

577.217.33

Ş 614 s

1996 - 3225

**TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU**  
**ARAŞTIRMA PROJESİ TBAG-325**

**SONRADAN İŞARETLEME**  
**TEKNIĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Doç. Dr. MEHMET ŞİMŞEK

**TÜRKİYE**  
**BİLİMSEL ve TEKNİK**  
**ARAŞTIRMA KURUMU**  
**KÜTÜPHANESİ**

**ORTA DOĞU TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ**

**ANKARA, 1979**

577.217.33

Ş 614 s.

TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

ARAŞTIRMA PROJESİ TBAG-325

SONRADAN İŞARETLEME

TEKNIĞİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Doç. Dr. Mehmet Şimşek

Orta Doğu Teknik Üniversitesi  
Biyolojik Bilimler Bölümü  
Ankara, 1979

13952

## ÖNSÖZ

Bu kitap, TBAG-325 numaralı projenin kesin raporudur. Projede, teknisyen olarak Beyazıt Dönmez çalışmıştır. Projenin yürütülmesine , sağladıkları maddi ve manevi desteklerinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu ile Orta Doğu Teknik Üniversitesine teşekkürü borç biliriz.

## ÖZET

Oligonükleotidlerin daha iyi bir şekilde işaretlenmesini sağlamak amacıyla, ekmeek mayası RNA karışımı,  $-^{32}\text{p}$ -ATP ve polinükleotidkinaz kullanarak  $^{32}\text{p}$  ile işaretlendi. İşaretleme miktarı zaman ve ATP derişimine göre optimize edildi. Ayrıca,  $\text{T}_1$ -RNaz ve hegzokinaz enzimlerinin saflık dereceleri incelendi. Özellikle hegzokinazın tümüyle saf olmadığı ve içinde az miktarda nükleaz etkinliği olduğu saptandı. DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile hegzokinaz nükleaz etkinliğinden arıtıldı.

## ABSTRACT

In order to improve the conditions for labelling of oligonucleotides, a mixture of yeast RNAs was labelled with  $^{32}\text{p}$  using  $-^{32}\text{p}$ -ATP and polynucleotidekinase, and the extent of labelling has been optimized for time and ATP concentration. In addition, purity of two enzymes ( $\text{T}_1$ -RNase and hexokinase) has also been studied. It is found that especially hexokinase is not completely pure and contains trace amount of nuclease(s). The contaminating nuclease(s) were removed by column chromatography of hexokinase on DEAE-cellulose.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
1. GİRİŞ	1
2. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	7
2.1. Maddeler	7
2.2. Yöntemler	7
2.2.1. Oligonükleotidlerin $^{32}\text{p}$ ile işaretlenmesi ve işaretlemenin ölçümü	7
2.2.2. $\text{T}_1$ -RNaz etkinliğinin ölçümü ve $\text{T}_1$ -RNazın kolon kromatografisi	8
2.2.3. Hekzokinaz etkinliğinin ölçümü ve hegzokinazın kolon kromatografisi	10
2.2.4. ApUpG nin $^{32}\text{p}$ ile işaretlenmesi	12
2.2.4.1. $^{32}\text{pApUpG}$ nin kağıt elektroforezi	12
2.2.4.2. Otoradyografi	12
2.2.4.3. $^{32}\text{pApUpG}$ nin DEAE-selüloz kağıdından elde edilmesi	13
2.2.5. $^{32}\text{pApUpG}$ nin $\text{T}_1$ -RNaz ve hegzokinaz ile tepkimesi	13
3. BULGULAR	
3.1. Oligonükleotidlerin $^{32}\text{p}$ ile işaretlenmesi ve optimizasyonu	15
3.1.1. Zaman optimizasyonu	15
3.1.2. ATP optimizasyonu	15
3.2. $\text{T}_1$ -RNaz ve hegzokinazın bulaşık enzim etkinliklerinden arındırılması	17
3.2.1. $\text{T}_1$ -RNaz'ın kolon kromatografisi	17
3.2.2. Hekzokinazın arıtılması	20

