

Gen Klonlama, Plazmit Seçimi ve *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Uygulamaları

Salih KUK, Ahmet ERENŞOY

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET: Gen klonlaması çalışmaları bugün çok çeşitli amaçlar için genetik ve biyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine gen klonlaması adı verilmektedir. Klonlamada; virus ve bakteriler, bakteriofajlar, plazmitler, nadiren de kozmid ve mayalar vektör olarak kullanılmaktadır. Plazmitler, bakteri ve diğer organizmalarda bulunan, konak hücre kromozomundan bağımsız olarak çoğalan küçük, yuvarlak yapıli kromozom dışı DNA'lardır. Gen klonlaması çalışmalarında plazmitler kullanıldığında, klasik olarak genler genomik DNA veya mRNA'dan izole edilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmakta, gen ve genin yerleştirileceği plazmit bir veya daha fazla enzimle kesilerek in vitro şartlarda genin plazmite yerleştirilmesi sağlanmaktadır. Bugünlerde araştırmacılara bir çok avantaj sağlayan plazmit ve klonlama kitleri firmalar tarafından üretilmektedirler. Bunlar yardımıyla çok kısa sürede ve çok etkin bir şekilde gen klonlaması yapılabilmektedir. Araştırmacıların biyoteknolojik gelişimi takip ederek gen klonlaması ve sonrasındaki çalışmalar için kullanacakları en uygun plazmiti; plazmitin kullanım özellikleri, maliyet ve zaman gibi faktörlerin yanı sıra kendi laboratuvar olanaklarını da göz önünde bulundurarak seçmelerinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Gen klonlama, vektör, plazmit, *Fasciola hepatica*

Gene Cloning, Selection of Plasmids and Application of *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Gene

SUMMARY: Gene cloning refers to the process by which a fragment of DNA is transferred from one organism to a vector. A vector is an agent that can carry a DNA fragment into a host cell. Commonly used vectors include plasmids, lambda phage, cosmid and yeast artificial chromosome (YAC). Plasmid vectors that have been extensively used in genetic engineering are derived from natural plasmids. These contain a genetic marker conferring a phenotype that can be selected for or against and a polylinker or multiple cloning site (MCS), which is a short region containing several commonly used restriction sites allowing the insertion of DNA fragments at this location easily. There are several plasmids and gene cloning kits available nowadays commercially. These kits contain an advanced positive selection system for the highest efficiency cloning of PCR products generated with any DNA polymerase. The kits offer cloning efficiencies of up to 100% positive clones, eliminating the need for tedious colony screening. We consider that researchers should choose the most suitable plasmids and cloning kits for gene cloning in view of factors such as time consumption, cost and individual laboratory options.

Key Words: Gene cloning, vector, plasmid, *Fasciola hepatica*

GİRİŞ

Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılılarının oluşturulması ve rekombinant

proteinlerin açıklatılması gibi amaçlarla yapılmaktadır (1, 5, 22, 36, 37). Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine "gen klonlaması" adı verilmektedir (5, 22, 36).

Makale türü/Article type: **Derleme/Review**

Geliş tarihi/Submission date: 19 Ocak/19 January 2007

Düzeltilme tarihi/Revision date: 05 Ekim/05 October 2007

Kabul tarihi/Accepted date: 05 Ekim/05 October 2007

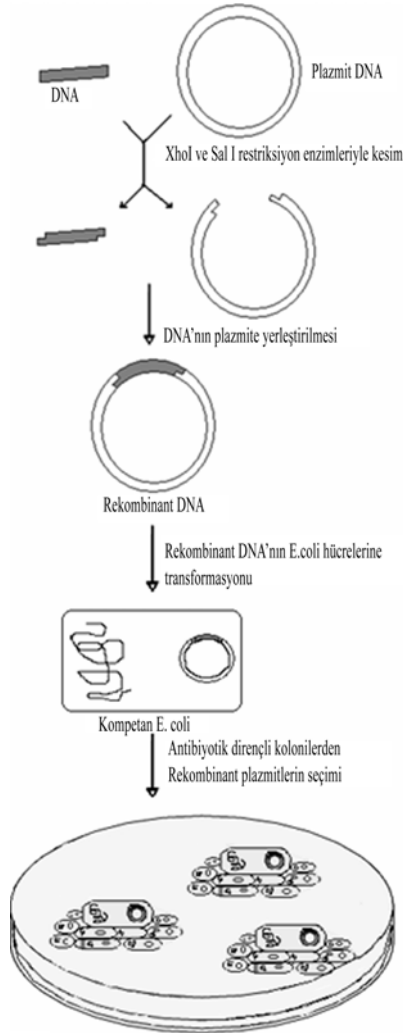
Yazışma /Corresponding Author: Salih Kuk

