

578.891.082.263

79 39 k

MFN:5450



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

TÜRKİYE'DE KRONİK KARACİĞER HASTALARINDA
SERUM HBV DNA DÜZEYLERİNİN DOT-BLOT YÖNTEMİ İLE
LİRLLENMESİ VE PRECORE MUTANT VİRÜSLERİN SIKLIĞININ
SAPTANMASI

1997-264

TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

PROJE NO: TAG-1018

TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

Tıp Araştırma Grubu

Medical Sciences Research Grant Committee

578.891.082.263

T939 k

502

TAG-1018 no'lu Tübitak tarafından destekli bir proje kapsamında kronik hastalıkların yanı sıra, akut ve kalıcı hastalıkların aşısına olanak sağlayacak bir yöntem olan DNA Teknolojisine dayalı leküler Hibridizasyon yöntemi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Heli Biyoloji ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

SERUM HBV DNA DÜZEYLERİNİN DOT-BLOT YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ VE PRECORE MUTANT VİRÜSLERİN SIKLIĞININ

SAPTANMASI

1997-264

TÜRKİYE BİLİMSEL ve
TEKNİK ARAŞTIRMA
KURUMU KÜTÜPHANESİ

PROJE NO: TAG-1018

DOÇ. DR. CEM KALAYCI
Yrd. DOÇ.DR. S.AYŞE ÖZER
Yük. BİO. MÜGE CANER
PROF. DR. NURDAN TÖZÜN ve
PROF. DR. BEYAZIT ÇIRAKOĞLU

TEMMUZ 1994

İSTANBUL

Beyaz, 1994-7704

19307

ÖNSÖZ

TAĞ-1018 no'lu Tübitak tarafından destekli proje kapsamında, viral hastalıkların yanı sıra, tümöral ve kalıtsal hastalıkların tanısına olanak sağlayacak Rekombinant DNA Teknolojisine dayalı Moleküler Hibridizasyon yöntemi, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında başarı ile oturtulmuştur.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No.</u>
1) Giriş	1
2) Gelişme	2
3) Serum HBV DNA Düzeyinin Dot-blot Yöntemi ile Analizi	
A) Bakterilerden Proben Elde Edilmesi	2
1) Transformasyon	
2) Kültür (LB)	
3) Modifiye Alkalen Lizis	3
4) Görüntüleme	
5) Kültür (TB)	4
6) Qiaegen Yöntemi	
7) Prep A Gene	5
B) Hasta Serum Örneklerinin ve Standartların Hazırlanması	6
C) Hasta Serum ve Standartların Membrana Yüklenmesi	6
D) Proben İşaretlenmesi	7
E) Prehibridizasyon/Hibridizasyon	7
F) Yıkama	7
G) Otoradyogram	8
Çalışmada Kullanılan Tampon ve Solusyonlar	9
3) Sonuç	
A) Bulgular	12
B) Tartışma	14
Referanslar	17

TÜRKİYEDE KRONİK KARACİĞER HASTALARINDA SERUM HBV DNA DÜZEYLERİNİN DOT-BLOT YÖNTEMİ İLE SAPTANMASI

GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinoma gibi tedavisi mümkün olmayan önemli karaciğer hastalıklarına yol açmaktadır(2,22). Hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg) seropozitif olmasına dayanarak, dünyada 300 milyondan fazla kişinin HBV ile kronik olarak enfekte olduğu düşünülmektedir(1,18). Türkiye'de hepatit B taşıyıcılığı ise bölgeler arası farklılıklar bir yana bırakıldığında ortalama %8 dir(9,12). Bu nedenlerle Hepatit B, virüs enfeksiyonu, dünyanın diğer ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de halk sağlığı açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir.

Hepatit B virüsünün replikasyonunu gösteren en duyarlı ve en güvenilir parametre serum HBV DNA'dır(3,4,5). Serum HBV DNA, Hepatit B e antijeni (HBeAg) ve DNA polimeraz aktivitesine kıyasla göre viral replikasyonun daha hassas ve erken göstergesidir. Ayrıca bu parametre tedaviye alınacak hastaların seçimine ve uygulanan tedavinin etkinliğinin izlenmesine de olanak sağlamaktadır.

Özellikle anti-HBe pozitif olan, pre-core bölgesinde mutasyon gösteren virüslerin replikasyonunun saptanmasında, dolayısıyla tedavi edilecek hastaların seçiminde serum HBV DNA tek kriterdir (6,7,11).

Serum HBV DNA düzeylerinin tayini, Türkiye'de az sayıda merkezde ticari şekilde hazırlanmış kitlerle yapılmaktadır. Ancak bu yöntem hem maliyetinin yüksek, hem de, düşük serum HBV DNA düzeylerinde duyarlılığının az olmasından dolayı tercih edilmemektedir.

Bu projenin amacı, kronik HBV taşıyıcılarında serum HBV DNA düzeylerinin duyarlı ve güvenilir bir yöntem olan dot-blot hibridizasyon yöntemi ile saptanması ve HBV araştırması için DNA dizi analiz yöntemleri bilimsel alt yapısının hazırlanmasıdır.

GELİŞME

SERUM HBV DNA DÜZEYİNİN DOT-BLOT HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ İLE ANALİZİ

Serum HBV DNA sınıfının dot-blot hibridizasyon yöntemi ile tayini; probun eldesi, hasta serum örneklerinin ve standartların hazırlanması, naylon membrana yüklenmesi, probun radyoaktivite ile işaretlenmesi, prehibridizasyon, hibridizasyon, yıkama ve otoradyogram aşamalarından oluşur. Otoradyogram sonrasında membrana yüklenmiş örneklerin HBV DNA düzeyleri sintilasyon sayacında sayılan radyoaktiviteye göre çizilen standart eğri üzerinden hesaplanır.

A) Bakterilerden Probun Elde Edilmesi

1) Transformasyon

Bu çalışmada kullanılan prob, 4.7 kb lık Tetrasiklin direnç geni taşıyan PBR 322 plazmidine Xho I enzimiyle eklenmiş 4 adet 3.2kb lık HBV genomunu içermektedir (HBV genomu Xho I enzimi kesim bölgele ri içermemektedir). BRL DH5 alfa kompetan E.Coli hücreleri (Gibco) Üreticinin transformasyon protokolüne uygun olarak bu ligasyon ürünü (HBV DNA+plazmid) kullanılarak transforme edilmiştir. -70°C de saklanan kompetan hücrelerden 100 ul alınarak önceden soğutulmuş olan polipropilen tüplere (Falcon 2059) konulmuş ve 5 ng/ul olacak şekilde dilüe edilmiş olan 2 ul ligasyon ürünü ile karıştırılmıştır. Ayrıca, transformasyon etkinliğini göstermek için kontrol DNA dan (PUC 19) 5 ul (0.05 ng) alınarak 100 ul kompetan hücre içeren tüpe konulmuş ve her iki tüp 30 dakika süreyle buz üstünde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonu takiben bu tüpler, ısı şoku sağlamak amacıyla 45 saniye süreyle herhangi bir ajitasyona tabi tutulmadan 42°C lik su banyosunda bekletilmiştir.

