
Hepatit B Virüs Yüzey Antijen (Surface) Gen Bölgesinin *Escherichia coli*'ye Klonlanması

Ayhan KUBAR*, Mehmet YAPAR*, Mustafa ÖZYURT*,
Tunçer HAZNEDAROĞLU*, Hüseyin GÜN*

* Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

ÖZET

Biz bu çalışmada HBV'nin yüzey antijen (surface) genini "PCR-dependent TA cloning" yöntemi ile *E. coli*'ye klonladık. Amacımız rekombinant DNA teknolojisini genel prensiplerini kullanarak gen aktarımlarını gerçekleştirmek ve ileride elde edeceğimiz ürünleri hastalıkların korunma (aşı) ve tanısında (antijen) kullanmaktır.

Anahtar Kelimeler: HBV, s gen, Klonlama

SUMMARY

Cloning of Hepatitis B Virus Surface Gene Region to *Escherichia coli*

In this study, we cloned HBV s gene to *E. coli* by using PCR-dependent TA cloning procedure. Our aim was to achieve gene transfer via general principles of recombinant DNA technologies and to use the cloned DNA fragments in future expression studies to obtain antigens to be utilized for diagnostic and immunization procedures.

Keywords: HBV, s gene, Cloning

GİRİŞ

Hepatit B virüsü, genomu küçük, sirküler, kıs-
men çift iplikçikli ve yaklaşık 3200 nükleotid uzunlu-
ğunda bir DNA virüsüdür^[1]. Virüs, gelişmekte olan
toplumlarda oldukça yaygın olması nedeniyle büyük
bir tıbbi öneme sahiptir. Özellikle, virüsün karaciğer-
de oluşturduğu komplikasyonlar toplum sağlığı açı-
sından son derece önemlidir^[2-6].

Hepatit B virüs yüzey antijen gen bölgesi yapısal
olarak bir "open reading frame (ORF)" ve 3 farklı
protein kodlayan bölgeden oluşmuştur. Hepatit B vi-
rüs ayrıca core/precure, X ve pol gen bölgelerine
sahiptir. Bu genler birbirlerine geçen yani overlap-
ping bir yapıya sahiptir^[1].

Günümüzde viral genom ile ilgili yapılan molekü-
ler çalışmaları, bu virüsle ilgili hızlı bilgi birikimi sağla-

mıştır. Seksenli yıllarda rekombinant DNA tekniği sayesinde mayalara HBsAg geni aktarılması ile ilk rekombinant HBV aşısı insanlığın hizmetine sunulmuş, sonraki çalışmalara da öncülük etmiştir^[1,3,10,11,12]. Ülkemiz son 15-20 yıl içinde hızla gelişen ve bize bir çok yararlar sağlayan bu teknolojinin henüz başlangıç aşamasında olup bir çok ülkenin gerisinde bulunmaktadır.

MATERYAL ve METOD

Viral Genom Ekstraksiyonu

HBV kaynağı olarak klinik örneklerden sağlanan pozitif serumlar toplandı. Bu serumlardan HBV-DNA ekstraksiyonu şu şekilde yapıldı:

Altmış mikrolitre hasta serumu üzerine 50 mg/mL konsantrasyondaki pronase E (Sigma)'den 10 µL ve 250 µL pronase E tampon çözeltisi (20 mM Tris-HCL pH: 8.0, 10 mM EDTA pH: 8.0, 10 mgL/mL SDS) ilave edildi. 40°C'de 1 saat inküasyonu takiben örnek alkali fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ile muamele edilerek etil alkol ile HBV-DNA'lar çöktürülüp yıkandı. Kurutulan HBV-DNA 20 µL distile su ile süspanse edildi. Bu şekilde elde edilen 25 adet HBV-DNA birbirleri ile karıştırılarak ortak bir havuz oluşturuldu. Bu DNA havuzu çalışma yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Primerlerin Saptanması

PCR reaksiyonu ve HBV s gen bölgesinin klonlanması için kullanılacak oligonükleotidlerin tespit edilmesi amacıyla bölümümüzde bir bilgisayar programı yazıldı. İnternet aracılığı ile ulaştığımız Dünya Gen Bankası'ndan mutant HBV'ler de dahil olmak üzere 100'den fazla komplet genom dizisi kopyalanarak bir dosya oluşturuldu. Bu dosya üzerinden HBV s gen bölgesi tespit edilerek en uygun s gen başlangıç ve bitiş oligonükleotidleri seçildi. Bu oligoların 5' uçlarına klonlama sonrası ekspresyon vektörlerine aktarımı kolaylaştırmak amacıyla sense tarafa KpnI, antisense tarafa da SacI restriksiyon endonükleaz enzim alanları ilave edildi. Tüm bunların sonunda oligonükleotidler;

Sense: 5' ggt acc aac atg gag aac atc 3'

Antisense: 5' gag ctc aat gta tac cca gag aca aa 3' olarak belirlendi.