Tel: (+90) (424) 233 35 55 Fax: (+90) (424) 238 80 96

E-mail: salihkuk@hotmail.com

Klonlamada; virus ve bakteriler, bakteriofajlar, plazmitler, nadiren de kozmid ve mayalar vektör olarak kullanılmaktadır (5, 36, 37). Viral vektörler, genlerin hücrelere aktarılması ve gen ekspresyon çalışmaları için virusların modifikasyonu ile oluşturulmuşlardır. Bu amaçla *herpes*, *adeno*, *retro*, *vaccinia*, *polyoma*, *baculovirus* gibi bir çok DNA ve RNA virusu vektör olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte *S. typhimurium*, *E. coli*,

Bacille Calmette Guerin (BCG) suşu gibi bakteriler de klonlamada denmektedir (10, 21, 23, 37). Bakteriofajlar; virus olarak bilinen, bakterileri infekte eden, çoğunlukla DNA nadiren de RNA içeren ve proteinden yapılmış kapsit ile çevrilmiş basit yapılardır (5, 37). Kozmitler; *cos* dizisi ile *mid* dizisinin laboratuvar ortamında birleştirilmesiyle oluşturulurken ve 45 kb.'lik DNA'ların klonlanmasına olanak veren vektörlerdir (5, 37).



Şekil 1. Gen klonlamasının temel ilkeleri. Konakçıdan elde edilen DNA ve plazmit aynı restriksiyon enzimleriyle kesilerek, DNA'nın plazmite yerleştirilmesi sağlandıktan sonra oluşan rekombinant DNA, *E. coli* hücrelerine transforme edilmektedir.

Klonlama çalışmalarında daha yoğun olarak kullanılan plazmitler ise, bakteri ve diğer organizmalarda bulunan, konak hücre kromozomundan bağımsız olarak çoğalan küçük, yuvarlak yapılmış kromozom dışı DNA'lardır (5, 31, 36, 37).

Gen klonlaması çalışmalarında plazmitler kullanıldığında, klasik olarak genler genomik DNA veya mRNA'dan izole edilerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmakta,

gen ve genin yerleştirileceği plazmit bir veya daha fazla enzim ile kesilerek *in vitro* şartlarda genin plazmite yerleştirilmesi sağlanmaktadır (5, 36, 37). Günümüz biyoteknolojisindeki hızlı değişiklikler, araştırmacılara farklı özellikleri olan plazmitler arasından amaçlarına en uygun olanı seçme olanağını sunmaktadır.

Bu yazıda, gen klonlaması çalışmalarının temel ilkelerinin belirtilmesinin yanı sıra bu çalışmalarda kullanılacak plazmitlerin seçiminde dikkat edilmesi gereken noktaların son gelişmelerin ışığında tartışılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, gen klonlaması, hedef genin seçilmesi, restriksiyon enzimleri ve DNA'nın kesilmesi, DNA'nın plazmite yerleştirilmesi, rekombinant DNA'nın çoğaltılması, klonlanan vektörün hücrelerden seçimi, klonlamanın doğrulanması, plazmitler, gen klonlamada yeni metodlar ve önemli noktalar başlıkları altında konu irdelenmiştir.

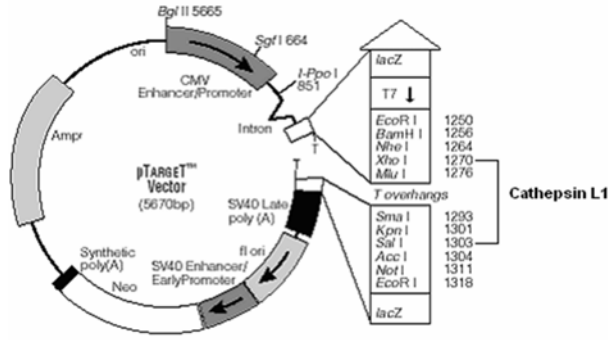
1. Gen klonlamanın temel ilkeleri

Gen klonlamanın temel ilkeleri Şekil 1'de özetlenmiştir. DNA için taşıyıcı rolü oynayan küçük ve sirküler yapılmış moleküllere vektör adı verilmektedir. Klonlamada temel işlem; organizma genomundan elde edilen DNA parçasının vektöre yerleştirilmesidir. Vektör DNA'sına, organizmaya ait bir DNA'nın yerleştirilmesiyle oluşturulan moleküle rekombinant DNA adı verilmektedir (31, 37). Bu rekombinant DNA molekülü bakteriyel hücrelere transforme edilmesi sonucunda bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA'da replike olarak klon olarak isimlendirilen kopyalar meydana getirilmektedir (37). Klonlanan DNA'nın varlığı, transforme edildiği hücrelerden saflaştırılarak doğrulanmaktadır (31).