2) Kültür (LB)

a) S.O.C *

42°C lik inkübasyonun ardından, tüpler 2 dakika süreyle buz üstüne alınmış ve üzerlerine 900 ul oda ısısında bekletilmiş* S.O.C eklenerek 37°C de 1 saat süreyle 225 rpm lik bir çalkalanma hızında inkübe edilmiştir.

*Çalışmada kullanılan solusyon ve tamponlar ekte belirtilmiştir.

b)LB Katı besiyeri*

Bunu takiben,HBV DNA taşıyan plazmid ile transforme olmuş E.Coli kültür ürününden 50 ul,100 ul,350 ul alınmış ve 12.5 ug/ml Tetrasiklin içeren LB kültür plağına ekilerek gece boyu 37°C de inkübasyona bırakılmıştır.Aynı işlem, S.O.C tamponu ile 1:100 sulandırılmış kontrol DNA'sına da uygulanmıştır.

c)LB Sıvı besiyeri

İnkübasyon süresinin sonunda her 2 plakta da üreme gözlenmiş ve plazmidde takılı HBV DNA'sı içeren E.Coli kolonilerinden 1 tanesi alınarak,12.5 ug/ml Tetrasiklin içeren 10 ml'lik LB kültür ortamına ekilmiş ve 160 rpm'de gece boyu 37°C de inkübe edilmiştir. Gliserol stok hazırlamak amacıyla,bu kültür ortamından 200 ul alınmış ve üzerine 800 ul gliserol eklenerek -70°C de saklanmıştır.

3)Modifiye Alkalen Lizis

Transforme edildikten sonra kültür ortamında çoğaltılmış E.Coli hücrelerinden HBV DNA taşıyan plazmidi izole etmek amacıyla modifiye Alkalen Lizis yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin seçilme nedeni kaynatma, lizozim ve fenol/kloroform ekstraksiyonu olmaksızın 10 dakika gibi kısa bir sürede uygulanabilmesidir. Yönteme göre, LB kültür ürününden 1.5 ml alınarak iki kez 30 saniye süre ile santrifüj edilmiş ve tübün dibinde 50 ul bırakıldıktan sonra kalan supernatan atılmıştır. Ardından hücre peleti vortekslenerek hücreler iyi ce suspanse edilmiş ve suspansiyon üzerine 300 ul TENS* konularak 5 saniye süreyle vortekslenmiştir.Elde edilen koyu kıvamlı bu karışıma 300 ul 3.0 M Sodyum Asetat Ph 5.2 eklenmiş ve vortekslenmeyi takiben hücre atıkları ile kromozomal DNA yı çöktürmek amacıyla iki dakika mikrosantrifüjde santrifüjlenmiştir.Supernatan temiz bir tübe alınarak 0.9 ml %99 luk soğuk etanol ile karıştırılmış; iki dakika süre ile tekrar santrifüjlenmiş ve elde edilen pelet 1ml %70 lik soğuk etanol ile yıkanmıştır. Çöktürülen pelet 37°C de 3 dakika süreyle kurutulmayı takiben 40 ul suda çözölmüş ve üzerine olacak şekilde 10 ug/ml RNase* eklenmiştir.

4.Görüntüleme

Plazmid DNA sını görüntülemek amacıyla mini prep ürünü %1 agarozluk (TAE 1x)* gelde yürütölmüş ve 17.5 kb lık (4.7 kb+ 4x3.2 kb) 4 adet HBV genomu içeren plazmid bandı gözlenmiştir. Çoğaltılan plazmidin HBV DNA sını taşıdığını göstermek amacıyla da, Xho I

kesimi yapılmış ve 4.7 kb ve 3.2 kb olmak üzere 2 ayrı band görülmüştür.

Çalışmamızda kullanılacak probun eldesi sırasında, transformasyon aşaması ile probdan standartların hazırlanması arasında çok zaman geçtiğinden transforme edilmiş E Coli hücreleri önce LB kültür ortamında çoğaltılmış ve bu kültür hacmine daha sonra Modifiye Alkalen lizis uygulanarak HBV DNA taşıyan plazmidin varlığından, Xho I kesimiyle bir kez daha emin olunmuştur.

5)Kültür(TB)

HBV DNA sının varlığından bu şekilde emin olunduktan sonra, 1 ml LB kültür ürünü,daha zengin bir besiyeri olan ve 100 ul (12.5 mg/ml Tetrasiklin içeren 100 ml lik TB* (terrific broth) içeren 2 adet erlene konmuş ve 37°C de gece boyu ajitasyonla inkübe edilmiştir. 125 ml lik kültür ürünü 3000 rpm de 5 dakika süreyle santrifüjlenmiş ve pelete Qiagen Inc prosedürü uygulanmıştır. Bu prosedür, Modifiye Alkalen Lizis ile Qiagen resinin yüksek ayırım özelliğine dayanmaktadır.Çalışmada, plazmid DNA bağlama kapasitesi 500 mg olan Qiagen-tip 500 kullanılmış ve üreticinin protokolünde önerildiği gibi, LB yerine daha zengin bir besi yeri olan TB kullanıldığından kolona uygulanacak olan kültür hacimi, 150 ml yerine 125 ml ile olarak belirlenmiştir.

6)Qiagen yöntemi

a)Hücre Lizatının Elde Edilmesi

Santrifüj sonrası elde edilen bakteriyel pelet, 10 ug/ml RNase A içeren P1* tamponunda suspanse edilmiş ve 10 ml P2* tamponu ekledikten sonra hafifçe karıştırılarak oda ısısında beş dakika süreyle inkübe edilmiştir.Elde edilen viskoz lizata 10 ml soğuk P3* tamponu ilave edildikten hemen sonra tüp 5-6 kez ters yüz edilerek karıştırılmış ve buz üstünde 20 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır.Hücre lizati, (30000 g) 12500 rpm de 4°C de Sorvall AHT 629 rotor kullanılarak 30 dakika süreyle santrifüjlenmiş ve berrak bir supernatan elde edilmiştir.(Temiz bir supernatan elde edilmediği takdirde santrifüj tekrarlanabilir).

b)Kolondan Geçirerek Saflaştırma

Qiagen kolonu kullanılarak, lizattaki tuz, pH şartları ve Qiagen'in seçiciliği sayesinde sadece DNA'nın kolona bağlanması amaçlanmaktadır. Supernatandan 125 ul bir tübe ayrıldıktan sonra (no.1) kalan, 10 ml QBT tamponu ile dengelenmiş olan Qiagen kolonuna uygulanmıştır.Toplanan sıvıdan da 125 ul başka bir tüpe aktarıldıktan sonra(no.2) kolon, 2 kez 30 ml lik QC tamponu ile yıkanmış ve bu aşamada da kolondan akan sıvıdan 500 ul örnek ayrılmıştır

(no.3).Böylece DNA nın fenol aşaması olmaksızın proteinlerden arındırılarak kolona bağlanması sağlanmıştır.DNA daha sonra,kolonun 15 ml QF tamponu yıkanması sonucu elüe edilmiş ve bu elüattan 50 ul no.4 ayrılmıştır(no.4).

c)DNA'nın Tuzdan Arındırılarak Konsantre Edilmesi

DNA eluatına 0.7 hacim izopropanol eklenmiş ve (15000 g),9000 rpm de 4°C de sorvall AHT 629 rotor kullanılarak 30 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Supernatanın atılmasını takiben pelet, 15 ml %70 lik soğuk etanol ile yıkanmış ve 5-10 dakika oda ısısında kurutularak 1300 ul TE* de çözülmüştür.