PCR Uygulanması

PCR reaksiyonu için uyguladığımız protokol;

50 µL PCR solüsyonu için: 2 µL dNTP (10 mM), 4 µL MgCl₂ (25 mM), 5 µL 10xTaq buffer, 0.5 µL sense primer, 0.5 µL antisense primer, 2 µL 5U Taq

polimeraz, 10 µL HBV-DNA ve 26 µL distile su karıştırıldı. Karışım, Termal Cycler'da aşağıdaki programa göre reaksiyona sokuldu:

94°C..... 5 dk
94°C..... 30 sn
50°C..... 30 sn
71°C.....1 dk
(20 siklus) ve
71°C.....10 dk

Klonlama

Klonlama için PCR dependent TA Cloning yöntemi kullanıldı. Bu amaçla PCR 2.1-TOPO vektör (Invitrogen) kullanıldı. Vektör 3890 bp uzunluğunda, lacZα komplementasyon alanı ve iki EcoRI restriksiyon endonükleaz alanının ortasında timin nükleotidi bir "overhang" (çıkıntı) oluşturacak şekilde dizayn edilmiştir. Klonlama reaksiyonunda yanlış pozitifliği engellemek için PCR ürünü önceden prep-A gen DNA pürifikasyon matrisi (Bio-Rad) ile muamele edilerek kısa PCR ürünleri ve oligonükleotidler ortamdan uzaklaştırıldı. Klonlama reaksiyonu, PCR 2.1 TOPO ile PCR ürünlerinin karışımından oluşan 5 µL'lik solüsyonun oda ısısında 5 dakika bekletilmesi şeklinde yapıldı. Bu süreci takiben reaksiyon ürünü transformasyon işlemine kadar buz üzerinde tutuldu.

Transformasyon

Bu amaçla Top 10 F' *E. coli* (Invitrogen) kullanıldı. Bakteri önce kompetan hale getirildi. Daha sonra CaCl₂ kimyasal transformasyonu ile plazmidler bakteri içine sokuldu. Transformasyon işlemi sonrasında bakteri, 60 µg/mL ampisilin içeren ve yüzeyine daha önceden X-gal (Sigma) ve IPTG (Sigma) sürülmüş olan LB agara ekildi^[13].

BULGULAR

Sense ve antisense oligonükleotidler kullanılarak HBV-DNA genomundan PCR ile çoğaltılan HBV s gen ürünü Şekil 1'de 750 bp olarak görülmektedir.

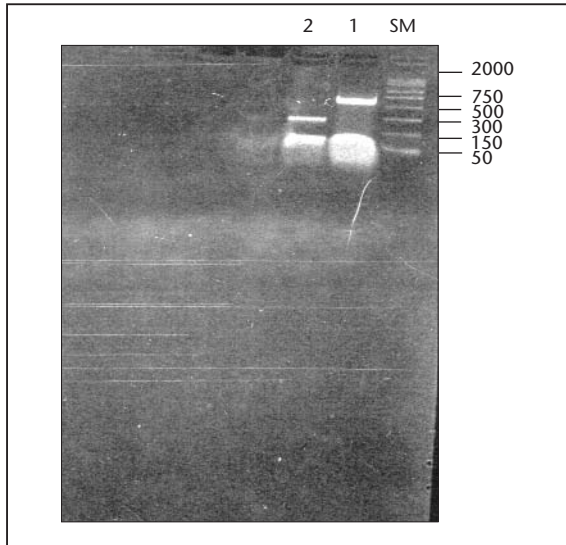
Transformasyon işlemi sonunda klonlamanın olduğu varsayılan LacZα-komplementasyonu bozulan renksiz kolonilerden alınan bakterilerin miniprep sonucu elde edilmiş 3890+750 bp = 4640 bp uzunluğundaki sirküler plazmidleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

Rekombine plazmidin iki tarafında bulunan EcoRI alanının bu enzimle kesilmesi sonucu plazmid içine sokulan 750 bp uzunluğundaki HBV s geninin geri çıkarılabildiği Şekil 3'te gösterilmiştir.