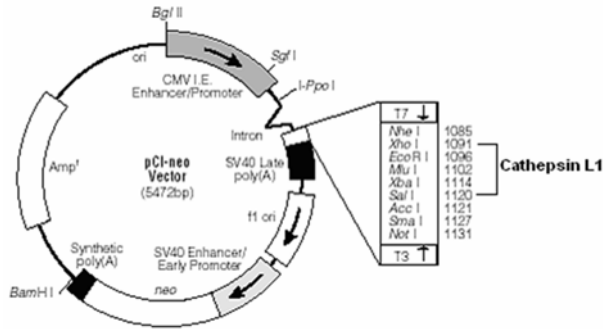
2. Hedef genin seçilmesi

Klonlama çalışmalarının en önemli basamaklarından biri, hedef genin seçilme aşamasıdır. Yapısal özelliği araştırılacak, DNA ve protein aşısı çalışmalarında kullanılacak bir gen klonlama çalışmalarında hedef olarak seçilebilmektedir (8). Ayrıca elde edilen rekombinant proteinlerin hastalıkların tanısında kullanılabilmesine olanak sağlaması, klonlamada gen seçiminde göz önünde bulundurulmuş durumlardan biridir (11).

Hedef DNA elde edilirken kullanılacak primerlere, genin yerleştirileceği vektöre uygun enzim kesim bölgelerinin eklenmesi önemli noktalardan birini oluşturmaktadır. Çalışmalarımızda, *Fasciola hepatica* cathepsin L1 genini, pTARGET™ (Şekil 2) (15, 29) ve pCI-neo (Şekil 3) (19, 27) plazmitine yerleştirmek için P1 ve P8 primerleri, PinPoint™ Xa-3 (Şekil 4) (16, 28) plazmitine yerleştirmek için ise S1 ve S8 primerleri aşağıdaki gibi dizayn edildi. P1 primerine *XhoI*, P2 primerine *SalI*, S1 primerine *HindIII*, S8 primerine *KpnI*, enzim kesim bölgeleri (altları çizili) eklendi.



Şekil 2: pTARGET™ Mammalian Expression Vector System (Promega). pTARGET™, Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR) ürününün direkt olarak klonlanması ve memeli hücrelerinde proteinin açıklanması için kullanılmaktadır. Plazmit 3' uçlarında asılı bulunan Timin bazları aracılığıyla PZR ürününün direkt olarak plazmite yerleştirilmesine olanak vermektedir. İnsan sitomegalovirus (CMV) erken promotor bölgesi, geç SV40 poliadenilasyon bölgesi, stabil transkripsiyona olanak veren neomisin fosfotransferaz geni, T7 RNA polimeraz promotörü, f1 orijini ve β -galaktozidazın α -peptidini kodlayan dizilim içermektedir (29). *F. hepatica* cathepsin L1 geninin pTARGET™ plazmitinde klonlanması ve klonlamanın doğrulanması daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı (15).



Şekil 3: pCI-neo Mammalian Expression Vector (Promega). pCI-neo, insan sitomegalovirus (CMV) erken promotor bölgesi, geç SV40 poliadenilasyon bölgesi, T7 RNA polimeraz promotörü, f1 orijini ve neomisin fosfotransferaz geni içermektedir (27). *F. hepatica* cathepsin L1 geninin pCI-neo plazmitinde klonlanması ve klonlamanın doğrulanması daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı (19).

P1 (5'-GG CTC GAG CCA CCA TGA GAT TGT TCA TAT-3')

P2 (5'-GG GTC GAC TCA CGG AAA TCG TGC-3')

S1 (5'-GG AAG CTT ATG CGA TTG TTC ATA T-3')

S8 (5'-GG GGT ACC TCA CGG AAA TCG TGC-3')

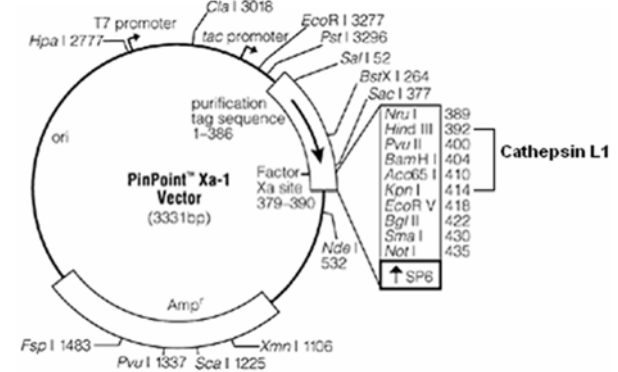
Ayrıca protein açıklanması çalışmalarında primere kozak dizisi (P1 isimli primerdeki CCA dizisi) eklenebilmektedir (18).