Spektrometrik olarak 260 nm de optik dansite ölçülmüş ve DNA'nın konsantrasyonu belirlenmiştir.

d)Analitik Gelde Görüntüleme

Qiagen prosedürünün her aşamasında toplanan (no 1,2,3 ve 4) örnekler %1 agarozluk gelde yürütülerek plazmidin elde edilme verimi gözlenmiştir.

Elde edilen Plazmid DNA, Xho I enzimiyle 37°C de 4 saat süre ile inkübe edilmiş ve large scale kesim ürünü %0.8 low melting agarozluk gelde (1xTBE) yürütülerek PBR 322 plazmidine ait 4.7 kb'lık ve HBV genomuna 3.2 kb lık HBV genomuna ait 2 ayrı bant tespit edilmiştir.

7)Prep A Gene (insert'in Eldesi)

Uzun süreli elektroforezi (100V sabit) takiben 3.2 kb lık HBV genomuna ait olan band steril bir jilette Transillüminatör kullanılarak UV altında gelden kesilmiş ve Prep-A Gene matriks materyalin-den (Bio Rad Cat no.782-8010) geçirilerek insert saf olarak elde edilmiştir.

Silikaya dayalı bir yöntem olan Prep A Gene, DNA nın hızla, tuz, RNA, protein, organik solventler, SDS ve enzim inhibe edici etkenlerden uzaklaştırılıp, saf olarak konsantre edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Bu yönteme göre gelden kesilen 3.2 kb lık bant mikrosantrifüj tübüne konulmuş ve bir kaç saniye santrifüjlenerek gelin parçalarının tübün dibine toplanması sağlanmıştır. Gel hacminin 3 katı hacim Prep A gene bağlama tamponu eklenerek çalkalanan tüp, agarozun çözülmesi için 37°C de birkaç dakika süreyle bekletilmiştir. Kullanılacak matriks hacmi,Prep A Gene matriksinin super sarmal DNA yı bağlama kapasitesinin 0.2 ug DNA/ul matriks olduğu gözönünde bulundurulurarak hesaplanmıştır.

Belirlenen uygun miktardaki Prep A gene matriksi tüpe eklenmiş ve

hafifçe vortekslendikten sonra 10 dakika süreyle oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. 30 saniye süreyle yapılan santrifüjü takiben, süpernatant atılarak DNA peleti elde edilmiştir. Daha sonra pelet, DNA matriksinin 50 katı bağlama tamponu içinde yıkanmış: hafifçe vortekslenerek çözülmüş ve kısa süreyle santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi 2 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen pelet, matriks hacmi nin 50 katı yıkama tamponu ile 3 kez yıkanmış ve santrifüjlenerek süpernatantın tümü atılmıştır.

Matrikse bağlanmış olan DNA nın elüsyonu amacıyla, matrikse matriks hacmi kadar elüsyon tamponu eklenmiş ve 37°C de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Bu şekilde, katı bir pelet elde etmek üzere santrifüjlenen DNA nın yaklaşık %75 inin süpernatanta geçmesi sağlanmıştır. Pelette kalan DNA nın geri kazanılması amacıyla pelet, eş hacim elüsyon tamponu ile bir kez daha yıkanmış ve DNA içeren süpernatantlar temiz bir tüpte toplanmıştır.

B) Hasta Serum Örneklerinin ve Standartların Hazırlanması

1) Serum Örneklerinin Hazırlanması

Serumdan konsantre HBV DNA elde etmek amacıyla 100 ul serum 1200ul sukroz* yastık üzerine yavaşça konularak 25.000 rpm de 4°C de 4.5 saat Sorvall santrifüjde TFT 800 tip rotor kullanılarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası gradient dökülerek tübün kenarları dibe değmeden tuvalet kağıdı ile kurulanmış ve pelet, 100 ul 10X SSC içinde iyice çözülmüştür.

2) Standartların Hazırlanması

Prep A Gene den geçirilen probdan kullanılarak 200 ul 10xSSC de 800 pg HBV DNA içerecek şekilde ilk standart hazırlanmış ve bu karışım, DNA nın kolay denatüre olması amacıyla 15 dakika süreyle 37°C de bekletilmiştir. Daha sonra, ilk standart 10xSSC ile sulandırılarak seri dilüsyona tabi tutulmuş ve 800 pg a ek olarak 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 ve 6.25 pg lık HBV DNA içeren toplam 8 adet standart elde edilmiştir.

Belirtilen şekilde hazırlanmış serum örnekleri ve standartlar 100 ul 2 M Sodyum Klorür ile 200 ul 1 M Sodyum Hidroksit eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletilmiş ve HBV DNA nın denatüre edilmesi sağlanmıştır.

C) Hasta Serum ve Standartların Membrana Yüklenmesi

Serum ve standartlardan alınan 160 ul lik örnek Bio-Rad dot-blot cihazı ve 5-10 mm Hg basıncı sağlayan Millipore vakum pompası kullanılarak naylon membrana (Dupont Gene Screen Plus) aktarılmıştır. Örneklerin duplike olarak çalışılmasına ek olarak, membrana negatif ve pozitif kontrol serum örnekleri de yüklenmiştir. Yükleme sonrası

dot-blot dan çıkarılan membran 0.5 M tris pH 7.5 ile 0.5 M Sodyum Klorür içeren karışımda 10 dakika süreyle bekletilerek nötralize edilmiştir. Bir ucu kesilerek yükleme sırasının karışmaması sağlanan membran, 80°C lik etüvde iki saat kurutularak DNA'ların membrana tespit edilmesi sağlanmıştır. Kurutulmayı takiben, her bir örneğin sintilasyon sayacında doğru olarak sayılabilmesi amacıyla membrandaki dot-blotlar kurşun kalemle çizilerek belirgin hale getirilmiştir.

D) Probun İşaretlenmesi

Hibridizasyon için gerekli prob, Qiagen prosedürü sonrası elde edilen ürünün Xho I kesimini takiben %0.8 lık low melting agaroz gelinde elektroforeze tabi tutularak gelden kesilen 3.2 Kb lık bandın 65°C de eritilmesiyle hazırlanmış ve 25 ng lık alikotlara ayrılarak -20°C de saklanmıştır. İşaretleme öncesi, alikotlardan birisi alınarak alfa 32P dCTP ile Random Primed kiti (Bio-labs) kullanılarak işaretlenmiştir.

Bu amaçla, prob, 10 ul dH O ilavesi ile 5 dakika süreyle kaynatılmış ve hemen buza alındıktan sonra sayfa 11 de belirtilen reaksiyon ortamında, oda ısısında gece boyu inkübe edilmiştir. Inkübasyonu takiben 5'er ul örnek alınarak 2 adet GFC 100 filtreye konulmuş ve filtrelerden birisi önce %10 TCA da sonra da %70 lik etanolde 15 dakika süreyle 4 C de bekletilmiştir. Her iki filtre 37°C de kurutulduktan sonra Tricarb sintilasyon sayacında 14 C kanalında sayılmış ve elde edilen sayımlardan inkorporasyon verimi hesaplanmıştır.

