

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**POLİMERİK YÜZEY AKTİF MADDELER İLE
PLAZMİD SAFLAŞTIRILMASININ ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Kimyager Neşe ATACI

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı Programında
Hazırlanan**

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı : Prof.Dr. İnci ARISAN

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖNSÖZ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK KISIM	4
2.1 Gen Klonlaması	4
2.1.1 Klonlama Vektörleri	6
2.1.2 Klonlama Vektörleri Olarak Plazmidler	8
2.1.2.1 Plazmid'te Seçici Markerlar	11
2.1.2.2 Kanamisin	11
2.1.3 Konakçı Hücre <i>E.coli</i>	12
2.1.4 Klonlamada Kullanılan Enzimler	16
2.1.4.1 Kısıtlayıcı Enzimler	16
2.1.4.2 DNA Ligazlar	17
2.2 Gen Aktarımı	18
2.3 Gen Tedavisi	18
2.3.1 Ex Vivo Gen Tedavisi	19
2.3.2 In Vivo Gen Tedavisi	19
2.3.3 Viral Vektörlerle Gen Tedavisi	19
2.3.3.1 Retrovirüsler	20
2.3.3.2 Adenoviral Vektörler	20
2.3.3.3 Adeno Bağlantılı Viral Vektörler	20
2.3.3.4 Herpes-Simplex Virüsü	20
2.3.3.5 Chimeric Viral Vektör	21
2.3.4 Viral Olmayan Vektörlerle Gen Tedavisi	21
2.4 Yüzey Aktif Maddeler	27
2.4.1 Katyonik Yüzey Aktif Maddeler	30
2.5 Gen Tedavisinin Etik Yönü ve Geleceği	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	32
3.1 Materyal	32
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.2 Biyolojik Maddeler	33
3.1.3 Malzemeler	33

3.1.4	Kullanılan Cihazlar	33
3.2	Kullanılan Yöntemler	36
3.2.1	Genetik Materyalin Seçimi	37
3.2.2.	pVAX1/lacZ Plazmidi İhtiva Eden <i>E.coli</i> DH5α Hücrelerinin Çoğaltılması.....	38
3.2.1.1	Gerekli Çözeltiler	38
3.2.1.2	Deneyin Yapılışı	39
3.2.2	Optik Yoğunluk Tayini ile Hücre Sayımı.....	40
3.2.3	Referans Olarak Kullanılacak Plazmid DNA'sının Kit ile Saflaştırılması.....	41
3.2.3.1	Gerekli Çözeltiler	42
3.2.3.2	Deneyin Yapılışı	43
3.2.3	Spektral Yöntem ile DNA Analizi	44
3.2.4	pVAX/lacZ Plazmidli <i>E.coli</i> DH5α Hücrelerine Alkali Lizis İşleminin Uygulanması	45
3.2.3.3	Gerekli Çözeltiler	45
3.2.3.4	Deney Yapılışı	46
3.2.4	Alkali Lizis Metodu.....	46
3.2.5	Saflaştırmada Kullanılacak Peg-10 tallow'un Yapısal Analizi	47
3.2.5.1	Peg-10 Tallow'un Genel Özellikleri.....	47
3.2.5.2	Peg -10 Tallow Bileşiğinin Yapısal Analiz için Yapılan İncelemeler.....	48
3.2.6	Peg-10 Tallow Kullanılarak Çöktürme Yöntemi ile pDNA'nın Saflaştırılması ...	48
3.2.6.1	Gerekli Çözeltiler	48
3.2.6.2	Deneyin Yapılışı	49
3.2.6.3	Peg-10 tallow ile Çöktürme Yönteminin iletkenlik Değerlerinin Belirlenmesi	50
3.2.7	Yüksek Hızlı Santrifüj	52
3.2.8	ATPS Sistemi ile pDNA'nın Saflaştırılması	53
3.2.8.1	Deneyin Yapılışı	53
3.2.8.2	ATPS sisteminden elde edilen Örneğin İsoopropanol ile Muamele Edilmesi	53
3.2.9	ATPS Ayırma Sistemi	55
3.2.10	Agaroz Jel Elektforezi ile pDNA'nın Saflık Analizi.....	55
3.2.10.1	Elektforez İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	55
3.2.10.2	Elektforez İşlemi	56
3.2.11	Agaroz Jel Elektforezi	57
4.	SONUÇLAR.....	58
4.1	pVAX1/lacZ Plazmidi İhtiva Eden <i>E.coli</i> DH5α Hücrelerinin Çoğaltılmasının Sonuçları	58
4.2	Referans Olarak Kullanılacak Plazmid DNA'sının Kit ile Saflaştırılmasının Sonuçları	60
4.2.1	Kit ile Saflaştırılan Plazmid'in Konsantrasyon Hesabı	61
4.3	PEG-10 Tallow Bileşiğinin Yapısal Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi.....	62
4.3.1	Peg-10 Tallow Bileşiğinin Elementer Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	62
4.3.2	Peg-10 Tallow Bileşiğinin FTIR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	62
4.3.3	Peg-10 Tallow Bileşiğinin NMR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	65
4.3.4	Peg-10 tallow Bileşiğinin UV spektrumları ve Çözünürlük Özelliğinin Değerlendirilmesi	66
4.4	Peg-10 Tallow ile pDNA'nın Çöktürülmesi Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar... 68	
4.4.1	Peg-10 Tallow'un pDNA'yı Seçici olarak Çöktürmesine Asit Etkisi Sonuçları ;	69
4.4.2	Farklı Lizat Miktarlarının Peg-10 Tallow'un Seçiciliğine Etkisi Sonuçları.....	77
4.4.3	Peg-10 Tallow'un Seçiciliğine Tuz (NaCl) Etkisi Sonuçları ;	81
4.6	ATPS Sisteminde PEG-600 (Polietilen glikol) Noniyonik Polimerin Kullanılması ile pDNA'nın Saflaştırılması İşleminin Sonuçları.....	89

5. TARTIŞMA.....	92
KAYNAK.....	94
ELEKTRONİK KAYNAK.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	100

SİMGE LİSTESİ

r	Göç eden partiküllerin merkezdeki dönüm eksenine uzaklığı
rpm	Dakikadaki dönü sayısı
g	Yerçekimi ivmesi “gravity”
A	Absorbans
A_{260}	260 nm’deki Absorbans
A_{280}	280 nm’deki Absorbans
μg	Mikro gram
mL	Mililitre
I	Işık Şiddeti
I_0	Başlangıçtaki Işık Şiddeti
C	Konsantrasyon
%(w/w)	Ağırlıkça yüzde
%(v/v)	Hacimce yüzde
mS	Mili Siemens
uS	Mikro Siemens
mA	Mili Amper
V	Volt
λ	Lamda
α	Alfa

KISALTMA LİSTESİ

DNA	Deoksiribo Nükleik Asid
p(DNA)	Plazmid DNA
oc p(DNA)	Gevşek sarmal plazmid formu
sc p(DNA)	Süper sarmal plazmid formu
ccc p(DNA)	Süper sarmal plazmid formu
gDNA	Genomic DNA
RNA	Ribo Nükleik Asid
rRNA	Ribozomal RNA
Rnase	Ribonükleaz
ATPS	Aqueous Two Phase Sistemi
APHs	Aminofosfotransferaz
<i>E.coli</i>	Eschericia Coli
PEG	Poli(etilen glikol)
Peg-10 _{tallow} N,N',N'-	Polioksietilen (10)-N tallow- 1,3-di amin propan
EDT 20	Ethoduomeen 20
PEI	Poli Etilen İmin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
CTAB	Setil Trietil Amonyum Bromür
DOPE	Dioloeylphosphatidylethanolamine
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
ADA	Adenozin diaminaze
Cox-1	Siklooksijenaz-1 (Cyclooxygenase-1)
Cox-2	Siklooksijenaz-2 (Cyclooxygenase-2)
YAC	Maya Yapay Kromozomu
Amp ^R	Ampisilin Direnç Geni (Ampicilline Resistance Gene)
Tel ^R	Tetrasiklin Direnç Geni (Tetracycline Resistance Gene)
Kan ^R	Kanamisin Direnç Geni (Kanamycine Resistance Gene)
ATP	Adenozin Trifosfat
Ura	Urasil
Bp	Baz çifti (base pair)
MBp	Mega Baz çifti (Base pair)
DEAE	Dietil amino etil
AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu (Acquired Immuno Deficiency Syndrome)

MOPS	Morfolino Propan Sülfonik Asit
Kb	Kilo baz
CpG	İmmun Uyarıcı dinükleotid
NLS	Nüklear Lokalizasyon Sinyali
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Healthy Organization)
HIC	Hidrofobik Etkileşim Kromotografi (Hydrofobic Interaction Chromotography)
HAC	Hidroksi Apatit Kromotografi (Hidroksi Apatite Chromotography)
IEC	İyon Değiştirici Kromotografi (Ion Exchange Chromotography)
EtBr	Etidyum Bromür
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asid
RCF	Göreceli Yerçekimi Kuvveti
OD	Optik Dansite
OS	Cam Küvvet Türü
LB	Luria –Bertani Hücre Kültürü
TAE	Tri Acetate EDTA
UV	Ultra Viole Işık
HCl	Hidro Klorik Asid
Tris-HCl	Trizma base-HCl Tamponu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Gen klonlaması yöntemi ile plazmid DNA'sının çoğaltılmasının şematik görünümü	5
Şekil 2.2	Kanamisin A,B,C'nin yapısı	12
Şekil.2.3	<i>E.coli</i> hücrelerinin görünümü	13
Şekil 2.4	Yüzey aktif maddelerin (surfaktan) genel şekli	28
Şekil 3.1	pDNA saflaştırılması yöntemlerinin akım şeması	36
Şekil 3.2	pVAX plazmid vektörünün haritası	37
Şekil 3.3	Kanamisinli LB besiyeri ortamına ilave edilmiş pVAX1/lacZ ihtiva eden <i>E.coli</i> DH5α hücre kültürü örnekleri	39
Şekil 3.4	Plazmid DNA için saflaştırma basamakları (Qiagen Plazmid Inc® Kit Protokolü)	41
Şekil 3.5	Peg-10 tallow ile plazmid çöktürme yönteminin şematik diyagramı	51
Şekil 3.5a	Aqueous two phase sistemi + isopropanol ile plazmid saflaştırma işleminin şematik diyagramı	54
Şekil 3.6	Etidyum bromür yapısı	56
Şekil 3.7	Agaroz molekül yapısı	57
Şekil 4.1	<i>E.coli</i> DH5α konakçısına ait büyüme eğrisi	59
Şekil 4.2	Kit ile saflaştırılan pDNA'nın %1'lik agaroz jelde incelenmesi	60
Şekil 4.3	Peg-10 tallow bileşiğinin FT-IR (ATR) spektrumu	62
Şekil.4.4	Peg -10 tallow'un %2.5, %5, %7.5, %10 HCl ilavesiyle FT-IR (ATR) spektrumunda meydana gelen değişimler,	63
Şekil 4.5a	Peg-10 tallow bileşiğine asid çözeltisinin etkisi	63
Şekil.4.5	Peg-10 Tallow bileşiğinin suyla muamele edildikten sonra FT-IR spektrumunda meydana gelen değişimler	64
Şekil 4.6	Peg-10 tallow yüzey aktif bileşiğinin A; orginal örneğinin görüntüsü B; jelleşmiş örneğinin görüntüsü	64
Şekil.4.7	Peg-10 tallow 'un ¹ H-NMR'ı	65
Şekil 4.8	Peg-10 tallow'un ¹³ C-NMR'ı	66
Şekil.4.9	Peg-10 tallow'un UV Spektrumu (H ₂ O)	67
Şekil.4.10	Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %10'luk HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	69

Şekil.4.11	Peg -10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %2.5 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	70
Şekil.4.12	Peg-10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %2, %3, %4, %5 HCl 'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	72
Şekil.4.13	Peg -10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminin %2.5, %5, %7.5, %10 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	73
Şekil.4.14	Peg -10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %5, %5.5, %6.0, %6.5 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	75
Şekil.4.15	Peg-10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminin farklı lizat konsantrasyonlarında %7.5 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	77
Şekil.4.16	Peg -10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminin farklı lizat konsantrasyonlarında %7.5 HCl 'in etkisinin standart lizat örnekleriyle kıyaslanması	79
Şekil.4.17	Peg-10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminde farklı lizat konsantrasyonlarına sırayla asitsiz, 0.008 (v/v), 0.012 (v/v) miktarlarında %7.5 (v/v) HCl 'in ilavesinin çöktürme işlemine etkisi	80
Şekil.4.18	Peg -10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %7.5 HCl 'nin Tuzlu (NaCl) ortamda etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	82
Şekil.4.19	Peg-10 tallo ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %7.5 HCl'nin tuzlu (NaCl) ortamda etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi ...	84
Şekil 4.20	Peg-10 Tallo katyonik yüzey aktif maddesinin deiyonize suda ortamında okunan iletkenlik değerleri	85
Şekil 4.21	0.1 M Tris-HCl tamponunun pH:7-10 aralığında değişen iletkenlik değerleri.	86
Şekil 4.22	0.1 M Tris-HCl tamponun farklı konsantrasyonlarda ki iletkenlik değerleri χ (mS/cm)	86
Şekil.4.23	PEG 600-(NH ₄) ₂ SO ₄ ATPS sisteminin alt faz ve üst faz bileşiminin %1'lik agaroz jelde incelenmesi	89
Şekil.4.24	PEG 600-(NH ₄) ₂ SO ₄ ATPS sisteminin farklı isopropanol konsantrasyonları ile çöktürülmüş alt faz ve üst faz bileşiminin %1'lik agaroz jeldeki görünümü ...	90

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1	Kullanılan klonlama vektörleri, (Casali N., Preston A. , 2003).....	7
Çizelge 2.2	Doğal plazmidler ve ilgili özellikleri (Casali N., Preston A. , 2003).....	10
Çizelge 2.3	<i>E.coli</i> 'nin bilimsel sınıflandırılması.....	14
Çizelge 2.4	<i>E.coli</i> DH5 α konakçısının bazı genotip özellikleri ve tarifleri (Casali N., Preston A. , 2003)	15
Çizelge 2.5	Bazı kısıtlayıcı enzimleri ve spesifik tanıma – kesme bölgeleri.....	16
Çizelge 3.2	Plazmid saflaştırma kitinde kullanılan tampon çözeltileri (Qiagen Inc® Plazmid Kit Protokolü)	42
Çizelge 3.1	Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin genel özellikleri (Sigma)	47
Çizelge 3.2	PEG 600 noniyonik yüzey aktif maddesinin genel özellikleri.....	53
Çizelge 4.1	<i>E.coli</i> DH5 α suşuna ait 600 nm'deki absorbans değerleri.....	59
Çizelge 4.2	Peg-10 tallow bileşiğinin elementer analiz sonuçları	62
Çizelge 4.3	Peg -10 tallow bileşiğinin çözünürlük öelliği ve λ_{max} değerleri.....	67
Çizelge 4.4	Tris-HCl tmpon çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki iletkenlik değerleri	87
Çizelge 4.5	Peg-10 tallow'un değişen konsantrasyonlarının 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortamda iletkenlik ve pH değerleri	87
Çizelge 4.6	0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortama Peg-10 tallow'un ve HCl'in iletkenlik ve pH değerlerine etkisi	88
Çizelge 4.7	Peg-10 tallow ve HCl içeren 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortamına NaCl çözeltisinin farklı kons.'da ilavesinin iletkenlik ve pH değerlerine etkisi.....	89

ÖNSÖZ

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve çalışmanın değerlendirilmesinde benden desteklerini hiç esirgemeyen, beni her konuda özgür bırakarak destekleyen, bilgilendiren, koruyan ve gözetten çok değerli hocam Prof. Dr. İnci ARISAN'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Erasmus bursiyeri olarak gittiğim Portekiz'de, Minho Ünivesitesinde (Universidado do Minho) Biyoloji-Kimya laboratuvarının imkanlarını açan, işbirliği içinde çalışmamızı sağlayan ve yeni konular öğrenmeye teşvik eden, çok sevgili hocam Assoc. Dr. Joao Carlos Marcos'a teşekkür ve şükranlarımı bildirmeyi bir borç bilirim. "Her zaman pozitif olacağım."

Yıldız Teknik Üniversitesi Fizikokimya Ana Bilim Dalının saygı ve sevgi'ye değer hocası Doç. Dr. Ayfer SARAÇ'a tezimin tamamlanmasında bilgilerini benimle paylaştığı ve beni yönlendirdiği için ve bana değerli zamanını ayırdığı için çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında Minho üniversitesi Biyoloji-Kimya laboratuvarında birlikte çalıştığım Sonia DUARTE, Sara SILVERIO, Isabella CORREIRA'ya yabancılık çekmemem için gösterdikleri destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.(obrigado)

Ayrıca okul hayatım ve doktora tez çalışmam sırasında bana hem maddi hem manevi desteklerini hiç esirgemeyen Anneme, ablam Necla'ya, kardeşim Somer'e ve uzaktan da olsa desteklerini hiç esirgemeyen teyzeme sevgi ve saygılarımı belirtmeyi bir borç bilirim. Doktora tezimi sizin sayenizde tamamlayabildim.

Neşe ATACI

İstanbul, 2007

ÖZET

Non viral gen tedavileri ve infeksiyöz hastalıklara yönelik DNA aşıları gibi moleküler tedavi yöntemlerinin son yıllarda gelişimi çok miktarda ve yüksek saflıkta plazmid DNA üretimi ihtiyacını arttırmıştır. Plazmid DNA saflaştırılması için standart moleküler biyoloji protokolleri mevcuttur ancak bu protokollerde kullanılan çözeltiler uygun değildir. Tedavi amaçlı ürünlerde kullanılacak protokollerde kullanılan çözeltilerin toksik olmaması ve fazla miktarda üretim için uygun olmaları gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında plazmid DNA'sının polimerik maddelerin kullanımı ile saflaştırılması amaçlandı. Birinci yöntemde N,N',N'- Polioksietilen (10)-N tallow- 1,3-di amin propan (Peg-10 tallow) katyonik yüzey aktif madde kullanılarak plazmid DNA'nın çöktürülerek saflaştırıldı. Peg-10 tallow bileşiğinin yapısal analizi, elementel analizi, FT-IR, UV-VIS, NMR (^1H , ^{13}C) alınarak yapıldı. pDNA'nın peg-10 tallow yüzey aktif maddesi ile çöktürme işleminin çalışma koşullarının iletkenlik değerleri belirlendi. Geliştirilen Alkali liziz metodu ile plazmid DNA ve RNA'dan oluşan lizat örneği elde edildi. Bu aşamada Peg-10 tallow yüzey aktif maddesi ile plazmid DNA'nın lizat örneğinden çöktürülerek saflaştırılmasına farklı asid (HCl), farklı tuz (NaCl) ve farklı lizat konsantrasyonlarının etkisi incelendi. DNA saflığı %1'lik agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildi.

İkinci yöntem olarak biyomoleküllerin ve partiküllerin ayrılmasında kullanılan "Aqueous Two Phase" (ATPS) iki fazlı ayırma sistemi kullanıldı. PEG 600 ile Amonyum Sülfat tuzunun sulu ortamda karışımından oluşan ATPS sisteminin bileşimi %35 PEG 600 ve %6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'dir. Geliştirilen alkali liziz işlemi ile plazmid DNA ve RNA'dan oluşan lizat örneği elde edildi. %35 PEG 600 ve %6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bileşimli ATPS sisteme %100(v/v) oranında lizat örneği uygulandı. Ayırma işleminin daha iyi olması için lizat örneği ATPS sisteme uygulandıktan sonra isopropanol çöktürülmesi işlemi ile integre edildi. p(DNA) saflığı %1'lik agaroz jel elektroforeziyle kontrol edildi.

Sonuç olarak PEG 600 ile yapılan saflaştırmanın daha başarılı olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Gen Tedavisi,DNA Aşıları,p(DNA) Saflaştırma,Peg-10 tallow,PEG 600

ABSTRACT

The development of molecular therapies such as non-viral gene therapy and DNA vaccination for infectious diseases have increased the need for high quantities of highly purified plasmid DNA (pDNA). Although standard molecular biology protocols are available, these are not suitable. In addition they frequently use toxic reagents that should not be used in the purification of therapeutic products.

In this study, the polymer compounds were used to develop purification methods for pDNA. In the first method N,N',N''- Polyoxsietylen (10)-N tallow- 1,3-di amine propane (Peg-10 tallow) surfactant was used as a precipitation agent. Structural analysis of Peg-10 tallow was determined by Elemental analysis, FT-IR, UV-VIS, NMR (^1H , ^{13}C). The conductivity of conditions of precipitation method was determined. A modified alkaline lysis method was used for cell lysis to obtain pDNA and RNA solution. Precipitation of the pDNA by Peg-10 tallow cationic surfactant was determined in different acid, different salt and different lysate concentrations. The results were realized by 1% agarose gel analysis.

Aqueous two phase systems (ATPS) is used as a system for separation of biomolecules and particles. In the second method was presented partitioning of the plasmid DNA in polyethylene glycol(PEG) / salt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aqueous two phase systems (ATPS). %35 PEG 600 - %6 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ATPS system was selected. A modified alkaline lysis method was used for cell lysis to obtain pDNA and RNA solution. 100% mass of lysate was loaded to the system. In addition the bottom phase of ATPS systems was integrated with isopropanol precipitation step. The results were realized by %1 agarose gel analysis.

Finally PEG 600 system provides plasmid purification better than peg-10 tallow precipitation system.

Key Words: Gene Therapy, DNA Vaccination, p(DNA) purification, Peg-10 tallow, PEG 600

1. GİRİŞ

Gen terapisi, genetik defektlerin oluşumunun yol açtığı hastalıkların tedavi edilmesinde yeni ve umut verici bir yaklaşımdır. (Prazeres D.M.F.2006, Sharon Y.W.2007)

Klinikte kullanılan ilaçların çoğu gen düzeyinde kontrol sağlamaktadır. Aspirin ve benzeri non steroidal antiinflatuar ilaçlar Cox-1 ve Cox-2 genlerini inhibe etmekte ve Cox-2 inhibisyonu ile tümör poliferasyonu, anjiyogenez baskılanmaktadır. Bu özelliğinden dolayı aspirin, kolon kanseri kemoprevansiyonunda kullanılmaktadır. Kolesterol sentezinde ve Ras onkogeni sinyal iletiminde rol oynayan farnezil transferaz enzimini inhibe eden ilaçlar lösemi ve akciğer kanserlerinin tedavisinde önem kazanmıştır. (Kars A. ,2004)

Son 25 yılda özellikle moleküler biyolojide rekombinant DNA tekniklerinde kaydedilen gelişmeler, gen tedavisini kuramsal bir kavram olmaktan çıkartmış ve gen düzeyinde kontrolün sağlanması için uygulanabilir bir yöntem haline getirmiştir. (Kars A., 2004)

Gen tedavisi kistik fibrozis, fanconi anemisi gibi tek gen defektinin söz konusu olduğu kalıtsal hastalıklarda yoğun araştırma konusudur. Bu çalışmaların tümü faz 1 çalışma niteliğindedir. İlk faz 1 gen tedavisi klinik deneyi 1990'da adenozin deaminaz (ADA) enzim eksikliği olan bir kız çocuğuna uygulanmıştır. Bu hastalık çok kötü gidişli ve tedavisi olmayan bir hastalık olması gibi nedenlerden seçilmiştir. Kalıtsal genetik hastalıkların tedavisi amacıyla 1989-1994 yılları arasında 100 adet gen tedavisi protokolü onay almıştır. Bunların hepsi faz 1 çalışma niteliğinde olup, terapötik etkinlikten çok kullanılan yöntemlerin toksiditesini belirlemeye yöneliktir. Bu çalışmalarda tedavi edilen başlıca genetik hastalıklar ; ADA eksikliği, kistik fibrozis, hemofili B, alfa-1, antitripsin eksikliği, fanconi anemisi, Gaucher hastalığı, Hunter sendromu ve LDL-reseptör eksikliği olan ailesel hiperkolesterolemidir. Gen tedavisi kalıtsal hastalıklar dışında kardiyomiyopatiler, nörolojik hastalıklar kanser ve AIDS'de uygulanmaktadır. Çok sayıda gen değişikliğinin birikimiyle ortaya çıkan kanser hastalıklarında kanserli hücrelerde mevcut genetik bozukluğu tümüyle düzeltmek ve organizmada bulunan tüm kanser hücrelerini hedeflemek var olan teknoloji ile şimdilik olanaksız gibidir. (Kars A.,2004)

Gen terapisi, terapötik amaçlı genetik olarak modifikasyonunun sağlanması için nükleik asidlerin insan hücrelerine verilmesi olarak da tanımlanabilir. Viral ve viral olmayan vektörler nükleik asidlerin hedeflenen hücreye sunulmasında kullanılır. (Galaev ve ark., 2006, Urthaler.J, 2007) Buna karşılık viral vektörler toksik olmaları ve immunojen özelliklerinden

dolayı güvenilirliği daha az ve kullanımda problem oluşturan taşıyıcı sistemlerdir. Viral olmayan vektörler ise güvenli olup çok sayıda alternatifleri geliştirilebilmektedir. Viral olmayan vektörlerin diğer bir avantajı da maliyetlerinin düşük olmasıdır. (Galaev ve ark. 2006, Hongtao L.2006)

Viral olmayan vektörler plazmid DNA ve plazmid DNA'nın lipozom ve polimerlerle v.b. oluşturduğu kompleks bileşiklere dayanır. Hedef hücrelere transfeksiyon işlemi sırasında viral olmayan vektörler viral vektörlere oranla daha az etkilidir. Plazmid DNA aynı zamanda infeksiyöz hastalıklar'a yönelik DNA aşılarının üretiminde immun yanıtın uyarılmasında ve arttırılmasında da kullanılmaktadır. (Donnelly ve ark. 1997, Gurunathan ve ark.2000, Tighe ve ark.1998)

DNA aşıları çok miktarda ilgili gen DNA'sını taşıyan plazmid DNA üretimini gerektirir. Bu aşılar çeşitli prosedürlerle in vivo ortamlara sunulurlar;

- (1) Direkt çıplak DNA enjeksiyonu şeklinde ,
- (2) Hedef dokuya veya hücreye ulaşımını sağlayan lipozom veya diğer bileşiklerle kompleks haline getirilerek,
- (3) DNA'nın altın parçacıklarına adsorbe edildiği ve direkt olarak hücre içine yüksek hızla bombardıman edilerek sunulduğu “gen tabancası” yöntemi ile.

Plazmid DNA üretimi ve saflaştırılması işlemi normal olarak alkali lizis prosedürü ile başlar. Alkali lizis metodu bakteri kültüründen etkili olarak hücre duvarları, organeller, proteinler ve genomik DNA'yı uzaklaştırmayı sağlar. Geriye kalan RNA, plazmid DNA ve az miktarda proteinlerdir.(Galaev ve ark., 2006)

Bakteri hücre kültüründen yüksek verimde ve yüksek miktarda plazmid DNA saflaştırılmasında kullanılan çeşitli kromatografik ve kromatografik olmayan yöntemler mevcuttur. (Ferreira ve ark, 2000) Plazmid DNA saflaştırılmasında kullanılan başlıca kromatografik teknikler; Anyon Değiştirici Kromatografisi (Hines ve ark. 1992, Prazeres ve ark. 1998), Moleküler Elek Kromatografisi (Ferreira ve ark 1997, Horn ve ark.1995) Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (Diogo ve ark 2000, 2001) ve Tripleks Heliks Afinite Kromatografisi'dir. (Schluep ve Cooney 1998; Wils ve ark. 1997)

Plazmid DNA saflaştırılmasında kullanılan kromatografik olmayan yöntemler ise Aqueous Two Phase Siste

mler (ATPS) (Cole 1991, Marcos ve ark. 2005, Ribeiro ve ark. 2002) Ultrafiltrasyon yöntemi (Kahn ve ark. 2000), Polietilen glikol / tuz karışımı ile plazmid DNA'sının çöktürülmesi, sadece poli(etilen) glikol kullanarak plazmid DNA'yı çöktürme'dir. Polimerler kullanılarak yapılan çöktürme işlemleri sonunda konsantre edilmiş plazmid DNA çözeltisini daha da saflaştırmak için alkol ile çöktürme, çeşitli tuzlar örneğin; Amonyum sülfat (Diogo ve ark. 2000), Amonyum asetat (Ferreira ve ark.1999), ve Lityum Klorür (Chakrabarti ve ark. 1992) ile çöktürme yapılarak plazmid DNA'nın saflaştırılması için yöntemler geliştirilmiştir.

Bu çalışmada gen tedavisinde ve plazmid esaslı aşılarda geliştirilmesinde kullanılmak üzere plazmid DNA'nın iki ayrı yöntem ile saflaştırılması amaçlandı.