3. Restriksiyon enzimleri ve DNA'nın kesilmesi

Rekombinant DNA teknolojisinin ve klonlamanın gelişmesinde önemli adımlardan birisi restriksiyon enzimlerinin bulunması ve özelliklerinin ortaya konulmasıdır. Restriksiyon enzimleri, fajlara karşı bir savunma mekanizması olarak bakteriler tarafından üretilmektedirler. DNA'yı kesen bu enzimler izole edildikleri bakterilere göre isimlendirilmektedirler. DNA'yı spesifik dizilerden kesen enzimler DNA manipülasyonları için anahtar rol oynamaktadırlar. Bazı restriksiyon enzimleri anahtar kilit ilişkisi gibi yapışkan uçlar meydana getirirken bazıları da küt uçlar oluşturmaktadırlar (31, 37). Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve enzim tanıma noktaları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları.

Enzimin adı	İzole edildiği mikroorganizma	Oluşturduğu uç	Tanıma dizisi
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] GATCC-3' 3'-C CTAG [^] G-5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] AATTC-3' 3'-C TTAA [^] G-5'
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yapışkan uç	5'-GGTAC [^] C-3' 3'-C [^] CATGG-5'
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] TCGAC-3' 3'-C AGCT [^] G-5'
<i>Xho</i> I	<i>Xanthomonas holcicola</i>	Yapışkan uç	5'-C [^] TCGAG-3' 3'-G AGCT [^] C-5'
<i>Afu</i> I	<i>Artrobacter luteus</i>	Künt uç	5'-AG [^] CT-3' 3'-TC [^] GA-5'
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	Künt uç	5'-CCC [^] GGG-3' 3'-GGG [^] CCC-5'



Şekil 4: PinPoint™ Xa-1 vektörü (Promega). PinPoint™ Xa-3 vektörü, PinPoint™ Xa-1 vektörünün 194. pozisyonuna iki adenozin nükleotidi eklenerek oluşturulmuştur. PinPoint™ Xa-3 vektörü, insan sitomegalovirus (CMV) erken promotor bölgesi, geç SV40 poliadenilasyon bölgesi, T7 RNA polimeraz promotörü, f1 orijini ve neomisin fosfotransferaz geni içermektedir (28). *F. hepatica* cathepsin L1 geninin Pinpoint plazmitinde klonlanması daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı (16).

4. DNA'nın plazmite yerleştirilmesi

Klasik metotla gen klonlanması çalışmalarında, DNA'nın plazmite yerleştirilmesi öncesinde, restriksiyon enzimleriyle kesilen genin ve plazmitin agaroz jelden saflaştırılması gerekmektedir.

Tablo 2. Plazmit elde edilebilecek bazı firmaların adresleri ve plazmitler.

Firma adı*	Adres	Plazmitler*
Aldevron	www.aldevron.com	pUMVC, pWiz
Fermentas	www.fermentas.com	pBR322, pUC18, pUC19
Invitrogen	www.invitrogen.com	pCDNA.3, pVax1, TOPO [®] XL
Lucigen	www.lucigen.com	pSMART, pEZSeq
New England Biolab	www.neb.com	pKLAC1, pMAL, pNEB193, pTWIN
NTC	www.natx.com	pDNAVACC-Ultra [™]
Qiagen	www.qiagen.com	QIAGEN PCR Cloning Kit
Promega	www.promega.com	pCI-neo, pTARGET, pGEM-T
Sigma	www.sigmaldrich.com	pFLAG

* Plazmitler ve plazmit sağlayıcı firmalar yukarıdaki tablo ile sınırlı değildir

Saflaştırılan gen ve plazmit, T4 DNA ligaz enzimiyle uygun ısı ve reaksiyon koşullarında birleştirilmektedirler (37). Isı derecesi ve reaksiyon süresi kullanılan enzimin üretildiği firma önerilerine göre çok farklılık göstermektedir. Isı derecesi +4°C'den +25°C'ye, inkübasyon süresi ise 5 dakikadan bir geceye kadar değişebilmektedir (26, 29, 32, 33). T4 bakteriofajlardan elde edilen T4 DNA ligaz enzimi, *E. coli* DNA ligaz enziminden 400 kat daha etkindir. DNA ligazın etki mekanizması bir nükleotidin 3' hidroksil ucu ile diğer nükleotidin 5' fosfat gurubu arasında kovalent fosfodiester bağı oluşturulma temeline dayanmaktadır (31, 32). T4 DNA ligaz aktivasyonunda kofaktör olarak ATP'ye gereksinim vardır. Bu nedenle ATP içeren T4 DNA Ligase buffer' ların çok sık dondurulup çözülmemeleri gerekmektedir (32).