E) Prehibridizasyon/Hibridizasyon

25 ml (200 ul/cm²) Hibridizasyon solusyonu eş hacimde Formamid ile karıştırılarak içinde membran bulunan plastik kutuya konulmuş ve sürekli ajitasyon ile 42°C de 2 saat süreyle prehibridizasyona tabi tutulmuştur. Bunu takiben prehibridizasyon solusyonuna işaretlenmiş prob ve background sinyali azaltmak amacıyla denatüre edilmiş salmon sperm DNA ilave edilmiştir. Prob prehibridizasyon solusyonuna ilave edilmeden önce 10 dakika kaynar suda bekletilerek denatüre edilmiştir. Membran sürekli ajitasyonla 16-18 saat süreyle gece boyu 42°C de inkübasyona bırakılmıştır.

F) Yıkama

Hibridizasyon tamamlandıktan sonra membran, bağlanmamış probun uzaklaştırılması amacıyla birinci yıkama solusyonu ile 5 dakika oda ısısında, 2 kez; 2.yıkama solusyonunda 30 dakika süreyle 65°C de 2 kez; 3.yıkama solusyonunda 30 dakika süreyle oda ısısında 2 kez yıkanmıştır. Tüm yıkamalarda ajitasyon uygulanmıştır.

G) Otoradyogram

Yıkanmış membran oda ısısında 15-20 dakika bekletildikten sonra XR 5 Omat filmi ile birlikte içinde intensifying screen bulunan kasete konularak -70°C de bırakılmış ve film karanlık odada banyo edilmiştir.

Otoradyogramı takiben membrana yüklenmiş olan örnekler ve standartlar membrandan kesilmiş ve 4 gr /lt de PPO içeren 5 ml lik toluen içinde sintilasyon sayacında sayılmıştır. Standartlardan ^{14}C kanalında sayım sonucu elde edilen değerlere göre çizilen eğri baz alınarak, serum örneklerindeki HBV DNA düzeyleri pg cinsinden hesaplanmıştır.

Bacto tryptic

Bacto yeast

NaCl 21

0.1%

15

11.2 (g/v)

13.4 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

10.0 (g/v)

Çalışmada kullanılan tampon ve solusyonlar

Sukroz Gradient:

Tris 0.01M
NaCl 0.05M
EDTA 0.002M
BSA 10mg/ml
Sukroz %30
B-Met 1ul/ml

10X SSC:

NaCl 1.5M
NaAc 0.15 M Ph: 7.0 Hcl

LB:

Bacto tryptone; %1
Bacto maya özütü %0.5
NaCl %1

TB:

%1.2(w/v) bacto tryptone
%2.4 (w/v) maya özütü
%0.04(v/v) gliserol

KH₂PO₄ 0.17M
K₂HPO₄ 0.072M

TENS:

10mM Tris Ph 8/Hcl
1mM EDTA
NaCl
SDS

TAE:

16M Tris
0.8M NaAC
40mM EDTA Ph7.2/glasial asetik asit

TBE (10x)

Tris 89 uM/ml
Borik asit 89 uM/ml
EDTA 2 mM/ml

Qiagen P1:

50mM Tris Ph 8/HCl
10mM EDTA
100 ug/ml RNase

RNase A:

10 mM Tris/HCl pH 7.5
15 mM NaCl içinde 10 mg/ml RNase A
100 C de 15 dakika kaynatılır. Oda
ısısına gelince alikotlanarak -20°C de saklanır.

Qiagen p2:

200mM NaOH
%1 SDS

Qiagen P3:

3M KAc Ph 5.5

Qiagen QBT:

750mM NaCl
50mM MOPS
%15 etanol Ph 7
%15 Triton X

Qiagen QC:

1M NaCl
50mM MOPS
%15 etanol

Qiagen QF:

1.25M NaCl
50mM Tris/HCL
%15 etanol Ph 8.5

XhoI Kesim ortamı:

12 Ünite Xho I enzimi	1 ul
HBV	1 ul
Distile su	7 ul
Xho I enzim tamponu	1 ul

Random primed reaksiyon ortamı:

5x Reaksiyon tamponu	10 ul
BSA	2 ul
dNTP mix	2 ul
Alfa 32 P dCTP	4 ul
Klenow enzimi	2.5 ul

S.O.C.:

1 M KCL ve 1 M NaCL stoğu hazırlanır. 1 M MgCL₂ 6 H₂O ve 1 M MgSO₄ 7 H₂O karışımı filtreden geçirilerek 2 M Mg stoğu hazırlanır. Daha sonra 2 M Glukoz stoğu yapılır. 97 ml dH₂O, 2 gr. bactotryptone, 0.5 gr maya özütü, 1 ml 1m NaCL ve 0.25 ml 1 M KCL karışımı otoklavlandıktan sonra oda ısısına geldiğinde bu karışıma, 1 ml 2 M Mg stok ile 1 ml 2 M glukoz eklenerek, filtreden geçirilir.

SONUÇ:

A) BULGULAR

Bu projede, Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitif (ELİSA) olan 100 hastanın serum örneklerindeki HBV DNA düzeyleri dot-blot hibridizasyon yöntemi ile saptanmıştır. Otoradyogramda görülen sinyal kriter alınarak hastaların 17'sinin (%17) HBV DNA açısından pozitif olduğu belirlenmiştir.

Kompetan E.Coli hücrelerinin HBV genomu taşıyan plazmid ile trans formasyonu gerçekleştirildikten sonra, bu hücreler kültüre edilmiş ve kültür ürününden Qiagen yöntemi kullanılarak plazmid izole edilmiştir. Tüm HBV genomunu içeren 3.2 kb lık prob, Xho I enzim kesimi sonucu elde edilmiş ve Prep A Gen prosedürü uygulanarak başarı ile saflaştırılmıştır.

Modifiye Alkalen Lizis yöntemi kullanılarak 4 adet HBV DNA genomu (4x3.2kb) içeren PBR 322 plazmidinin (4.7 KB) varlığı, %0.8 lik (1x TAE) agaroz gelde 17.5 kb'lık bir bandın görülmesi ile saptanmış ve böylece transformasyon aşamasının başarılı olduğu gösterilmiştir. (Foto 1) Ardından bu plazmidin Xho I enzim kesim bölgesi içermeyen HBV DNA genomu taşıdığını doğrulamak amacıyla, yapılan Xho I enzimi ile kesim sonrası 32 kb' lık HBV DNA'sına ait bir banda ek olarak, 4.7 kb'lık plazmid DNA'sına ait band görüntülenmiştir. (foto 2).