2. TEORİK KISIM

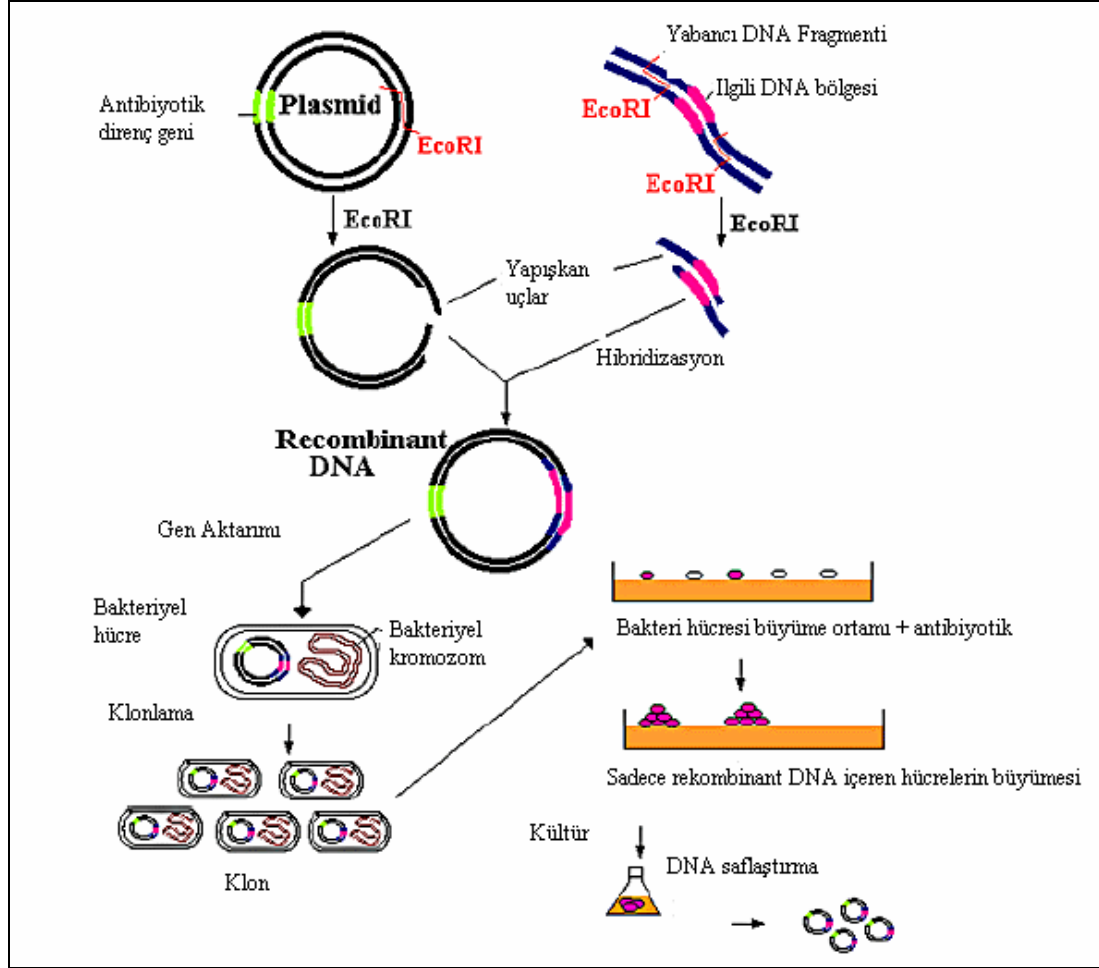
2.1 Gen Klonlaması

Biyolojik bir ürünün veya proteinin sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik veya ökaryotik) genomundan (veya kromozomundan) restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek çıkarılması, bunun bir taşıyıcı (vektör) DNA'sı ile birleştirilerek alıcı bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfer edilmesi, ve bu alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasına “gen klonlanması” denir

Klonlanacak geni içeren DNA fragmenti, vektör adı verilen dairesel DNA molekülüne yerleştirilir. Böylece rekombinant DNA molekülü veya “chimaera” üretilir. Vektör, iletme aracı olarak geni konakçı hücreye transport etmekte kullanılır. Genellikle bakteriler bu amaçla kullanılmakla birlikte bu amaçla kullanılan başka canlı hücrelerde mevcuttur. Konakçı hücre içinde vektör çoğalır. Vektör çoğalırken, vektöre ilave edilmiş ilgili geninde kopya sayısı artar. Konakçı hücre bölündüğünde rekombinant DNA molekülünün kopyaları yavru hücreye geçer ve vektör replikasyonu bu hücrelerde devam eder. Çok sayıda hücre bölünmesinden sonra, benzer konakçı hücrelerinden bir koloni veya bir klon üretilir. Klondaki herbir hücre rekombinant DNA molekülünden bir veya daha fazla kopyalar içerir. Böylece rekombinant molekül tarafından taşınan gen klonlanmış olur. (Brown.T.A, 1989) Klonlama işlemi şekil 2.1’de şematik olarak gösterilmiştir.

Gen klonlamasında önemli aşamalar şunlardır ; (Arda .M, 1995)

- 1) Gen taşıyan DNA'nın (veya RNA) saf olarak elde edilmesi,
- 2) Genin yerinin belirlenmesi,
- 3) Genin çıkarılması,
- 4) Taşıyıcı (vektör) DNA'nın elde edilmesi,
- 5) Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi,
- 6) Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması,
- 7) Seleksiyon,
- 8) Gen ürününün kontrol edilmesi .



Şekil 2.1. Gen klonlaması yöntemi ile plazmid DNA'sının çoğaltılmasının şematik görünümü

2.1.1 Klonlama Vektörleri

Gen klonlamada en önemli bileşen klonlama vektörüdür. Klonlama vektörü seçilmiş DNA fragmentinin konakçı hücreye transportundan ve replikasyonundan sorumlu bir DNA molekülüdür. İyi bir klonlama vektörü;

- küçük olmalıdır (ideali 10 kilobazdan küçük olmasıdır),
- kopya sayısı yüksek olmalıdır,
- konakçı hücrede dayanıklı olmalıdır
- taşıdığı genin ekspresyonunu yüksek düzeyde yapabilmelidir.

Vektörler amaca uygun ve bilinçli olarak seçilmelidirler. Özellikle restriksiyon haritalarının, baz sıralarının, gen işlevlerinin, hücre içi replikasyon basamaklarının, özgün işaret genlerinin çok iyi bilinmesi ve tanınması klonlamanın başarılı olması için oldukça önemlidir.

Klonlayıcı vektörler olarak plazmidler, bakteriyofajlar, viral vektörler, Maya Yapay Kromozomu (YAC), Bakteriyel yapay kromozomlar (BAC) gibi çeşitli vektörler kullanılmaktadır. İlk *Escherichia coli* (*E.coli*) vektörleri ekstrakromozomal halkasal plazmidlerdir ve birçok bakteriyofaj da *E.coli*'de kullanılmıştır. Klonlama vektörü olarak kullanılan bakteriyofajlar, genellikle bakterilerde üreyen litik bakteri virüsleridirler. Fajlar arasında vektör amacıyla en yaygın olarak kullanılanlar *E.coli*'ye ait λ , M13, fajmid ve kozmidlerdir. Faj λ plazmit vektörlerden daha büyük fragmentleri klonlamak için kullanılabilir ve Faj M13 tek-iplikli formda DNA'nın klonlanmasında kullanılmaktadır. Plazmitlerin ve bakteriyofajların özellikleri kullanılarak, kozmidler olarak bilinen plazmit-bakteriyofaj λ hibridleri gibi bir çok özelleşmiş vektörlerin mühendisliği yapılmıştır. İnsanlar ve diğer türlerden kaynaklı çok büyük genomik fragmentler, bakteriyel yapay kromozomları (BAC'lar) olarak *E.coli*'de ve maya yapay kromozomları (YAC'lar) olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de klonlanmıştır. (Konuk.M., 2004)

Plazmidler, özellikle moleküler ağırlıklarının küçük olmalarından ve hücrelerde bağımsız olarak çoğalmalarından dolayı yabancı genlerin ifadesinde iyi sonuçlar verirler. Bunlar, moleküler tekniklerin uygulanmasıyla amaca uygun olarak geliştirilip kullanılmaktadırlar.

Aşağıda çizelge 2.1'de Gen klonlamasında kullanılan çeşitli vektörler ve özellikleri yer almaktadır.

Çizelge 2.1 Kullanılan klonlama vektörleri, (Casali N., Preston A. , 2003)

Plazmid	Özellikler	Ticari Üreticiler
PUC18,PUC19	Küçük boyutlu(2.7kb) Yüksek kopya sayılı Çoklu klonlama uçlu Ampisilin direnç markerlı	NEB
pBluescript vektör	pUC Tek yönlü replikasyon orjini MCS'de bulunan T7veSP6 promotörler	Stratagene
PACYC vektör	Düşük kopya sayılı (hücre başına 15 kopya) p15A replikasyon orjini	NEB
Supercos	Kozmid vektör, iki cos uçlu,	Stratagene
EMBL3	Ampiciline direnç markerlı Klonlama ucu bulunan T7 ve T3 promotörleri λ yerdeğiştirme vektörü MCS ucu : Sall,BamHI ve EcoRI	Promega
λ ZAP	λ vektör Klonlama kapasitesi 10 kb	Stratagene
pBeloBAC11	BAC vektör Mavi / Beyaz seçimliAkterma ucu içeren T7 ve Sp6 promotörler Cos uçlu LoxP uçlu	NEB

^aMCS : Çoklu klonlama kısmı

2.1.2 Klonlama Vektörleri Olarak Plazmidler

Plazmidler, bakteri sitoplazmasında genom DNA'sından bağımsız replikasyon yapabilen, çift zincirli genellikle halkasal (ender olarak doğrusal) olan, içinde bulundukları bakterilere bazı özellikler kazandıran DNA molekülleridir. (Bilgehan .E,1999). Bir veya birden fazla genler içerirler, bu genler konakçı hücreler için faydalı karakteristik özelliklere sahiptirler. Bakterilerin kloramfenikol veya ampisilin antibiyotiklerinin toksik konsantrasyonlarında canlı kalabilme yeteneği plazmidde bulunan antibiyotik direnç genlerini taşımasından ileri gelir. Bütün plazmidler replikasyon orjini gibi davranan en azından bir DNA sekansına sahiptir, ve plazmidler bakteri hücresinin esas kromozomunda bağımsız olarak çoğalma yeteneğine sahiptir. Küçük plazmidler çoğalmak için bulundukları konakçı hücrenin kendi DNA replikasyon enzimlerini kullanırlar, büyük olan plazmidler replikasyon için spesifik olan özel enzimleri kodlayan genler taşırlar. Replikasyonlarını bakteriyel kromozoma entegre olarak gerçekleştiren plazmidlere episomlar veya integratif plazmidler denir.

Plazmidler, sitoplazmada genom DNA'sından bağımsız replikasyon yapabilen , çift zincirli genellikle halkasal (ender olarak doğrusal) olan DNA molekülüdür. Molekül ağırlıklarının $1.5-5.0 \times 10^6$ dalton arasında değiştiği bilinmektedir. 3-100 gen taşıyabilen plazmidler bakterilerin yanısıra maya ve diğer mantarlarda da bulunmaktadır.

Plazmidin büyüklüğü ve kopya sayısı özellikleri klonlama'da önemlidir. Klonlama vektörü olarak kullanılacak vektörlerin büyüklüğünün 10 kb (kilobaz)'dan daha az olması istenir. Büyük boyutlara sahip plazmidler şartlar sağlandıkça klonlama işlemine adapte edilebilirler. Plazmidin kopya sayısı bir bakteride bulunan plazmidin molekül sayısıdır. Her bir plazmid için karakteristik kopya sayısı 1 olabileceği gibi (özellikle büyük moleküller için) 50 veya daha fazla olabilmektedir. Genellikle klonlama vektörü olarak kullanılırken klonlama sayısının çok sayıda rekombinant DNA moleküllerinin elde edilebilmesi için multiple olması gerekir (Brown.T.A, 1989) .

Plazmidler hidrofilik moleküllerdir ve her bir nükleotidin fosfat grubu nedeniyle, oldukça yüksek negatif yüzey yüküne sahiptirler. Bu moleküller süper sarmal, açık, dairesel ve doğrusal formlarında bulunabilir ve zeta potansiyel değerleri -30mV ile -70mV arasında değişir (K.D.Barut, 2001).

Plazmidler, vücutta parçalanırlar; bu da gen ekspresyon süresinin sınırlı olmasına neden olur. Uygulanan dozda in vivo olarak plazmidin konakçı kromozomlarına entegre olduğunu

gösteren bir kanıt bulunamamaktadır. Bu nedenle mutagenез ve onkogeneze neden olmazlar (K.D.Barut, 2001).

Plazmidlerin ;

- çok sayıda, kolay ve ucuz elde edilmeleri,
- çift iplikçikli, sarmal ve sirküler bir yapıya sahip olmaları,
- yapılarında seleksiyonda önemli fonksiyonu olan bazı spesifik markerlerin (amp^R , tel^R , kan^R v.s.) bulunması,
- belli uzunlukta yabancı genleri kabul etmeleri, infeksiyöz olmamaları,
- restriksiyon endonükleaz için bazılarında bir tek kesim yerinin bulunması,
- replikasyon orjinine sahip olmaları,
- hücre içinde bağımsız olarak replikasyon özelliği taşıması, vs.

gibi özelliklere sahip olması vektör olarak kullanılmaların başlıca nedenleri arasındadır. Doğal olarak bulunan plazmidlerden gen aktarımında yararlanılmakla birlikte in vitro koşullarda amaca göre hazırlanan suni plazmidler de tercih edilmektedirler (Brown,T.A.,1989). Çizelge 2.2’de kullanılan bazı doğal plazmidler, büyüklükleri bulundukları konakçılar ve ilgili diğer özellikleri hakkında bilgi verilmektedir.

Çizelge 2.2 Doğal plazmidler ve ilgili özellikleri (Casali N., Preston A. , 2003)

Plazmid	Konakçı	Plazmid büyüklüğü (kbp)	İlgili Özellikler
PT181	<i>Staphylococcus aureus</i>	4.4	Tetrasiklin dirençli
pRN1	<i>Sulfolobus islandicus</i> ^a	5.4	-
2μ	<i>Saccharomy cescerevisiae</i> ^b	6.3	-
ColE1	<i>Eschericia coli</i>	6.6	Colin üretimi ve immünite
pMB1	<i>Escherichia coli</i>	8.5	EcoRI restriksiyon-modifikasyon sistemi
pGKL2	<i>Kluyveromyces lactis</i> ^b	13.5	Plazmid öldürücü
pAMβ1	<i>Enterococcus faecalis</i>	26	Eritromisin dirençli
pSK41	<i>Staphylococcus aureus</i>	46.4	Multi ilaç dirençli
pBM4000	<i>Bacillus megaterium</i>	53.0	rRNA operon
pI258	<i>Staphylococcus aureus</i>	28.0	Metal iyon direnci
pADP-1	<i>Pseudomonas sp.</i>	108.8	Atrazin katabolizması
pWW0	<i>Pseudomonas putida</i>	117.0	Aromatik hidrokarbon parçalama
pBtoxis	<i>Bacillus thuringiensis ssp.israelensis</i>	137.0	Sineklarva toksiditesi
pX01	<i>Bacillus anthracis</i>	181.7	Ekzotoksin üretimi
pSOL1	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	192.0	Solvent üretimi

^a Arkeo bakterileri “archaea”

^b Eukaryot (maya)

2.1.2.1 Plazmid'te Seçici Markerlar

Hemen tüm plazmidlerde antibiyotik direnç genleri seçici markerlar olarak kullanılır. Kültürün büyüdüğü ortama uygun antibiyotiğin ilavesi ile plazmid içermeyen hücreler ölür ve plazmid içeren hücrelerden oluşan bir kültür üretilmiş olur. Rekombinant klonların antibiyotik direnç profilleri klona ilave edilecek DNA fragmentinin seçiminde önemlidir. Klonlanmış DNA fragmentinin sekansında mutasyon antibiyotik seçiminde marker görevi görür. Mutasyon, antibiyotiğe dirençte değişime neden olur. *E.coli*'nin bazı klonlama türleri kalıtsal olarak bazı antibiyotiklere dirençlidir. Böyle durumlarda antibiyotik plazmidi taşıyan hücrenin seçimi için kullanılmaz. Bazı plazmid vektörleri iki antibiyotiğe karşı direnç gösterebilir. (Brown.T.A, 1989)

E.coli'de en çok bilinen vektörler; ampicilin, kanamisin, tetrasiklin ve kloranfenikol'e dirençli antibiyotik genleri taşıyan vektörlerdir. İnfeksiyöz hastalıkların tedavisine yönelik DNA aşılarda kullanılmak üzere geliştirilen plazmid vektörlerinde kanamisin'e dirençli antibiyotik genleri taşıyan vektörler geliştirilmiştir.

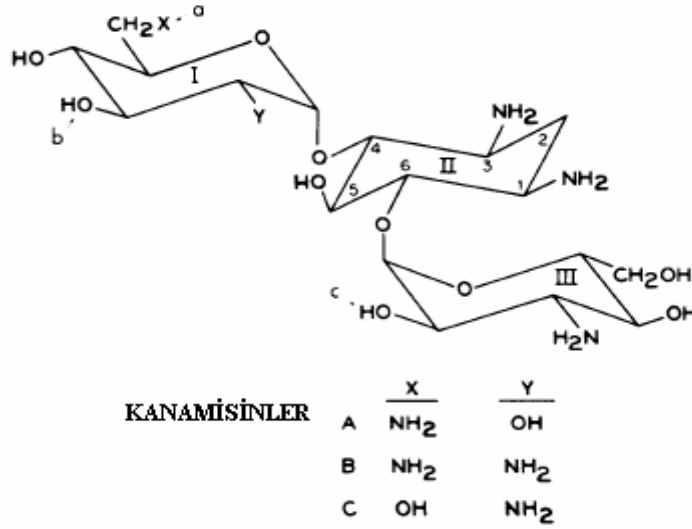
2.1.2.2 Kanamisin

Antibiyotiklerin aminoglikozid ailesinin bir üyesi olan kanamycine ilk kez 1957'de Japonya'da kanamisinin A,B ve C formlarını sentezleyen “*Streptomyces kanamyceticus*” dan izole edilmiştir. Şekil 2.2'de Kanamisin A,B,C formlarının yapısı görülmektedir. Kanamisin A aktivitesi bakterilerin bir çok türüne karşı geniş spektrumlu olup, son yıllarda Gram-negatif basilli bakterilerinin neden olduğu tehlikeli infeksiyöz hastalıkların tedavisinde kullanılan temel antibiyotiktir.

Kanamisinlerin etkisi; Gram-negative bakterilerinin hücre dışı membran porlarından membran potansiyelinden yararlanarak enerji bağımlı prosesle sitoplazmik membrana geçer. Bu antibiyotikler sitoplazmada en az üç ribozomal protein ve ribozomal RNA'nın 30S subünitesi ile etkileşim göstererek, başlangıç kompleksinin zincir uzatma kompleksine geçişini önleyerek protein sentezini engellemektedir.(Sambrook, 2001)

Kanamisin'e karşı direnç (rezistans) bakterilerde bulunan aminofosfotransferaz (APHs) enzimleri ile gerçekleşir. APHs 'ların 7 temel grupları arasında kanamisine karşı direncin oluşumu için seçici marker olarak en yaygın kullanılanları; Tn 903 transpozondan izole edilen Aph (3')-I ve Tn,5'den izole edilen Aph(3')-II vektörleri ile kodlanırlar. Bu vektörler kanamisin inaktivasyonunun gerçekleşmesi için ATP'den bir fosfatı (γ -fosfat) pseudosakkarid'in

3' pozisyonundaki hidroksil grubuna transfer ederek gerçekleştirirler.(Casali N., Preston A., 2003)



Şekil 2.2. Kanamisin A,B,C'nin yapısı

2.1.3 Konakçı Hücre *E.coli*

Konakçılar vektör ve vektörün taşıdığı genin çoğaltılmasında kullanılan hücrelerdir. Klonlama için sıklıkla kullanılan konakçılar, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Streptomyces türleri* gibi bakteri hücreleri *Saccharomyces cerevisiae* gibi maya hücreleri ve Çin hamster yumurta hücreleri gibi memeli hücrelerdir.

İdeal bir konakçı hücre:

- 1) Hızlı üreyebilmeli,
- 2) Ucuz bir kültür ortamında uygun üreme gösterebilmeli,
- 3) Zararlı ve patojenik olmamalı,
- 4) DNA ile transforme olabilmeli,
- 5) Kültür ortamında dayanıklı kalabilmelidir.

DNA teknolojisinde kullanılan *E.coli* konakçı türleri *E.coli* K 12'nin genetik varyantlarıdır. Prokaryotik genlerin ekspresyonu daha ekonomik ve basittir. Daha çabuk sonuç alınır ve daha çok protein elde edilir. Ökaryotik genlerin ekspresyonu için ise daha güçlü konakçı seçenekleri olmalıdır . (K.D.Barut, 2001)

E.coli, pediyatrist ve bakteriyolog olan Theodore Escherich tarafından bebek dışkılarında keşfedilmiştir. *E.coli*, kimyasal besi ortamında hızlı büyüyebilme özelliğinden dolayı model sistem olarak seçilmiş bir mikroorganizmadır. Zenginleştirilmiş besi ortamında logaritmik büyüme fazında her 20-30 dakikada iki kat büyüme özelliği gösterir. Rekombinant DNA deneylerinde kullanılmak üzere izole edilen suşların tümü *E.coli* K-12 suşundan türetilmiştir.

E.coli, normal bağırsak florasına aittir, biyolojik sınıflandırmada da bağırsaklarda yaşayan bakterilerden oluşan enterik bakteriler ailesinde yer alır. Bakteri çubuk şeklinde olup, 4.6 Mb (mega baz) sirküler genomuna sahiptir, boyutları 1-2 um uzuluğunda ve 0.1-0.5 µm çapındadır. Aşağıda ki Şekil 2.3'te *E.coli* bakteri hücrelerinin çubuksu yapısı görülmektedir.



Şekil.2.3 *E.coli* hücrelerinin görünümü

E.coli gram-negatif bir bakteri olduğundan endospor oluşturmaz, pastörizasyon veya kaynatma ile ölür. Memeli hayvanların bağırsaklarında büyümeye adapte olmuş olduğu için en iyi vücut sıcaklığında çoğalır. Moleküler biyolojisi ve genetiği iyi bilinen bir bakteri olduğu için klonlama vektörü olarak çok sık kullanılmaktadır. *E.coli*'de gen klonlanmasında, gen ekspresyonu sırasında ortaya çıkabilen, protein ürününün kontaminasyonun azlığı, dayanıksızlığı, konformasyon bozukluğu gibi sorunlar mevcut değildir. (K.D.Barut, 2001, Casali N., Preston A. , 2003)

E.coli'ye ait alem, takım, sınıf, şube, familya, cins, türden oluşan bilimsel sınıflandırılması çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge2.3 *E.coli*'nin bilimsel sınıflandırılması

Alem	Eubacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gamma Proteobacteria
Takım	Enterobacteriales
Familya	Enterobacteriaceae
Cins	Escherichia
Tür	<i>E.coli</i>
Binominal adı	“Escherichia coli” T.Escherich,1885

Gen Klonlaması ile vektör çoğaltma yönteminde konakçı olarak kullanılan çeşitli *E.coli* suşları mevcuttur. Bilinen *E.coli* konakçı suşları ;DH10B, DH5 α , DM1, JM109, JS5, LE392, STBL4, Gene Hogs ‘dir. Herbir suşun genotipi birbirinden farklı olup herbiri *E.coli* K 12’nin genetik varyantlarıdır. *E.coli* DH5 α konakçısının genotipi; deoR endA1 gyrA96 hsdR17 Δ (lac)U169recA1 relA1 supE44 thi-1 (Φ 80lacZ Δ M15) ifade edilir. Aşağıda çizelge 2.4’te *E.coli* DH5 α konakçısının genotipinde yer alan kısaltmaların özellikleri ve tarifleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.4 *E.coli* DH5 α konakçısının bazı genotip özellikleri ve tarifleri (Casali N., Preston A. , 2003)

Kısaltmalar	Tarif	Özellik
deoR	Regülaor gen mutasyonuna neden olarak deoksiriboz sentezi ile ilgili genin sürekli ekspresyonuna izin verir.	Büyük plazmidlerin replikasyonuna izin verir.
endA1	Spesifik olmayan endonükleaz I'in aktivitesinin kaybolması	İzole edilmiş plazmid DNA'nın verimin ve kalitesini geliştirir.
gyrA96	DNA giraz mutasyonu	Nalidixic aside direnç oluşturur.
hsdR	Eco endonükleaz aktivitesini inaktive eder.	-----
recA	Homolog rekombinasyon kaybolması	Aktarımı yapılan DNA'nın stabilitesini arttırarak konakçı DNA ile rekombinasyonunu önler.
thi	Tiamin biyosentezinin mutasyonu	Tiamin minimal ortamda büyüme için gereklidir.
Ø 80	Ø 80 Profaznı taşır.	Genellikle lac ZΔM15 eksprese eder.
lacZΔM15	B-galaktozidaz geninin kısmi delesyonu	-----
lacZ	B-galaktozidaz aktivitesinin kaybolması	Laktoz kullanımını bloke eder.

2.1.4 Klonlamada Kullanılan Enzimler

2.1.4.1 Restriksiyon Enzimler

DNA fragmentlerinin enzimatik kesiminde kullanılan enzimler kısıtlayıcı endonükleazlar “restriksiyon endonükleazları (RE) ‘dır. Çif iplikli sarmal DNA ‘da özel nükleotid dizilerini tanıyan ve DNA’nın her iki ipliğini kesen enzimlerdir.

Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA’da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işlemini, enzime göre değişmek üzere tanıma yerinde veya bu yerin dışında başka özel bir dizide gerçekleştirirler. Kesim sonucunda küt veya yapışkan uçlu DNA fragmentleri oluştururlar. (G. Temizkan, 2004)

Kısıtlayıcı enzimlerin adlandırılması ilk üç harf cinsin ilk harfi (E) ile türün ilk iki harfinden (co) oluşmaktadır. Bunu soya ait bir isimlendirme (R) ve keşfediliş sırasını gösteren bir Roma rakamı (I) izleyebilir (örn. EcoRI, Eco RII gibi) (J.D. Watson, 1992)

Bazı kısıtlayıcı endonükleazlar, kaynakları ve tanıma kesme bölgeleri çizelge.2.5’te yer almaktadır. (J.D. Watson,1992)

Çizelge 2.5 Bazı kısıtlayıcı enzimleri ve spesifik tanıma – kesme bölgeleri

Mikroorganizma (Kaynak)	Enzim	Tanıma – Kesme Bölgesi
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5'...GG CC...3' 3'...CC GG...5'
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5'...TCGA...3' 3'...AGCT...5'
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5'...GAT ATC...3' 3'...CTA TAG...5'
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5'...GAAGA(N) _n ...3' 3'...CTTCT(N) _n ...5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5'...CTNAG...3' 3'...GANTC...5'

Haemophilus haemolyticus

HhaI

5'... G C G C...3'

3'... C G C G...5'

Providencia stuarti

PstI

5'... C T G C A G...3'

3'... G A C G T C...5'

Microcoleus

MstII

5'... C C T N A G G...3'

3'... G G A N T C C...5'

Nocardia otitidis-caviarum

NotI

5'... G C G G C C G C...3'

3'... C G C C G G C C...5'

2.1.4.2 DNA Ligazlar

Ligazlar hücre içinde çift zincirli DNA moleküllerin tek zincirlerinde meydana gelen kesikleri 3'- hidroksil ve 5'- fosfat uçları arasında kovalent fosfodiester bağlarının oluşumunu katalizleyerek tamir eden enzimlerdir.

Ligaz enzimleri ile kör ve yapışkan uçlu çift zincirli DNA fragmentleri birleştirilir, iki nükleotid arasında fosfodiester bağının eksikliğine bağlı olan kesikler tamir edilir veya bir DNA molekülü halkasal hale getirilir. (Brown.T.A, 1989)

E.coli DNA ligaz, T4 DNA ligaz, Tth DNA ligaz, Pfu RNA ligaz ve T4 RNA ligaz olmak üzere 5 tip ligaz vardır.

2.2 Gen Aktarımı

Hücelere gen aktarımı prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde farklı mekanizmalarla gerçekleşmektedir.

Prokaryotik hücrelerde gen aktarımı DNA parçası alıcı hücreye transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon olmak üzere 3 farklı yolla girebilir. Transformasyonda DNA molekülü genel olarak hücelere kalsiyum klorür çözeltisi ile serbest DNA'yı içeri alma yeteneği kazandırılarak veya elektroporasyon ile sokulabilir. (Temizkan G.,1999)

Transdüksiyonda DNA bir bakteri hücrelerinden diğerine bakteriyel bir virüs (faj) aracılığı ile aktarılırken, konjugasyonda ise DNA bir bakteri hücrelerinden diğerine doğrudan temas ile aktarılır.

Ökaryotik hücrelerde gen aktarımına transfeksiyon denir. Klonlanan ökaryotik DNA'ları memeli hücre kültürlerinde hücelere aktarmak için pek çok yöntem vardır. Bunlar; kalsiyum fosfat, DEAE(dietil aminoetil) dekstran, polibrene/dimetilsülfoksit, protoplast füzyonu, elektroporasyon, çekirdeğe doğrudan enjeksiyon ile transfeksiyon yöntemleri veya viral ve viral olmayan taşıyıcılar ile gen aktarımıdır. (Sambrook J.R, 1989)

2.3 Gen Tedavisi

Gen tedavisi, genetik defektlerin düzeltilmesi amacıyla somatik hücelere nükleotid dizilerinin aktarımı olarak tanımlanmaktadır. Eksik genlerin yerine konması, yanlış veya fazla çalışan genlerin susturulması ve bazı genlerin işlevlerinin değiştirilmesini kapsar. Gen tedavisi, kalıtsal hastalıklar dışında kardiyomiyopatiler, nörolojik hastalıklar, kanser ve AIDS'de uygulanmaktadır. (Kars A., 2004)

Gen tedavisinin başarılı olması için ; karar verilen genin etkili ve yeterli olarak hücre içine taşınması, taşınan genin etkinliğini tedavi boyunca sürdürmesi, bu gene konakçı hücrenin cevabının uygun şekilde olması ve ayrıca bu genin diğer bir hastalığa yol açmaması gereklidir. Gen tedavisi geliştirme programlarında en çok vektör tasarımında ,bunu izleyerek genin regülasyonu ve immün yanıtın engellenmesinde sorun yaşanmaktadır. Gen transfer modellerinde genetik madde hücreye fiziksel, kimyasal yöntemler ve viral vektörler kullanılarak gönderilebilir.

Gen tedavisinde gen aktarımında kullanılmak üzere geliştirilen gen transfer metodları ex vivo ve in vivo olmak üzere iki teknik ile yapılmaktadır.(Kasper K.F., 2004)

2.3.1 Ex Vivo Gen Tedavisi

Gen tedavisinde gen ekspresyonunda birinci yaklaşım genlerin ex vivo manipülasyonunu içerir. Bu yaklaşıma göre istenilen hedef hücreler belirlenir ve dokudan alınır. Hücreler kültür ortamında modifiye edilir ve sonra transplante edilir. Ex vivo gen aktarımı çok çeşitli hücre tiplerine uygulanabilir.

Ex vivo gen aktarım metodu spesifik hücrelerde yüksek etki sağlar, ancak uzun zaman alan bir işlemdir, kompleks ve pahalıdır. Bu metod özellikle hızlı modifikasyon gerektiren işlemler için uygun değildir .