5. Rekombinant DNA'nın çoğaltılması

Genin plazmite yerleştirilmesi ile elde edilen rekombinant DNA'nın çoğaltılması sonraki çalışmalar için büyük avantajlar sağlamaktadır. Bunun için rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine sokulması (transformasyon) gerekmektedir. Transformasyon işlemi, basit ve ucuz olan kimyasal metotların yanında daha etkin bir metot olan elektroporasyon metodu da araştırmacılara alternatif olabilmektedir (3, 14). Laboratuvar çalışmalarımızda kimyasal yolla transformasyon metodunu yoğun olarak kullanılmaktadır (19, 24).

Transformasyonda kullanılacak kompetan hücreler ticari olarak satın alınabileceği gibi araştırmacıların kendi laboratuvarlarında da elde edilebilmeleri mümkündür. Bunun için kalsiyum klorid ve rubidyum klorid gibi metotlar yoğun olarak kullanılmaktadır. Laboratuvar çalışmalarımızda rubidyum klorid metodu ile hazırladığımız kompetan hücreleri etkin olarak kullanılmaktadır (19, 24, 32).

6. Klonlanan vektörün hücrelerden seçimi

Klonlamada karşılaşılan sorunlardan biri de kolonilerden rekombinant plazmitlerin seçimidir. Çoğu zaman transformasyon sonrasında onlarca hatta yüzlerce koloni karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan hangilerinin rekombinant plazmitleri içerdiğinin tespiti gerekmektedir. Bir çok plazmit, ampisilin, tetrasiklin gibi antibiyotik direnç genleri içermektedir. Bu direnç genleri sayesinde rekombinant plazmitlerin seçimi sağlanacaktır. Ayrıca çalışmalarımızda da kullandığımız pTARGET gibi bazı vektörler β -galaktozidazın α -peptidini kodlayan dizilime sahiptirler. Bu sebeple transforme katı besi yerlerinde mavi ve beyaz koloniler (rekombinant plazmit içeren koloniler) oluşmakta ve rekombinant plazmitlerin seçimi kolaylaşmaktadır (15).

7. Klonlamanın doğrulanması

Klonlamanın doğrulanması için transforme katı besiyerindeki kolonilerden, laboratuvarımızda da uyguladığımız PZR-Tarama ile kolonilerin rekombinant DNA'yı içerip içermediği hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir (25, 32). Kolonilerin, direkt olarak agaroz jelde yürütülmesi de rekombinant plazmitin doğrulanmasına yardımcı olmaktadır (31, 32).

Ayrıca bu kolonilerden miniprep ile elde edilecek rekombinant DNA'ların varlığı enzim kesim deneyleriyle doğrulanabilmektedir. Fakat sonraki çalışmalarda güvenilirliği arttırmak ve klonlamanın doğrulanmasını kesinleştirmek için DNA dizi analizinin yapılması gerekmektedir. Günümüzde manuel metotlarla yapılan DNA dizi analizlerinin yerini artık ülkemizde de hizmet veren otomatize metotlar almıştır.

8. Plazmitler

Genetik mühendislikte ve gen klonlaması çalışmalarında temel unsurlardan biri plazmitlerdir. Bakterilerde kromozom dışı ve çift zincirli bir DNA olarak bulunan plazmitler bazı genetik manipülasyonlara tabi tutularak genetik mühendislikte kullanılmışlardır (31). Rekombinant DNA teknolojisinde ilk kullanılan plazmit pBR 322'dir. Bu plazmit, ampisilin ve tetrasiklin direnç genleri ve birçok restriksiyon enzim bölgeleri içermektedirler (31, 37). Bu plazmitten geliştirilen pUC plazmiti ise, pBR 322'nin yarısı büyüklüğünde olup daha büyük DNA'ların klonlanmasına izin vermektedir. pUC plazmitleri birçok farklı restriksiyon enzimiyle kesilebilen polilinker bölge (multiple cloning site) içermektedirler. Polilinker bölge, *E. coli*'nin *lac Z* geni içerisinde yer almaktadır. Polilinker bölgeye sokulan DNA, *lac Z* geninin bozulmasına sebep olarak beyaz bakteri kolonilerinin oluşmasını ve dolayısıyla rekombinant DNA'yı taşıyan hücrelerin kolaylıkla tanınmasını sağlamaktadır (4, 31, 37).