Terrific Broth (TB) kültür ortamında transforme olmuş hücreler kültüre edildikten sonra large scale plazmid izolasyonu Qiagen prosedürü uygulanarak gerçekleştirilmiş ve saflaştırma aşamasını görüntülemek amacıyla Analitik gel yapılmıştır. Bunun için daha önce protokolda belirtilen 1-4 no'lu örnekler, 0.7 hacim izopropanol ile çöktürülmüş ve elde edilen pelet %70 etanol ile yıkanmayı takiben 5 ml TE pH 8.0'de çözülmüştür. Hazırlanan bu örneklerden 1'er ul alınmış ve %1'lik agaroz gelde (1xTBE) yürütüldükten sonra EtBr ile boyanarak UV altında görüntülenmiştir. Böylelikle prob'un protein ve RNA'dan uzaklaştırılarak saflaştırılması gözlenmiştir. (foto 3).

Qiagen prosedürü kullanılarak izole edilen plazmidin Xho I enzimle kesimi yapılmış ve ürün, %1.2 lik (1x TBE) Low Melting agaroz gelde yürütülerek 4.7 kb lık plazmid ve 3.2 kb lık HBV DNA genomuna ait 2 ayrı bant olarak görülmüş ve bu bantlardan HBV genomuna ait olan 3.2 kb'lık bant steril jiletle kesilerek, Prep-A Gene uygulanmıştır. (foto 4).

Prep A Gene sonrası saf olarak elde edilen probun konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 260 nm'de okunmuş ve 0.8 ug/ul olarak hesaplanmıştır.

B) TARTIŞMA

Serum HBV DNA düzeylerinin moleküler Biyolojide son yıllarda geliştirilen Rekombinant DNA Teknolojisine dayalı dot-blot hibridizasyon yöntemi ile tayini, Türkiye'de ilk kez Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

HBV taşıyıcılığı yüksek olan ülkemizde serum HBV DNA sının bu yöntem ile tayini, önemli bir halk sağlığı sorununa ışık tutmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan Moleküler Hibritleme Yöntemi, birtakım avantajları da beraberinde getirmektedir. Ülkemizde serum HBV DNA düzeyleri bazı laboratuvarlar tarafından ticari kitler kullanılarak saptanmaktadır; ancak, bu oldukça pahalı bir yöntemdir. Kullandığımız yöntemin ticari kitlelere üstünlüğü, maliyetinin düşük olmasıdır. Ayrıca, bazı laboratuvarlarda da serum HBV DNA, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile tayin edilmektedir. Bu yöntem laboratuvarımızda dizi analizi amacıyla uygulanmaktadır. Ancak, PZR, aşırı duyarlılığı nedeniyle, çok düşük serum HBV DNA düzeylerini yüksek göstereceğinden, klinik amaçlı, özellikle tedavi edilecek hastaların seçiminde elverişli bir yöntem değildir.

Dot-blot Hibridizasyon yönteminin bir diğer önemli özelliği, duyarlılık limitinin serolojik yöntemlere kıyasla oldukça yüksek olmasıdır. 1 pg gibi düşük bir HBV DNA düzeyini saptayabilmesine ek olarak, HBeAg ve DNA polimeraz aktivitesi gibi replikatif göstergelerin negatif olduğu durumlarda HBV'nin replikasyona devam ettiğini gösteren ve infektivite hakkında bilgi veren güvenilir bir yöntemdir (20,21). Bu yöntem ayrıca, serumdaki viral genomun direkt olarak saptanmasına olanak tanıdığından yüksek spesifiteye sahiptir (13,15).

Bunların yanısıra, tedaviye alınacak hastaların saptanmasına ve tedavinin değerlendirilerek prognoz belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Tedaviye HBV replikasyonu gösteren hastalar alınmaktadır. HBV DNA bunun en duyarlı göstergesidir, sık olarak kullanılan diğer bir replikasyon göstergesi HBeAg'ye göre çok daha hassastır (4,21). Özellikle Ülkemizde ve diğer Akdeniz ülkelerinde görülen precore bölgesinde mutasyon gösteren virüsler e antijenini yapamamaktadır.

Bu virüsleri taşıyan hastaların tedaviye alınmasındaki tek kriter serum HBV DNA'dır. (7,12,14,15,16,19,22).

Ayrıca, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de, ilk değişiklik gösteren parametre serum HBV DNA olduğundan, tedavinin izlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Bunlara ek olarak, tedavi öncesi serum HBV DNA düzeyleri prognozun belirlenmesinde de çok yardımcıdır. Yüksek serum HBV DNA düzeyleri olan hastalardan yanıt alma olasılıkları oldukça düşüktür (6,9).

Ayrıca, gerek standartlar, gerek pozitif ve negatif kontrolle rin gerekse hata serum örneklerinin duplike olarak membrana yüklendiğinde benzer sonuçların elde edilmesi, bu kantitatif sonuç veren yöntemin çoğaltılabilirliğinin de yüksek olduğunun bir göstergesidir. (8,11,14)) (Şema 1)

Fenol/kloroform ekstraksiyonu sırasında yasanabilecek olası HBV DNA kaybı göz önüne alınarak, konsantre serum HBV DNA elde etmek amacıyla sukroz gradient (yastık) kullanılmıştır. Bu peletleme işleminin, diğer olumlu bir yanı ise, serum komponentlerinin uzaklaştırılması sonucu kontaminasyonu önlemesidir. (10,13)

Dot-blot yöntemi ile, tek bir membrana 96 örnek yüklenebilmekte ve 1 hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası serumları aynı membranda aynı koşullarda değerlendirilebilmekte ve bu da, belli bir kullanım kolaylığı getirmektedir.

Bu projede, dayanıklılığı ve belli bir işlemten geçirildikten sonra tekrar kullanılabilirliği göz önüne alınarak nitroselüloz membran yerine naylon membran kullanılmıştır.

Örneklerdeki DNA'ların membrana tespiti için DNA ipliklerini kırma potansiyeli nedeniyle UV ışığı yerine 80°C lik etüvde fırınlama yöntemi tercih edilmiştir.

Membranların, örneklerin yüklenmesinden sonra hibridizasyon aşamasına kadar oda ısısında uzun süre bekletilebilmesi yöntemin bir diğer özelliğidir.

Çalışmanın prehibridizasyon ve hibridizasyon aşamasını etkileyen en önemli öge ısıdır, çünkü hibridizasyonun gerçekleşmesi için ısıнын $2(A+T)+4(G+C)$ formülü ile belirlenen T_m değerine ulaşması gerekmektedir. Ancak, tüm HBV genomu prob olarak kullanıldığından ve T_m değeri çok yüksek çıkacağından prehibridizasyon ve hibridizasyon solusyonlarına eş hacimde formamid eklenerek, hibridizasyon ısısı 42°C'ye ayarlanmıştır.

Bu arada hibridizasyon aşamasında proba özgül olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla tek iplikli bir taşıyıcı DNA (Salmon Sperm DNA) kullanılmıştır. Bu sayede zemin aktivitesi olmayan ya da çok düşük olan membranlar elde edilmiştir.

Serum HBV DNA ile probun spesifik bağlanmasını sağlamak amacıyla prob, Prep A Gene Matriksi kullanılarak saflaştırılmıştır. Trans-formasyonu ve probun saflaştırılması aşaması titiz, uzun ve zahmetli bir çalışmayı takiben gerçekleştirilmiştir. Ancak, prosedürün geri kalan kısmı deneyimli bir teknisyen tarafından kısa sürede uygulanabilmektedir.