Ex vivo gen tedavisi elektroporasyon, kalsiyum fosfat veya DEAE-dekstran ile transfeksiyon, mikroenjeksiyon ve sonikasyon olmak üzere çeşitli yöntemlerle yapılabilmektedir. (Kasper K.F., 2004, Sambrook J.R, 1989)

2.3.2 In Vivo Gen Tedavisi

Ex vivo yaklaşıma alternatif olan diğer bir yol gen ekspresyonunun in vivo manipülasyonudur. İstenilen genler direk olarak istenilen hücrelere in vivo olarak vektörler aracılığıyla aktarılır. Bu gen aktarımı viral ve viral olmayan taşıyıcı sistemleri ile yapılabilmektedir. Ex vivo metoduna göre daha avantajlıdır. Kültür ve hücre izolasyonunun olmaması maliyeti azaltır, zaman kaybını engeller, donör kaybını azaltır. (Kasper K.F., 2004)

2.3.3 Viral Vektörlerle Gen Tedavisi

Gen tedavisi uygulamalarında viral vektörler viral hastalık oluşturmada terapötik genleri hastanın hücrelerine aktarmak üzere tasarlanmaktadır. Viral vektörler ile yapılan gen tedavisi genetik olarak işlenmiş zayıflatılmış veya hasarlı virüslerin kullanımını içermektedir. İn vivo gen tedavisi için viral vektörler olarak retrovirüsler, adenovirüsler, adeno bağlantılı virüsler, herpes simplex virüsü ve chimeric vektörler en sık kullanılan virüsler olup, lentivirüsler, insan sitomegalovirüs, alfa virüs ve herpes virüs saimiri geliştirilmekte olan diğer viral vektörlerdir. (Robbins P.D., 1989)

2.3.3.1 Retrovirüsler

Viral vektörlerin prototipi olan retrovirüsler, RNA genomlarının DNA kopyasını ters transkriptaz enzimleri ile sentezleyerek konakçı hücrenin DNA'sına entegre olurlar. Özel yöntemler kullanılarak virüsün bağımsız çoğalması engellenir ve yapısal elemanlarını sentezlemesi sağlanarak istenen geni sentezleyen bir üretici hücre oluşturulmaktadır.

Retrovirüsler DNA'ya entegre oldukları için kalıcı uzun süreli infeksiyon sağlamaktadırlar. Retrovirüsler nükleer membrandan geçemedikleri için sadece bölünen hücrelere entegre olabilirler ve konakçıda immun tepki oluşturmazlar.

2.3.3.2 Adenoviral Vektörler

Çift sarmal DNA virüsleri olup genomları 36 kb'dir. İmmunojeniteleri nedeniyle konakçıda inflammasyon ve toksik tepkilere yol açabilmektedirler. Bu etkilerden sorumlu E2 geni çıkarılarak vektör üretme çalışmaları yapılmaktadır. Adenovirüsler 7-8 kb genetik madde taşıyabilmektedirler.

Adenoviral vektörler 1990'da kistik fibrozisin gen tedavisinde akciğer dokusuna afiniteleri nedeniyle kullanılmışlardır. Bölünmeyen hücrelere genetik materyali nakletme yetenekleri nedeniyle ailesel hiperkolesterolemide, nörolojik ve kardiovasküler sistem hastalıklarında kullanılmaları amacıyla çalışmalar yapılmaktadır.

2.3.3.3 Adeno Bağlantılı Viral Vektörler

Gen tedavisinde kullanılan en küçük virüs olup, çoğalabilmek için yardımcı virüse gereksinim duyar ve taşıyabileceği genetik madde küçüktür (4kb). Bölünmeyen hücrelere özellikle hepatosit ve nöronlara genomu integre edebilmektedir.

2.3.3.4 Herpes-Simplex Virüsü

Büyük genomik yapılarından dolayı vektör hazırlanması zor bir süreçtir. Herpes virüsün nörotrop olması bir seçicilik yaratır. İmmunojeniteleri ve sitopatik özellikleri sınırlayıcı faktörlerdir.

2.3.3.5 Chimeric Viral Vektör

“Chimeric” viral vektörler iki veya daha fazla virüsün özelliklerini içeren vektörlerdir. Herpes Simplex virüsü ve adenovirüs vektörleri “plus strand RNA” virüsü olan Sindbis’i hücreye aktarmada kullanılır. Kendi virulent kapsül genleri silinmiş böyle virüsler, yüksek oranda protein üretimine izin veren RNA’larının sitoplazmada replikasyonuna devam edebilme özelliklerini böylece korumuş olurlar. (Robbins P.D., 1989)

2.3.4 Viral Olmayan Vektörlerle Gen Tedavisi

Gen terapisinde başarı, hedef hücreye seçici ve etkili gen aktarımını sağlayan vektörlerin veya taşıyıcıların geliştirilmesine bağlıdır. İnsan vücudunda virüslerin kullanımının güvenliği konusu “non viral” viral olmayan vektör sistemlerinin gelişimine sebep olmuştur.

Viral olmayan vektörler, özellikle basit kullanımı, yüksek oranda üretimi ve spesifik immun yanıtın kısa süreli veya hiç oluşmamasından dolayı gelişim göstermiştir , ancak in vivo uygulama güçlükleri vardır. (Li.S., 2000, Kasper K.F., 2004)

Viral olmayan vektörlerin viral vektörlere üstünlükleri ;

- Toksiditelerinin düşük olması,
- Konakçı hücrede immun yanıt oluşturmaması,
- İstenen hücrelere hedeflendirilebilmeleri
- Konakçı hücre genomuna entegre olmamaları,
- Gen ekspresyonunun fazla olması
- Ticari olarak büyük miktarlarda üretilmeleri,
- Taşıdıkları DNA uzunluğunda bir sınırlamanın olmamasıdır

Gen terapisinde kullanılmak üzere çeşitli non viral sistemler geliştirilmiştir.

- Çıplak plazmid DNA ile direkt gen transferi
- Katyonik lipid (lipopleks) sistemleri ile gen transferi
- Chimeric DNA/RNA oligonükleotidleri
- Reseptör aracılı polikasyon sistemler (örn. Asialoglikoprotein-polilizin molekül sistemleri)
- CPG adjuvantı içeren DNA sistemleri
- Katyonik polimer (polipleks) sistemleri ile gen transferi

1987’de ilk olarak in vitro ortamda katyonik lipidler ile başarılı transfeksiyon uygulaması Felgner ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Katyonik lipidler / DNA kompleksleri (lipopleks) kanser ve kistik fibrosis hastalıklarının birçok klinik uygulamasında kullanılmıştır. Lipopleks sistemlerinin düşük dozda uygulandıklarında güvenli oldukları ısıpatlanmıştır. DNA’ya entegre olamadıkları için kısa süreli tedaviler için uygun olup sınırsız genetik madde taşıyabilirler ve toksiditeleri düşüktür. Ancak in vitro ve in vivo transfeksiyon uygulamaları arasında farklı sonuçlar elde edilmiştir. İn vivo gen transferinde lipoplekslerin fiziksel özelliklerinin biyolojik sıvılarla etkileşiminden dolayı değiştiği düşünülmektedir. Lipopleks konjugatının hedefe ulaşmadan önce yapısının, büyüklüğünün, net yükünün değiştiği bilinmektedir.

Katyonik lipidler genellikle pozitif yüklü baş grubu ve buna bağlı hidrofilik lipid’lerden oluşmaktadır. Yapısındaki hidrofilik lipid grupları lipozomların fiziksel özelliklerini, kinetiklerini ve esnekliklerini etkilemektedir. Katyonik lipidlerin formülasyonlarında tipik olarak katyonik lipidlere ilave olarak zwitterion veya nötral lipidler içermektedir. Yüklü baş grupları monovalent olan lipozom komplekslerinde özellikle plazmid DNA’sının etkili olarak yoğunlaşmadığı görülmüştür.

Katyonik lipidlerin deterjan ve tanponlama özellikleri DNA ‘nın in vivo ve in vitro ortamda serbestleşmesini kolaylaştırmaktadır.

Lipopleks sistemlerinin invivo çalışmalarda karşılaşılan engeller;

- Lipopleks sistemler genellikle hücre içine endositoz ile alındığı kabul görürken, bazı çalışmalara göre kompleks hücre membranı tarafından direk olarak alınmaktadır.
- Lipopleks ile etkileşimden sorumlu hücre yüzeyindeki moleküller kesin olarak tanımlanamamıştır. Proteoglikanların önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir.
- Lipopleks sistemlerin hedef liganda kovalent veya non kovalent bağlanması transfeksiyonun etkisini değiştirmektedir.
- Lipopleks sistemleri ile hücre transfeksiyonunda plazmid DNA’nın endozomdan sitoplazmaya translokasyonu güçtür. Bu amaçla fusogenik (helper) lipid olarak geliştirilen DOPE katyonik lipidi ve fusogenik peptidler kullanılmıştır ve transfeksiyonun arttırılmasında önemli etkileri mevcuttur.
- İn vivo çalışmalarda serumun etkisi ile lipoplekslerin parçalandığı veya dağıldığı ve DNA’nın açığa çıkarıldığı gösterilmiştir. Katyonik lipidlerin endotelial sistem tarafından hızlıca temizlenmesi bu yapıların hedefe spesifikliğini azaltmaktadır.

Transfeksiyonun kısıtlanmasındaki en önemli faktör plasmid DNA'sının nükleer transportunun verimsiz olmasıdır. Birçok çalışmaya göre nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile nükleer transportun olduğu düşünülmektedir. DNA'nın taşınması DNA'nın hacmiyle ilişkilidir. DNA'nın konformasyonunun 'da bu aşamada önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Lineer plasmid DNA'nın nükleusa translokasyonunda plasmid DNA'nın diğer konfigürasyonlarına göre daha etkili olduğu düşünülmektedir. Klasik peptidler veya nükleotid sinyal sekanslarının vektör sistemlere yerleştirilmesi ile DNA'nın nükleer transportunun geliştirilmesi sınırlı başarı sağlamıştır.

Katyonik lipidler nonviral gen terapisi uygulamalarında geniş yer bulmasına rağmen kullanımında bazı sınırlamaları da beraberinde taşımaktadır;

- Katyonik lipidlerin yapıları ve transfeksiyon mekanizmaları henüz iyi karakterize edilmemiştir.
- Lipopleks sistemler hücre içine girebilmelerine rağmen hedeflenen hücreye ulaşması ve gen ekspresyon dereceleri düşüktür.
- Tekrar kullanımlarında yüksek toksidite oluşturmaktadırlar.
- İn vivo olarak anti enflamatuvar cevabı yüksektir.

Küçük hacimli RNA:DNA oligonükleotidleri katyonik lipidler veya polimerlerle elektrostatik etkileşimle veya nötral yada anionik liposomların içine kapsül olarak sarılarak kompleks oluştururlar. Hastalıklı hücrelere chimeric RNA:DNA oligonükleotidi sunularak genin tamir edilmesi (nükleotid eksikliği veya değişikliği) amaçlanmaktadır. Birden fazla nükleotidin mutasyona uğradığı genetik hastalıklara uygulanıp uygulanamayacağı bilinmemektedir. Bu teknoloji in vitro ortamda birçok gende yer alan, spesifik kromozomal mutasyonların düzeltilmesinde başarılı sonuç vermiştir. RNA:DNA oligonükleotid modeli non viral vektör olarak sıçanlarda "Crigler-Najjar sendromu" olarak bilinen hepatosit hücrelerine uygun serum bilirubin düzeyinde uygulanmış ve %50 genotip değişikliğine yol açtığı görülmüştür.

Katyonik lipidlerin DNA ile kompleksleri yüksek oranda sitokinlerin INF- γ ve TNF- α üretimini tetiklediği bilinmektedir. Sitokinler hayvan deneylerinde yapılan incelemeye göre sadece toksiditeye neden olmakla kalmayıp transgen ekspresyonunu inhibe etmektedir. DNA'nın immun hücrelerle spesifik olmayan etkileşiminin önlenmesi amacıyla dokuya spesifik taşıyıcı vektörlerin geliştirilmesi gereklidir, immun cevap oluşturan kompleksler nonspesifiktir. (Li.S., 2000, Kasper K.F. , 2004)

Katyonik polimerler katyonik lipidlere oranla kompleks içinde DNA'nın yoğunlaştırılmasında daha etkilidir. Gen terapisinde non viral polimer vektörleri olarak in vitro çalışmalarda uygulaması en çok olan polimer Polietileniminler (PEI)'dir. Buna karşılık in vivo çalışmalarda toksik etki gösterdikleri bilinmektedir. Jelatin ve Kitosan gibi çalışmalarda denenmiş doğal biyopolimerler ile DNA karıştırıldığında stabil nanopartiküller oluştururlar, gen terapisinde kullanılmak üzere geliştirilen bu polipleks sistemlerin oral aşıların kullanılmasında hedeflenmektedirler. Polylysine, protamine gibi polimerlerin küçük miktarlarının lipopleks sistemlere ilave edilmesi hem in vitro hem de in vivo transfeksiyonun etkisini arttırmaktadır.

Katyonik lipidler veya katyonik polimerler yoğun DNA ile etkileşimlerinin sonucu oluşan lipopleks ve polipleks komplekslerinin kas içine enjeksiyonunda gen ekspresyonunun negatif etkilendiği bilinmektedir.

Viral olmayan vektör sistemlerinde çıplak plazmid DNA ile direkt gen transferi en basit yaklaşım olup, toksidite etkisinin olmaması ve oluşan immun yanıt, organizmayı koruyucudur. Bu oluşan immun yanıtların hayvanları çeşitli infeksiyöz ajanlara karşı koruduğu gözlemlenmiştir. Bu yaklaşım DNA ve tümör aşılarının gelişimini sağlamıştır. Wolff ve arkadaşlarına göre iskelet kaslarına bir viral antijeni taşıyan plazmidin direkt enjeksiyonu antiviral immun yanıtın oluşumuna neden olur. Ayrıca plazmidin intramasküler enjeksiyonu diğer farmakolojik aktif moleküllerin eritropoietin ve leptin'in ifade edilmesine neden olur. Deri, bazı tümör hücreleri ve immun hücreler özellikle dentritik hücreler de çıplak DNA ile gen transferinden etkilenmektedir. Antitümör immunité çeşitli sitokin genleri ve tümör inhibitör genlerinin doku içi enjeksiyonunu indükler. Antitümör etkide tümör büyümesini inhibe etmektedir. Plazmid DNA 'sının intravasküler enjeksiyonu tüm önemli organlarda sınırlı gen ekspresyonu ile sonuçlanır. Buna karşılık 1.5-3.0 ml plazmid DNA'nın hızlı enjeksiyonu özellikle karaciğerde yüksek oranda gen ekspresyonu sağlar. (Li.S., 2000)

Çıplak DNA'nın tabanca ve elektroporasyon gibi fiziksel yöntemlerle transferi'de yapılabilir. DNA, gen tabancası ile hücre nükleusuna kadar ulaşabilmektedir. Elektroporasyon yöntemi ile kas içi plazmid DNA enjeksiyonu etkili oranda gen ekspresyonuna neden olmaktadır.

Genetik aşılar ve gen terapisinde kullanılmak üzere saflaştırılmış plazmid DNA ileri jenerasyon biofarmasötikleri temsil etmektedir. DNA aşı çalışmaları için büyük miktarda

şafıaştırılmış plasmid DNA'nın dūřuk miktarlarda endotoksin kontaminasyonu içermesi gerekmektedir (Madhu V.,2000). Plazmid DNA viral, bakteriyel ve protozoan antijenlerine karşı birçok tūrde örneğin; balık, kedi, fare, insan v.b. antikor ve hūcreseel immun yanıt oluşumunu indūkler. Plazmid DNA aşıları diğer klasik aşılara göre (saflaştırılmış protein ve viral vektörlerle yapılan) daha avantajlıdır. Plazmid DNA'nın aşılarda kullanılması için farmasötik kalitede ve miktarda saflaştırılması gerekmektedir.

Supercoild (sc) veya covalend closed circular (ccc) topolojili pDNA isoformları terapötik uygulamalar için daha stabil yapılarıdır. İstenmeyen topolojikseel pDNA relaks formdur. Bu form aynı zamanda çıplak , open circular veya oc form veya lineer plazmid formu olarak da isimlendirilir. Gen terapisinde invivo uygulamalar için plazmidin formu olduğu kadar konakçı hūcreye ait kirlilikler olan gDNA, RNA, proteinler ve endotoksinlerden uzaklaştırılmış olması gerekmektedir. (Ascher C.,2007)

Plazmid DNA'nın elde edilmesinde önemli ařamalardan biri *E.coli* hūcrelerinin parçalanmasıdır. Bakteriyel hūcrelerin parçalanması fizikseel, kimyasal metodlarla ve enzimatik olarak gerçekleřtirilmektedir. Yūkseel basınçla homojenizasyon, termal parçalama genellikle yūkseel kesici gūcūnden dolayı tercih edilmemektedir. Termal parçalama metodu ise deterjan ve lizozim enzimleri ile birleřtirilerek kullanılmaktadır. Enzimatik ve kimyasal parçalama metodlarında plazmid DNA'sı minimum irreversible parçalamaya uėramaktadır. Enzimatik parçalama sırasında kullanılan lizozim enzimlerinin hayvan kaynaklı olması farmasötik ūrūn olarak deėerlendirilmesini engellemektedir.

pDNA ūretiminde bakteriyel hūcrelerin kimyasal olarak parçalanmasında Birnboim ve Dolly (1979) tarafından ilk olarak açıklanan alkali lizis iřlemi çalıřmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır, özellikle konakçı hūcreye ait gDNA'nın ve proteinlerin denatūre edilerek uzaklařtırılmasında bařarılı bir metoddur. Bu yöntem endūstriyel oranda plazmid ūretilimi için uygun deėildir. Alkali lizis eldesinde kullanılan diėer bir yöntem ısı temelli lizis metodudur (Holmes ve Quigley, 1981). Bu medotla yūkseel verimde plazmid eldesi yapılabilirmektedir ancak plazmid DNA yūkseel oranda denatūre olma riski tařımasından dolayı kullanımı kolay bir metod deėildir.(Lander J.R., 2002)

Birnboim ve Dolly'nin plasmid eldesinde kullanılan prosedūre göre *E.coli* hūcreleri NaOH alkali çözeltisine ve SDS deterjan çözeltisine tabi tutulur. Bu řartlar altında bakteriyel hūcreye ait hūcre duvar yapıları parçalanır, açıėa çıkan plazmid ve diėer hūcre komponentleri sonucunda çözelti viskoz hal alır. g-DNA ve proteinler pH'ya baėlı olarak denatūre olur,

pDNA ise çözeltide bozulmadan kalır. Oluşan viskoz çözeltinin homojenizasyonu plazmid DNA'nın çift zincirinin birbirine tamamlayıcı olmayan kısımlarının birbirine dolaşması sonucu pDNA'nın istenmeyen isoformlarının oluşması engellenmiş olur. Yüksek pH'da muamele süresi pDNA'nın kalitatif ve kantitatif özelliklerini etkilemektedir. Ortama asidik çözeltisinin ilavesi nötralizasyona neden olmaktadır. RNaz enzimi ortama ilave edilerek RNA'nın pDNA'dan enzimatik olarak uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Elde edilen safsızlıkların plazmid içeren çözeltiden ayrılması ve plazmid içeren temiz lizat çözeltisinin elde edilmesi için santrifüj ve filtrasyon işlemleri de önemlidir. (Ascher C.,2007)

Plazmid saflaştırma işlemi normal olarak alkali lizis metoduyla başlamaktadır ve plazmid DNA eldesi sağlanmaktadır. (Wahlund P.O., 2004) Bu metodla etkili olarak bakteriyel hücrelere ait hücre duvarı, organeller, proteinler ve genomik DNA uzaklaştırılırken plazmid DNA'sıyla birlikte önemli miktarda RNA ve az miktarda protein ortamda kalmaktadır. (Wahlund P.O., 2004)

Tedavi amaçlı uygulamalarda RNaz (Rnase A, EC 3.1.27.5) enzimi kullanılarak RNA'nın ortamdan uzaklaştırılması RNaz enziminin hayvansal kaynaklı (sığır pankreasından elde edilir) olmasından dolayı tercih edilmemektedir. (Stadler J.,2004) Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) açıklamasında sığır ve türevi hayvansal kaynaklı enzimler bioterapötik çalışmalarda kullanılmaması gerektiği yer almaktadır. Sığır kaynaklı RNaz enziminin yerine recombinant Rnase enzimi önerilmiş olduğu halde ticari üretimi yüksek maliyet gerektirmektedir. RNA'nın ortamdan uzaklaştırılmasında çeşitli kromatografik metodlar da kullanılmaktadır; örneğin Hidroksi apatit kromatografisi (HA), Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) (Ferreira ve arkadaşları 1997), İyon değiştirici kromatografi (IEC) (Hins ve arkadaşları,1992) ve Triple heliks afinite kromatografisi (Schluep ve Cooney,1998) ancak bu metodların kullanımı saflaştırma işleminin maliyetini arttırmaktadır.

Kromatografik olmayan plazmid DNA saflaştırma adımları ise aqueous-two phase sistemleri (Cole 1991, Ribeiro ve arkadaşları2002), ultrafiltrasyon işlemi (Kahn ve arkadaşları 2000), negatif membran adsorpsiyonu (Kendall ve arkadaşları 2002 ; Levy ve arkadaşları 2000), çeşitli tutucular ve kolon öncesi saflaştırma metodu ekstraksiyon metodudur. Bu metod toksik ve çabuk yanan organik solvent kullanımını içeren laboratuvar protokolüne dayanır (Prazeres 2001) . Plazmid DNA' nın polietilen glikol / tuz sistemleri (Nicoletti ve Condorelli,1993) ile veya sadece polietilen glikol (Marquet ve arkadaşları 1995), ile çöktürülmesi metodları genellikle ikinci bir çöktürme adımına ihtiyaç duyulmaktadır . Genellikle ikinci adımda

çöktürme için Alkol veya Amonyum Sülfat tuzu (Diogo ve arkadaşları, 2000), Amonyum Asetat (Ferreira ve arkadaşları 1999), ve Lityum Klorür (Chakrabarti ve arkadaşları, 1992) kullanılmaktadır .

Plazmid DNA'nın daha seçici olarak çöktürülmesine dayanan önemli bir diğer metod küçük katyonik moleküller olan spermine veya spermidine molekülleri kullanılarak yapılan çöktürme işlemidir. Bu metod üç adımlı bir çöktürme işlemidir. İlk iki adım isopropanollü çöktürmeden oluşur üçüncü adıma ise LiCl tuzu kullanılarak istenmeyen RNA 'nın ortamdan uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Daha sonra küçük katyonik moleküllerin ortama ilavesi ile küçük molekül RNA'ların ortamdan uzaklaştırılması sağlanır (Murphy ve arkadaşları, 2001). Plazmid DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine dayanan diğer bir metod ise sıcaklığın değişimine bağlı olarak çözünürlüğü değişen polimerlerin kullanılmasıdır (Costioli ve arkadaşları, 2003). Bu metod direkt olarak alkali lizis ile kontaminasyonların arınmış lizis çözeltisine uygulanamaz . Lizat çözeltisi alkali lizis'in yüksek konsantrasyonlu potasyum asetat tuzu ile muamele edilmesini gerektirir.

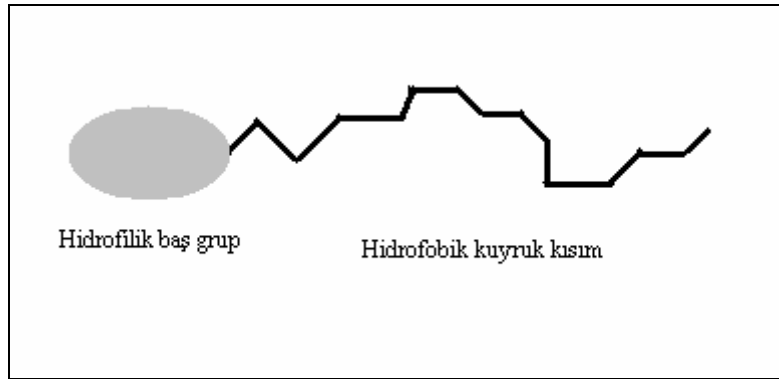
Diğer bir metod ise katyonik yüzey aktif madde olan setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) ile plazmid DNA'nın seçici olarak RNA, endotoksinler ve proteinlerden ayrılmasıdır (Lander ve arkadaşları 2002, Wahlund P.O., 2004).

2.4 Yüzey Aktif Maddeler

Surfaktan maddeler yüzey aktif maddelerdir. Bütün surfaktan maddeler en az iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısım spesifik sıvılarda çözünebilen liyofilik kısmı ve diğeride liyofobik yani çözünür olmayan kısmı teşkil etmektedir. Spesifik sıvı su olduğu zaman, liyofilik kısım hidrofilik liyofobik kısım ise hidrofobik olarak isimlendirilmektedir. Hidrofilik kısım surfaktan maddenin baş grubunu, hidrofobik kısım ise kuyruk kısmını temsil etmektedir. Şekil.2.4'te yüzey aktif maddelerin genel şekli yer almaktadır. Hidrofobik kısım lineer olabildiği gibi dallanmış yapıda gösterebilmektedir. Polar (yükü) baş grupları alkil zincirinin ucundan bağlanarak yüzey aktif maddenin yapısını oluşturur. Hidrofobik zincirin uzunluğu ve polar grupların pozisyonu surfaktan'ın fizikokimyasal özelliklerini belirleyen yapısal parametrelerdir.

Molekölün non-polar (hidrofobik) kısmı yedi çeşit hidrofobik grup ile karakterize edilir; (Saraç.A.,2001)

- Doğal yağ asitlerinden türetilmiş 8-18 C'lu düz zincirli alkil grupları (bitkisel veya hayvansal kaynaklı)
- Bir aromatik çekirdeğe bağlı 3-8 C'lu düşük alkil grupları,
- Benzenle yoğunlaştırılabilen 8-20 C atomlu dallanmış monoolefinler,
- Kerosen , gaz yağı veya parafin wax fraksiyonundan türetilmiş 8-20'den fazla C atomlu modifiye edilmiş petrol hidrokarbonları,
- Petrolün bazı tiplerinden naftenik asit,
- Fischer-Tropsch ve benzeri sentezlerden türetilmiş yüksek alkoller ve hidrokarbonlar,
- Terpenler veya terpen-alkoller tarafından modifiye edilmiş aromatikler.



Şekil 2.4 Yüzey aktif maddelerin (surfaktan) genel şekli

Surfaktanların sınıflandırılması polar (hidrofilik) baş grubunun elektriksel yükü esas alınarak yapılmaktadır.

Surfaktanlar hidrofilik grupların etkilerine göre;

- Non-iyonik Yüzey aktif maddeler,
- Anyonik Yüzey Aktif Maddeler,
- Katyonik Yüzey Aktif Maddeler,
- Amfoterik Yüzey Aktif Maddeler,

olarak sınıflandırılmaktadırlar. Bu sınıflar çözeltideki molekülün iyonik karakterini gösterir.

Non-iyonik yüzey aktif maddelerde polieter veya polihidroksil polar grupları, anyonik yüzey

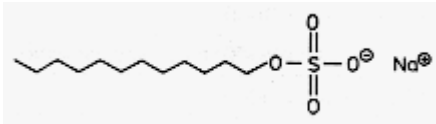
aktif maddelerde karboksilat, sülfat, sülfonat ve fosfat grupları, katyonik yüzey aktif maddelerde amin veya kuarterner amonyum bileşikleri , amfoterik yüzey aktif maddelerde ise genellikle pozitif yüklü polar grup olarak amonyum, negatif yüklü polar grup olarak ise karboksil bulunmaktadır.(Holmberg L.J.,1998)

Surfaktan maddeler çözündükleri ortamın yüzey gerilimini ve/veya yüzeylerarası gerilimi indirgeyerek ortamda yer alan kirlilik veya istenmeyen maddelerin uzaklaşmasını yada birbirinden ayrılmasını sağlarlar. Bu maddelerin kendiliğinden bir araya gelme(kendiliğinden yapılanma), emülsifiye etme özellikleri de vardır. Sentetik veya doğal orjinli molekül ağırlığı 600-4000 g/mol olan noniyonik, katyonik ve amfoterik yüzey aktif maddeler aşılarda ajuvant olarak da kullanılmaktadırlar (Ascarateil S.,2006)

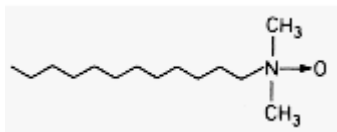
Sulu ortama ilave edildiklerinde uzun hidrofobik zincirler molekül içi hidrofobik etkileşimlerden dolayı bir araya gelir ve molekül organize olarak üç boyutlu küresel yapısını oluşturur. Bu yapıya misel yapı denir. Misel yapı hidrokarbon çekirdeğinden ve yüzeyde polar gruplardan meydana gelir. Bazı surfaktanlar ise misel yapı oluşturmadan tek bir tabaka “monolayer” oluşturarak suyun yüzeyini kaplarlar.

En çok bilinen ve biyokimyasal uygulamalarda kullanılan yüzey aktif maddeler;

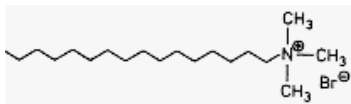
- Sodyum dodesil sülfat (anyonik),



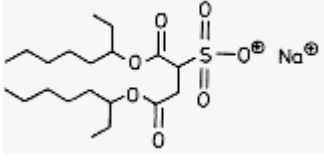
- Laurildimetilamin-oksit (LDAO) (noniyonik) ,



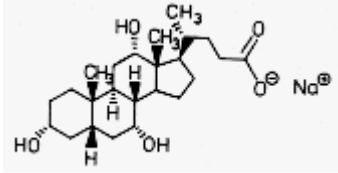
- Setiltrimetilamonyum bromür(CTAB) (katyonik),



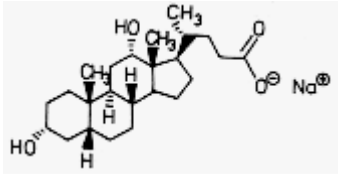
- Bis(2-etilhekzil)sülfosüksinat'ın sodyum tuzu (katyonik),



- Sodyum kolik asid (anyonik),



- Sodyumdeoksi kolik asid'dir (anyonik) .



2.4.1 Katyonik Yüzey Aktif Maddeler

Katyonik surfaktant maddeler yapılarında yer alan azot atomunun katyonik elektriksel yük taşımasından dolayı katyonik yüzey aktif maddeler olarak adlandırılmaktadırlar. Yapısında amin ve kuarterner amonyum bileşikleri bulundurmaktadırlar. Kuarterner amonyum bileşikleri HCl ve H₂SO₄ ile nötral tuz oluşturan kuvvetli bazlardır. Katyonik yüzey aktif maddeler, anyonik yüzey aktif maddelerle ve polivalan anyonlarla geçimsizdirler. Noniyonik ve zwitter iyonik yüzey aktif maddelerle uyumludurlar (Rosen M.J., 1978). Sınıflandırılmaları aşağıdaki şekilde yapılmaktadır;

1. Uzun zincirli aminler ve tuzları,
2. Diamin, poliamin ve tuzları,
3. Kuarterner amonyum tuzları,
4. Polioksietillenmiş uzun zincirli aminler
5. Polioksietilenli kuarternize olmuş uzun zincirli aminler

2.5 Gen Tedavisinin Etik Yönü ve Geleceği

Gen tedavisinde gen aktarımı germ hücrelerine değil, somatik hücrelere yöneliktir. Genel olarak invitro koşullarda aktarılan geni taşıyan hücreler hastaya daha sonra verilmektedir. Tedavi olanağı kısıtlı ya da olmayan ciddi hastalıkların gen tedavisi etik kurallara uymaktadır. Genetik hastalıkların tedavisinde germ hücrelerinin manipulasyonu durumunda kişinin genetik yapısının parçası olacak bu değişiklik çocuklarına da aktarılacaktır, bu durum sakınca yaratmaktadır.