3.3.	T <sub>1</sub> -RNaz ve hegzokinazın saflık derecesinin ölçümü	22
3.3.1.	ApUpG nin <sup>32</sup> p ile işaretlenmesi	22
3.3.2.	T <sub>1</sub> -RNaz ve hegzokinazın <sup>32</sup> pApUpG ile test edilmesi	25
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	28
4.1.	Oligonükleotidlerin <sup>32</sup> p ile işaretlenmesi ve optimizasyonu	28
4.2.	T <sub>1</sub> -RNaz ve hegzokinazın nükleaz etkinliklerinden arındırılması	28
5.	REFERANSLAR	31

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No.</u>
1. Sonradan işaretleme tekniğini oluşturan etablar	4
2. Elüsyon aygıtı	14
3. Oligonükleotidlerin $^{32}$ P ile işaretlenmesinde zaman optimizasyonu	16
4. Oligonükleotidlerin $^{32}$ P ile işaretlenmesinde ATP optimizasyonu	18
5. T <sub>1</sub> -RNazın DEAE-selüloz kolon kromatografisi	19
6. Hekzokinazın sephadex G-50 kolon kromatografisi	21
7. Hekzokinazın DEAE-selüloz kolon kromatografisi	23
8. ApUpG'nin işaretlenmesi ve kağıt elektroforezi	24

## 1. GİRİŞ

Ribonükleik asit (RNA)lerin nükleotid dizi analizi 15 yıl önce yapılmaya başlanmıştır.<sup>(1)</sup> Yapılan çalışmalar çoğunlukla transfer-RNA (tRNA)lar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunun en önemli nedeni, tRNA'ların diğer RNA lara göre çok daha küçük olması ve dolayısıyla yapısal çalışmalara daha elverişli olmasıdır. Son 15 yıl içinde 100 den fazla tRNA nın yapısı bulunmuş olmasına karşın elçi (mRNA),<sup>(2)</sup> ribozomal (rRNA)<sup>(3)</sup> ve faj RNA<sup>(4)</sup> yapıları çok az çalışılmıştır. Burada söz konusu edilen yapı nükleotid dizisini içeren birincil yapıdır. Biyolojik açıdan daha da önemli olan üç-boyutlu yapı hakkında bilgimiz yalnızca tRNA lar için mevcuttur.<sup>(5)</sup>

Bu projenin konusu, RNA ların (özellikle tRNA ların) birincil yapısını inceleyen bir teknikle ilgilidir. Daha önce proje yürütücüsü tarafından geliştirilmiş olan ve sonradan işaretleme olarak niteliyebileceğimiz bu tekniği irdeleyebilmek için yapı-bulma sahasında kullanılan diğer iki teknikten bahsetmek yararlı olacaktır.

Bunlardan ilki, 1965 yılında Holley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 'soğuk' tekniktir.<sup>(1)</sup> Bu teknik ile yapılan çalışmalar 1-2 yıl gibi uzun bir zaman almakta ve ayrıca, çok fazla miktarda da saflaştırılmış tRNA ya gereksinim göstermektedir. Bu nedenlerle soğuk teknik 1970 yıllarından sonra çok az kullanılır bir durumda kalmıştır. Bunun böyle olmasında 1968-69 yıllarında geliştirilen Sanger tekniği<sup>(6)</sup> de büyük rol oynamıştır. 'Sıcak' teknik olarak nitelenebilecek olan Sanger tekniğinde hücre içinde (in vivo) <sup>32</sup>P ile işaretlenmiş