Bu projenin bir diğer yararı da, gelecekte yapılacak HBV'e ilişkin moleküler biyoloji çalışmalarında kullanılmak üzere elimizde transforme olmuş kompetan E.Coli hücrelerinin gliserol stogunun bulunmasıdır.

Projede uygulanan yöntem çok sayıda örneğin birlikte değerlendirilmesine olanak sağladığından, referans laboratuvarlar için önemli ve gerekli bir yöntemdir. Özel koşullar dışında acil uygulama gerektirmeyen dot-blot hibridizasyon yönteminde kullanılan HBV DNA içeren serumlar -20°C de uzun süre bozulmadan saklanabilmektedir. Ayrıca, serum HBV DNA sınıfının fragil olmayışı, örneklerin kolaylıkla transforme edilerek belli referans laboratuvarlarında toplanıp çalışılmasına olanak sağlamaktadır.

Bu çalışma ayrıca bir başka proje kapsamında çalışılmakta olan Türk Toplumunda HBV mutantlarının dizi analizi ile saptanmasına ilişkin araştırmanın bilimsel alt yapısının oluşturulmasına olanak tanımıştır.

Viral hastalıklara ek olarak kalıtsal ve tümoral hastalıkların tanısında da kullanılabilen duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan; kantitatif sonuç veren dot-blot hibridizasyon yönteminin Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi laboratuvarında başarı ile oturtulmuş olması, gelecekte yapılması planlanan viral, tümoral ve kalıtsal hastalıkların moleküler biyolojisine ilişkin çalışmalara da bir zemin oluşturacağı düşünülmektedir.

Şişli Etfak Hastanesi, İstanbul
Viroloji, 21. 12-13 1981

1. Örnekteki P. varonae
stada eşlikli kladlar
coli Vdögrest. 12-1382

10-12-1981 EN, Guderma
Oavron F. and W. A.
HBV DNA in serum
Guderma

REFERANSLAR

- 1- Arthur M.J.P., Hall Aj., Wright R. Hepatitis B, Hepatocellular carcinoma and strategies for prevention. Lancet, 1, 607-610, (1984).
- 2- Beasley RP, Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma-epidemiologic considerations. Hepatology, 2, 215-265, (1982).
- 3- Berninger M., Hammer M., Hoyer B., Gerin JL. An assay for the detection of the DNA genome of hepatitis B virus in serum. J. Med. Virol, 9, 57-68, (1982).
- 4- Bonino F., Hoyer B., Nelson J., Engle R., Verme G., Gerin JI. Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: A marker of active hepatitis B virus replication in the liver. Hepatology, 1, 386-391, (1981).
- 5- Brechot C., Hadchovel M., Scotto J., Degos F., Charnay P., Trepo C., Tiollais P. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: A direct appraisal of the chronic carrier state. Lancet, 2, 765-768, (1981).
- 6- Brunetto, MR., Giarin MM., Oliveri F. et al. Wild type and e Antigen-minus hepatitis B viruses and course of chronic hepatitis B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4186-4190, (1991).
- 7- Brunetto MR., Stenler M., Rizzetto M., Verne G., Wil H., Bonino F. An HBV variant is responsible for anti-HBe positive hepatitis B. J. Hepatol., 9, 511, (abstract), (1989).
- 8- Carloni G, Colloca S, Delfini C, Manz. A, Clementi M, and Galibert F. Detection of hepatitis B virus infectivity by spot hybridization in HBeAg negative chronic carriers; HBV DNA in sera from asymptomatic and symptomatic subjects. J. of Medical Virol., 21, 15-23, (1987).
- 9- Değertekin H., Canoruç F., Kastellioglu F. Diyarbakır ve çevresinde sağlıklı kişilerde HBsAg taraması. VI. Türk Gastroenteroloji Kongresi, 22-25Ekim, İzmir, Bildiri Kitabı, 336, (1988).
- 10-Fagan EA., Guarner P., Perera SDK., Trowbridge R., Rolando N., Davison F., and Williams R. Quantitation of hepatitis B virus DNA (HBV DNA) in serum using the spot hybridization technique and scintillation counting. J. Virol. Meth., 12, 251-262, (1985).

- 11- Karayiannis P., Fowler M.J.F., Lok ASF., Greenfield L., Mondarjino J., and Thomas HC. Detection of serum HBV DNA by molecular hybridization Correlation with HBeAg/anti-HBe status, racial origin, liver histology and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatology*, 1, 99-106, (1985).
- 12-Kumdalı A., Mutlu G. Kan donörlerinde, hemodiyaliz hastalarında, sağlık personelinde, hepatit ön tanılı hastalarda ve diğer gruplarda hepatit B yüzey antijeninin ELISA yöntemi ile araştırılması. 1. Ulusal Enfeksiyon Hast. Kong, 20-23 Nisan, İzmir, Bildiri Kitabı, 257, (1987).
- 13-Lagassy C., Bernueu J., Thiers V., Krosgard K., Toillais P., Brechot C. Sequences of hepatitis B virus DNA in the serum and liver of patients with acute benign and fulminant hepatitis. *The j. Infective Diseases*, 155,1,64-71, (1987).
- 14-Lieberman H.M., La Brecque D.R., Kew M.C., Hadziyannis S., Shafritz D. Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test; comparison to HbeAg/ anti-HBe status in HBsAg carriers. *Hepatology*, 3, 285-291, (1983).
- 15-Makris A., Zignego L., Hadziyannis S.V. Measurement of hepatitis B viral DNA in serum by solution hybridization and comparison with the dot-blot hybridization technique. *Hepatogastroenterol*, 38, 53-55, (1991).
- 16-Santantonio T., S., Jung MC., Miska S., Pastore G., Rape GR., and Will H. Prevalence and type of Pre-C HBV mutants in Anti-HBe positive carriers with chronic liver disease in a highly endemic area. *Virology*, 183, 840-844, (1991).
- 17-Scotto J., Zignego L., Hadziyannis S.V. Measurement of hepatitis B viral DNA in serum by solution hybridization and comparison with the dot-blot hybridization technique. *Hepato Gastroenterol*, 38, 53-55, (1991).
- 18-Szmuness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus-evidence for a casual association. *Prog. Med. Virol.*, 24, 40-69, (1978).
- 19-Takada K., Akahana Y., Suzuki H., et al. Defects in the precore region of the HBV genome in patients with chronic hepatitis B after sustained seroconversion from HbeAg to Anti-HBe induced spontaneously or with interferon therapy. *Hepatology*, 12, 1284-1289, (1990).

- 20-Walter E., Blum HE., Offspenger W.B., Zeschnigk C., Offspengr S. Gerok W. Spot-blot hybridization assay for the detection of hepatitis B virus DNA in serum: factors determining its sensitivity and specificity. Hepatology, 7, 557-562, (1987).
- 21-Weller IVD., Fowler M.J.F., Mondarjino J., Thomas HC. The detection of HBV DNA in serum by molecular hybridization: A more sensitive method for the detection of complete HBV particles. J. Medical Virology, 9, 273-280, (1982).
- 22-Zuckerman Aj. Report of a W. H. O. Scientific group. Lancet, 1, 463-465, (1983).