Genetik mühendislik yöntemleri ile somatik hücrelerde ve hatta germ hücrelerinde yapılabilecek değişikliklerle boy, göz, rengi ve zeka gibi özelliklerle oynamak ileride mümkün olabilir ama bu tür yaklaşımın yoğun tartışmalara yol açacağı kesindir. Gen tedavisinin somatik hücrelere yönelik ve ciddi hastalıklarla sınırlı kalması bugün için en uygun durumdur. Gen tedavisi ve kanserin ilaçlarla tedavisinde, ilacın verilmesi, hedefe ulaşması, seçiciliği ve etkisi gibi bazı ortak sorunlar vardır. Bu sorunlar kanserin genetik kökenleri ve kanser hücresinin biyolojisinin anlaşılmasıyla daha kolay aşılabilecektir. Bu konuda çalışmaların vektör tasarımı teknolojisine yoğunlaşmış olması, vektörlerin transgenlerini daha çok tümör hücrelerine aktarmalarını sağlamak ve tümör hücrelerinde tedavinin seçiciliğini arttırmayı hedeflemektedir. Bununla birlikte vektörler, gen transferi ve ekspresyonu konusunda bilinmeyenler, bilinenlerden daha fazladır .

- Vektör raftan alınıp hastaya enjekte edilebilmeli ve bu vektör metabolik bozukluğun bulunduğu dokuya hedeflenmiş olmalıdır.
- Vektör hücreye ulaştığı zaman ya kromozomda emniyetli bir bölgeye yerleşmeli veya bozuk gen ile homolog rekombinasyon sonucu doğru yere oturmalıdır.
- Aktarılan gen metabolik değişikliklere uygun yanıt verebilmelidir.

Bu koşullar sağlandığı zaman gen tedavisi, ilaç tedavisinin yüksek teknolojik uygulaması haline gelecektir. Tüm güçlüklerle ve bilinmeyenlere karşın önümüzdeki yüzyıl gen tedavisinin yaygın kullanılacağı bir dönem olmaya adaydır.(Ayşe K.,2004)

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agaroz	Sigma, ABD
Asetik asid	Sigma, ABD
Amonyum Sülfat	Sigma, ABD
Bromfenol mavisi	Sigma, ABD
Etilendiamintetra Asetik Asid (EDTA)	Sigma, ABD
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma, ABD
Etanol	Sigma, ABD
Glasial Asetik Asid	Sigma, ABD
Glukoz	Sigma, ABD
Gliserol	Sigma, ABD
Hidroklorik Asid	Sigma, ABD
İzopropanol	Sigma, ABD
Kanamisin	Sigma, ABD
Kalsiyum Klorür	Merck, Almanya
Kloroform	Merck, Almanya
N,N,N-Polyoxyethylene (10)-N-tallow-1,3-diaminopropane, (PEG-10 tallow)*	Sigma, ABD

* Plazmid DNA saflaştırılması için çöktürücü katyonik yüzey aktif madde olarak kullanıldı. Literatürde Peg-10 tallowun yapısal karakterizasyonu ile ilgili döküman bulunamadığından FTIR, NMR (¹³C, ¹H), Elementer Analiz incelemesi yapıldı.

Polietilen Glikol 600 (PEG-600) [†]	Sigma, ABD
Potasyum Asetat	Sigma, ABD
Sodyum hidroksit	Sigma, ABD
Sodyum dodesil sülfat	Sigma, ABD
Trizma Baz	Sigma, ABD
Tripton	Sigma, ABD
Triton X-100	Sigma, ABD

3.1.2 Biyolojik Maddeler

Ribonükleaz Enzimi (Rnase)	Sigma, ABD
PVACX/LacZ plazmidi	Invitrogen, ABD
E.Coli DH5α Bakteri Suşu	Invitrogen, ABD

3.1.3 Malzemeler

Plazmid Saflaştırma Kiti	Qiagen, ABD
Steril Pipet Kutusu	LP, İtalya
Pipet Ucu	Eppendorf, Almanya
Eppendorf Tüpler	Eppendorf, Almanya

3.1.4 Kullanılan Cihazlar

CHNS-O Analyzer	Thermo Electron Corporation
Fluoresan Spektrofotometre	Time Master Control Module
FT-IR Spectrometer	Perkin Elmer, Spectrum One

[†] Aqueos Two Phase Polimer/tuz sisteminde non iyonik polimerik madde olarak molekül ağırlığı 600 gr/mol olan likid ve şeffaf renkli, sulu ortamda çözülebilen polietilen glikol 600 polimeri kullanıldı.

Jel Elektroforezi	Hoefer HE-33
Jel Görüntüleme Aleti	Bio-Rad, Gel Doc 1000 system,USA
Elektroforez güç kaynağı	Bio-Rad, Powerpac 200, USA
Etüv80 °C	Memmert, Almanya
-70 °C Dondurucu	Heraeus Instrumenrs, Almanya
Otoklav	Minho Üniversitesi, Portekiz [‡]
pH Metre	Hannan, 8417
Soğutmalı Santrifüj Aleti	Minho Üniversitesi, Portekiz
UV Spektrofotometre	Jasco Model, 7850
Kondüktometre	WTW Cond 340 İ
Otomatik Mikropipet (1-20 µl)	Eppendorf, ABD
Otomatik Mikropipet (20-200 µl)	Eppendorf, ABD
Otomatik Mikropipet (100-1000 µl)	Eppendorf, ABD
Otomatik Mikropipet(1000-5000 µl)	Eppendorf, ABD
Nükleer Magnetik Rezonans	BÜ, Türkiye [§]
İnkübatör	HT Infors, Minitron
Vorteks	Thermolyne, USA
Destile su Cihazı	Elix, Millipore, France
Deiyonize Su Cihazı	MilliQ, Millipore, France
Manyetik Karıştırıcı	Yellow line, MSH basic, Germany

[‡] Minho Üniversitesi'nin (Portekiz) Biyoloji-Kimya Laboratuvarından bulunan soğutmalı santrifüj ve otoklav cihazları kullanılmıştır.

[§] Nükleer Magnetik Rezonans Spektrumları Boğaziçi Üniversitesinde alınmıştır.

Hassas Terazî

Gec Avery, İngiltere

Kaba Terazî

Gec Avery, İngiltere

Buzdolabı -4⁰C-8 ⁰C

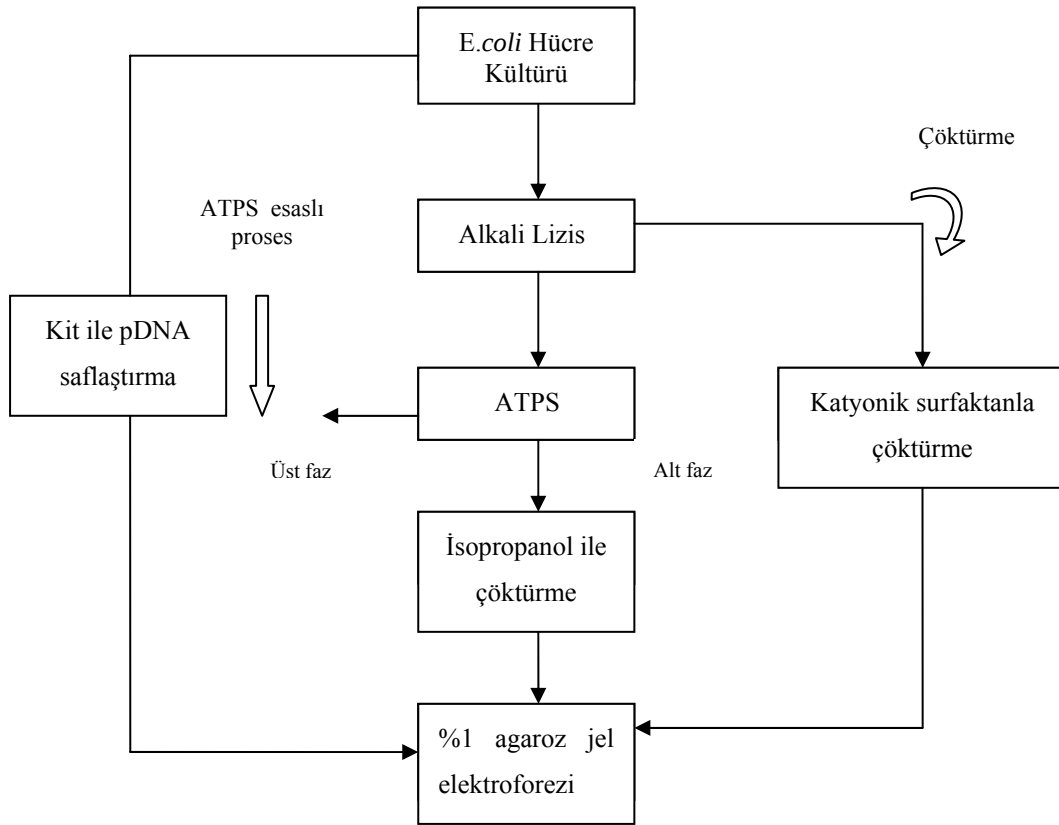
Bosch, Türkiye

Devar Kabı

Dilvac, İngiltere

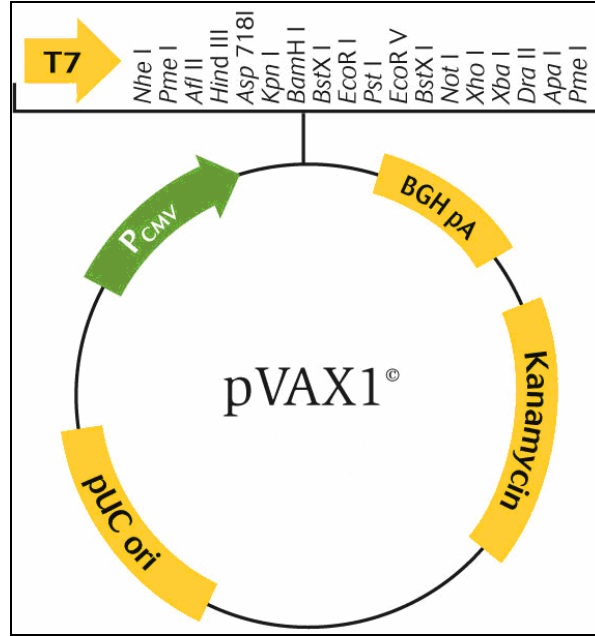
3.2 Kullanılan Yöntemler

pDNA'nın saflaştırılması için kullandığımız yöntemlerin akım şeması Şekil 3.1'de verildi. Şekil 3.1'deki sistemin her bir basamağı aşağıda her bir bölümde tek tek açıklandı.



Şekil 3.1 pDNA saflaştırılması yöntemlerinin akım şeması

3.2.1 Genetik Materyalin Seçimi



Şekil 3.2 pVAX plazmid vektörünün haritası

Model plazmid olarak 6050 bp baz çifti (6,1 kbp) içeren ve DNA aşısı için Invitrogen tarafından geliştirilen Col E1-type plazmid pVAX1/lacZ seçildi. pVAX1/lacZ vektör promotor olarak (immediate-early promotor) İnsan cytomegalovirüsü, BGH poliadenil sekansı ve bazı bireylerde ampisilinin allerjik reaksiyon oluşturduğu bilindiğinden dolayı *E.coli*'de kanamisine karşı direnç sağlayan antibiyotik direnç geni içerir. Model plazmidin *E.coli*'de replike olabilmesi için pUC'den türetilmiş bir pMB1 orijini, T7 promotor diziler ve beta galactozidase enzimini kodlayan *lac Z* geni içermektedir. (Carlos ve ark.,2005)

3.2.2. pVAX1/lacZ Plazmidi İhtiva Eden *E.coli* DH5α Hücrelerinin Çoğaltılması

3.2.1.1 Gerekli Çözeltiler

1. LB Besiyeri'nin Hazırlanması

pVAX1/lacZ plazmidi ihtiva eden *E.coli* DH5α hücrelerinin çoğaltılması için Luria Bertani sıvı besiyeri ortamı seçildi. LB besiyerinin içeriği aşağıda ki gibidir;

Maya Ekstresi.....5.0 gr

Tripton.....10.0 gr

Sodyum Klorür.....10.0 gr

Distile su.....1000 ml

Yukarıda belirtilen miktarlarda maya ekstresi, tripton, sodyum klorür maddeleri 800 ml destile suda çözülür .Hazırlanan LB besiyerinin pH'sı 7.4'e NaOH ile ayarlanır ve hacim 1000 ml'ye tamamlanır.

2. Kanamisin Antibiyotik Çözeltisinin Hazırlanışı

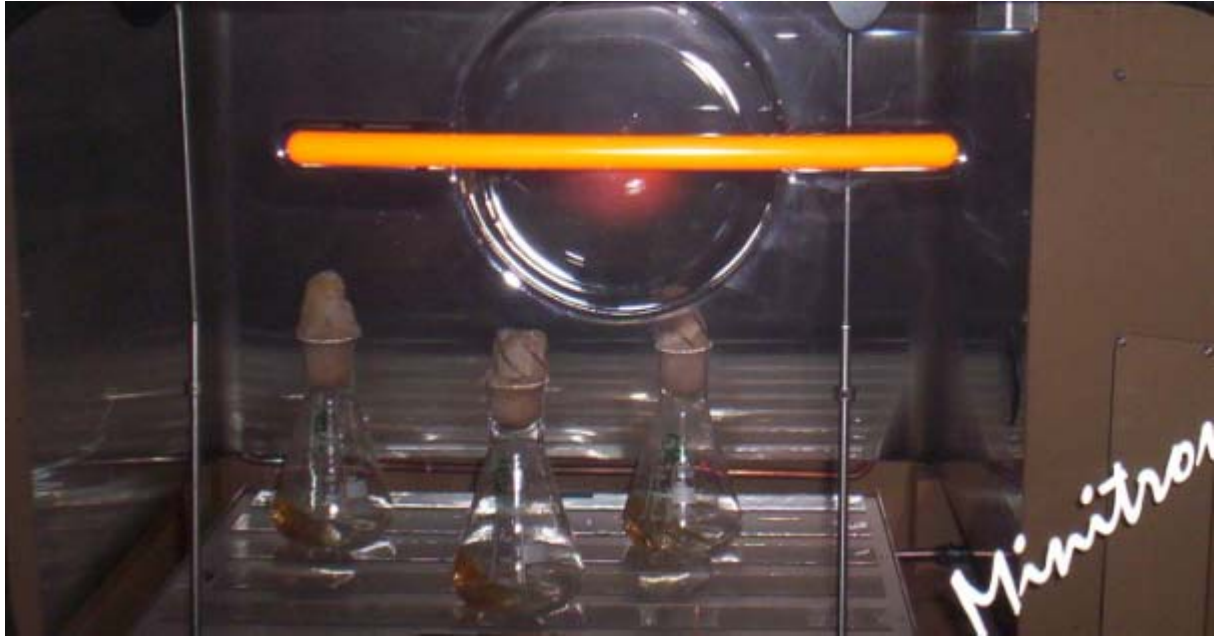
pVAX1/lacZ plazmidinin gen haritasını gösteren şekil 3.1'de görüldüğü gibi pVAX1/lacZ'nin yapısında kanamisin direnç geni bulunmaktadır. LB besiyerinde çoğaltılacak olan *E.coli* DH5α hücrelerinin pVAX1/lacZ plazmidi ihtiva edenlerin çoğaltması için besiyeri ortamına kanamisin antibiyotik çözeltisinin ilave edilmesi gerekir.

30 µg/ml kanamisinli 25 ml'lik ve 250 ml'lik LB besiyeri ortamını oluşturmak için 30 mg/ml kanamisin stok çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlandı;

30 mg kanamisin 1 ml steril suda çözüldü ve 0.20 µm steril filtreden geçirilerek (non-pyrogenic sterile-R 0.20 µm) steril tüpe aktarıldı. Hazırlanan çözelti çalışma boyunca buzdolabı sıcaklığında korundu, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

3.2.1.2 Deneyin Yapılışı

1. pVAX/lac Z plazmidinin *E.coli* DH5 α hücreleri ile transformasyonu yapılmış hücre örnekleri İnvitrogen üretici firmasından temin edildi. Temin edilen örnekler -70 $^{\circ}$ C'de saklandı.
2. 1. maddede ifade edilen örneklerden 0.5ml alınıp 25 ml LB besiyeri içeren erlenlere ilave edildi. 25 μ l kanamisin antibiyotik çözeltisi besiyerine eklendi. Bu örnekler yatay çalkalayıcı su banyosunda 37 $^{\circ}$ C 200 rpm'de 14 saat inkübe edildi .



Şekil 3.3 Kanamisinli LB besiyeri ortamına ilave edilmiş pVAX1/lacZ ihtiva eden *E.coli* DH5 α hücre kültürü örnekleri

3. Örnekler inkübasyon tamamladıktan sonra 1/10 oranında seyreltilip ve 600 nm'de optik dansitesi (OD) okundu .
4. 250 ml LB besiyerinde başlangıç absorbansı 0.2 olacak şekilde hacim hesaplaması yapılarak 25 ml LB besiyerinden örnek alındı ve 250 ml LB ortamına aktarıldı. Örnek ilave edilmeden önce yeni LB ortamına 250 μ l kanamisin çözeltisi ilave edildi. Örnekler 37 $^{\circ}$ C de ve 200 rpm'de inkübe edildi .
5. İnkübasyon sırasında 1.5 saat arayla örnekten bir miktar alınıp çoğalmanın maksimum noktası belirlendi ,ve inkübasyon tamamlandı.
6. Elde edilen hücre çözeltisi 5400 rpm'de 10 dakika 4 $^{\circ}$ C'de santrifüj edilerek süpernatanttan ayrıldı. Hücreler -20 $^{\circ}$ C'de saklandı.

3.2.2 Optik Yoğunluk Tayini ile Hücre Sayımı

Yeterince ve gerekli maddeleri alan, sentezleyen ve latent fazı geçen mikroplar kendi türlerine özgü bir generasyon süresi içinde ve belli aralıklarla bölünerek çoğalmaya başlarlar.

Logaritmik gelişme dönemleri içinde bulunan mikroorganizmalar hızlı çoğalma içindedirler ve hücre ölümleri yeni hücre oluşum hızı ile kıyaslandığında son derece azdır. Bu dönemde elde edilen parametre canlı hücre sayısını doğru yansıtmaktadır.

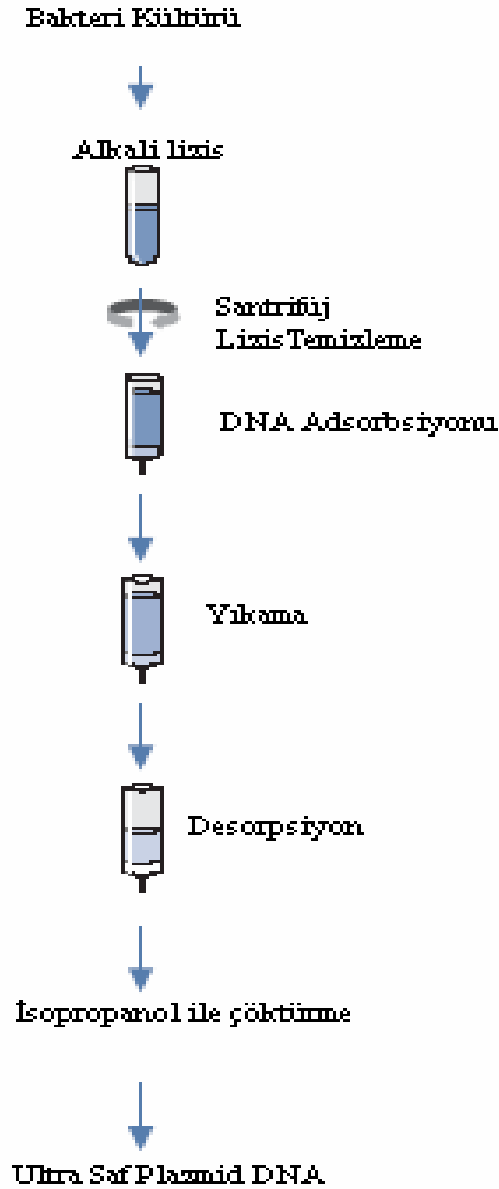
Lambert- Beer kanununa göre, hücre süspansiyonundan geçen ışığın yoğunluğu (I) girişteki ışığın yoğunluğuna göre (I_0) azalır. O_D hücre süspansiyonundaki biyomas (hücre) konsantrasyonu (c) ile doğru orantılıdır.

E.coli gibi pigment içermeyen bakterilerin optik yoğunluk 600 nm'de ölçülmektedir. Optik yoğunluk ölçümlerinde OS veya 103 tipi cam küvetler kullanılmaktadır.

E.coli hücreleri 20 dakikada hücre süspansiyonun yoğunluğu $2-3 \times 10^9$ hücre/ml ulaşmaya kadar bölünür. 1 O_D 600 nm dalga boyunda 0.8×10^9 hücre/ml 'ye karşılık gelmektedir. (Hardy K.G.,1993)

3.2.3 Referans Olarak Kullanılacak Plazmid DNA'sının Kit ile Saflaştırılması

Kit ile *E.coli* DH5 α konakçısına plazmid DNA saflaştırılması işlemi Qiagen Inc® firmasından temin edilen “Qiagen Plazmid Mega and Giga Kits” protokolünün uygulanması ile gerçekleştirildi. Şekil 3.4'te kit ile plazmid DNA saflaştırılması işleminin basamakları görülmektedir. Bu işlemin basamakları aşağıda tek tek açıklandı.



Şekil 3.4 Plazmid DNA için saflaştırma basamakları (Qiagen Plazmid Inc® Kit Protokolü)

3.2.3.1 Gerekli Çözeltiler

Kit ile plazmid DNA saflaştırılması işlemi sırasında kullanılan çözeltiler ve çözeltilerin içeriği aşağıda çizelge 3.2’de verildiği gibidir. Qiagen Inc® firmasından temin edilen “Qiagen Plazmid Mega and Giga Kits” protokolünden alınmıştır.

Çizelge 3.2 Plazmid saflaştırma kitinde kullanılan tampon çözeltileri (Qiagen Inc® Plazmid Kit Protokolü)

TAMPON	BİLEŞİMİ	MUHAFAZA KOŞULLARI
Tampon P1 (Süspansiyon Tamponu)	50 mM Tris-HCl, pH:8.0 10 mM EDTA 100µg /mlRnase A	2-8 °C
Tampon P2 (Lizis Tamponu)	200mM NaOH, %1 SDS	Oda sıcaklığı
Tampon P3 (Nötralizasyon Tamponu)	3.0 M potasyum asetat pH:5.5	Oda sıcaklığı veya 2-8°C
Tampon QBT (Adsorpsiyon Tamponu)	750 mM NaCl 50mM MOPS, pH:7.0 %15 isopropanol (v/v) %0.15 Triton X-100 (v/v)	Oda sıcaklığı
Tampon QC (Yıkama Tamponu)	1M NaCl 50 mM MOPS, pH:8.5 %15 isopropanol	Oda sıcaklığı
Tampon QF (Desorpsiyon Tamponu)	1.25 M NaCl 50mM Tris-HCl, pH:8.5 %15 isopropanol (v/v)	Oda sıcaklığı

3.2.3.2 Deneyin Yapılışı

1. Bakteri kültürü

3.2.1.2 bölümünde anlatıldığı gibi pVAX1/lacZ plazmidli *E.coli* DH5 α bakteri hücreleri 250 ml'lik LB besiyeri ortamında 37°C'de 200 rpm'de çoğaltılarak, +4°C'de santrifüj edilen örneklerden bakteri kültürü oluşturuldu.

2. Alkali lizis işlemi

Kit ile pDNA saflaştırılması işleminin ikinci basamağı alkali lizis işlemidir. Tablo 3.2 'de gösterilen Tampon 1(süspansiyon), Tampon 2(lizis), ve Tampon 3 (nötralizasyon) çözeltileri kullanıldı.

Tampon 1 çözeltisi kullanılmadan önce RNaz A çözeltisi tampon 1 çözeltisine ilave edilir ve bakteriyel hücreler vorteks ile karıştırılarak süspansiyon edilmesini sağlanır. Elde edilen çözeltiye Tampon 2 çözeltisinin ilave edilmesi ile genomik DNA'nın çökmesi sağlandı. Bu aşamada elde edilen çözelti viskoz görünüm kazandı. Kit ile alkali lizis işleminin son aşamasında Tampon 3 çözeltisi kullanılarak genomik DNA, protein ve *E.coli* DH5 α bakteri hücre duvarları parçalanarak çöker. Lizat çözeltisi daha az viskoz haline gelir, ancak kabarık beyaz materyallerin lizat örneği içinde görüntüsü belirginleşir.

3. Lizat örneğini temizleme işlemi

Alkali lizis işleminden sonra lizat örneği santrifüj edilir. pVax1/lacZ plazmid DNA'sını içeren süzüntü çökeltiden ayrılır. Örnek kolona verilmeden lizat örneğinin şeffaf olması ve partikül içermemesi istenir.

4. DNA adsorpsiyonu işlemi

Yüksek kopya sayısına sahip plazmid olan pVax1/lacZ plazmidinin saflaştırılmasının DNA adsorpsiyon, yıkama ve desorpsiyon işlemleri için kullanılacak kolon protokolün önerisi doğrultusunda seçildi. Seçilen kolon içeriği Tablo 3.2'de gösterilen QBT tamponu ile yıkanarak kolonun yüzey gerilimi düşürüldü. Lizat örneğini temizleme aşamasında elde edilen pDNA içeren temiz lizat örneği kolona uygulandı. pDNA'nın kolona adsorbe edilmesi sağlandı.

5. Yıkama işlemi

Kolonda adsorbe edilen pDNA QC tampon çözeltisi ile yıkanarak pDNA ile birlikte adsorbe edilmiş özellikle protein maddelerinin ve diğer istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması sağlandı.

6. Desorpsiyon işlemi

Kolona adsorbe olmuş ve yıkanmış pDNA örneği tablo 3.2 'de içeriği yer alan QF tamponu ile kolondan elue edildi.

7. İsoopropanol ile çöktürme işlemi

Elue edilen pDNA çözeltisine isopropanol ilave edilerek hızlıca karıştırılır ve santrifüj edilir. Süzüntü çökeltiden ayrılır ve saf pDNA içeren çökelti etanol ile yıkanır, santrifüj edilir ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Kurutulan çökelti Tris HCl çözeltisinde çözünerek elde edilen saf plazmidin çözeltisinin konsantrasyonunu belirlemek için spektral analizi yapılır.

Yüksek kopya sayısına sahip plazmid olan pVax1/lacZ plazmidinin saflaştırılmasının DNA adsorbsiyon, yıkama ve desorbsiyon işlemleri için Qiagen-tip 2500 kolonu protokolün önerisi doğrultusunda seçildi. “Qiagen Plazmid Mega and Giga Kits” ile pDNA saflaştırılması işlemi boyunca kullanılan kolonlar tek kullanımlıktır.

3.2.3 Spektral Yöntem ile DNA Analizi

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorbsiyon özelliği gösterir. 260 nm’de ölçülen absorbsiyon saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarının belirlenmesinde kullanılır.

Çift zincirli DNA molekülleri için 1 optik dansite (OD) 50 µg/ml ye karşılık gelir.Çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik izlenir;

$$\text{DNA (ug/ml)} = A_{280} \times \text{seyreltme oranı} \times 50 \quad (3.2)$$

Tek zincirli DNA ve RNA molekülleri için 1 optik dansite (OD) 40 µg/ml’ye karşılık gelir. Tek zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik izlenir;

$$\text{DNA(ug/ml)} = A_{260} \times \text{seyrltme oranı} \times 40 \quad (3.3)$$

260 nm ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Saflaştırılmış DNA'da A_{260} / A_{280} oranı yaklaşık 1.75-1.80'in üzerinde olmalıdır. (Hardy K.G.,1993)

3.2.4 pVAX/lacZ Plazmidli E.coli DH5α Hücrelerine Alkali Lizis İşleminin Uygulanması**

3.2.3.3 Gerekli Çözeltiler

- **Çözelti (Buffer) 1**

(Süspansiyon Çözeltisi)

50 mM glukoz veya S/RNase

10 mM EDTA

25 mM Tris-HCl

Çözeltinin pH'sı 8 'e 1 M HCl ile ayarlanmıştır.

- **Çözelti (Buffer) 2**

(Lizis Çözeltisi)

1% SDS(w/v)

200 mM NaOH

- **Çözelti (Buffer) 3**

(Nötralizasyon çözeltisi)

3M CH₃COOK

11.5 % (v/v) glacial asetik asid

** Bu bölümde kullanılan alkali lizis işlemi Birnboim & Dolly tarafından 1979'da yayınlanan alkali lizis ile plazmid saflaştırma işlemi referans alınarak Minho üniversitesinde Kimya Biyoloji laboratuvarında (Portekiz) geliştirilmiştir.

3.2.3.4 Deney Yapılışı

- 1- 250 ml LB ortamında çoğaltılan ve çöktürülen pVAX1/lacZ plazmidini içeren *E.coli* DH5 α hücrelerine 8 ml çözelti 1'den ilave edildi. Hücrelerin süspansiyonu sağlanana kadar vorteksle karıştırma yapıldı.
- 2- Süspanse olmuş hücrelerin oluşturduğu lizatta çözelti 2'den 8 ml manuel karıştırma gerçekleştirilerek ilave edildi. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Genomik DNA'nın ayrılmasını sağlamak için vorteks yerine manuel karıştırma tercih edildi. Lizat viskoz görünüm kazandı.
- 3- Lizata 8 ml çözelti 3'ün manuel karıştırma sağlanarak ilave edilmesi ve örneğin 10 dakika buz banyosunda bekletilmesinden sonra genomik DNA, protein ve hücre kalıntısı içeren beyaz çökelti oluştu. Çözelti 3 lizata ilave edilmeden önce buz banyosunda bekletildi.
- 4- Lizattan çökeltiyi uzaklaştırmak ve süzüntüde kalan plazmid elde etmek için 15000g'de 20 dakika 4°C şartlarında santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- 5- Elde edilen süzüntünün temizliğinden emin olunmadığı durumlarda santrifüj işlemi şartlar değiştirilmeden bir yada iki kez tekrar edildi.
- 6- Yukardaki işlemlerin sonucunda lizat örneğinden genomik DNA, *E.coli* DH5 α hücre duvarı ve protein çöktürülerek uzaklaştırıldı.
- 7- Yukarıda anlatılan alkali lizis işlemi sonucunda pDNA ve RNA içeren lizat örneği polimerik yüzey aktif maddeler ile RNA'dan uzaklaştırılarak, saflaştırılması için geliştirilecek yöntemde kullanılmak için -4°C'de saklandı.