Klonlama çalışmalarında kullanılan, plazmitlerin büyüklüğü 1 kb'den 200 kb'ye kadar değişebilmektedir. Plazmitlerin çoğu bakteriyel yapıdan süperheliks yapıda izole edilen kovalent

olarak kapalı, çift zincirli ve yuvarlak yapılarıdır. Plazmitlerin bakterilerde replikasyonunu sağlayan ve birkaç yüz baz çifti uzunluğunda replikasyon orjinleri bulunmaktadır. Bu sayede amaca göre düşük veya yüksek sayıda replike olabilen plazmitler oluşturulmuştur. Birçok klonlama plazmiti, genlerin yerleştirileceği bir klonlama bölgesi ve bakteriofajlardan elde edilen T3, T7, SP6 ve *tac* promotorları içerirken gen ekspresyon çalışmalarında kullanılacak plazmitlerin bir çoğu ise, *Sitomegalo virus* (SMV) promotoru ve *Simian virus* promotoru (SV40) içermektedir (9, 31, 37).

Bugün birçok farklı özelliği olan plazmitler farklı üretici firmalar tarafından araştırmacıların hizmetine sunulmuştur. Bunlardan bir kısmı tablo 2’de sunulmuştur.

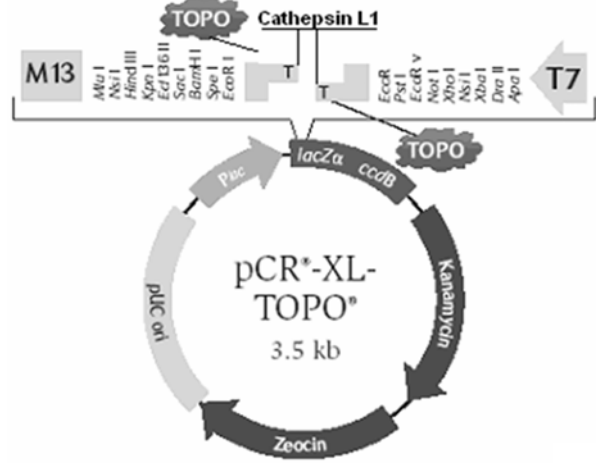
9. Gen klonlamada yeni metotlar ve önemli noktalar

Klonlama çalışmasının başlangıcında amaca yönelik bir plazmitin seçimi önem taşımaktadır. Genin bir plazmite yerleştirilmesinde geleneksel olarak pUC ve pBR gibi plazmitler kullanılmaktadır. Bu tür plazmitlerin kullanımı sırasında, plazmit ve çoğaltılan genlerin bir veya birden çok kesim enzimleriyle kesilmesi ve agaroz jelden saflaştırılması gibi işlemler gerekmektedir (31).

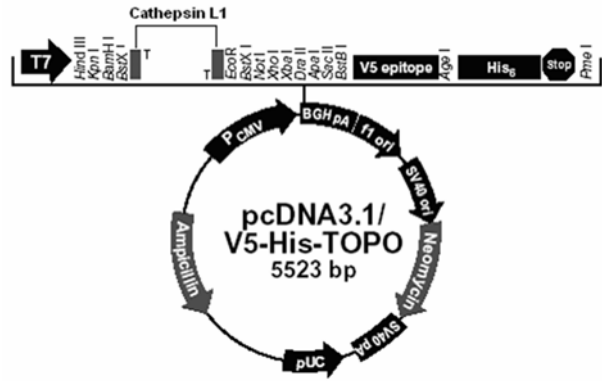
Bugün gelişen teknoloji ile birlikte birçok özelliği bir arada bulunduran plazmit, araştırmacıların hizmetine sunulmuş durumdadır. Genin çoğaltılması ve koruma altına alınması gibi bir amacı olan araştırmacılar, çalışmalarımızda da kullandığımız TOPO[®]XL (Şekil 5) gibi bir plazmiti seçebilirler (26). TOPO[®]XL plazmiti, yapısındaki topoizomeras aktivitesi ile ligaz ilişkili vektör sistemlerine göre önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu sistemde sadece vektör ve PZR ile çoğaltılan gene gereksinim duyulmakta ve vektöre genin yerleştirilmesi işlemi 5 dakikada tamamlanmaktadır. Ayrıca ligazların nükleazlarla kontamine olarak gen ve vektör de çentikler oluşturması ve sonrasında rekombinasyon sayısının azaltılması, topoizomeras kullanımı ile önlenebilmektedir. TOPO[®]XL plazmiti dışında PinPoint Xa-T, pGEM-T ve bizim de kullandığımız pTARGET gibi vektörlere de PZR ile çoğaltılan genin enzim kesimlerine ihtiyaç duyulmaksızın plazmite direkt olarak yerleştirilmektedir. Fakat bu işlem için bir saat veya çoğunlukla bir gecelik bir inkübasyon süresi gerekmektedir (26, 29, 32, 33).