ÖZ

Kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi ciddi karaciğer hastalıklarının etkenlerinden biri olan HBV enfeksiyonu, ülkemizde önemli bir sağlık sorunu teşkil etmektedir.

HBV'nin replikasyonunu gösteren en duyarlı parametre olan serum HBV DNA düzeyi, tedaviye alınacak hastaların seçiminde, tedaviye verilen yanıtın izlenmesinde ve prognozun belirlenmesinde önem taşımaktadır.

Bu nedenle, çalışmamızda kronik karaciğer hastalarında serum HBV DNA düzeyleri, duyarlı, güvenilir, özgül ve ucuz bir yöntem olan dot-blot hibridizasyon yöntemi ile saptanmış ve 100 hastanın 17 sinde serum HBV DNA pozitif olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: HBV-DNA, Dot-blot hibridizasyon

ABSTRACT

HBV infection, one of the causative agents of chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma is an important health problem in Turkey.

Serum HBV is the most sensitive parameter of viral replication. Therefore, its level is valuable in choosing the patients to be taken to therapy and evaluating the prognosis of the disease.

In our study, serum HBV DNA levels have been detected by using dot-blot hybridization assay which is a sensitive, specific and an inexpensive method and 17 of 100 patients have been found positive for serum HBV DNA.

Key Words: HBV-DNA, Dot-blot hybridization

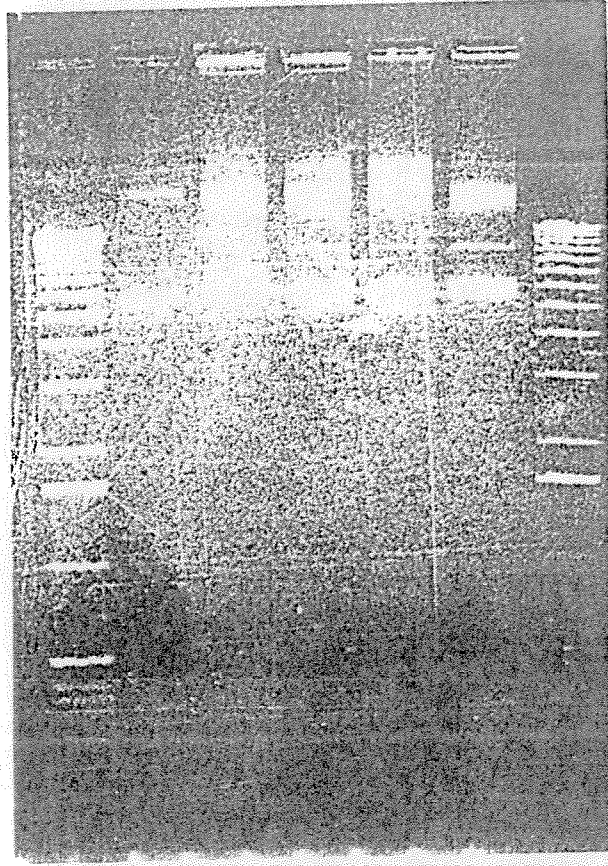


Foto 1) 1.ve 7. kuyu,DNA marker; 2-6. kuyular, 17.5 kb'lık Transformasyon ürünü.

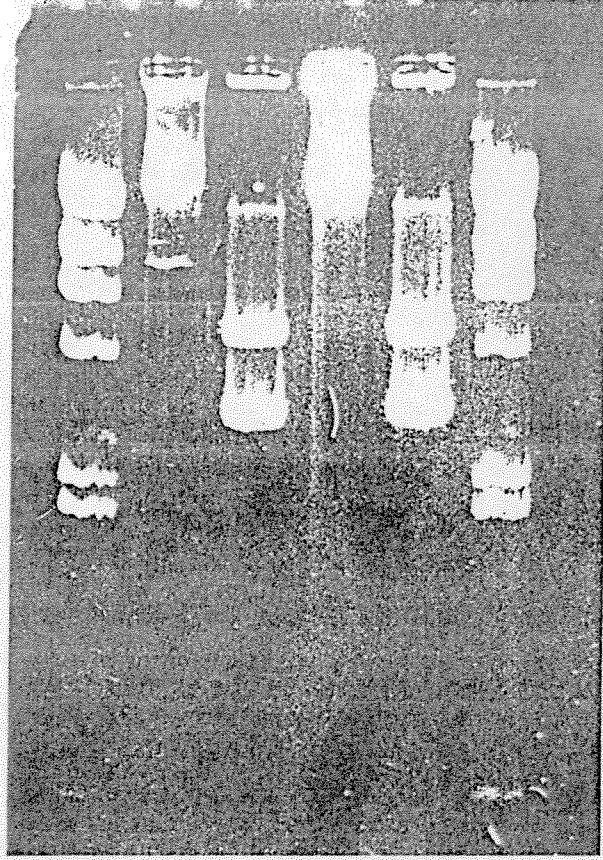


Foto 2) 1.ve 6.kuyu DNA marker (DNA/Hind III); 2 ve 4. kuyu, kesilmemiş Alkalen Lizis (17.5 kb); 3 ve 5. kuyu, Xho I ile kesilmiş Alkalen Lizis ürünü(17.5 kb,4.7 kb,3.2 kb).

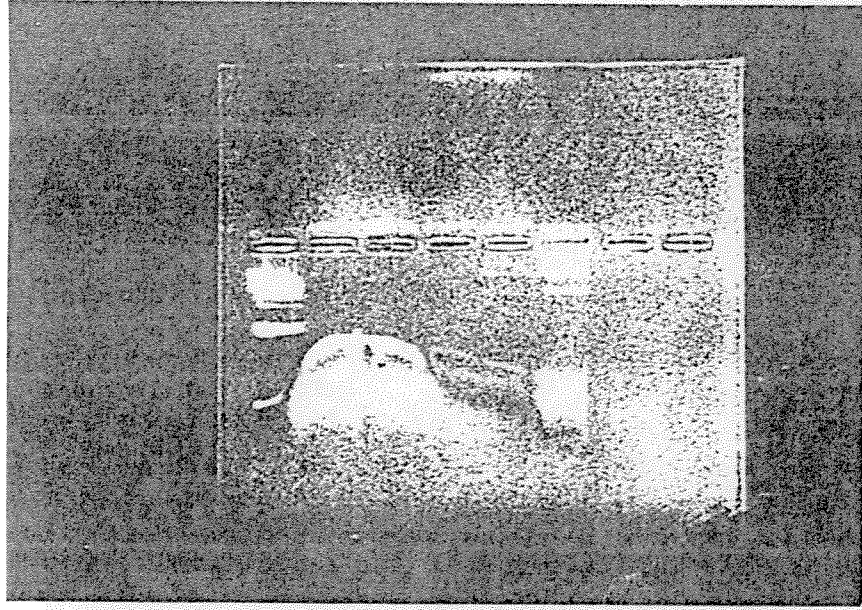


Foto 3) Analitik Gel

1.kuyu,marker (DNA/Hind III); 2-5. kuyular sırasıyla
1-4 no'lu örnekler; 6.kuyu, Qiagen sonrası elde edilen ürün



Foto 4) 1.kuyu, marker (DNA/Hind III); 2. kuyu, kesilmemiş Qiagen ürünü; 3.kuyu, Xho I ile kesilmiş Qiagen ürünü (17.5 kb, 4.7 kb ve 3.2 kb).