3.2.4 Alkali Lizis Metodu

SDS deterjan maddesi ile kombine alkali lizis işlemi (Birnboim & Dolly,1979) ile *E.coli* hücrelerinden plazmid DNA'sının izolasyonu 20 yıldır kullanılan bir yöntemdir. Bakteriyel süspansiyonun anyonik deterjan ile yüksek pH'da muamele edilmesi ile bakteriyel hücre duvarları açılır. Kromozomal DNA ve protein denatüre olur, açığa çıkan plazmid DNA süpernatanta geçer. Alkalin çözeltileri baz çiftlerini tamamen bozsa da ccc p(DNA)'sına veya sc p(DNA)'sına ait baz çiftlerini bu molekülün topolojisi yüzünden bozamaz.

Lizis işlemi süresince bakteriyel protein, kırılmış bakteriyel hücre duvarları ve denatüre edilmiş kromozomal DNA dodesil sülfat ile kaplanmış büyük bir kompleks haline gelir. Bu kompleks sodyum iyonları potasyum iyonları ile yer değiştirdiğinde etkili bir şekilde çöker. Denatüre edilmiş materyalin santrifüj ile çöktürülmesi ile plazmid DNA süpernatantta kalarak

elde edilir.

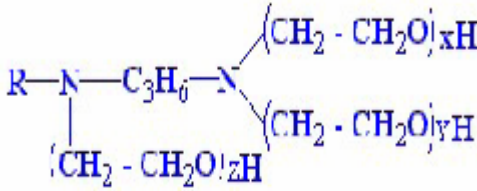
SDS varlığında alkali lizis işlemi ile *E.coli* bakteri hücrelerinin farklı suşlarının 1 ml ile 500 ml'lik kültür ortamlarına uygulanabilir bir yöntemdir. (Sambrook J.R, 1989)

3.2.5 Saflaştırmada Kullanılacak Peg-10 Tallow'un Yapısal Analizi

3.2.5.1 Peg-10 Tallow'un Genel Özellikleri

Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesi plazmid DNA'nın saflaştırılması için geliştirdiğimiz çöktürme yönteminde çöktürme ajanı olarak kullanıldı. Çizelge 31'de Peg-10 tallow yüzey aktif maddesine ait genel özellikler görülmektedir;

Çizelge 3.1 Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin genel özellikleri (Sigma)

Peg-10- tallow	N,N',N'- Polioksietilen (10)-N tallow- 1,3-di amin propan
Kimyasal Yapısı	
Ticari adı	EDT-20 (Ethoduomeen)
Renk	Koyu Kehribar rengi
Madde hali	Likid
Kategorisi	Deterjan-katyonik
Klasifikasyonu	Etiloksitenmiş Diamin
Açıklama	Suda çözülebilen kuarternar amin olup mikrobial hücrelerden enzimlerin ekstraksiyonu kullanımında faydalıdır. 100 gram hücre ağırlığı için 1 ml peg-10-tallow pH:7.3-8.0 tamponunda kullanılması gereklidir.

3.2.5.2 Peg 10- Tallow Bileşiğinin Yapısal Analiz için Yapılan İncelemeler

Plazmid DNA'nın çöktürülerek saflaştırılmasında kullanılan katyonik yüzey aktif madde olan Peg-10 tallow 'un yapısal analizi aşağıdaki sırayla incelendi.

1. Bileşiğin FT-IR spektrumu alındı,
2. Bileşiğin %2.5,%5, %7.5 ve %10 HCl konsantrasyonlarındaki HCl asid çözeltileri ile muamele edildikten sonra FT-IR' spektrumu alındı,
3. Bileşiğin deiyonize su ile muamele edilmiş örneğinin FT-IR spektrumu alındı,
4. Bileşiğin ^{13}C ve ^1H NMR spektrumları alındı,
5. Bileşiğin Elementer Analizi yapıldı,
6. Bileşiğin çözünme özelliği gösterdiği organik çözücüler belirlendi ve bileşiğin sulu ortamdaki UV-VIS spektrumu alındı.

3.2.6 Peg-10 tallow Kullanılarak Çöktürme Yöntemi ile pDNA'nın Saflaştırılması

3.2.6.1 Gerekli Çözeltiler

0.1 M Tris-HCl, pH: 8.7

1.22 gr Trizma maddesi tartılıp 70 ml destile suda çözülmüştür.Derişik HCl çözeltisi ile pH: 8.7'ye ayarlanıp total hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlanmıştır. Hacim tamamlanması sırasında pH ayarının değişmemesi sağlanmıştır. Çözeltinin pH'sı her gün, çalışma öncesi, kontrol edilmiştir.Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

0.1 M Tris-HCl, pH:9.5

1.22 gr Trizma maddesi tartılıp 70 ml destile suda çözülmüştür.Derişik HCl çözeltisi ile pH: 9.5'e ayarlanıp total hacim 100 ml'ye destile su ile tamamlanmıştır. Hacim tamamlanması sırasında pH ayarının değişmemesi sağlanmıştır. Çözeltinin pH'sı her gün, çalışma öncesi, kontrol edilmiştir. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

%10 HCl Stok Çözeltisi

Yoğunluğu 1.18 gr/ml olan derişik HCl çözeltisinden 25 ml örnek alınıp 100 ml'ye tamamlanmıştır. %10 HCl stok çözeltisi kullanılarak %7.5, %7, %6.5, %6.0, %5.5, %5.0, %4.5 HCl çözeltileri hazırlanmıştır.Çözeltiler oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.6.2 Deneyin Yapılışı

1. Alkali Lizis işlemi sonunda elde edilen lizattan 250 µl alınıp 245 µl deiyonize suda çözülmüş ve üzerine 5 µl PEG-10-tallow propan amin ilave edilmiştir. Karışım vorteksle PEG-10-tallow propan amin çözününceye kadar karıştırılmıştır.
2. Karışım soğutmalı santrifüjde 4⁰C’de 15 dakika 18000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Çökelti süzüntünün pipet yardımı ile ayrılması sonucu elde edilmiştir. Süzüntü (süzüntü 1) agaroz jelde yürütülmek ve incelenmek amacıyla 4⁰C’de saklanmıştır.
3. Çökelti (çökelti 1)’e 500 µl deiyonize su ilave edilmiştir.Örneğin olduğu tüp 2-3 çevrilerek deiyonize su ile çökeltinin yıkanması sağlanıp 18000 rpm’de ve 4⁰C’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.Yıkama aşamasında elde edilen süzüntü (süzüntü 2) jelde yürütülmek ve incelenmek amacıyla 4⁰C’de saklanmıştır.
4. Yıkamadan sonra çökelti (çökelti 1) 487 µl 0.1 M Tris-HCl’de çözülmüştür.Çözeltiliye 5 ul PEG-10-tallow propan amin, 8 µl farklı konsantrasyonlarda HCl çözeltisi ilave edilip 10 dakika buz banyosunda bekletilmiştir. Buz banyosundan hemen sonra karışım 18000rpm’de 4⁰C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti (çökelti 3) pipet yardımıyla süzüntüden ayrılmıştır. Süzüntü(süzüntü 3) agaroz jelde yürütülmek ve incelenmek amacıyla 4⁰C’de saklanmıştır.
5. Çökelti (çökelti 2) üzerine 500 µl deiyonize su ilave edilmiştir. Örneğin olduğu tüp 2-3 kez çevrilerek deiyonize su ile çökeltinin yıkanması sağlanıp 18000 rpm’de ve 4⁰C’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.Yıkama aşamasında elde edilen süzüntü (süzüntü 4) jelde yürütülmek ve incelenmek amacıyla 4⁰C’de saklanmıştır.
6. Yıkanmış çökelti (çökelti 2) 500 µl 0.1 M Tris-HCl pH:9.5 tampon çözeltisinde çözülmüştür . Agaroz jelde yürütülmekve incelenmek üzere 4⁰C’de saklanmıştır.
7. Çöktürme prosedürünün sonunda elde edilen Süzüntü 1, Süzüntü 2, Çökelti 2, Süzüntü3, Süzüntü 4 örnekleri çalışmanın yapıldığı gün kalitatif analiz için agaroz jel elektroforez’e uygulanmıştır.
8. Çöktürme prosedürü tamamlandıktan sonra agaroz jel elektroforezine uygulanan 12µl’lik karışımın bileşimi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır ;

Örnek.....8µl

TritonX-100.....2µl

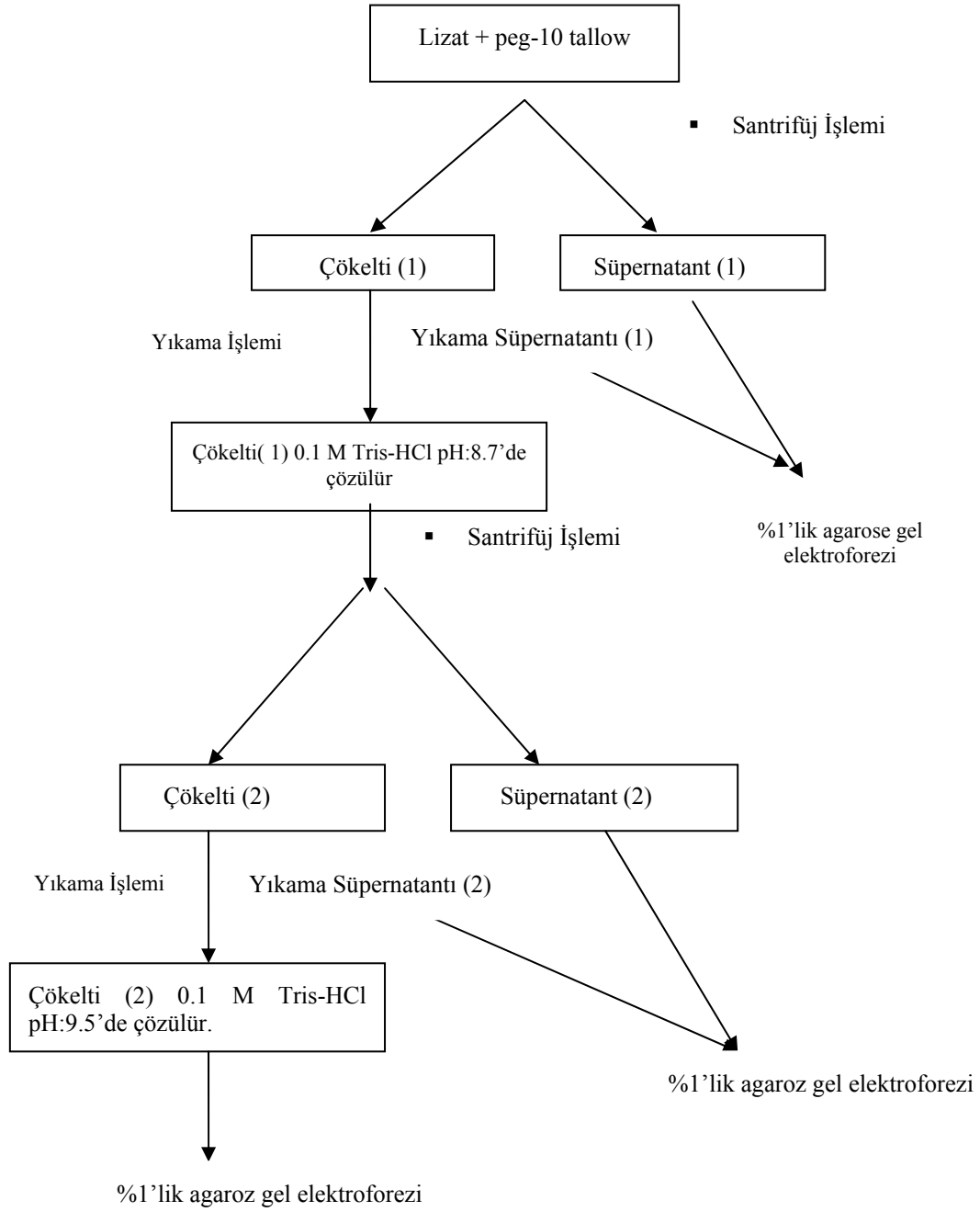
Örnek yükleme tamponu.....2 µl

3.2.6.3 Peg-10 tallow ile Çöktürme Yönteminin İletkenlik Değerlerinin Belirlenmesi

Peg -10 tallow'un çöktürme ajanı olarak kullanıldığı pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması yönteminde oluşturulan koşullarının iletkenlik değerleri kondüktometre ile okundu. İletkenlik değerlerinin okunduğu koşullar aşağıda verildi ;

1. Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin 0.002-0.02 (v/v) konsantrasyonları için deiyonize su ortamındaki iletkenlik değerleri belirlendi.
2. 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltisinin pH:7-10 aralığındaki iletkenlik değerleri belirlendi.
3. Tris-HCl tampon çözeltisinin 0.2 M, 0.1M, 0.05M, 0.04M, 0.03M, 0.02M, 0.01M konsantrasyonları için iletkenlik değerleri belirlendi.
4. pH:8.7 olan 0.1M Tris-HCl tampon çözeltisine farklı miktarlarda peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin 0.002-0.02 (v/v) konsantrasyonda ilavesi ile iletkenlik değerlerinde meydana gelen değişimler belirlendi.
5. pH:8.7 olan 0.1 M Tris-HCl tampon çözeltisinden oluşan ortama 0.01(v/v) peg-10 tallow ve %1-%10 aralığında değişen HCl asid çözeltisinin ilavesinin iletkenlik değerlerinde oluşturduğu değişimler belirlendi.

3.2.6 bölümünde anlatılan peg-10 tallow ile plazmid çöktürme işleminin akım şeması aşağıda şekil 3.5'te verildiği gibi özetlenebilir;



Şekil 3.5 Peg-10 tallow ile plazmid çöktürme yönteminin şematik diyagramı

3.2.7 Yüksek Hızlı Santrifüj

Yüksek sıcaklığa duyarlı olan biyolojik materyallerde, homojenattaki diğer moleküllerden ayırma ve saflaştırma işlemi için yüksek devirli ve ısı kontrollu santrifüjler kullanılmaktadır. Sıcaklık +4⁰C ve dolaylarında ve hız kontrol altında tutulmalıdır. Hıza bağlı santrifüjlemede daha ağır olan moleküller düşük devirli santrifüjlemeyle, daha hafif molekülleri ise çok yüksek hızda döndürerek çöktürme işlemi gerçekleştirilir.

Yüksek hızlı santrifüjlerin hız aralığı 1.000-25.000 devir/dakika'dır. Maksimum RCF (santrifüj kuvveti) değeri 50.000 x g'dir. Rotorlar karbon-fiber karışımı hafif malzemeden imal edilerek hızlanma ve durma sürelerinin kısa olması sağlanmaktadır.

$$RCF = 1.119 \times 10^{-5} (\text{devir/dakika})^2 (r) \quad (3.1)$$

r : göç eden partiküllerin merkezdeki dönüm eksenine uzaklığı (cm)

Biyolojik örneklerin hazırlanmasında orta yada yüksek hızlı santrifüjler kullanılır. Bu santrifüjlerle biyolojik ürünlerin kimyasal parçalanmasından sonra hücresel atıklar yok edilebilmektedir. Hücre organelleri; nukleus, mitokondri, kloroplast, makromoleküller; nükleik asitler, proteinler çöktürülerek ayrılabilir. (Temizkan G.,2004)

3.2.8 APTS Sistemi ile pDNA'nın Saflaştırılması

3.2.8.1 PEG 600'ün Genel Özellikleri

Çizelge3.2 PEG 600 maddesinin genel özellikleri

PEG 600	Polietilen glikol 600 gr/mol
Kimyasal Yapısı	$(C_2H_4O)_n H_2O$ $H (OCH_2CH_2)_{13} OH$
Ticari adı	PEG, Carbowax®
Renk	Renksiz, şeffaf
Madde hali	Likid
Çözünürlüğü	Suda çözünü
Erime noktası	20-25 0C (68-77 F)
Açıklama	Suda çözülebilen lineer polimer grubuna aittir. Toksiditesi düşüktür.[Victor O. Sheftel (2000). Indirect Food Additives and Polymers: Migration and Toxicology]

3.2.8.2 Deneyin Yapılışı

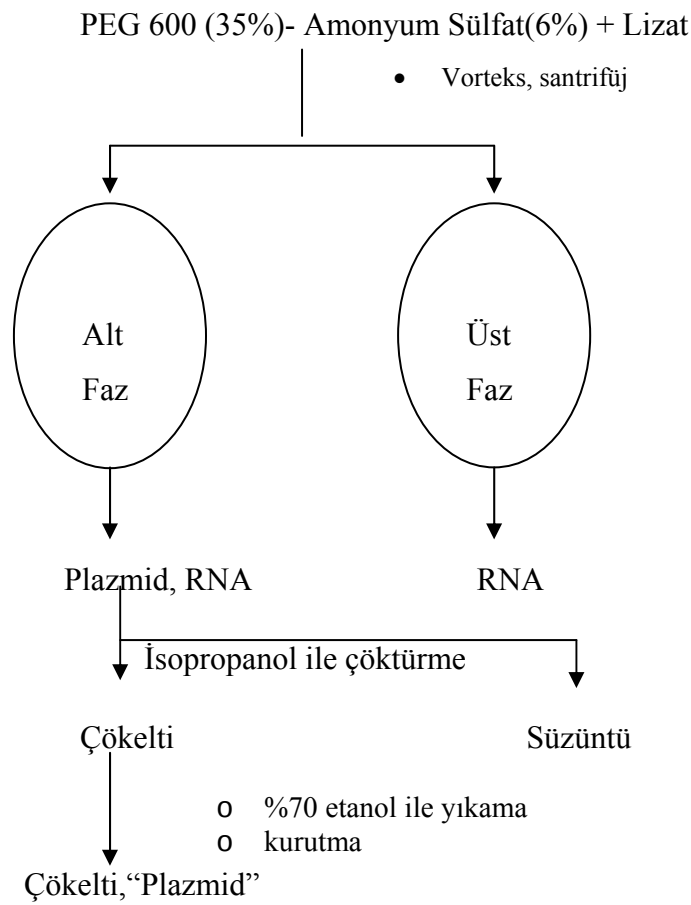
E.Coli lizatı, PEG ve Amonyum sülfat karışımı 5 gr olacak şekilde tartıldı ve karışım vorteksle karıştırıldı. Karışım örneği 15000xg'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst faz ve alt faz oluşumu gözlemlendi. İki ayrı fazdan alınan örnekler %1 'lik agarose jel elektroforezde yürütüldü.Çalışma boyunca örnekler buzdolabında saklandı.

3.2.8.3 APTS sisteminden elde edilen Örneğin İsopropanol ile Muamele Edilmesi

APTS sisteminden elde edilen 200 µl alt faz deiyonize su ile iki buçuk kat oranında seyreltildi. Seyreltilen örneğin total hacminin 0.7'si kadar iso propanol alkol çözeltisi ilave edildi. Karışım kuvvetlice çalkalandı ve 30 dakika +4 °C'de (buz banyosunda) bekletildi.

Örnek 15000x g'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Süzüntü elde edilen çökeltiden dikkatlice dekante edildi. İsoopropanolle muameleden elde edilen çökelti %70 etanol ile 15000x g'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Elde edilen plazmid Tris-EDTA pH:8.01 çözeltisinde çözülerek ve %1'lik agaroz jel elektroforezine uygulanarak kalitatif olarak belirlenmeye çalışıldı.

3.2.8.2 ve 3.2.8.3 bölümlerinde anlatılan deneylerin yapılışının şematik diyagramı aşağıda şekil 'de verilmiştir;



Şekil 3.5a Aqueous two phase sistemi + isopropanol ile plazmid saflaştırma işleminin şematik diyagramı

3.2.9 ATPS Ayırma Sistemi

ATPS biyolojik maddelerin (protein, nükleik asit, virüsler ve hücreler) ayrılması ve saflaştırılmasında gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan etkili iki fazlı sulu sistemlerdir. Bu sistemler polimer-polimer karışımından oluşan iki fazlı sistemler olabileceği gibi, polimer – tuz iki fazlı karışımından oluşurlar. Polimer- tuz ATPS sistemlerinde fazlar daha az viskoz olup, bu sistemle ayırma işlemi daha kısa süre almaktadır (Hatti - Kaul, 1999) .

3.2.10 Agaroz Jel Elektroforezi ile pDNA'nın Saflık Analizi

Plazmid DNA'nın saflaştırılmasında kullanılan ve yukardaki bölümlerde anlatılan iki ayrı yöntem ile alınan sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi..

3.2.10.1 Elektroforez İşleminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Yürütme Tamponu

Agaroz jel elektroforezi çalışmaları sırasında tank tamponu olarak Tris-Asetat-EDTA (TAE) kullanılmıştır. Bu tampon 50 kez konsantre stok olarak (50XTAE) hazırlanmış, elektroforez için 1XTAE tamponu kullanılmıştır. Tamponun bileşimi aşağıda verilmiştir;

50XTAE Tamponu Bileşimi (2M Tris, 1M Asetik asid, 50 mM EDTA pH:8.0);

Trizma baz.....242gr

Asetik asid.....57gr

EDTA.....100ml

Deiyonize su.....1000ml

EDTA Çözeltisinin Bileşimi(0.5M, pH:8.0, 100 ml);

Na₂EDTA x 2H₂O.....18.6 gr

Deiyonize su.....70 ml

NaOH(10M).....5 ml

Deiyonize su.....100ml

Örnek Yükleme Tamponu

Agaroz jele uygulanacak örnekleri kuyucuklara yüklemek için örnek yükleme tamponu kullanıldı. Örnek yükleme tamponu hazırlandıktan sonra mikro tüpe bir miktar alınıp oda sıcaklığında saklandı.

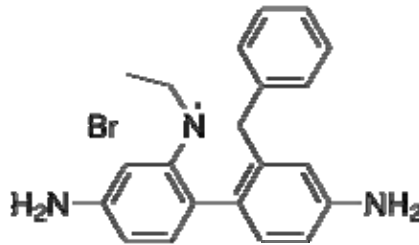
Örnek Yükleme Tamponu Bileşimi;

Bromfenol mavisi.....%0.25

Gliserol(suda).....%30

Etidyum Bromür Stok Çözeltisi

Jele uygulanan ve yürütülen DNA moleküllerinin görüntülenmesi için etidyum bromür (EtBr) kullanılmıştır. DNA moleküllerinin oluşturduğu bantlar UV ışığı altında floresan etki gösteren etidyum bromür boyası ile boyanarak görünür hale gelir. Örnekler jelde yürütüldükten sonra 0.5 µg/ml EtBr içeren destile suda boyanarak görüntülenmiştir. UV ışığı altında floresans özelliği gösteren Etidyum Bromür bileşiğinin yapısı şekil 3.6'da görüldüğü gibidir.



Şekil 3.6 Etidyum bromür yapısı

3.2.10.2 Elektroforez İşlemi

Elektroforez işlemi için %1 konsantrasyonunda agaroz jel kullanılmıştır. 0.4 gr agaroz tartılarak 40 ml TAE tamponu ile karıştırılmış ve mikrodalga fırında agaroz tamamen çözünene kadar beklenmiştir. Çözelti 10-15 saniye musluk suyunda soğutulurken jel tepsisi üzerine dökülmüş ve kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkarılmıştır. Jel tepsisi tank içindeki yerine yerleştirilerek jelin üzerini tamamen örtecek şekilde yürütme tamponu ilave edilmiştir. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara yüklenmiş ve 200mA gerilim altında yaklaşık 120 dakika

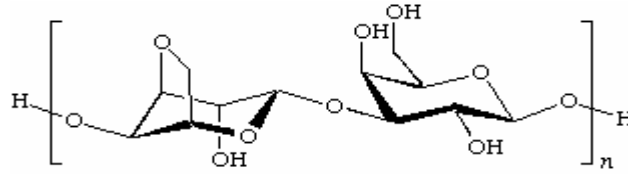
yürütülmüştür. Jel EtBr içeren destile suda yaklaşık 15 dakika bekletilmiş ve UV ışık altında görüntülenmiştir.

3.2.11 Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez, yüklü moleküllerin elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği bir tekniktir. Bu sistemde analizi yapılacak örnek bir destek ortamına uygulanır.

DNA ve RNA moleküllerini tanımlamakta kullanılan standart yöntem destek ortamı olarak agaroz'un kullanıldığı elektroforezdir. Agaroz bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkariddir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile jel yapısı oluşur. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. Agaroz konsantrasyonu %0.5-1.5 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir ve uygulamada yatay sistem tercih edilir..

Küçük DNA fragmentleri için yüksek büyük DNA fragmentleri için düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanabilir.



Şekil 3.7 Agaroz molekül yapısı

Plazmid DNA'sının jeldeki görüntüsü genellikle üç farklı biçimi gözlenir; süper sarmal biçim, gevşek sarmal biçim, ve doğrusal biçim. Eğer saflaştırma biçimi doğru yapılmışsa jelde sadece süper sarmal ve gevşek sarmal formlar gözükcektir.

DNA 'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak 300 ve 360 nm 'de ışığı absorblaması sonucu fluoresans etki göstermesi ile olur. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir.

Uygulamalarda genellikle 0.1-0.5 µg/ml EtBr konsantrasyonu kullanılır. (Temizkan G.,2004)

4. SONUÇLAR

4.1 pVAX1/lacZ Plazmidi İhtiva Eden *E.coli* DH5α Hücrelerinin Çoğaltılmasının Sonuçları

pVAX1/lacZ ihtiva eden *E.coli* DH5α hücrelerini 25 ml'lik LB besiyeri ve kanamisin antibiyotiği içeren ortamda 14 saatlik inkübasyonu sonucunda 600 nm'de okunan absorbans değerleri sırasıyla örnek 1 için 7.38, örnek 2 için 7.83 ve örnek 3 için 7.92 olarak bulundu.

Aynı örneklerden ,250 µl kanamisin antibiyotiği içeren 250 ml'lik LB besiyeri ortamına 1 ml ilave edildiğinde ortamın başlangıç absorbansının 0.2 olması için yapılan hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanıldı;

$$0.2 \cdot X + 50 = A \cdot X \dots\dots\dots(4.1)$$

A: 25 ml'lik LB besiyerinde çoğaltılan örneklerin 600 nm'deki absorbans değeri.

X: 25 ml'lik besiyerinden alınacak hücre miktarı (ml)

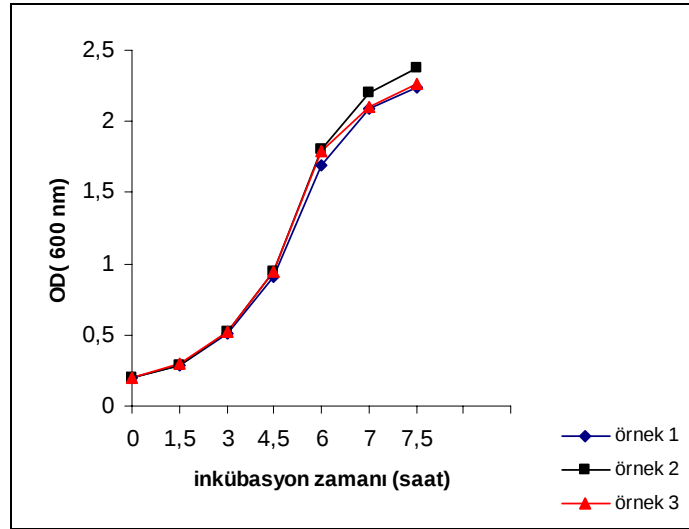
Yukardaki formüle göre yapılan hesaplamalarda örnek1'den 6.96 ml, örnek 2'den 6.55 ml ve örnek 3'ten 6.48ml alınarak 250 ml'lik LB besiyerine aktarılması gerektiği bulundu.

250 ml'lik kanamisinli LB besiyerine aktarılan plazmidli *E.coli* hücrelerinin 1.5 saat arayla 600 nm'de okunan absorbans değerleri çizelge 3.2'de verilmiştir. Bu absorbans değerlerine göre *E.coli* bakteri hücrelerinin çoğalma eğrisi şekil 3.3'te verildi.

pVAX1/lacZ plazmidi içeren *E.coli* DH5α hücrelerinin 7.5 saatte 600 nm'deki absorbans değerleri ~ 2.3'e ulaştığı gözlemlendi.

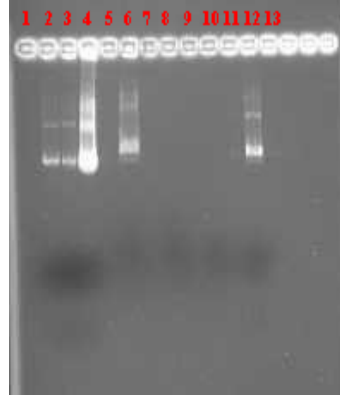
Çizelge 4.1 *E.coli* DH5 α suşuna ait 600 nm'deki absorbands değerleri

Inkübasyon Zamanı(saat)	Örnek 1 OD600 nm	Örnek 2 OD 600 nm	Örnek 3 OD600 nm
0	0.200	0.200	0.200
1.5	0.285	0.292	0.295
3.0	0.506	0.520	0.524
4.5	0.914	0.944	0.946
6.0	1.694	1.808	1.792
7.0	2.085	2.199	2.100
7.5	2.244	2.376	2.265



Şekil 4.1 *E.coli* DH5 α konakçısına ait büyüme eğrisi

4.2 Referans Olarak Kullanılacak Plazmid DNA'sının Kit ile Saflaştırılmasının Sonuçları



Şekil 4.2 Kit ile saflaştırılan pDNA'nın %1'lik agaroz jelde incelenmesi

2 numaralı kuyucuk; Saf DNA₁

3 numaralı kuyucuk; Saf DNA₂

4 numaralı kuyucuk; Hatalı uygulama

6 numaralı kuyucuk; Örnek₁

8 numaralı kuyucuk; Örnek₂

10 numaralı kuyucuk; Örnek₃

12 numaralı kuyucuk; Örnek₄

Kit ile saflaştırılarak elde edilen referans plazmid DNA'nın saflaştırılma işleminin incelenmesi %1'lik agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Şekil 4.2'de kit ile saflaştırılan plazmid DNA'nın saflaştırma basamaklarından alınan örneklerin incelenmesi görülmektedir. 1. ve 2. kuyucuğa uygulanan saf plazmid DNA bu çalışmanın referans plazmid örneklerini oluşturmaktadır. Bu örnekler daha önce kit ile saflaştırılmış konsantre plazmid DNA çözeltileridir. Bu örnekler (1. ve 2. kuyucuklardaki örnekler) şekil 4.2'de ki agaroz jel elektroforezinde referans plazmid örneği olarak kullanıldı. 6 numaralı jel kuyucuğuna uygulanan örnek 1 kit ile yapılan alkali lizis işleminden plazmidin başarılı olarak izole edildiğini göstermektedir.