Genlerin kodladığı proteinlerin açıklatılmasının istendiği durumlarda protein açıklama vektörlerinin seçilmesi gerekmektedir. Bunun için çalışmalarımızda kullandığımız, geleneksel olarak enzim kesimleriyle genin yerleştirileceği pCI-neo gibi plazmitler kullanılabileceği gibi direkt PZR ürününün yerleştirileceği pTARGET gibi vektörler de kullanılabilir (29). Ayrıca yapısında V5 epitop kuyruğu ve C-terminal 6x His dizisi bulunan pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] (Şekil 6) plazmiti ve biotin proteinini kodlayan dizi içeren

PinPoint Xa gibi plazmitler protein ekspresyonunun tespitinde önemli avantajlar sağlamaktadır (28). Protein ekspresyon seviyesinin kantitatif olarak ölçümünün gerektiği durumlarda ise çalışmanın ilk aşamasında β -Galaktosidaz reporter vektör, Kloramfenikol asetil transferaz reporter vektör ve lusiferaz reporter vektörlerden birine genin yerleştirilmesi gerekmektedir (2, 6, 7, 17, 30, 34).



Şekil 5. TOPO@XL PCR Cloning Vector (Invitrogen). TOPO@XL PCR Cloning Vector, topoizomeras aktivitesi olan ve direkt PZR ürününün klonlanmasına olanak veren bir vektördür. Ayrıca T7 promotor bölgesi ve ccdB içermektedir (33).



Şekil 6. pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] Vector (Invitrogen). pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] Vektör, topoizomeras aktivitesi olan bir vektördür. Güçlü bir CMV promotoru, C-terminal V5 epitop kuyruğu, C-terminal 6x His dizisi içermektedir (26). *F. hepatica* cathepsin L1 geninin TOPO plazmitinde klonlanması daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı (20).

Genin bu plazmitlere yerleştirilmesi aşamasında, genin kodladığı proteinin doğru şekilde sentezlenmesi için hangi plazmitin seçileceği en önemli konu olmaktadır. Çalışmamızda kullanılan vektörlerden biri olan PinPoint[™] Xa vector sisteminden PinPoint[™] Xa-3 vektörü kullanılarak biotinli cathepsin L1 proteininin doğru olarak sentezlenmesine olanak sağlanmıştır (16). Ayrıca yapısında green fluorescent protein (GFP)’ i

kodlayan gen dizisini içeren plazmitler de vardır. Bunlar proteinlerin hücre içi trafiğinin ve yapısının öğrenilmesi çalışmalarında araştırmacılara çok büyük olanaklar sağlamaktadır (12, 13, 35).

TOPO gibi plazmitleri içeren klonlama kitleri, içerdikleri plazmit ve kompetan hücrelerin yanı sıra klonlamanın doğrulanması, PZR tarama ve DNA dizi analizleri için gerekli olan plazmit tabanlı primerleri bulundurmaktadır. Bu kitler klonlamanın hem hızlı bir şekilde yapılmasına hem de doğrulama yapılmasına olanak sağlayarak araştırmacılara alternatif oluşturmaktadır (33).

Gen klonlaması çalışmalarında göz önünde bulundurulması gereken en önemli konulardan birisi de maliyet hesaplarıdır. PUC tabanlı veya pCI-neo gibi miniprep yapılarak plazmit DNA'sı elde edilmesine olanak sağlayan vektörler düşük maliyetleri ile özellikle yeni kurulan laboratuvarlar için önemli olmaktadır (19). Belirli sayıda reaksiyona olanak sağlayan TOPO, pGEM-T gibi plazmitler maliyeti arttırsa da zamanın önemli olduğu durumlarda kullanılması gerekebilmektedir (20, 32).