bu teknikte kullanılmakta ve böylece tRNA ya olan gereksinim soğuk teknikte göre yaklaşık 1000 kez daha azaltılabilmektedir. Ayrıca yapısal çalışmalar 2-3 ay kadar kısa bir zamanda tamamlanabilmektedir. Ancak madde ve zaman açısından oldukça avantajlı olan sıcak tekniğin de önemli bir dezavantajı bulunmaktadır. O da, tekniğin yalnızca tek hücreli ilkel canlılar da uygulanabilmesi, fakat gelişkin-kompleks canlılarda ise kullanılamamasıdır. Bunun nedeni, kompleks canlılara verilen  $^{32}\text{P}$ 'nin organizma içinde fazla şekilde seyrelmesi ve böylece sentezlenen RNA'ların yapısına giren  $^{32}\text{P}$  miktarının sıcak teknik için gerekli olandan çok az olmasıdır. (7)

Sıcak tekniğin kompleks canlılarda kullanışlı olmayışı 1972 yılında yeni bir tekniğin geliştirilmesine neden olmuştur. Sonradan işaretleme tekniği (8) olarak nitelediğimiz bu yeni teknikte de sıcak teknikte olduğu gibi  $^{32}\text{P}$  ile işaretli tRNA kullanılmaktadır. Fakat  $^{32}\text{P}$  ile işaretleme hücre içinde (in vivo) değil, hücre dışında (in vitro) yapılmaktadır. Böylece teknik hem ilkel canlılar (9) hemde kompleks canlılar (10-12) için kullanılabilir. Ayrıca, sıcak teknikte olduğu gibi yapı bulmak işi 10-20 ug kadar az saf tRNA ile yapılabilen ve bu iş 2-3 ay gibi kısa bir zamanda tamamlanabilmektedir.

Yukarıda ana hatları ile belirtilen üç teknik arasında gerek kullanım sahası gerekse tRNA miktarı ve zaman açısından ayrıcalıklar bulunmakla beraber yapılan işlemler esas itibariyle aynı ilkelere dayanmaktadır. Her üç teknikte de önce yapısı araştırılan tRNA'nın elde edilmesi ve diğer tRNA lardan ayrılarak saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırma

tRNA, daha sonra, özgül enzimlerle ( $T_1$ -RNaz ve pankreatik RNaz) küçük oligonükleotidlere bölünmekte ve bu oligonükleotidler birbirinden ayrılarak her birinin ayrı ayrı nükleotid dizisi bulunmaktadır. tRNA'nın tüm nükleotid dizisini bulabilmek için yapısı saptanan küçük oligonükleotidlerin uçuca eklenerek doğru sıraya konulabilmesi gerekmektedir. Bu iş çoğunlukla saf tRNA'nın özgül enzimlerle kısmi şekilde bölünerek daha uzun boyda oligonükleotidlerin elde edilmesi ile mümkün olmaktadır. Uzun oligonükleotidler birbirinden ayrılıp teker teker nükleotid dizileri bulunduktan sonra gerek kendi aralarındaki gerekse daha küçük boydaki oligonükleotidlerle olan çakışmalarından faydalanılarak tRNA'nın tüm nükleotid dizisi bulunmuş olmaktadır.

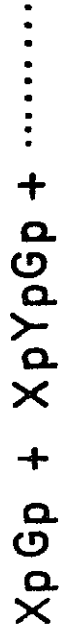
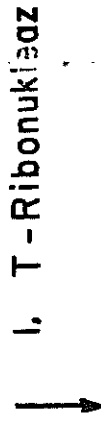
Her üç teknikte de güdülen ilkelerin esas yönünden aynı olmasına karşılık kullanılan yöntemler arasında önemli ayrıcalıklar bulunmaktadır. Radyoaktif  $^{32}P$  kullanan Sanger ve sonradan işaretleme teknikleri soğuk teknikten oldukça değişik yöntemler kullanırken  $^{32}P$  kullanan iki tekniğin izlediği yöntemler arasında büyük benzerlikler bulunmaktadır. Şekil 1 de sonradan işaretleme tekniğini oluşturan sayfalar görülmektedir. Buradaki (1) ve (6) nolu etaplar Sanger tekniğinde de aynı şekilde bulunmaktadır. Geriye kalan diğer yöntemlerin tümü sonradan işaretleme tekniğine özgü olup, bunların çoğunluğu Şimşek et.al. (8,11) tarafından geliştirilmiştir. Teknik, gerek geliştirildiği laboratuvar<sup>(10-12)</sup> gerekse diğer laboratuvarlar<sup>(14,15)</sup> tarafından başarı ile kullanılmış ve çok sayıda RNA'nın primer nükleotid yapısı ortaya çıkarılmıştır.