8. ve 10. kuyulara uygulanan örnek 2 ve örnek 3'te plazmid DNA'ya ait bandın olmaması kit ile saflaştırma sırasında kolonda plazmid DNA'nın tamamen tutulduğunu göstermektedir. 12 numaralı kuyudaki plazmid DNA'ya ait görüntü kit ile saflaştırma işleminin en son basamağında kolondan pDNA 'nın başarılı elue edildiğini göstermektedir.

4.2.1 Kit ile Saflaştırılan Plazmid'in Konsantrasyon Hesabı

Kit ile saflaştırılan pVAX1/lacZ plazmid çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek 260 ve 280 nm'deki absorbansları belirlendi. $A_{260}=0.361$ ve $A_{280}=0.190$

$$A_{260}/A_{280} = 0.361/0.190 = 1.9 \dots\dots\dots(1)$$

$$0.361 * 50 = 18.05 \dots\dots\dots(2)$$

$$0.190 * 50 = 9.5 \dots\dots\dots(3)$$

$$18.05 / 9.5 = 1.9 \dots\dots\dots(4)$$

$$18.05 * 50 = 902.5 \mu\text{g/ml} \dots\dots\dots(5)$$

500 ml pVAX1/lacZ plazmidli *E.coli* DH5 α hücre kültüründen Qiagen Inc® firmasından temin edilen “Qiagen Plazmid Mega and Giga Kits” ile yapıldı. $OD_{260} / OD_{280} = 1.9$ (902.5 $\mu\text{g/ml}$) olan saf plazmid elde edildi.

4.3 PEG-10 Tallow Bileşiğinin Yapısal Analiz Sonuçları ve Değerlendirilmesi

Peg-10 tallow bileşiğinin yapısında yer alan fonksiyonel gruplarının belirlenmesi için,elementer analiz,¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR ve bileşiğin farklı çözücülerdeki UV spektrumları alındı, sonuçlar değerlendirildi.

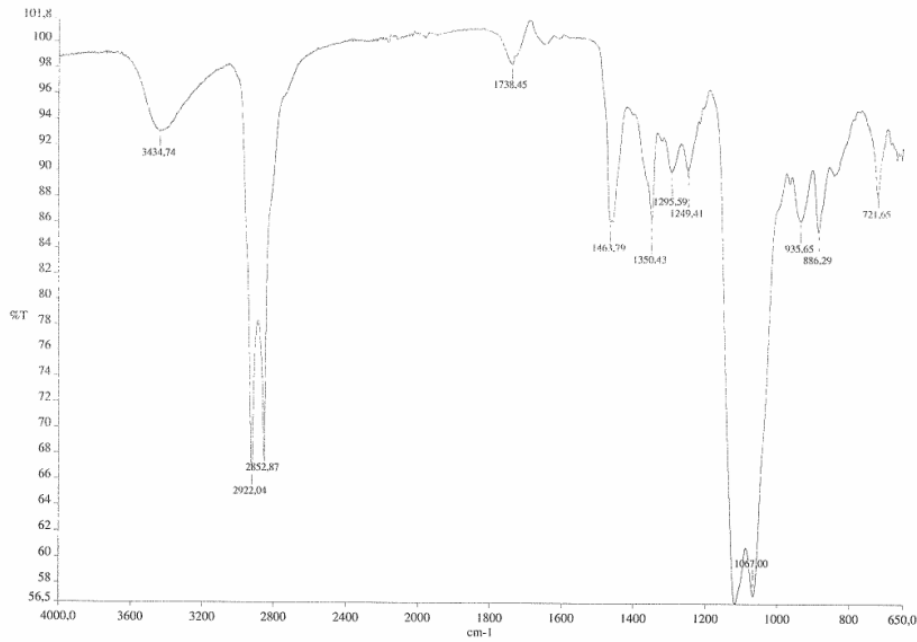
4.3.1 Peg-10 Tallow Bileşiğinin Elementer Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Peg-10 tallow bileşiğinin yapısında yer alan elementlerin dağılımını ve % bileşimini elementer analiz yöntemi ile belirlenmiştir.Elementer analiz sonuçları aşağıdaki çizelge 4.2’de verilmiştir; Molekülün element dağılımı C, H,O ve N atomlarından oluşmaktadır.

Çizelge 4.2 Peg-10 tallow bileşiğinin elementer analiz sonuçları

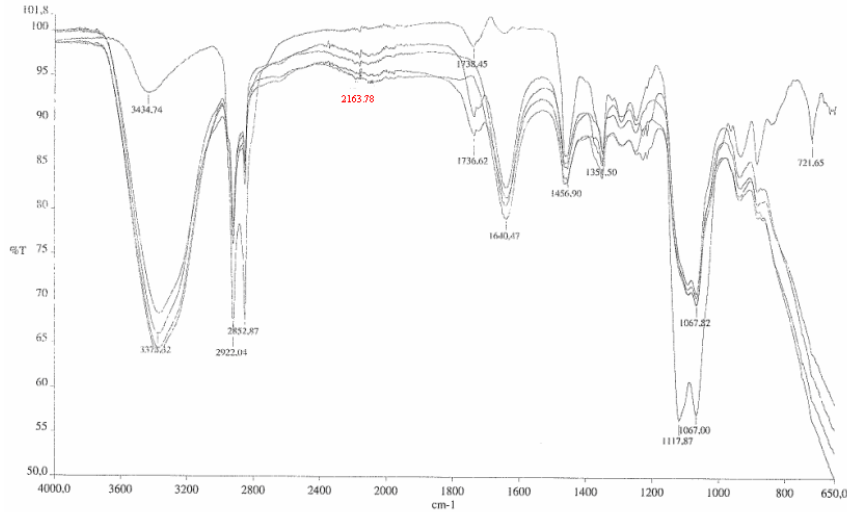
C	% 56.23
H	% 30.28
O	% 10.37
N	% 3.12

4.3.2 Peg-10 Tallow Bileşiğinin FTIR Sonuçlarının Değerlendirilmesi



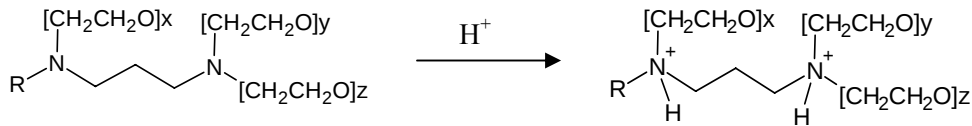
Şekil 4.3. Peg-10 tallow bileşiğinin FT-IR (ATR) spektrumu

Şekil 4.3’de Peg-10 Tallow bileşiğine ait FT-IR spektrumunda 3434 cm^{-1} frekansında görülen geniş band bileşiğin yapısında yer alan O-H gerilmesi, 2922 ve 2852 cm^{-1} ’deki çift band -C-H gerilmelerini, 1463 ve 1350 cm^{-1} sırasıyla C-H düzlem içi asimetric ve simetric eğilmesi, 935 , 886 ve 721 cm^{-1} C-H düzlm dışı eğilmesi , 1067 cm^{-1} ’de C-O-C gerilmeleri belirlendi.



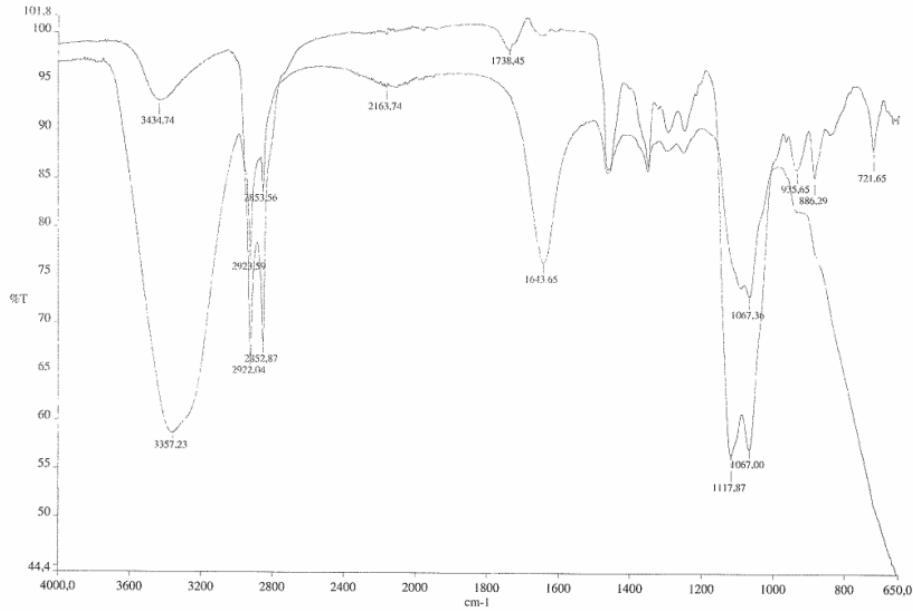
Şekil.4.4 Peg -10 tallow’un %2.5, %5, %7.5, %10 HCl ilavesiyle FT-IR (ATR) spektrumunda meydana gelen değişimler,

Peg-10-tallow bileşiğinin asid (HCl) ile muamele edildiken sonra alınan infrared spektumunda 2163 cm^{-1} frekans bölgesinde görülen bandı ammonyum tuzlarının oluşumunu gösterdiği düşünülmektedir. (bkz. Şekil.4.5) Peg-10 tallow bileşiğinin yapısının asid ilavesinden sonra şekil 4.5 a’deki gibi değiştiği düşünülmektedir.



Şekil 4.5a Peg-10 tallow bileşiğine asid çözeltisinin etkisi

2922 ve 2852 cm^{-1} ’deki C-H gerilmesine ait çift bandlar ve $1117 - 1000\text{ cm}^{-1}$ C-O-C gerilmelerine ait band’ların şiddetinde azalma gözlemlendi.



Şekil.4.5 Peg-10 Tallow bileşiğinin suyla muamele edildikten sonra FT-IR spektrumunda meydana gelen değişimler

Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin 1:2 (v/v) oranında su ile etkileşimi sonucu 2. günde yapısında meydana gelen değişimler infrared spektumu alınarak incelendi.(Şekil.4.5)

OH gerilme bölgesini ifade eden 3300cm^{-1} 'de ve 1600 cm^{-1} bölgelerinde pik şiddetinde artış gözlemlendi. 2922 ve 2852 cm^{-1} 'deki C-H gerilmesine ait çift bandlar ve $1117 - 1000\text{ cm}^{-1}$

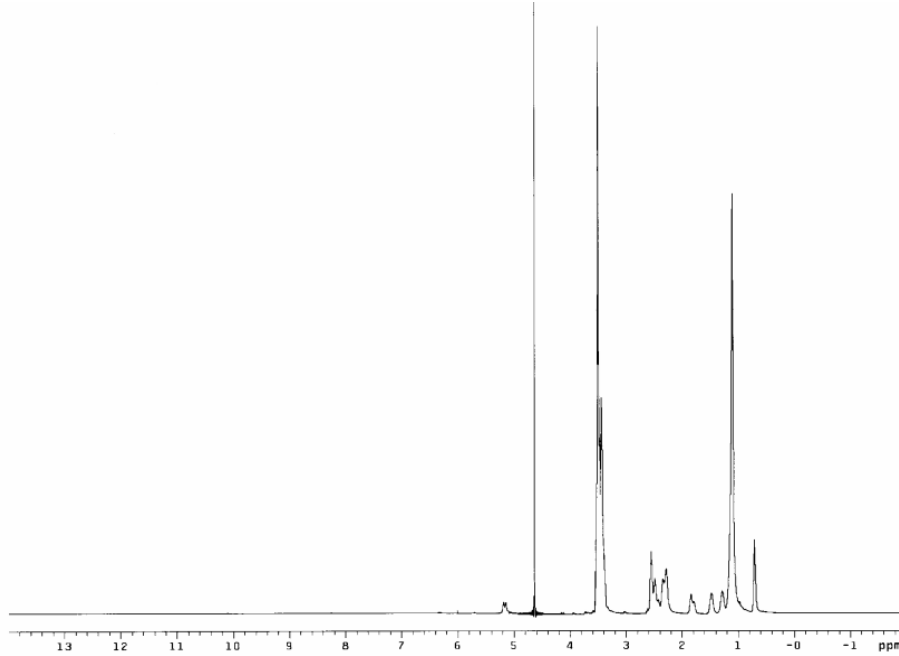
C-O-C gerilmelerine ait band'ların şiddetinde azalma belirlendi.(Şekil.4.3) Molekülün su ile etkileşiminin 5. gününde jelleşme özelliği gösterdiği belirlendi. Peg-10 tallow bileşiğinin jelleşmeden önce ve jelleşmeden sonraki görüntüsü aşağıdaki gibidir;



Şekil 4.6 Peg-10 tallow yüzey aktif bileşiğinin A; orginal örneğinin görüntüsü B; jelleşmiş örneğinin görüntüsü

4.3.3 Peg-10 Tallow Bileşiğinin NMR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

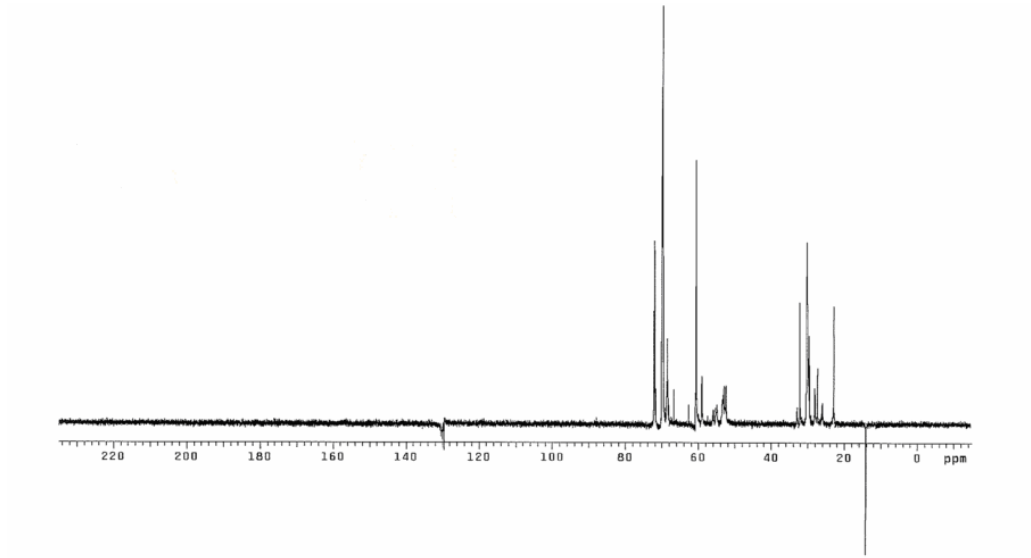
Peg-10-tallow bileşiğinin D₂O çözücüsünde alınan ¹H ve ¹³C NMR'larından alınan sonuçlarla Peg-10-tallow bileşiğinin yapısında yer alan temel fonksiyonel gruplar belirlendi.



Şekil.4.7 Peg-10 tallow 'un ¹H-NMR'ı

Proton (¹H)NMR'ından (Şekil 4.7) alınan sonuçlara göre $\delta = 0.7$ ppm ; (metil) $-\text{CH}_3$ grupları, $\delta = 1$ ppm $-\text{CH}_2$ grupları, $\delta = 3.5$ ppm'de polietilen glikol fonksiyonel gruplarına ait $-\text{CH-O}-$ grupları, $\delta = 1.2-2.0$ ppm aralığında molekülün yapısında yer alan O-H gruplarına ait H protonları, $\delta = 2.4-2.7$ ppm aralığında azot atomuna bağlı (N-CH_2) H protonları belirlendi.

$\delta = 5-6$ ppm aralığında gözlemlenen proton piki $-\text{C=CH}-$ fonksiyonel grubuna ait olduğu belirlendi. $\delta = 6-13$ ppm aralığında H pikinin görülmemesi ile yapıda asid ($-\text{COOH}$), aldehit ($-\text{CHO}$), ve aromatik gruplarına ait protonların olmadığı belirlendi.



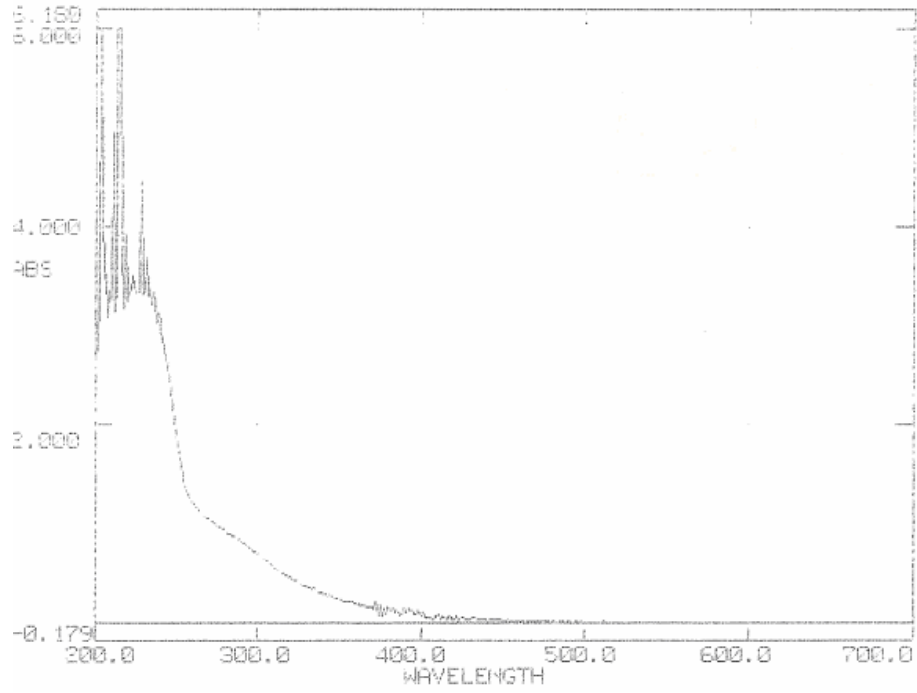
Şekil 4.8 Peg-10 tallow'un ^{13}C -NMR'ı

^{13}C NMR sonuçları peg-10 tallow bileşiğinin yapısında yer alan fonksiyonel grupların belirlenmesinde ^1H NMR sonuçları ile paralellik gösterdiği belirlendi. (Şekil 4.8) $\delta=120\text{-}140$ ppm aralığında gözlenen karbon pikinin proton NMR'ında belirlendiği gibi $-\text{CH}=\text{CH}-$ fonksiyonel grubunu tanımlamaktadır.

NMR sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda Peg-10 tallow yüzey aktif bileşiğinin yapısında yer alan $-\text{R}$ hidrofobik zincirinin aromatik fonksiyonel grubu içermediği belirlendi.

4.3.4 Peg-10 tallow Bileşiğinin UV spektrumları ve Çözünürlük Özelliğinin Değerlendirilmesi

Peg-10 tallow bileşiğini sulu ve organik çözücü ortamlarda çözünürlük özelliği ve UV spektroskopisinden alınan sonuçlardan bileşiğin farklı çözücülerdeki maksimum dalga boyu belirlendi. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelge 4.3'de toplu halde görülmektedir;



Şekil.4.9 Peg-10 tallow'un UV Spektrumu (H₂O)

Çizelge.4.3 Peg -10 tallow bileşiğinin çözünürlük özelliği ve $\lambda_{\max}$ değerleri

Çözücü adı	Çözünürlük Özelliği	$\lambda_{\max}$
Su	Çözünür	220-400 nm
Etil Alkol	Çözünür	341 nm
Kloroform	Çözünür	262 nm
Asetonitril	Çözünür	257 nm
Dietileter	Çözünür	250 nm

4.4 Peg-10 Tallow ile pDNA'nın Çöktürülmesi Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

1. Katyonik surfaktant ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması için geliştirdiğimiz yöntemde, Peg-10 tallow seçici olarak pDNA'yı çöktürmek için kullanılan yüzey aktif maddedir. Çalışmamızın birinci aşamasında lizatın pH'sı 5.10-5.20 aralığında iken 0.01(v/v) Peg-10 tallow yüzey aktif maddesi %50 (v/v) lizat örneğinden pDNA ve RNA'yı seçicilik göstermeden lizat homojenatından ayırarak çöktürebildiği görülmüştür. RNA molekülünün Süpernatant 1 örneğinde görülen bandı katyonik Peg-10 tallow-pDNA- RNA'nın oluşturduğu kompleks oluşumuna girmeyen RNA molekülüne aittir. Kompleks kirli beyaz renktedir.

% 1'lik agaroz jel elektroforez görüntülerinde bu aşama "süpernatant 1" olarak ifade edilmiştir. Tüm agaroz jel elektroforez görüntülerinde süpernatant 1'de pDNA bandı gözlemlenmedi.

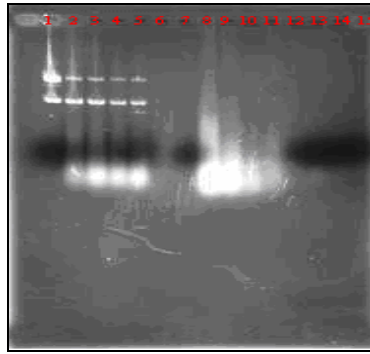
2. Geliştirdiğimiz çöktürme yönteminde iki adet yıkama aşaması mevcuttur. Yıkama deiyonize su ile yapılmıştır. "Çökelti 1" ve "Çökelti 2" olarak adlandırılan Peg-10 tallow-pDNA- RNA kompleksinin yıkama aşamasında deiyonize suda çözünmediği görülmüştür. "Yıkama 1" ve "Yıkama 2" olarak adlandırdığımız bu aşamalar %1'lik agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir. "Yıkama 1" ve "Yıkama 2"den dekante edilen süpernatantlar agaroz jel elektroforezine uygulandı. Bu örneklerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri temizdir.

3. Geliştirdiğimiz çöktürme yönteminde ikinci çöktürme aşamasında Peg -10 tallow katyonik yüzey aktif maddesine seçicilik kazandırılması amaçlanmıştır. Peg -10 tallow'un pH aralığı 5.10-5.20 olan alkali lizattan direk çöktürme koşullarında pDNA ve RNA ayrımı yapmadığı görülmüştür. Birinci çöktürmeden sonra yıkanıp temizlenen çökeltinin çözünmesi için 0.1 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. Seçilen tampon çözeltisi çöktürme için kullanılan santrifüj işlemleri sırasında pDNA'nın degradasyonunu ve denatürasyonunu da engellemektedir. Tris-HCl tamponunun kullanılabilir olduğu pH aralığı baziktir (pH:7- 9.5). (Sigma Katalogu) Tris-HCl tamponunun pH'sı arttıkça iletkenlik değerlerinin (mS/cm) düştüğü görüldü.(Bölüm 4.5, Şekil 4.21) Seçilen tampon çözeltisinin 0.1 M Tris-HCl, pH 8.7'de iletkenliği 1.9 mS/cm'dir.(Bölüm 4.5, Şekil 4.21)

4.4.1 Peg-10 Tallow'un pDNA'yı Seçici olarak Çöktürmesine Asid Etkisi Sonuçları ;

Geliştirdiğimiz Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması yönteminin ikinci çöktürme aşamasında (“çökelti 2” +Peg-10 tallow + 0.1 M Tris-HCl pH:8.7) Peg -10 tallow katyonik yüzey aktif maddesine pDNA ve RNA moleküllerine karşı ayırmada seçicilik özelliği kazandırarak çöktürme işlemini sağlamak için çeşitli konsantrasyonlarda asid çözeltisi ilavesi yapıldı. Bu koşullarda ortamın iletkenliğinde ve pH'sında meydana gelen değişimler saptandı. Elde edilen sonuçlar ve bulgular aşağıda maddeler halinde verildi;

1. Lizat örneğinden elde edilen çökelti 1'in 0.1 M Tris HCl pH:8.7 tampon ortamına asid ilavesi yapıldı. % 10' luk HCl ilavesinin pDNA ile RNA 'nın Peg-10 tallow ile çöktürülmesine yaptığı etki aşağıda şekil.4.10'daki %1'lik agaroz jelde görülmektedir.



Şekil.4.10 Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %10'luk HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

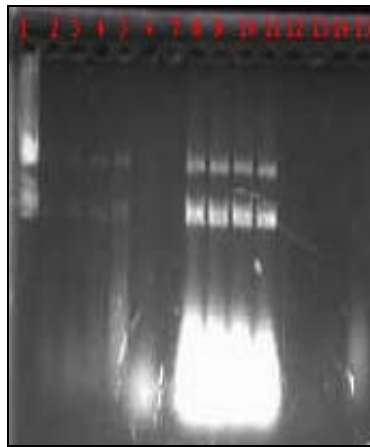
1. Saf pDNA
2. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %10 HCl
3. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.008 (v/v) %10 HCl
4. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.012 (v/v) %10 HCl
5. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %10 HCl
6. Süpernatant 1
7. Yıkama 1
8. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %10 HCl

9. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.008 (v/v) %10 HCl
10. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.012 (v/v) %10 HCl
11. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %10 HCl
12. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %10 HCl
13. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.008 (v/v) %10 HCl
14. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.012 (v/v) %10 HCl
15. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %10 HCl

%10 HCl'in etkisiyle Peg-10 tallow'un pDNA'nın tümünü çöktürdüğü RNA'nın ise kısmi olarak ayrılmasını sağladığı gözlemlenmiştir. %10'luk HCl çözeltisi farklı hacimlerde ortama ilave edildiğinde süpernatant 2 'deki RNA miktarlarının değiştiği görülmektedir. (Şekil 4.10)

0.1 M Tris-HCl pH:8.7'de 0.01(v/v)'lik Peg-10 tallow'un çözülmesi ile oluşan ortamın iletkenliği 1876 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ve pH :8.73'tür. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.5) Çözünen polianyonik moleküller pDNA ve RNA ortamda bulunmadan peg-10 tallow'un %10'luk HCl'den 0.016 (v/v) ilave edilmesi ile ortamın pH'sı 7.76, ortamın iletkenliği ise 6.00 mS/cm ölçüldü. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.6)

2. Lizat örneğinden elde edilen çökelti 1'in 0.1 M Tris HCl pH:8.7 tampon ortamına asid ilavesi yapıldı. % 2.5'luk HCl'in ilavesinin pDNA ile RNA 'nın Peg-10 tallow ile çöktürülmesine yaptığı etki aşağıda şekil.4.11'deki %1'lik agaroz jelde görülmektedir.

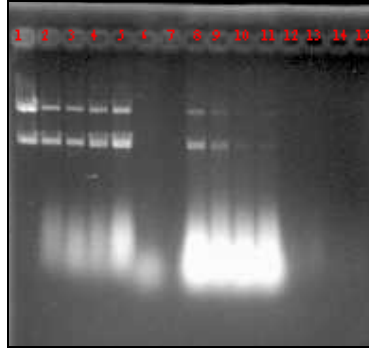


Şekil.4.11 Peg -10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %2.5 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1. Saf pDNA
2. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %2.5 HCl
3. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.008 (v/v) %2.5 HCl
4. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.012 (v/v) %2.5 HCl
5. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %2.5 HCl
6. Süpernatant 1
7. Yıkama 1
8. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %2.5 HCl
9. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %2.5 HCl
10. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.008 (v/v) %2.5HCl
11. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.012 (v/v) %2.5 HCl
12. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2.5HCl
13. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.004 (v/v) %2.5 HCl
14. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.008 (v/v) %2.5 HCl
15. Yıkama 2;0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.012 (v/v) %2.5 HCl
16. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2.5 HCl

Katyonik yüzey aktif maddenin, %2.5 HCl asid çözeltisinin farklı hacimlerde ilavesinde pDNA'yı tamamen çöktüremediği ve pDNA ve RNA moleküllerinin ayrımını yapamadığı görülmektedir. pDNA ve RNA'nın bu koşullarda süzüntü 2 'de kaldığı görüldü. Peg-10 tallow'un bu koşullarda polianyonik biomoleküllere karşı seçicilik gösteremediği görüldü. (Şekil.4.3) 0.1 M Tris-HCl pH:8.7'de 0.01(v/v)'lik Peg-10 tallow'un çözülmesi ile oluşan ortamın iletkenliği 1876 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ve pH :8.73'tür. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.5) Çözünen polianyonik moleküller pDNA ve RNA ortamda bulunmadan peg-10 tallow'un %2.5'lik HCl çözeltisinden 0.016(v/v) ilave edilmesi ile ortam pH'sı 8.48, ortamın iletkenliği ise 3.17 mS/cm ölçüldü. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.6)

3.



