senteyini sıvı ortamda (nutrient broth-Antib.) üç etapından üremenin ikinci dönenine kadar 37°C de kovalandırmalı şartlarda üretildi. Plazmid kanamısına tıraş gen taşıyordu ve ortamda bağlandıktı 5 ug/ml olacak şekilde kanamisin elave edildi. Üç etapından üremenin ikinci döneninden itibaren, son kontrasyon 10ug/ml olacak şekilde kanamisin

eklendi ve üretim sürdürdü (4). Üreme 8×10^8 (ml de koloni oluşturan bakteri) sayısına ulaşlığında üretim durduruldu. Ortamdan bakteriler sentoz (Lugasyonla (400 gx 15')) ayrıldılar. Lizozim-tris (sigma) içerisinde parçalanan bakterilerden fenol-kloroform reaksiyonu ve etil alkol çöktürmesi ile DNA elde edildi. RNA az (Sigma) ile 37°C de 15 dakika muamele edilerek RNA dan arındırıldı. CsCl dansite tabakalanması ile plazmid DNA'sı ayırdı. Sonuç, poliakrilamid jelde kontrol edildi (9).

Elde edilen plazmid 55 mM sodyum-asetat (pH 6.0) ve 20 mM (^{203}Hg) civa asetat'ta (New England Nuclear Cooperation) 50°C de 24 saat süreyle inkub edilerek özelliğle sitozinler üzerine civa takılması sağlandı. Her mililitre reaksiyon ortamına 0,4 ml Quenc tamponu (10 mM tris-HCl pH 7.6, 1 M NaCl ve 10 mM EDTA) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra fazla civanın ortamdan uzaklaştırılması için her 3 ml reaksiyon karışımı 1 L dializ tamponunda (10 mM Tris/HCl pH 7.8, 2 mM NaCl ve 1 mM EDTA) üç kez 4'er saat dialize tabi tutuldu. Civa takılı DNA etanolde -20°C de çöktürülerek ayırdı (10-11).

Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals) üzerine sulfidril grupları Cuatrecasas'ın yöntemi ile takılarak (10) sulfidril Sephadex G-50 elde edildi. 5x80 mm çift cidarlı kolona dolduruldu ve civa takılı plazmid DNA adsorbsiyonu için yüklendi. Tris-HCl pH 7.8, 0.1 M NaCl ile oda sıcaklığında yıkandı.

İnsan hücreinden elde edilen DNA karışımı etil alkol çöktürmesi ile üç kez yıkandı. Ultrason mikro ucu ile 100 pg/ml DNA konserantasyonda buz banyosunda 10×3 saniye şoklarla parçalandı. Parça büyükligi 550±50 baz çifti olacak şekilde sistem enerjisi ayarlandı. Kolon yüklemeye önce poliakrilamid jel elektroforezinde standartlarla karşılaştırılarak ölçümler kontrol edildi (11-12). Bu DNA parçaları %70 formamid hibridizasyon ortamında kolona 55°C de yüklendi ve akıntısız 30 dakika hibridizasyon için beklandı. Kolon $32^\circ\text{C}'e$ soğutuldu ve 0.5—0.1 M NaCl %10 formamid ile yıkandı. Hibridize olmamış DNA parçaları kolondan tam olarak uzaklaştırıldı. Kolon çıkışı sürekli olarak spektrofotometrede 265 nm'de takip edildi (13). Daha sonra kolon 55°C ye isıtildi ve plazmid üzerindeki globulinle hibridize olmuş beta globin DNA'sı saf olarak elde edildi. Optik dansite ölçümlerinden miktar tayinleri ve kolon verimliliği ölçümleri yapıldı.

BULGULAR: Bakteri başına plazmid eldesi geliştirilen iki kademeli kanamisin liavesi ile 12 olarak saptandı. Civa bağlanma etkenliği DNA miktar tayini ve gama sayıcıda (^{203}Hg Ölçümlerinde %85 etken olarak saptandı). Sulfürlenmiş kolon üzerine yüklenen plazmid DNA'nın adsorbsiyon oranı, yüklenen ve kalan radyoaktivite ölçümlerinin oranlanmasıyla saptandı ve %76 olarak bulundu. Saf beta globin eldesi ve kolon miktari saptandı ve %76 olarak bulundu. Saf beta globin eldesi ve kolon

verim kat sayısı %82 olarak saptandı. Standartlarla yapılan tüm karşılaştırmalarda saflik moleküller geçerlilik sınırları içerisinde bulundu (8,10,12).

TARTIŞMA VE SONUÇ: Kalitsal hastalıkların moleküller temelinin aydınlatılmasında kullanılan temel tekniklerin bir gurubunun uygulanabilirliği gözleendi. Verimlilik ve saflik ölçümleri daha önceki çalışmalarla (9-12) uyumlu olarak bulundu. Gen teknolojisi kavramı içerisinde yer alan yükü plazmid eldesi ve hibridizasyonla saf gen eldesi yeni klonlar ve kendi ülkemiz haplotiplerinin araştırılmasında kullanılabilirlik açısından olumlu gözlendi. Zincirleme polimeraz reaksiyonu ile gen çoğaltımının yaygınlaştiği günümüz teknolojisinde kontrol ve karşılaştırma olanağı vermesi açısından klonlama ve saf gen eldesinde paralel çalışılmasının olumlu sonuçlar verebileceği kanaatine varıldı.

TEŞEKKÜR: Çalışmanın gerçekleştirilmesinde olanak sağlayan Claude Bernard Univ. (Lyon) Dokuz Eylül Üniversitesi (İzmir) ve Imperial College (London) yetkililerine teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Smith, A.L. Principle of microbiology. C.V.Mosby Company. London. 1973; 84-96.
2. Weatherall, D.J. (Ed) The Thalassemias. Churchill Livingstone Ltd. New York. 1983.
3. Huens, E.R. Haemoglobin and the haemoglobinopathies. In: Hardisty R.M., Weatherall, D.J. (Eds) Blood and its disorders, 2nd edn. Blackwell Scientific publication, Oxford. 1982.
4. Weatherall, D.J. and Clegg J.B. The Thalassaemia syndromes, 3th edn. Blackwell Scientific Publication. Oxford. 1981.
5. Rougeon, and Mach, B. Cloning and amplification of rabbit and p-Globin gene sequences into Escherichia coli plasmids. J. Biological Chem. 1976; 252(7): 2209-2217.
6. Higgs, D.R. Hill, A.V.S., Bowden, D.K. Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. Independent recombination events between the duplicated human globin genes: Implications for their concerted evolution. Nucleic Acids Res. 1988; 12: 6965-6077.
7. Benson, P.F. and Fensom, A.H. Genetic biochemical disorders. Oxford Medical Publication. Oxford. 1986.