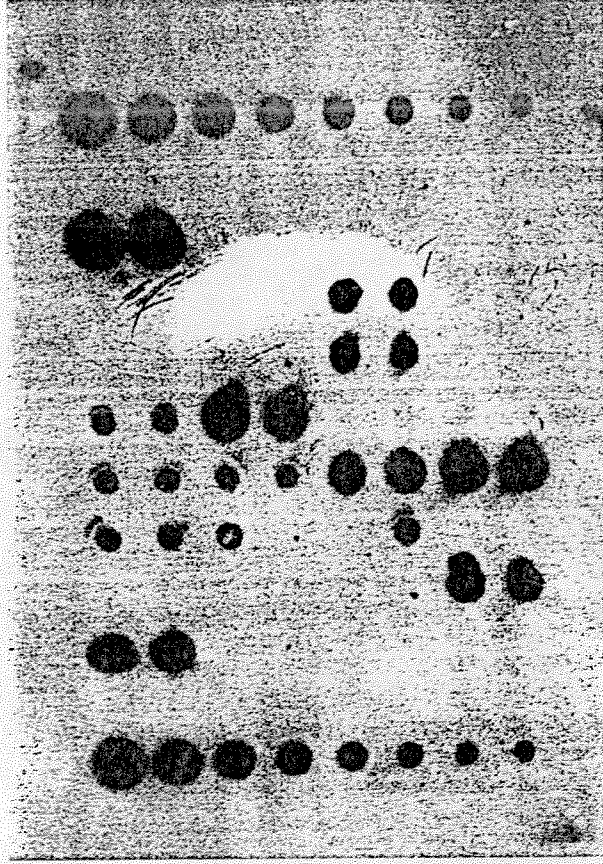
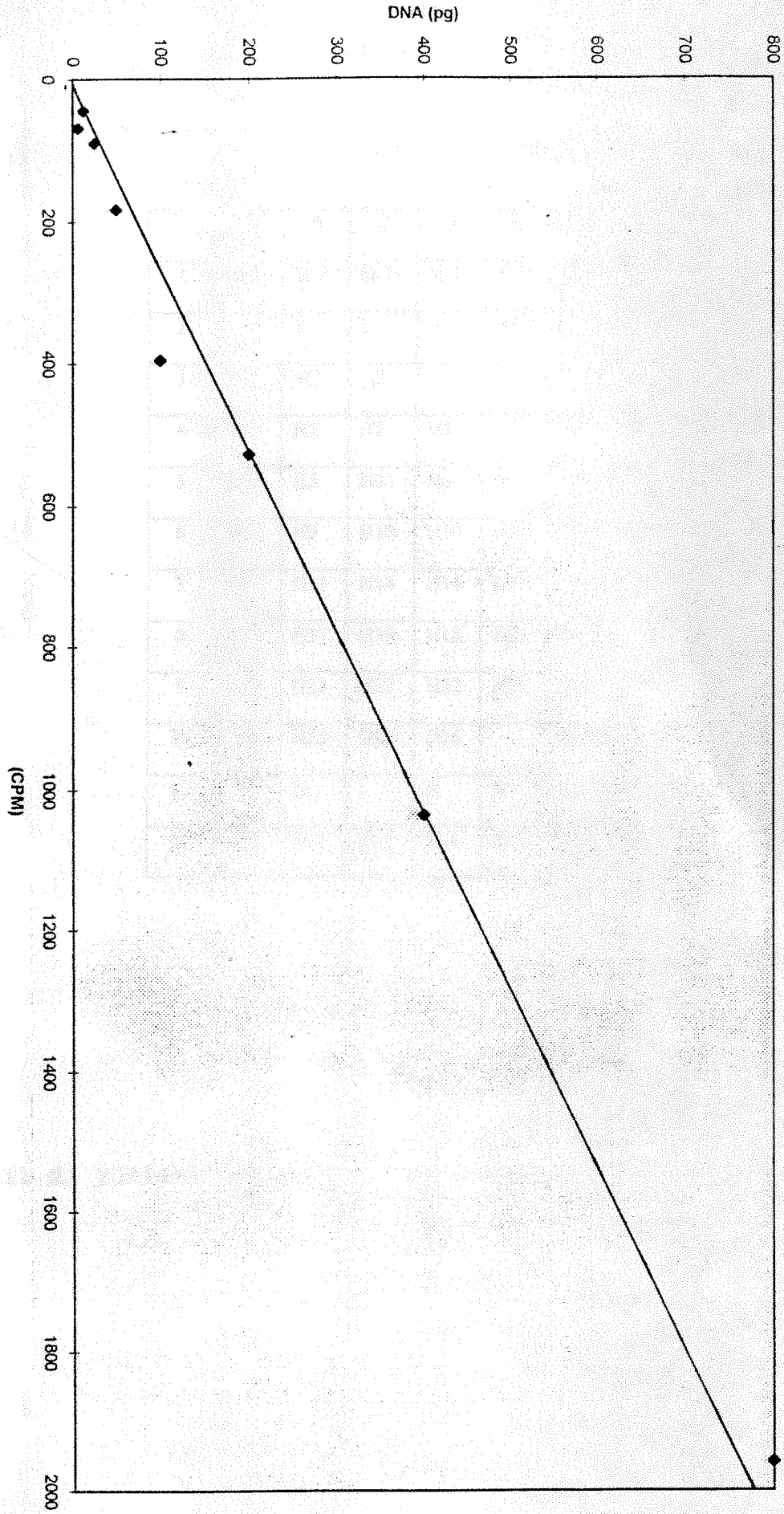


Foto 5) Yükleme Şeması Belirtilen Membranın Otoradyogram Sonucu



Şekil 2) HBV DNA düzeylerinin Standartların Sintilasyon Sayım

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8
2		B	L	A	N	K		
3	+C	+C	_C	_C				
4	H1	H1	H2	H2	H3	H3	H4	H4
5	H5	H5	H6	H6	H7	H7	H8	H8
6	H9	H9	H10	H10	H11	H11	H12	H12
7	H13	H13	H14	H14	H15	H15	H16	H16
8	H17	H17	H18	H18	H19	H19	H20	H20
9	H21	H21	H22	H22	H23	H23	H24	H24
10	H25	H25	H26	H26				
11		B	L	A	N	K		
12	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6	St 7	St 8

Şekil 2) Yükleme Şeması

H1	10pg	H2	-	H3	120pg	H4	-
H5	-	H6	9pg	H7	112,5pg	H8	-
H9	37,5pg	H10	645pg	H11	-	H12	-
H13	45pg	H14	35pg	H15	440pg	H16	586pg
H17	40pg	H18	-	H19	-	H20	15pg
H21	-	H22	-	H23	-	H24	122,5pg
H25	445pg	H26	-				

Tablo 1 : Serum HBV DNA düzeylerinin pg cinsinden deęerleri