Şekil.4.12 Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %2, %3, %4, %5 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

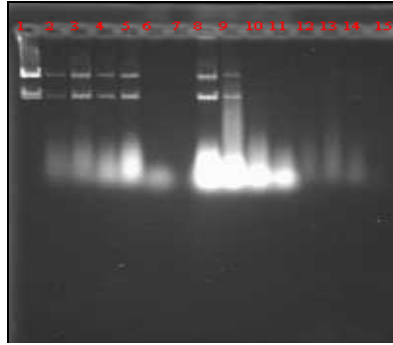
1. Saf pDNA
2. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2 HCl
3. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %3 HCl
4. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %4 HCl
5. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5 HCl
6. Süpernatant 1
7. Yıkama 1
8. Süpernatant 2; 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2 HCl
9. Süpernatant 2; 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %3 HCl
10. Süpernatant 2; 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %4 HCl
11. Süpernatant 2; 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5 HCl
12. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2 HCl
13. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %3 HCl
14. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %4 HCl
15. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5 HCl

Peg-10 tallow ile çöktürme yönteminin ikinci aşamasına çözeltideki konsantrasyonu %2, %3, %4, %5 olan HCl çözeltisi ilave edildi.%1'lik agaroz jel elektroforezinden alınan görüntüye

göre Süpernatant 2 de kalan RNA miktarında farklılık oluşmadı. pDNA'nın katyonik yüzey aktif madde tarafından düşük verimle çöktürebildiği görüldü. %5 HCl ilavesini gösteren numaralı sütunda RNA miktarı en fazladır. Yukarıda belirtilen HCl konsantrasyonlarında pDNA'nın tamamının çöktürülemediği görüldü.. (Şekil.4.12)

Çözünen polianyonik moleküller pDNA ve RNA ortama bulunmadan %1 peg-10 tallow'un %2, %3, %4, %5 HCl konsantrasyonlarında ki çözeltisinden %1.6 (v/v) ilave edilmesi ile ortam pH'sı sırasıyla, 8.48, 8.35, 8.27, 8.21'dir. Ortamın iletkenliği ise 2.75, 3.23, 3.61, 4.15 mS/cm'dir. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.6)

4. 4.4.1 bölümünde yer alan 1., 2. ve 3. maddelerde ki sonuç yorumlarımıza bağlı olarak incelememiz %2.5, %5, %7.5, %10 konsantrasyonlarında ki HCl çözeltisinin ilavesine yönlendi. Katyonik yüzey aktif madde olan Peg-10 tallow'un yukarıda belirtilen asid konsantrasyonlarında pDNA ve RNA moleküllerine karşı kazandığı seçici çöktürme özelliği %1'lik agaroz gel'in incelenmesi ile belirlendi.



Şekil.4.13 Peg -10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminin %2.5, %5, %7.5, %10 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1. Saf pDNA
2. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2.5 HCl
3. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.0 HCl
4. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
5. Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 10 HCl
6. Süpernatant 1
7. Yıkama 1
8. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2.5 HCl

9. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.0 HCl
10. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
11. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 10 HCl
12. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %2.5 HCl
13. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.0 HCl
14. Yıkama 2 %1 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
15. Yıkama 2 %1 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 10 HCl

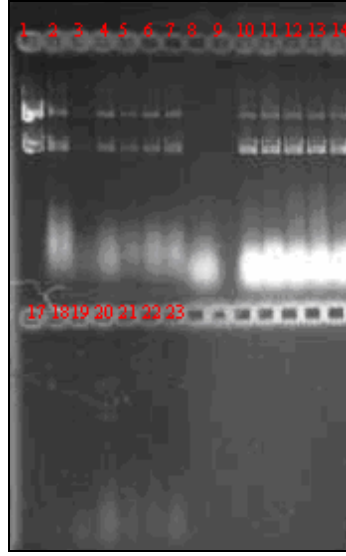
Konsantrasyonu %2.5 ve %5 olan HCl asid çözeltisinin %1.6 (v/v) ilavesinin %1'lik agaroz jel görüntüsüne göre “çökelti 2” olarak adlandırdığımız “Peg-10 tallow- pDNA- RNA”

kompleks oluşumundan ayrılan plazmid DNA verimi düşüktür. RNA ayrımı %2.5 HCl için en yüksek olup %5 ve %7.5 HCl'de ise neredeyse aynıdır. %10 HCl ilavesinde süzüntüde kalan RNA miktarı en fazladır, buna karşılık pDNA'nın tamamı çöktürüldü. %7.5 HCl asid çözeltisi ilavesi ile de pDNA tamamen çöktürüldü ve çökeltideki RNA miktarının %10'luk HCl 'deki ne göre daha az olduğu gözlemlendi. (Şekil.4.13)

“Süzüntü 2” örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntülerinden Peg-10 Tallow katyonik yüzey aktif maddesinin, farklı konsantrasyonlarda HCl çözeltisinin etkisi ile RNA molekülüne karşı seçici çöktürme özelliği kazandığı görülmektedir.

Polianyonik moleküller pDNA ve RNA ortama bulunmadan 0.01(v/v)'lik Peg-10 tallow'un 0.1 M tris-HCl pH:8.7 çözeltisine %7.5 HCl çözeltisinden %1.6 (v/v) ilave edilmesi ile ortam pH'sı 8.00'dir.Ortamın iletkenliği ise 5.14 mS/cm'dir. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.5)

5.



Şekil.4.14 Peg -10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %5, %5.5, %6.0, %6.5HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1. Saf pDNA
2. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.0 HCl
3. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.5 HCl
4. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %6.0 HCl
5. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 6.5 HCl
6. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.0 HCl
7. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.0 HCl
8. Süpernatant 1
9. Yıkama 1
10. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.0 HCl
11. Süpernatant 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.5 HCl
12. Süpernatant 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %6.0 HCl
13. Süpernatant 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 6.5 HCl
14. Süpernatant 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.0 HCl

15. Yıkama 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.0 HCl
16. Yıkama 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %5.5 HCl
17. Yıkama 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %6.0 HCl
18. Yıkama 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %6.5 HCl
19. Yıkama 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.0 HCl

%5, %5.5, %6, %6.5 ve %7 HCl konsantrasyonlarında Peg-10 tallow'un seçici çöktürme özelliği belirgin olarak gözlemlenmemiştir. Çöktürme işleminde pDNA verimi yüksek değildir. RNA ayrımı gerçekleştirilmiştir ancak plazmid DNA'nın son çökelti'ye total aktarımı sağlanamamıştır. (Şekil.4.14)

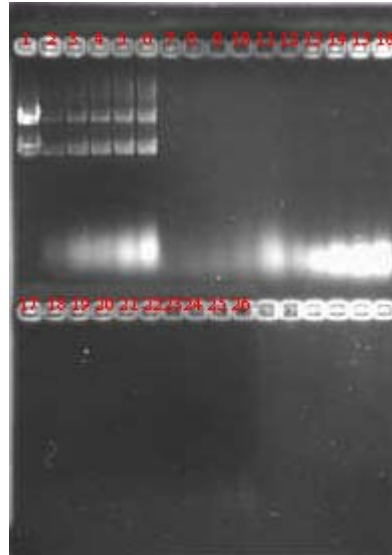
Polianyonik moleküller pDNA ve RNA ortama bulunmadan %1'lik Peg-10 tallow'un 0.1 M tris-HCl pH:8.7 çözeltisine %5, %5.5, %6, %6.5 ve %7 HCl çözeltisinden %1.6 (v/v) ilave edilmesi ile ortamın pH'sı sırayla 8.21, 8.11, 8.16, 8.06, 8.05'tir..Ortamın iletkenliği ise sırayla 4.15, 4.45, 4.26, 4.82, 4.79 mS/cm'dir. (Bölüm 4.5, Çizelge 4.5)

6. Peg-10 Tallow'un 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortamda aside bağlı seçiciliğindeki değişimlerin izlenmesi 50 (%_{v/v}) lizat miktarı için yapılmıştır.

4.4.2 Farklı Lizat Miktarlarının Peg-10 Tallow'un Seçiciliğine Etkisi Sonuçları

Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesi kullanılarak pDNA'nın saflaştırılması işlemine asidin etkisinin incelendiği 4.4.1 bölümünde %7.5 HCl asid çözeltisinin %1.6 (v/v) hacmi plazmid DNA'sının tamamını kısmi RNA molekülü ile birlikte çöktürdüğü asid konsantrasyonu olarak belirlendi. Bu bölümde ki çalışmada asid konsantrasyonu değiştirilmeden lizat örneğinin miktarının değiştirildiği denemeler bulunmaktadır. Lizat konsantrasyonu deiyonize su ile seyreltilerek değiştirildi. Lizat örneğinin seyreltme ile tuz oranı azaltılmaya çalışıldı ve Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesi ile yapılan çöktürmede meydana gelen değişimler saptandı. Elde edilen sonuçlar ve bulgular aşağıda maddeler halinde verildi ;

1. Alkali lizis işlemi ile (Birnboim ve Dolly, 1979) elde edilen lizat örneğinin doğal tuz miktarının etkisi farklı oranlarda seyreltildiğinde azaltılmaya çalışılarak 0.01(v/v)'lik Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin çöktürme özelliğine etkisi gözlemlenmeye çalışıldı.



Şekil.4.15 Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminin farklı lizat konsantrasyonlarında %7.5 HCl'in etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1. Saf pDNA
2. Çökelti 2 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + %1.6 (v/v) %7.5 HCl
3. Çökelti 2 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + %1.6 (v/v) %7.5 HCl

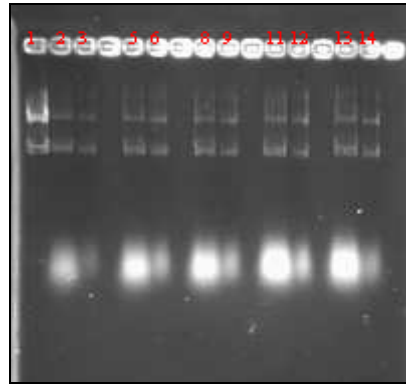
4. Çökelti 2 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow +%1.6 (v/v) %7.5 HCl
5. Çökelti 2 ; 40(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow +%1.6 (v/v) %7.5 HCl
6. Çökelti 2 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + %1.6 (v/v) %7.5 HCl
7. Supernatant 1 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow +%1.6 (v/v) %7.5 HCl
8. Supernatant 1 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
9. Supernatant 1 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
10. Supernatant 1; 40(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
11. Supernatant 1 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
12. Supernatant 2 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
13. Supernatant 2 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
14. Supernatant 2 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow +0.016 (v/v) %7.5 HCl
15. Supernatant 2 ; 40(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
16. Supernatant 2 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
17. Yıkama 1 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
18. Yıkama 1 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
19. Yıkama 1 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
20. Yıkama 1 ; 40(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
21. Yıkama 2 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
22. Yıkama 2 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
23. Yıkama 2 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
24. Yıkama 2 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
25. Yıkama 2 ;40(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl
26. Yıkama 2 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01 Peg-10 tallow + 0.016(v/v) %7.5 HCl

%10 (v/v), %20 (v/v), %30 (v/v), %40 (v/v), %50 (v/v) konsantrasyonlu lizat örneklerine

%7.5'luk HCl asid çözeltisinin etkisi %1'lik agaroz jelde görülmektedir.(Şekil.4.15) Lizat örneklerin farklı konsantrasyonlarında %7.5 HCl asid çözeltisinin 0.016(v/v) hacminin

etkisi pDNA her bir lizat konsantrasyonu için Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesi ile tamamen çöktürüldüğü görüldü. Lizat örneğinin konsantrasyonu azaldıkça, örnekte bulunan plazmid ve RNA moleküllerinin miktarı da azalmaktadır. Peg- 10 tallow yüzey aktif maddesinin her bir lizat konsantrasyonunda pDNA yı tamamen çöktürmesine karşın RNA'yı da kısmi olarak pDNA ile birlikte çöktürmüştür. (Şekil.4.15) Çöktürme işleminde kullanılacak lizat miktarı Peg-10 tallow konsantrasyonu değişmeden 0.01(v/v) Peg-10 tallow arttıkça “süzüntü 2” ‘de kalan RNA miktarı da artan lizat miktarına orantılı olarak artmıştır.

2. 4.4.2 bölümünün 1. maddesinde 0.01(v/v)'lık Peg-10 tallow ile çöktürme işleminden elde edilen örnekler çöktürme işlemi görmemiş standart lizat örnekleri ile kıyaslanması yapıldı. Sonuçlar %1'lik agaroz jel ile incelendi. (Şekil.4.16)



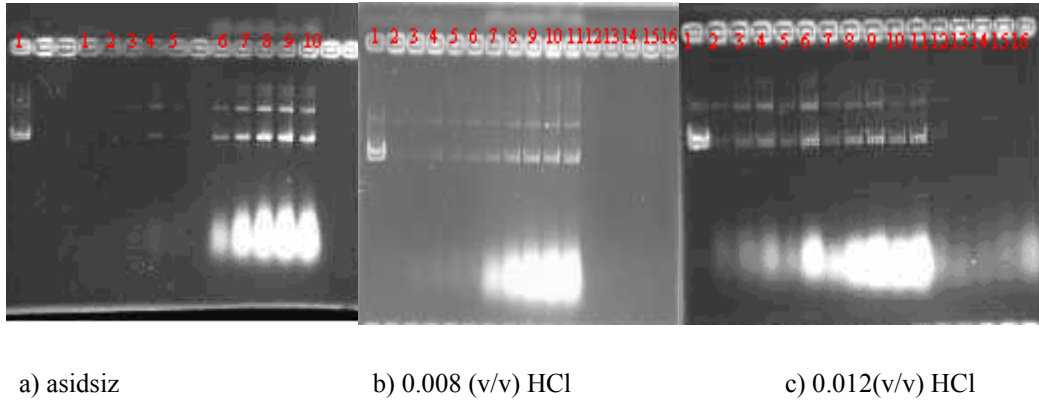
Şekil.4.16 Peg -10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminin farklı lizat konsantrasyonlarında %7.5 HCl 'in etkisinin standart lizat örnekleriyle kıyaslanması

- 1.saf pDNA
2. standart 10(%_{v/v}) lizat
3. çökelti 2 ; 10(%_{v/v}) lizat
5. standart 20(%_{v/v}) lizat
6. çökelti 2; 20(%_{v/v}) lizat
8. standart 30(%_{v/v}) lizat

9. çökelti 2; 30 (%_{v/v}) lizat
10. standart 40 (%_{v/v}) lizat
11. çökelti 2; 40(%_{v/v}) lizat
13. standart 50(%_{v/v}) lizat
14. çökelti 2; 50(%_{v/v}) lizat

Plazmid DNA miktarı standart lizat örneği ile kıyaslandığında verim %100'dür. RNA'nın ise kısmi olarak uzaklaştırılması sağlandı. Lizat örneğinin konsantrasyonunun değiştirilmesi RNA'nın ortamdaki tamamen uzaklaştırılmasını sağlamadığı gözlemlendi.

3. Konsantrasyonları farklı lizat örneklerine sırayla, %7.5'lük HCl asid çözeltisi ilave edilmeden, aynı konsantrasyonda ki asid çözeltisinden 0.008 (v/v) ve 0.012 (v/v) hacimleri ilave edilerek 0.01(v/v)'lik PEG-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesinin çöktürme özelliğindeki değişimler izlendi. (Şekil 4.17)



Şekil.4.17 Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işleminde farklı lizat konsantrasyonlarına sırayla asitsiz, 0.008 (v/v), 0.012 (v/v) miktarlarında %7.5 (v/v) HCl 'in ilavesinin çöktürme işlemine etkisi

1. Saf pDNA
2. Çökelti 2 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
3. Çökelti 2 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
4. Çökelti 2 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow

5. Çökelti 2 ; 40(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
6. Çökelti 2 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
7. Supernatant 2 ; 10(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
8. Supernatant 2 ; 20(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
9. Supernatant 2 ; 30(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
10. Supernatant 2 ; 40(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow
11. Supernatant 2 ; 50(%_{v/v}) lizat + 0.01(v/v) Peg-10 tallow

0.1 M Tris-HCl tampon çözeltisinin de (pH:8.7) çözölen pDNA ve RNA moleköleri asid çözeltisi ilavesi olmadan %1'lik Peg-10 tallow yüzey aktif maddenin pDNA ve RNA molekölerini çöktürme özelliğı göstermediğı göröldü. %7.5'luk HCl asid çözeltisinin pDNA ve RNAmolekölerinin çözüdüğü 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponuna ilave edilmesi ile Peg - 10 tallow yüzey aktif maddesi çöktürme özelliğı gösterdi. %7.5'luk HCl asid çözeltisinin sırayla %0.008 (v/v) ve 0.012 (v/v) hacimlerinde ilave edilmesi pDNA'nın tamamen çökmesini sağlamadığı belirlendi. Bu koşullarda elde edilen pDNA verimi düşüktür.

4.4.3 Peg-10 Tallow'un Seçiciliğine Tuz (NaCl) Etkisi Sonuçları ;

1. Çalışmanın bu bölümünde Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesi kullanılarak pDNA'nın saflaştırılması işlemine tuz (NaCl) çözeltisinin etkisini gösteren denemeler yer almaktadır . Peg-10 tallow yüzey aktif maddesine asid (HCl) çözeltisinin etkisinin belirlendiğı 4.2.1 bölümünden alınan değlerlerden yararlanılarak 0.1 M Tris-HCl (pH:8.7)'li ortama asid çözeltisinin yanı sıra tuz çözeltisinin ilave edilmesi ile pDNA çöktürme işleminde meydana gelen değışimler %1'lik agaroz jel elektroforezinden elde edilen gözlemlere göre değlendirildi. İlk olarak konsantrasyonları 0.1, 0.3, 0.5 ve 0.9 M olan yüksek konsantrasyonlu NaCl çözeltisinin Peg-10 tallow yüzey aktif maddesi ile çöktürmeye etkisi incelendi. Daha sonra konsantrasyonları 20mM, 40mM, 60mM, 80mM ve 100 mM olan NaCl tuz çözeltisilerinin de çöktürme işlemine etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar ve bulgular aşağıda maddeler halinde verildi ;

1.



Şekil.4.18 Peg -10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %7.5 HCl 'nin Tuzlu (NaCl) ortamda etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1.Saf pDNA

2. Çökelti 2 ; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

3. Çökelti 2 ; 0.1 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

4. Çökelti 2 ; 0.3 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

5. Çökelti 2 ; 0.5 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.5 HCl

6. Çökelti 2 ; 0.7 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

7. Çökelti 2 ; 0.9 M NaCl +0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.5 HCl

8. Süpernatant 1

9. Yıkama 1

10. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

11. Süpernatant 2; 0.1 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

12. Süpernatant 2; 0.3 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

13. Süpernatant 2; 0.5 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.5 HCl

14. Süpernatant 2; 0.7 M NaCl + %1 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

15. Süpernatant 2; 0.9 M NaCl +%1 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.5 HCl

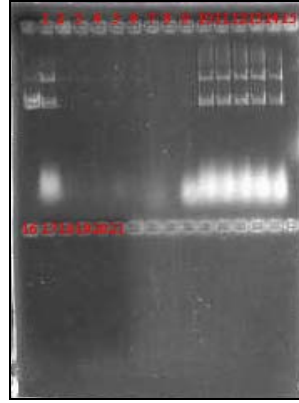
16. Yıkama 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

17. Yıkama 2; 0.1 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
18. Yıkama 2 ; 0.3 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
19. Yıkama 2; 0.5 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.5 HCl
20. Yıkama 2; 0.7 M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
21. Yıkama 2; 0.9 M NaCl +0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.5 HCl

Peg -10 tallow yüzey aktif maddesinin çöktürme özelliği, 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ve %7.5'luk HCl asid çözeltisinin bulunduğu ortama NaCl tuz çözeltisinin farklı konsantrasyonları (0.1 M, 0.3M, 0.5M, 0.9M) ilave edildiğinde incelendi. Peg-10 tallow'un bu ortamda pDNA ve RNA moleküllerini çöktürme özelliği %1'lik agaroz jel elektroforezinde belirlendi. Tuz çözeltisinin ilave edilmesi ile katyonik yüzey aktif madde olan Peg-10 tallow'un çöktürme özelliği Şekil.4.18'de görülmektedir. 0.5, 0.7, 0.9 M NaCl çözeltisinin etkisi ile çökelti oranı artmıştır. 0.1M ve 0.3 M NaCl'lü ortamda az miktarda çökeltme olmuştur.(Şekil.4.18)

Ortamdaki tuz konsantrasyonu arttıkça, çöktürülen plazmid ve RNA miktarı artmıştır. Çöktürülmenin Peg-10 tallow ile yapılacağı ortama asid çözeltisine ilave olarak, tuz çözeltisinin ilave edilmesi ile pDNA ve RNA moleküllerinin çöktürülme miktarlarının değiştiği görüldü..Elde edilen sonuçlar sadece % 7.5'luk asid çözeltisine bağlı olarak yapılan çöktürmede elde edilen sonuçlardan farklıdır.(Şekil.4.15) Peg-10 tallow yüzey aktif maddesinin, tuz çözeltisinin yukarıda belirtilen konsantrasyonlarında pDNA'nın tamamını çöktüremediği görüldü. 0.1 M ve 0.3 M Tuz konsantrasyonunda pDNA verimi düşüktür beraberinde çöken RNA oranı'da düşüktür. Bu konsantrasyonlarda süzöntü 2'de kalan RNA miktarı yüksektir. 0.5, 0.7, 0.9 M tuz çözeltisi varlığında ise pDNA verimi düşüktür ve RNA kontaminasyonunun da yüksek olduğu gözlemlendi.(Şekil.4.18)

2.



Şekil.4.19 Peg-10 tallow ile pDNA'nın çöktürülerek saflaştırılması işlemine %7.5 HCl'nin tuzlu (NaCl) ortamda etkisinin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1.Saf pDNA

2.Çökelti 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl (tuzsuz örnek)

3.Çökelti 2; 20 mM NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

4.Çökelti 2; 40 mM NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

5.Çökelti 2; 60 mM NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.5 HCl

6.Çökelti 2; 80m M NaCl + 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

7.Çökelti 2; 100mM NaCl +0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.5 HCl

8.Süpernatant 1

9.Yıkama 1

10. Süpernatant 2; 0.01 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

11. Süpernatant 2; 20 mM NaCl + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

12. Süpernatant 2; 40m M NaCl + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0016 (v/v) %7.5 HCl

13. Süpernatant 2; 60m M NaCl + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.5HCl

14. Süpernatant 2; 80mM NaCl + 0.01(v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

15. Süpernatant 2; 100mM NaCl +0.01 (v/v)Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.5 HCl

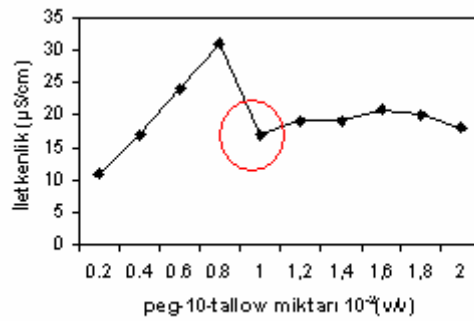
16. Yıkama 2; %1 (v/v) Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl

17. Yıkama 2; 20m M NaCl + 0.01 (v/v)Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
18. Yıkama 2; 40mM NaCl + 0.01 (v/v)Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
19. Yıkama 2; 60mM NaCl + 0.01 (v/v)Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) % 7.5 HCl
20. Yıkama 2; 80mM NaCl + 0.01 (v/v)Peg-10 tallow + 0.016 (v/v) %7.5 HCl
21. Yıkama 2; 100mM NaCl +0.01 (v/v)Peg-10 tallow + 0.016 (v/v)% 7.5 HCl

Peg -10 tallow yüzey aktif maddesinin çöktürme özelliği, 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ve %7.5'luk HCl asid çözeltisinin bulunduğu ortama NaCl tuz çözeltisinin farklı konsantrasyonlarında (20m M, 40mM, 60mM, 80M, 100mM)incelendi.(Şekil.4.19) Düşük tuz konsantrasyonlarında Peg-10 tallow çöktürme özelliği göstermedi .

4.5 Peg -10 tallow ile Çöktürme Yönteminin iletkenlik Sonuçları

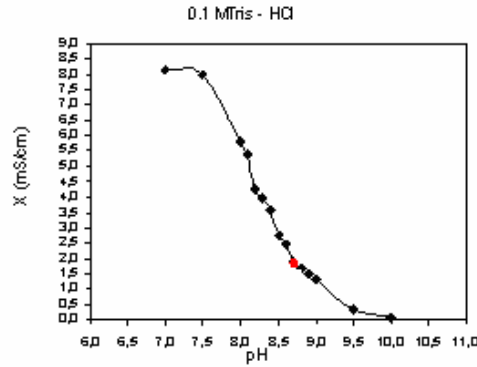
1. Peg-10 tallow yüzey aktif maddesinin 0.002- 0.02(v/v) arasında değişen miktarları deiyonize suda çözülerek, elde edilen farklı konsantrasyondaki peg-10 tallow içeren çözeltilerin iletkenlik değerlerinin değişimi şekil 4.20'de görülmektedir. Molekülün deiyonize su ortamında 0.01- 0.02 (v/v) çözeltisinin iletkenlik değerlerinin değişmediği görüldü. Bu değerler için molekülün sabit ve kararlı bir hal aldığı söylenebilir.



Şekil 4.20 Peg-10 Tallow katyonik yüzey aktif maddesinin deiyonize suda ortamında okunan iletkenlik değerleri

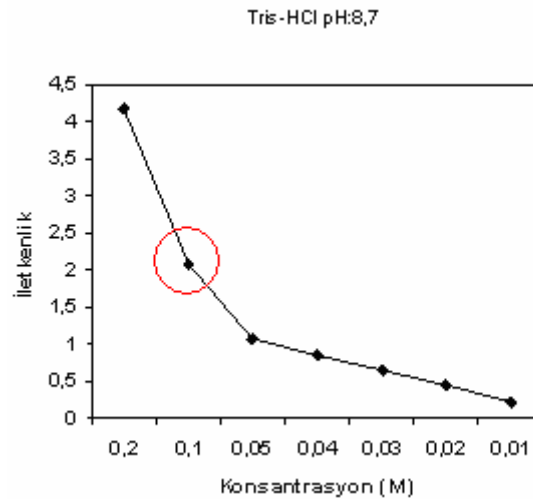
2. Peg-10 tallow ile plazmid çöktürmek için geliştirilen yöntemde plazmid molekülü, RNA molekülü ve Peg-10 tallow polimer karışımının çözünmesi için Tris-HCl tamponu kullanıldı. Tris-HCl tamponunun kullanılabildiği pH aralığı 7-9'dır.(Sigma) Bu pH aralıklarında

tamponun iletkenlik değerlerindeki değişim aşağıdaki şekil 4.21’de ve görülmektedir. 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tampon zeltisinin iletkenlik değeri~ 1.9mS/cm’dir.



şekil 4.21 0.1 M Tris-HCl tamponunun pH:7-10 aralığında değişen iletkenlik değerleri

3. Peg-10 tallow yüz aktif maddesi ile plazmin DNA’nın çöktürülerek saflaştırılması yönteminde tampon zelti olarak kullanılan ve pH’sı:8.7 olan Tris –HCl tamponunun farklı konsantrasyonlarda hazırlanan zeltisinin iletkenlik değerleri aşağıda şekil 4.22’de ve izelge 3.4’te görülmektedir. Peg-10 tallow ile plazmid çöktürme yönteminde kullanılan Tris-HCl tamponunun konsantrasyonu 0.1 M olup iletkenlik değeri 1.9mS/cm’dir.



şekil 4.22 0.1 M Tris-HCl tamponun farklı konsantrasyonlarda ki iletkenlik değerleri κ (mS/cm)

Çizelge 4.4 Tris-HCl tmpon çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki iletkenlik değerleri

C (mol/L)	0,2	0,1	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
X (mS/cm)	4,17	1,9	1,07	0,86	0,66	0,45	0,23

4. Peg-10 tallow bileşiğinin değişen miktarlarının 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortama ilave edilmesinin tamponun pH değerinde değişime neden olmadığı belirlendi. Sonuçlar çizelge 4.5'te verildi. pH değerleri sabit kalırken iletkenlik değerlerinin de büyük ölçüde değişmediği görüldü.0.1 M Tris-HCl tamponuna sadece peg-10 tallow'un ilave edilmesi iletkenlik değerlerinde değişim oluşturmadığı ve pH değerinin sabit kaldığı belirlendi.

Çizelge 4.5 Peg-10 tallow'un değişen konsantrasyonlarının 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortamda iletkenlik ve pH değerleri

PEG-10 tallow miktarı (v/v)	X (uS/cm)	pH
0	1895	8,73
0.002	1885	8,72
0.004	1890	8,73
0.006	1888	8,72
0.008	1883	8,72
0.01	1876	8,73
0.012	1873	8,71
0.014	1886	8,71
0.016	1884	8,73
0.018	1876	8,71
0.02	1870	8,71

5. 0,1 M pH:8.7 Tris-HCl tamponunda 0.01 (v/v) peg-10 tallow'un çözülmesi ile hazırlanan çözeltiye asid ilave edilmesinin ortamın iletkenliğine ve tamponun pH değerine olan etkisi incelenmiştir. Asid çözeltisinin ilavesi ortamın iletkenlik ve pH değerlerini değiştirmiştir. Elde edilen değerler aşağıda çizelge 4.6'da ki gibidir.

Çizelge 4.6 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortama Peg-10 tallow'un ve HCl'in iletkenlik ve pH değerlerine etkisi

PEG-10 tallow(v/v) + HCl	X (mS/cm)	pH
0.01peg +%1 HCl	2,31	8,61
0.01peg +%2 HCl	2,75	8,48
0.01peg +%2,5 HCl	3,17	8,40
0.01peg +%3 HCl	3,23	8,35
0.01peg +%3.5 HCl	3,60	8,31
0.01peg +%4 HCl	3,61	8,27
0.01peg +%4.5 HCl	3,92	8,23
0.01peg +%5.0 HCl	4,15	8,21
0.01peg +%5.5 HCl	4,45	8,11
0.01peg +%6.0 HCl	4,26	8,16
0.01peg +%6.5 HCl	4,82	8,06
0.01peg +%7 HCl	4,79	8,05
0.01peg +%7.5 HCl	5,14	8,00
0.01peg +%10 HCl	6,00	7,76

6. 0.01(v/v) peg-10 tallow ve %7.5 HCl içeren 0.1 M pH:8.7, Tris-HCl tampon çözeltisine NaCl tuz çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının ilave edilmesi ile iletkenlik ve pH değerlerinde meydana gelen değişimler aşağıda ki çizelge 4.7'de görüldüğü gibidir. Tuz konsantrasyonunu artması iletkenlik değerlerinde yüksek miktarda artış sağladı. Tuz çözeltisinin ilavesi ile iletkenlik değerlerinde görülen yüksek artışın peg-10 tallow yüzey aktif maddesinin plazmid DNA'yı çöktürme etkisini etkilediği düşünülmektedir.