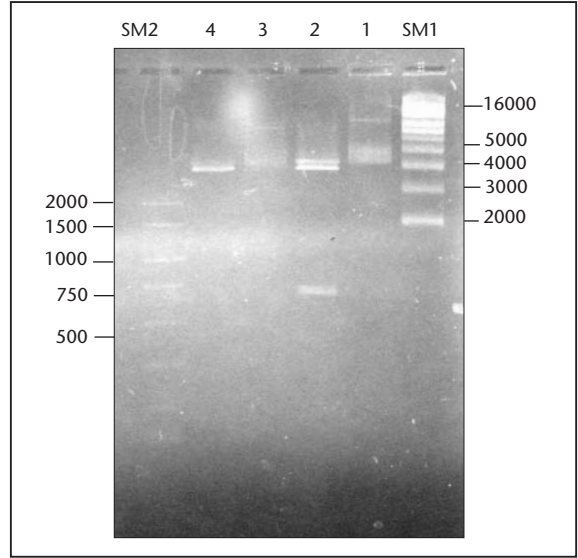
TARTIŞMA

Gen klonlanmasının rekombinant DNA teknoloji alanında yeri ve önemi oldukça fazladır. Genetik klonlama sayesinde bugün diğer yöntemlerle elde edilmesi zor ya da pahalı olan çeşitli ürünlerin sentezi kolay ve bol olarak yapılabilir. İnsülin, interferon ve hepatit B virüs aşısı gibi ürünler bunlardan bazılarıdır^[1,5,12]. Seksenli yıllardan itibaren dünyada birçok ülke bu alanda hızlı bir ilerleme kaydederken, henüz ülkemizde bu teknolojiye dayalı çalışma ve araştırmalar başlangıç aşamasındadır. Özellikle içinde bulunduğumuz yıl içinde alınan bir kararla toplumda HBV'ye karşı bağışıklama kampanyası için ithal edilecek aşıların getireceği ekonomik bedel gözönüne alındığında, rekombinant DNA teknolojinin araştırma aşamasından çıkıp uygulama alanlarına sokulma gerekliliği ortadadır.

Biz bu çalışmada rekombinant DNA teknolojinin başlangıç aşamasından birisi olan gen klonlanmasını PCR bağımlı TA cloning metodu ile gerçekleştirdik. Klonlama için farklı teknikler kullanmak mümkündür^[13]. Bizim bu tekniği tercih etmemizin nedeni kolay uygulanabilir, hızlı ve pratik olmasıdır. Metod temel olarak timin nükleotidinin overhang (çıkıntı) oluşturduğu lineer bir plazmidin, Taq polimeraz enziminin terminal deoksinükleotidil transferaz aktivitesi ile yeni sentezlenen DNA ipliğine, kalıba bağımsız (template independent) tercihen guanin nükleotidi sonrası, adenin nükleotidi ilave etmesi ve bu ampikon ile plazmidin topoizomeras enzimi aracılığı ile birleştirilmesi esasına dayanmaktadır.

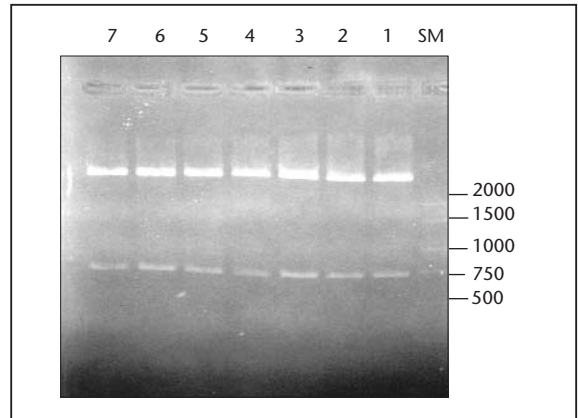


Şekil 1. 1. yol, HBV s gen bölgesinin PCR amplifikasyonu; 2. yol, HBV s gen bölgesinin parsiyel amplifikasyonu; SM, size marker'ı (Sigma PCR marker) göstermektedir