Sonuç olarak, araştırmacıların biyoteknolojik gelişimi takip ederek gen klonlaması ve sonrasındaki çalışmalar için kullanacakları en uygun plazmiti; plazmitin kullanım özellikleri, maliyet ve zaman gibi faktörlerin yanı sıra kendi laboratuvar olanaklarını da göz önünde bulundurarak seçmelerinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Katkılarından dolayı Fırat Üniversitesi'nden Dr. Şükrü Tonbak, Dr. A. Kürşat AZKUR ve Dr. İbrahim Tekedereli'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds.**, 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, p. 308-318.
2. **Ashutosh, Gupta S, Ramesh, Sundar S, Goyal N**, 2005. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(9): 3776-3783.
3. **Babiuk S, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA**, 2006. Delivery of DNA vaccines using electroporation. *Methods Mol Med*, 127: 73-82.
4. **Bensasson D, Boore JL, Nielsen KM**, 2004. Genes without frontiers? *Heredity*, 92(6): 483-489.
5. **Brown TA**, 1990. *Gene Cloning*. Second Edition. London: Chapman & Hall, p.3-11.
6. **Chen Y**, 2002. A novel single-stranded DNA expression vector. *Expert Opin Biol Ther*, 2(7): 735-740.
7. **DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM**, 2004. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res*, 92(2): 113-120.
8. **Doria-Rose NA, Haigwood NL**, 2003. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods*, 31(3): 207-216.
9. **Ertl PF, Thomsen LL**, 2003. Technical issues in construction of nucleic acid vaccines. *Methods*. 31(3): 199-206.
10. **Grimm D**, 2002. Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods*, 28(2): 146-157.
11. **Hartley JL**, 2006. Cloning technologies for protein expression and purification. *Curr Opin Biotechnol*, 17(4): 359-366.
12. **Hazelrigg T, Mansfield JH**, 2006. Green fluorescent protein applications in Drosophila. *Methods Biochem Anal*, 47: 227-257.
13. **Hutter H**, 2006. Fluorescent reporter methods. *Methods Mol Biol*, 351: 155-173.
14. **Inoue H, Nojima H, Okayama H**, 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1): 23-28.
15. **Kaplan M, Kuk S, Özdarendeli A, Bulut Y, Kalkan A**, 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması ve rekombinant plazmitlerin polimeraz zincir reaksiyon taraması ile belirlenmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 26: 388-392.
16. **Kaplan M, Kuk S, Özdarendeli A, Kalkan A, Kılıç SS**, 2003. Rekombinant *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 proteininin elde edilmesi ve avidin-biotin sistemiyle saflaştırılması (ön çalışma). 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi 8-12 Eylül, Konya.
17. **Kines KJ, Mann VH, Morales ME, Shelby BD, Kalinna BH, Gobert GN, Chirgwin SR, Brindley PJ**, 2006. Transduction of *Schistosoma mansoni* by vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped Moloney murine leukemia retrovirus. *Exp Parasitol*, 112(4): 209-220.
18. **Kozak M**, 1984. Compilation and analysis sequence upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 12: 857-872.
19. **Kuk S**, 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 geninin ökaryotik hücrelerde açıklanması. Uzmanlık Tezi. F.Ü. Tıp Fakültesi Parazitoloji AD. Elazığ.
20. **Kuk S, Kaplan M, Özdarendeli A, Tonbak S, Felek S, Kalkan A**, 2005. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 from a Turkish isolate is related to Asiatic isolates. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 50(3): 244-248.
21. **Lachmann R**, 2004. Herpes simplex virus-based vectors. *Int J Exp Pathol*, 85(4): 177-190.
22. **Lewin B, eds.**, 2000. *Gene VII*. New York: Oxford University Pres, p.52-60.
23. **Li S, Ma Z**, 2001. Nonviral gene therapy. *Curr Gene Ther*, 1(2): 201-226.
24. **Özdarendeli A, Kaplan M, Kuk S, Demirdağ K, Kalkan A**, 2003. *In vitro* transkripsiyonla *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 RNA'sının Elde Edilmesi (Ön çalışma). *Türkiye Parazitoloj Derg*, 27: 27-30.

25. **Özdarendeli A, Toraman ZA, Kuk S, Tonbak S, Bulut Y, Kalkan A**, 2003. Polimeraz zincir reaksiyonu ile transforme bakteriyel kolonilerin belirlenmesi (PZR-Tarama). *Firat Tıp Dergisi*, 8: 79-82.
26. **pcDNA3.1/V5-His-TOPO**. 2007. Invitrogen K4800.
27. **pCI-Neo Mammalian expression vector**. 2007. Promega Technacal Bulletin. TB215.
28. **PinPoint™ Xa Protein Purification System**. 2007. Promega Technical Manual TM028.
29. **pTARGET™ Mammalian Expression Vector System**. 2007. Promega Technical Manual TM044.
30. **Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, Ouellette M, Olivier M, Papadopoulou B**, 2000. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol*, 110(2):95-206.
31. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T**, 1989. *In Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pres, p. 1-1.86.
32. **Subcloning notebook**. 2007. Promega
33. **TOPO XL PCR Cloning Kit**. 2007. Invitrogen K4700.
34. **Waller KL, Muhle RA, Ursos LM, Horrocks P, Verdier-Pinard D, Sidhu AB, Fujioka H, Roepe PD, Fidock DA**, 2003. Chloroquine resistance modulated in vitro by expression levels of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter. *J Biol Chem*, 278(35): 33593-33601.
35. **Welsh S, Kay SA**, 1997. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr Opin Biotechnol*, 8(5): 617-622.
36. **www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.479**. Medical Microbiology. Erişim tarihi: 12.01.2007.
37. **www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mga.chapter.1536**. Modern Genetic Analysis. Erişim tarihi: 12.01.2007.