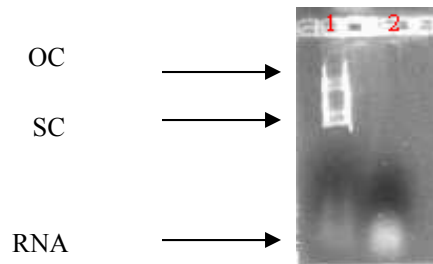
Çizelge 4.7 Peg-10 tallow ve HCl içeren 0.1 M Tris-HCl pH:8.7 tamponlu ortamına NaCl çözeltisinin farklı kons.'da ilavesinin iletkenlik ve pH değerlerine etkisi

NaCl Kons. (M)	pH Değerleri	İletkenlik (mS/cm)
0	8.3	1.9
0.1	8.1	15.54
0.3	8.1	33.50
0.5	8.1	50.02
0.7	8.1	66.20
0.9	8.1	81.60

4.6 ATPS Sisteminde PEG-600 (Polietilen glikol) Noniyonik Polimerin Kullanılması ile pDNA'nın Saflaştırılması İşleminin Sonuçları

1. Çalışmamızda %35 PEG 600 - %6 (NH₄)₂SO₄ bileşimli ATPS sistemi seçilerek pDNA'nın oluşan fazlar arasında ayrılması sağlanmaya çalışıldı. Ayrımın gerçekleşip gerçekleşmediği %1 agaroz jele uygulanan örneklerden gözlemlendi.(Şekil.11) Üst faz polietilen glikol'ce (PEG) zengin olup, alt faz tuzca zengin fazdır.(D.M.F Prazeres ve ark., 2001)

Sisteme seyreltilmemiş %100 lizat verildi. Polimerce (PEG 600) zengin üst faz Plazmid DNA bandı görülmezken RNA'nın büyük bir kısmının bu fazda kaldığı gözlemlendi. Tuzca (Amonyum Sülfat) zengin alt fazda ise pDNA'nın tamamı toplanırken kısmi oranda RNA'da beraberinde gözlemlendi. (Şekil.4.23)

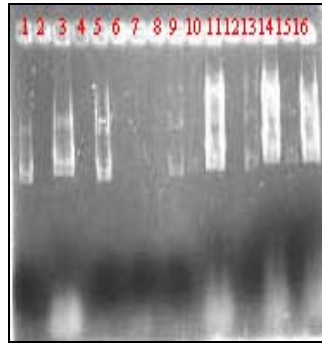


Şekil.4.23 PEG 600-(NH₄)₂SO₄ ATPS sisteminin alt faz ve üst faz bileşiminin %1'lik agaroz jelde incelenmesi

1. Alt Faz 2. Üst Faz

2. Küçük molekül ağırlıklı nükleik asitleri (RNA), safsızlıkları (protein ve endotoksinler) çöktürerek uzaklaştırmak ve plazmid DNA miktarını konsantre edebilmek için çeşitli çöktürücü ajanlar kullanılmaktadır. Bunlardan biri 2-propanol'dur (isopropanol). (D.M.F Prazeres, 2006)

%35 PEG 600 - %6 (NH₄)₂SO₄ ATPS sisteminden elde edilen alt fazda Şekil.11'de görünen RNA molekülünün tamamen uzaklaştırılması için isopropanol çözeltisi ile çöktürülme ek adım olarak gerçekleştirildi. 0.7 (v/v) isopropanol ilavesinden sonra çöktürme ile pDNA RNA'dan tamamen uzaklaştırıldı. (Şekil.4.24)



Şekil.4.24 PEG 600-(NH₄)₂SO₄ ATPS sisteminin farklı isopropanol konsantrasyonları ile çöktürülmüş alt faz ve üst faz bileşiminin %1'lik agaroz jeldeki görünümü

1. Saf pDNA
3. Lizat 100(%_{v/v})
5. Çökelti_{Alt faz} 0.4 (v/v) + 0.6(v/v) deiyonize su + 0.7 (v/v)isopropanol
7. Süpernatant _{Alt faz} 0.4(v/v)+ 0.6(v/v)deiyonize su + 0.7(v/v) isopropanol
9. Çökelti_{Alt faz} 0.4 (v/v) + 0.6(v/v) deiyonize su + 0.8(v/v) isopropanol
11. Süpernatant _{alt faz} 0.4(v/v) +0.6(v/v) deiyonize su + 0.8(v/v) isopropanol
13. Çökelti_{Alt faz} 0.4 (v/v) + 0.6(v/v) deiyonize su + 0.9 (v/v)isopropanol
14. Süpernatant _{Alt faz} 0.4(v/v)+ 0.6(v/v)deiyonize su + 0.9(v/v) isopropanol
15. Çökelti_{Alt faz} 0.4 (v/v) + 0.6(v/v) deiyonize su + 10 (v/v) isopropanol
16. Süpernatant _{alt faz} 0.4(v/v) +0.6(v/v) deiyonize su + 10 (v/v) isopropanol

Şekil 12’de görünen %1’lik agaroz jelde 5 numaralı kuyucuğun olduğu sütunda sadece pDNA bandı görülmektedir. RNA molekülüne ait leke şeklindeki görüntü ise süpernatant fazda (7 numaralı kuyucuğun olduğu sütunda) kaldığı gözlemlendi.

İsopropanol küçük molekül ağırlıklı RNA’nın uzaklaştırılmasında çöktürücü ajan olarak seçildi. Çöktürme farklı isopropanol hacimleri kullanılarak yapıldı. Örneğin; 0.7 (v/v) 0.8(v/v) 0.9(v/v) ve 1.0(v/v). 0.8(v/v), 0.9(v/v) ve 1.0(v/v) isopropanol hacimlerinde RNA molekülünün yukarda belirtilen bileşimdeki ATPS sisteminin alt fazından uzaklaştırılamadı.

5. TARTIŞMA

Biyolojik proseslerde elektrostatik etkileşimler önemli rol oynar. Bazı önemli makromoleküller örneğin DNA, RNA, proteinler, fosfolipidler sulu ortamda iyonize olurlar. Örneğin DNA'da fosfat grupları sulu ortamda iyonize olarak molekül polianyon haline dönüşür. (Levin ve ark.,2000 ; Hansson, 2007)

Katyonik yüzey aktif maddeler ise sulu çözeltide iyonize olurlar. Bir pozitif yüklü hidrofilik baş grubuna ve nötral hidrokarbon kuyruğundan oluşan hareketli zincire sahiptir. Elektrostatik etkileşimler sonucu polianyonlar ve katyonik yapılar arasında yeni bir kompleks oluşumu meydana gelmektedir. Ayrıca hidrofobik grupların olmasından dolayı hidrofobik etkileşimlerde mevcuttur. (Levin ve ark.,2000 ; Hansson, 2007)

Bu doktora çalışmasın da pDNA saflaştırmak için kullandığımız iki ayrı yöntemde yer alan Peg-10 tallow yüzey aktif maddesi ve PEG 600 polimerik maddesi polietilen glikol grupları içermektedirler. Peg-10 tallow'un yapısında uzun alkil zincirli hidrofobik kuyruk içermesinden dolayı sulu ortamda plazmid DNA'sını çöktürerek ayırma özelliği gösterdiği düşünülmektedir.

Peg-10 tallow ile plazmid DNA'sının elde edilmesi için geliştirilen bu yöntemin orijinalliği Peg-10 tallow yüzey aktif maddesinin bu amaçla ilk kez kullanılmasıdır. İki çöktürme aşamasından oluşan bu yöntem kısadır ve uygulaması kolaydır. Birinci aşamada direkt lizat örneğinden Peg-10 tallow yüzey aktif maddesi ile çöktürülme yapıldı. Lizatın pH'sı 5.10-5.20 arasında değişmektedir. Birinci aşamada pDNA ve RNA yüzey aktif maddesi tarafından seçicilik sağlanmadan çöktürüldü. Yıkama aşaması elde edilen çökeltinin temizlenmesi için yapıldı. Deiyonize su kullanılarak yapılan yıkama aşamasında çökeltinin su ile çözünmediği görülmüştür. Çöktürme prosedürün ikinci aşamasında elde edilen çökelti (pDNA ve RNA içeren) Tris-HCl tamponlu ortamda çözünmüştür. Ortam pH'sı 8.7'ye ayarlandı.

Peg-10 tallow'un elektriksel yük durumu ortama HCl'in ilavesi ile değiştirilerek yüzey aktif maddenin poli anyonik özellikte olan ve hacmi plazmid DNA 'sından farklı olan RNA'yı seçici olarak bırakıp çöktürmemesi sağlandı.

Son çöktürme aşamasında plazmidin tamamının kullanılan lizat örneğinden kısmi RNA ile birlikte asid varlığında çöktürülmesi gerçekleştirildi. Lizat örneğinden RNA tamamen uzaklaştırıldığında ise pDNA'nın veriminin düştüğü görüldü. Geliştirilen peg-10 tallow yüzey aktif maddesi ile çöktürme yönteminde agaroz gel analiz örneklerinde denatüre plazmid

DNA gözlemlenmedi.

Lizat konsantrasyonunun değiştirilmesi, tuz çözeltisinin farklı konsantrasyonlarının ilave edilmesi, bu yöntem ile plazmid saflaştırılmasında asid etkisi kadar başarı vermediği gözlemlendi. Peg-10 tallow katyonik yüzey aktif maddesi ile pDNA ve RNA moleküllerinin etkileşim mekanizmasının incelenmesi bu çalışmanın ileri aşamasını oluşturacaktır.

ATPS biyolojik maddelerin (protein, nükleik asit, virüsler ve hücreler) ayrılması ve saflaştırılması gibi biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan etkili iki fazlı sulu sistemlerdir. Bu sistemler polimer-polimer karışımından oluşan iki fazlı sistemler olabileceği gibi, polimer – tuz iki fazlı karışımından oluşurlar. Polimer- tuz ATPS sistemlerinde fazlar daha az viskoz olup, bu sistemle ayırma işlemi daha kısa süre almaktadır (Hatti - Kaul, 1999) .

Polimer – tuz bileşenlerinden oluşan ATPS sistemlerde üst faz polimerce zengin, alt faz ise tuzca zengin fazı oluşturmaktadır. Her iki fazın %80-95 oranında su içermesinden dolayı biyomoleküller için toksik olmayan bir ortam sağlanır. Fazlar arası gerilimin düşük, fazlar arası temas yüzeyinin yüksek olması, yüksek derecede kütle transferinin olmasına neden olmaktadır (Hatti-Kaul, 1999).

ATPS sistemlerde nükleik asitlerin ayrımı; makromoleküllerin kimyasal özelliklerine ve büyüklüğüne, sistem komponentlerin özelliklerine ve iyonik bileşimine bağlıdır. (Albertson,1962 ; Frick ve lif 1962; Lif ve arkadaşları 1961; Müller 1985). Sistem özelliklerindeki değişim fazlar arası yüzey özelliklerinin değişimine neden olur, bu da sistemin ayırma özelliğini etkiler. Fazlar arası etkileşimlerde hidrojen bağları, elektriksel etkileşimler, van der Waals bağları, hidrofobik ve sterik etkileşimler rol oynar (Albertsson, 1986). ATPS sistemlerde ayırma işlemini etkileyen faktörler polimer bileşiğinin moleküler ağırlığına, tuz konsantrasyonu ve sisteme verilen maddenin hacmine bağlıdır.

Polietilen glikol noniyonik bir polimer bileşiğidir ve suda kolay çözünür. Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılan ATPS sistemlerde genellikle PEG polimeri ile potasyum hidrojen fosfat veya amonyum sülfat tuz bileşenlerinden oluşur. PEG noniyonik polimerik bileşiğin farklı molekül ağırlıkları ile ATPS sistem oluşturulur. Molekül ağırlığı 400'den küçük PEG polimer bileşiği kullanıldığında pDNA ATPS sistemde polimerik faz olan üst fazda toplanmaktadır (Marcos.J.C.,2005).

Çalışmamızda plazmid saflaştırılmasında ikinci yöntem olarak kullanılan“aqueous two faz polimer-tuz sistemi”nde molekül ağırlığı 600 olan PEG maddesi kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 400’den büyük olan PEG kullanıldığında ATPS sistemle yapılan ayrılma işlemlerinde pDNA sistemin tuzca zengin olan alt fazında kalarak ayrılmaktadır.(Marcos.J.C.,2005, Prazeres D.M.F.,2001).

pDNA eldesinde verimin yüksek olduğu %35 PEG 600 - %6 (NH₄)₂SO₄ ATPS sistemi kullanılmıştır. %35 PEG-600 ve %6 (NH₄)₂SO₄ ‘den oluşan ATPS sisteminde alt fazın total hacmi 0.35 ml üst fazın total hacmi ise 4.2 ml’dir. Sistemin toplam ağırlığı 5 gr’dır. Sistem su ile tamamlandığı için ve suyun yoğunluğu oda sıcaklığında 1 gr/ml olduğundan dolayı sistemin hacmi yaklaşık 5 ml’ye denk gelmektedir. Bu sisteme uygulanan pDNA’nın molekül büyüklüğü 6.1 kbp ‘dır. Bu sisteme %20(v/v), %30 (v/v), %40(v/v) lizat örneği yüklendiğinde sistemden yüksek verimde pDNA elde edilebilmiştir. (Joao Carlos ve ark.,2005)

%35 PEG-600 ve %6 (NH₄)₂SO₄ ‘den oluşan ATPS sisteme %100 lizat örneği bizim çalışmamızda uygulandı. %100 lizat örneği bu sisteme yüklendiğinde p(DNA)’nın tamamının kısmi RNA ile birlikte alt fazda kaldığı %1’lik agaroz jel elektroforezinde belirlendi. pDNA’yı tamamen saflaştırmak için %35 PEG 600 - %6 (NH₄)₂SO₄ sistemi 0.7 (v/v) ‘lik isopropanol ile entegre edildi. İsoopropanol ile RNA’nın lizat örneğinden uzaklaşması sağlandı.İşlemin sonunda %1’lik agaroz jel elektroforezinde RNA’ sız pDNA elde edilebildiği görüldü. Elde edilen örneğin hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak kantitatif analizi bu çalışmanın ileri aşamasını oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

Sharon Y.W., Jeisa M.P., David P., (2007) "Polymer Systems for Gene Delivery-Past, present and Future", Progress in Polymer Science, Vol:32, Iss:8-9, 799-837, 2007.

Urthaler J., Ascher C., Wöhrer H., Necina R., (2007) "Automated Alkaline Lysis for Industrial Scale cGMP Production of Pharmaceutical grade Plasmid DNA", Journal of Biotechnology, 30 January 2007, 132-149.

Zhu Li L., Liu Y., Sheng Sun M., Shao Y.M., (2007) "Effect of Salt on Purification of Plasmid DNA Using Size- Exclusion Chromatography", Journal of Chromatography A, 19 January 2007, 228-235.

Ouyang C., Chen S., Che B., Xue G., "Aggregation of Azo Dye Orange I Induced by Polyethylene Glycol in Aqueous Solution", Colloids and Surfaces A, vol:301, 1-3, p:346-351, 2007.

Ketner A.M., Kumar R., Davies T.S., Elder P.W., Raghavan S.R., "A Simple Class of Photoreological Fluids: Surfactant Solutions with Viscosity Tunable by Light", Journal of American Chemical Society, 129, 1553-1559, 2007.

Derkaoui N., Said S., Grohens Y., Olier R., Privat M., "PEG 400 Novel Phase Description in Water", Journal of Colloid and Interface Science, vol:305, 2, p:330-338, 2007

Kolishetti N., Ramakrishnan S., "Effect of Surfactants on the Fluorescence Spectra of water-Soluble MEHPPV Derivatives Having Grafted Polyelectrolyte Chains", Journal of Chemical Science, vol:119, No:2, 185-193, March 2007.

Hongtao L., Shubiao Z., Bing W., Shaohui C., Jie Y., (2007) "Toxicity of Cationic Lipids and Cationic Polymers in Gene Delivery", Journal of Controlled Release, Vol:114, Iss:1 100-109, 2006.

Ascarateil S., Dupuis L., (2006) "Surfactants in Vaccine Adjuvants: Description and Perspectives", 24S2, S2/83-S2/85, 2006.

Zhao T., Sun G., "Synthesis and Characterization of Antimicrobial Cationic Surfactants: Aminopyridinium Salts", Journal of Surfactants and Detergents, vol:9, April 2006.

Chiang C.L., Sung C.S., (2006) "Purification of Transfection-Grade Plasmid DNA from Bacterial Cells with Superparamagnetic Nanoparticles", Journal of Magnetism and Magnetic Materials, July 2006, USA, 7-13.

Williams L.E., Detter C., Barry K., Lapidus A., Summers A. O., (2006) "Facile Recovery of Individual High-Molecular-Weight, Low-Copy-Number Natural Plasmid for Genomic Sequencing", Applied and Environmental Microbiology, July 2006, 4899-4906.

Abouzid K., Ndeboko B., Durantel S., Jamard C., Zoulim F., Butonfosse T., Cova L., (2006) "Genetic Vaccination for Production of DNA-designed Antibodies Specific to Hepadnavirus Envelope Proteins", DNA Vaccines, 22 May 2006, 4615-4617.

Freitas S.S., Santos J.A.L., Prazeres D.M.F., (2006) "Optimization of Isopropanol and Ammonium Sulfate Precipitation Steps in the Purification of Plasmid DNA", American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers, 4 May 2006.

Diogo M.M., Queiroz J.A., Prazeres D.M.F.,(2005) “ Chromotography of Plasmid DNA ”, Journal of Chromotography A, 1069, 3-22, 2005.

Badea I., Verrall R., Baca-Estrada M., Tikoo S., Rsenberg A., Kumar P., Foldravi M., (2005) “In Vivo Cutaneous Interferon γ Gene Delivery Using Novel Dicationic (gemini) Surfactant-Plasmid Complexes”, The Journal of Gene Medicine, (7), 1200-1214, 2005

Tridade I.P., Diogo M.M., Prazerers D.M.F., Marcos J.C., (2005), “Purification of Plasmid DNA Vectors by Aqueous Two-Phase Extraction and Hydrophobic Interaction Chromotography”, Kournal of Chromotography A, 1082, 176-184, 2005.

Frerix A., Müller M., Kula R.M, Hubbuch J., (2005),“ Scalable Recovery of Plasmid DNA Based on Aqueous Two-Phase Separation”, Biotechnol. Appl. Biochem. 42, 57-66, 2005.

Sousa F., Tomaz C.T., Prazeres D.M.F., Queiroz J.A.,(2005) “Separation of Supercoiled and Open Circular Plasmid DNA Isoforms by Chromotography with a Histidine- Agarose Support”, Analytical Biochemistry 343, 183-185, 2005.

Cardenas M., Nylander T., Lindman B.,(2005) “DNA and Cationic Surfactants at Solid Surfaces”, Colloid and Surfaces A:Physicochem. Eng. Aspects, 270-271, 33-43,2005.

Scott M., Kenton Z., Adrian H., (2005),”Therapeutic Compositions and Methods for Treating Viril Infection”, United States Patent, 6,960,431, ! November 2005.

Mc Loughlin D., Delsanti M., Albouy A., Langevin D., “Aggregates formation between short DNA fragments and Cationic Surfactants”, Molecular Physics,vol:103,21-23,December 2005

Mc Loughlin D., Delsanti M., Tribet C., Langevin D.” DNA Bundle Formation Induced by Cationic Surfactants”, Europhysics Letter, 69 (3), pp:461-467, 2005.

Shubiao Z., Yingmei X., Bing W., Weihong Q., Dongliang L., Zongshi L., (2004) “Cationic Compounds Used in Lipoplexes and Polyplexes for Gene Delivery”, Journal of Controlled Release, Vol:100,Iss:2, 165-180, 2004.

Sharma V.K., Kalonia D.S., “Polyethylene glycol-Induced Precipitation of Interferon Alpha-2a Followed by Vacuum Drying:Development of a Novel Process for Obtaining a Dry, Stable Powder”, AAPS PharmSci. 6(1), January 2004.

Konuk M., (2004) “Moleküler Biyoloji Önemli Notlar”, Nobel Yayın Dağıtım, 2.Baskı Ankara, Ocak 2004.

Temizkan G., (2004) “Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler”,Genişletilmiş 2. Baskı , Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (Biyogem), Yayın no:2.

Dong-ShunD., Hao-Ran L., Di-Xia L., Shi-Jun H., “Cation- π Interaction between the Aromatic Organic Counterion and DTAB Micelle in Mixed Solvents”, Chinese Journal of Chemistry, 22, 1123-1127, 2004.

Qian Z.Y., Li S., He Y., Liu X.B., “Thermal and Hydrolytic Degradation Behaviour of Degradable poly(etheresteramide) Copolymers Based on Caprolactone, 11-Aminoundecanoic Acid, and Poly(ethylene glycol) ”, Polymer Degradation and Stability 84, 41-47, 2004.

Stadler J., Lemmens R., Nyhammar T.,(2004) “Plasmid DNA Purification”, The Journal of Gene Medicine, (6), 54-66, 2004 .

Christensen M., Nielsen O.F., Jensen P., Schnell U., “ Water structure in polyethylene glycols for preservation of wooden artefacts”, Journal of Molecular Structure, vol: 735-736,267-270, 14 Şubat 2004

Wahlund P.O., Gustavson P.E., Izumrudov V.A., Larsson P.O., Galaev I.Y.,(2004) “Polyelectrolyte Complexes as a Tool of Plasmid DNA”, Journal of Chromotography B, Vol:80, No:1,121-127, July 2004.

Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.,(2004)“Design of Flowsheets for the Recovery and Purification of Plasmids for Gene Therapy and DNA Vaccination”, Chemical Engineering and Processing, Vol:43, No: 5, 609- 624, May 2004.

Wahlund P.O., Gustavsson P.E., Izumrudov V.A., Larsson P.O., Galaev Y.I., (2004), “Precipitation by Polycation as Capture Step in Purification of Plasmid DNA From a Clarified Lysate”, Biotechnology and Bioengineering, vol:87, No:5, September 5, 2004.

Tomanee P., Hsu J.T., Ito Y., (2004)“Fractionation of Protein, RNA and Plasmid DNA in Centrifugal Precipitation Chromotography Using Cationic Surfactant CTAB Containing Inorganic Salts NaCl and NH₄Cl ”, Biotechnology and Bioengineering, vol:88, No:1, 5 October 2004.

Dr. Ayşe Kars, (2004), “Gen Tedavisi”, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Non-Hodgkin Lenfoma, 18-22 Mayıs 2004, 59-63.

Kasper K.F., Mikos A.G.,(2004) “Biomaterials and Gene Therapy”, Advances in Chemical Engineering, vol:29, 137-168.

Wahlund P.O., Gustavsson P.E., Izumrudov V.A., Larsson P.O., Galaev I.Y.,(2004) “Precipitation by Polycation as Capture Step in Purification of Plasmid DNA From a Clarified Lysate”, iotechnology and Bioengineering, Vol 87, No:5, 5 September 2004.

Tomanee P., Hsu J.T., Ito Y., (2004) “ Fractionation of Protein ,RNA and Plasmid DNA in Centrifugal Prepitation Chromotography Using Cationic Surfactant CTAB Containing Inorganic Salts NaCl and NH₄Cl”, Biotechnology and Bioengineering, vol:88, no:1,October 5,2004.

Diogo M.M., Prazeres D.M.F., (2003)“Assesment of Purity and Quantification of Plasmid DNA in Process Solutions Using High Performance Hydrophobic Interaction Chromotography”, Journal of Chromotography A 998, 109-117,2003.

Thatcher D.R., Hitchcock A., Hanak J.A.J, Varley D.L.,(2003),”Method of Plasmid DNA Production and Purification”, Uited States Patent, 6,503,738, January 7, 2003.

Casali N., Preston A., (2003)“*E.coli* Plasmid Vectors Methods and Applications”,Humana Press, volume 235,Totowa,New Jersey,2003.

Mourich D.V., Munks M. W., Murphy J.C., Willson R.C., Hill A.B., (2002) “Spermine Compaction is an Efficient and Economical Method of Producing Vaccination-grade DNA”,

Recombinant Technology, 1 March 2003, USA, 257-264.

Marcos J.C., Fonseca L.P., Ramalho M.T., Cabral J.M.S., (2002) “Application of Surface

Response Analysis to the Optimization of Penicillin Acylase Purification in Aqueous Two-Phase Systems”, Enzyme and Microbial Technology, 31, 1006-1014, 2002.

Parkin J.S., (2002) “Human Cytomegalovirus DNA Constructs and Uses Therefor ”, United States Patent 6448389.

Doç.Dr.Hasan BAYDAR, (2002)“Genetik”, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın no:23 Ziraat Fakültesi.

Kral T., Hof M., Langner M., “The Effect of Spermine on Plasmid Condensation and Dye Release Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy”, Biological Chemistry, vol:383, pp:331-335, February 2002.

Riberio S.C., Monteiro G.A., Cabral J.M.S., Prazeres D.M.F.,(2002) “Isolation of Plasmid DNA from Cell Lysate by Aqueous Two-Phase Systems”,Biotechnology and Bioengineering, vol:78, No:4, May 20, 2002.

Madhu V.S., Weil P.A. (2002) “A Method for Plasmid Purification Directly From Yeast”, Analytical Biochemistry , 1 August 2002, USA, 13-17.

Lander R.J., Winters M.A., Meacle F.J.,(2002) “Fractional Precipitation of Plasmid DNA from Lysate by CTAB”, Biotechnology and Bioengineering, Vol 79, No;7, 30 September 2002.

Barut K.D., (2001) “Gen Tedavisine Yönelik Katyonik Yüzey Etkin Madde İçeren Emülsiyon Şeklinde Taşıyıcı Sistem Üzerinde Çalışmalar”,Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.

Li S., Huang L.,(2000) “Nonviral Gene Therapy :Promises and Challenges” , Gene Therapy, vol:7, 31-34.

Kuhn P.S., Barbosa M.C., Levin Y.,(2000) “Effects of Hydrophobicity in DNA Surfactant Complexation”, Physica A 283, 113-118, 2000.

Ernst N., Ulrichskötter S., Schmalix W.A., Radler J., Galneder R., Mayer E., Gersting S., Plank C., Reinhardt D., Rosenecker J.,(1999) “Interaction of Liposomal and Polycationic Transfection Complexes with Pulmonary Surfactant”, Journal of Gene Medicine, 1: 331-340,1999.

Bilgehan H., (1999)” temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi”, Barış Yayınları Kitabevi,1999.

Halaf K.N.,(1999), ”Crosslinked protein crystal fomulation and their use as catalysts in Organic Solvents ”, US Patent 652964, August 1999.

Jönsson B., Lindman B., Holmberg K., Kronberg B., (1999) “Syrfactants and Polymers in Aqueous Solution”, John Wiley& Sons, New York,1999.

Marcos J.M., Fonseca L.P., Ramalho M.T., Cabrol J.M.S., (1999), “Partial Purification of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* in Poly(Ethylene Glycol) – Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems, Journal of Chromotography B, 734, 15-22.

Kuhn P.S., Levin Y., Barbosa M.C., (1999)“ Charge Inversion in DNA-Amphiphile Complexes:Possible Application tı Gene Therapy”, Physica A 274, 8-18, 1999.

French W., (1998)” Humana Gene Therapy”,Naturel, 392, 25-30,1998.

Robbins P.D., Tahara H., Ghivizzani S.C.,(1998) “Viral Vectors for Gene Therapy”, Tibtech, January 1998 ,vol:16, 35-40.

Schluep T., Cooney C.L.,(1998) “Purification of Plasmids by Triplex Affinity Interacton ”, Nucleic Acids Research, 26 (19), Oxford University Press, July 1998, 4524-4528.

Marcos J.C., Fonseca L.P., Ramalho M.T., Cabral J.M.S., (1998)” Variation of Penicillin Acylase Partition Coefficient with Phase Volume Ratio in Poly (Ethylene Glycol)- Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems”,Journal of Chromotography B, 711 (1998) 295-299.

Saraç A., (1997)“Vinil Asetat Monomerinin Non-iyonik Emülgatörler ile Emülsiyon Polimerizasyonu ve Poli (Vinil Asetat) Latekslerinin Yüzey ve Kolloidal Özelliklerinin İncelenmesi”,Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi,1997

Herrera A.M., Campistrous A.E.L., Roman C.A., Sandez B., Hayes O., Hechavarria M., Duarte C.A., (1997), “Use of Plasmid DNAPurified by PEG Precipitation for *in Vivo* Transfection in Mice”, Minevra Biotechnologica, 9(1) :25-8, 1997.

Montgomery D.L., Ulmer J.B., Donnelly J.J., Liu M.A., (1997) “DNA Vaccines”, Pharmacol Ther., vol:74, No:2, 195-205,1997.

Russell P.J., (1996) Genetics Fourth Edition, Harper Collins College Publishers, NewYork,1996.

Zaslavsky B.Y.,(1995) “Aqueous two Phase Partitioning Physical Chemistry and Bioanalytical Applications”Marcel Dekker Inc. ,New York,1995.

Smith A., (1994) “Gene Expression in Recombinant Microorganism”, Marcel Dekker, Inc. New York, 1994.

Hardy K.G., (1993) “Plasmids A Practical Approach”, The Practical Approach Series, Oxford University Press,1993.

J.D. Watson, Gilman M., Witkowski J., Zoller M.,(1992) “Recombinant DNA”, Second Edition Scientific American Books, New York, 1992.

Sambrook J.R, Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning 2nd Edn. CSH Laboratory Press. ColdSpring Harbor,FL.,1989.

Brown T.A., (1989) “Gene Cloning an Introduction”, Great Britain ,T.J. Press, Cornwall.

Sanders J.P.M., Docherty A.J.P.,(1980) “Plasmid and its Use”, United State Patent 4430434 , 1980, February.

Birnboim H.C., Doly J., (1979)” A rapid alkaline extraction Procedure fo Screening Recombinant Plasmid DNA”, Nucleic Acid Research,7: 1513-1523,1979.

Rosen M.J., (1978),“Surfactants and Interfacial Phenomena”, John Wiley&Sons ,New York, 1978.

Birnboim H.C., Doly J., (1979) "A rapid alkaline extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA", *Nucleic Acid Research*, 7: 1513-1523, 1979.

Benveniste R., Davies J., "Structure Activity Relationships Among the Aminoglycoside Antibiotics ; Role of Hydroxyl and Amino Groups", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol:4(4), p:402-409, 1973

ELEKTRONİK KAYNAKLAR

www.itsa.fr/images7E.coli.jpeg,

http://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

<http://www.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pvax1.pdf>

<http://www.33.websamba.com/surfactan/anyo.html>

<http://www.miktobiyoloji.org/dokgoster.asp>

<http://www.saglikcilarportali.com>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	12.8.1976	
Doğum Yeri	Skopye / Makedonya	
İlköğretim	1982-1986	Tefeyyüz İlköğretim Okulu / Makedonya
Lise	1993-1997	Şehremini Lisesi-Fen Bölümü
Lisans	1993-1997	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	1999-2001	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı
Doktora	2001-2007	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Ens.Kimya Anabilim Dalı,Biyokimya Programı
Erasmus Bursu	2005-2006	Minho Üniversitesi-Portekiz
Çalıştığı Kurumlar		
	1997-1998	Zorluteks Tekstil Ticaret ve Sanayii A.Ş.
	1998-Devam ediyor	Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Uzman