Şekil 2. 1. yol, HBV s gen ile rekombine pCR2.1 vektörü; 2. yol, EcoRI ile kesilmiş rekombine pCR2.1 vektörü; 3. yol, rekombine olmamış pCR2.1 vektörü; 4. yol, EcoRI ile kesilmiş rekombine olmamış pCR2.1 vektörü; SM1 ve SM2 sırasıyla size marker 1 (Sigma supercoil plasmid marker) ve size marker 2'yi (Sigma PCR marker) göstermektedir

dır^[6]. Klonlama aslında klonlanan gen ile ilgili dizi analizleri veya başka amaçlara yönelik araştırmalar için yapılmaktadır^[13]. Özellikle klonlanacak gen üzerindeki restriksiyon alanlarının bilinmesi klonlama işlemlerinin daha kolay yapılmasını sağlamaktadır. Klonlama eğer bir rekombinant ürün elde edilmek için yapılıyorsa gen aktarımı sadece restriksiyon alanları ile sınırlı kalmayıp, aynı zamanda protein sentezinin başlayacağı başlangıç ve bitiş kodonuna, ayrıca elde edilen ürünlerin glikolize olup olmaması gibi özelliklere de bağlıdır^[1,3,5,10,12].



Şekil 3. 1-7 yol, HBV s gen bölgesi ile rekombine pCR2.1 vektörünün EcoRI ile kesilmesini; SM size marker'ı (Sigma PCR marker) göstermektedir

Bu çalışmada bilim dalı laboratuvarımızda hazırlanan bilgisayar programı yardımı ve internet aracılığı ile Dünya Gen Bankası veri tabanından elde edilen birçok mutant HBV-DNA dizilerinin karşılaştırılması ile elde edilen bilgiler ışığında HBV s geninin başlangıç ve bitiş nükleotidlerini saptadık. Saptanan bu nükleotidlerin (sense ve antisense) 5' uçlarına rekombinasyon işlemlerinin kolaylaşması ve bu gen bölgesinin ekspresyonu amacıyla başka vektörlere taşınması ve protein ürünlerinin elde edilmesini kolaylaştırıcı KpnI ve SacI gibi restriksiyon alanları yerleştirdik.

Rekombinant DNA teknolojisinin genel prensiplerini kullanarak gen aktarımını gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın daha sonra yapacağımız gen ekspresyon çalışmalarına öncülük edeceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Ganem D. Hepadnaviridae and their replication In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al (eds). Fields Virology. Third edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1996;2703-37.
2. Beasley RP. Hepatitis B virus-the major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer 1988;61:1942-56.
3. Ganem D. Persistent infection of humans with hepatitis B virus: mechanisms and consequences. Rev Infect Dis 1982;4:1026-47.
4. Hollinger FB. Hepatitis B virus In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al (eds). Fields Virology. Third edition, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996;2739-807.
5. Peters RL. Viral hepatitis: a patologic spectrum. Am J Med Sci 1975;270:17-28.
6. Redeker AD. Viral hepatitis: clinical aspects. Am J Med Sci 1975;270:9-16.
7. Attanasio-R Lanford RE, Dilley-D, Stunz GW, Notvall L, Henderson AB, Kennedy RC. Immunogenicity of hepatitis B surface antigen derived from the baculovirus expression vector system: a mouse potency study. Biologics 1991;19(4):347-53.
8. Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, et al. High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Bio/Technology 1987;5:479-85.
9. Fujisawa Y, Ito Y, Ikeyama S, Kikuchi M. Expression of hepatitis B virus surface antigen P31 gene in *Escherichia coli*. Gene 1985;40:23-9.
10. Hamsa PV, Chattoo BB. Cloning and growth-regulated expression of the gene encoding the hepatitis B virus middle surface antigen in *Yarrowia lipolytica*. Gene 1994;143(2):165-70.
11. Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. SO: Proc-Natl-Acad-Sci-USA 1992;89(24):11745-9.
12. Pumpen P, Kozlovskaya TM, Borisova GP, Bichko VV, Dishler A, Kalis J, Kukaine RA, Gren EJ. Expression of hepatitis B virus surface antigen gene in *Escherichia coli*. Gene 1991;30:201-10.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Mannatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press Printed in the USA, 1989.
14. Buckholz RG, Gleeson MAG. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. Bio/Technology 1991;9:1067-72.
15. Glick BR, Pasternak JJ. Heterologous protein production in eukaryotic cells in chapter 5., Molecular Biotechnology Washington DC, 1995;113-32.
16. Glick BR, Pasternak JJ. Molecular research procedures in chapter 3., Molecular Biotechnology Washington DC, 1995;75-6.

Yazışma Adresi:

Doç. Dr. Ayhan KUBAR

Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Viroloji Bilim Dalı

Etlik-ANKARA

Makalenin Geliş Tarihi: 03.04.1998 Kabul Tarihi: 21.07.1998