Şekil 1 - Sonradan işaretleme tekniğinci oluşturan etaplara

RNA

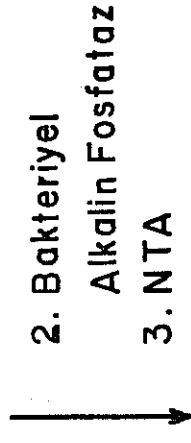
RNA'nın özel enzimle

kırılması

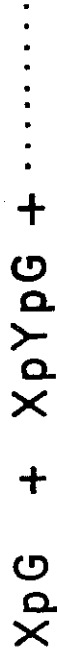


2) BAP ile uç fosforların ayrımı

3) BAP in öldürülmesi

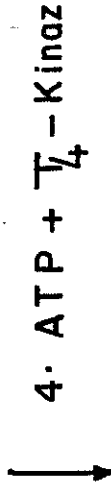


4) P ile işaretleme



5) Artık ATP nin glukoz-6-P a

dönüşümü



6) İki boyutlu elektroforez ve

autoradyografi



X, Y = U, C, A

Bu projenin konusu, yukarıda irdelenmiş olan sonradan işaretleme tekniğini biraz daha geliştirerek daha mükemmel hale getirmek amacına yöneliktir. Söz konusu teknik her ne kadar bir çok grup tarafından başarı ile kullanılmış ise de Şekil 1 de belirtilen bazı etapların geliştirilmeye ihtiyaç gösteren yönleri bulunmaktadır.

Bunlardan birincisi, oligonükleotidlerin  $T_4$ -polinükleotid-kinaz ve radyoaktif  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP kullanarak  $^{32}P$  ile işaretlenmesini içeren 4 nolu etaptır. Daha önce yayınlanan çalışmalar, bu etaptaki işaretlemenin bazı oligonükleotidler için istenilen yüzde yüzlük verimden daha düşük olduğunu göstermiştir. (8-13) Özellikle 6-7 monomerden daha uzun olan oligonükleotidlerde veya 5'- ucunda modifiye baz içeren oligonükleotidlerde işaretleme verimi çoğu zaman yüzde 60-70 seviyesinde kalmaktadır. (6) Projenin amaçlarından birisi bu sorunu çözmeye yönelik olup, işaretleme etabını zaman ve ATP'ye göre incelemek ve optimize etmek olacaktır.

Amaçlardan ikincisi, teknikte kullanılan bazı enzimlerin saflık derecesi ile ilgilidir. Sonradan işaretleme tekniği kullanılarak yapılan ve yayınlanan parmak izi haritalarında çoğu zaman teorik olarak beklenilmeyen bir iki radyoaktif nokta bulunmaktadır. (8-13) Bu noktaların en belirginleri  $^{32}pX$ ,  $^{32}pA$  ve  $^{32}pC$  olup,  $T_1$ -RNaz enzimi kullanarak yapılan parmak izi haritalarında yer almaktadırlar. Bunların ortaya çıkış nedeni, kullanılan enzimlerden birinde (veya birkaçında) arzu edilmeyen bulaşık nükleaz etkinliklerinin bulunması ile açıklanabilmektedir. (10) Her ne kadar teknikte kullanılan

enzimleri hazırlayan ve satan firmalar bu ların oligonükleotidleri parçalayan nükleaz etkinliği içermedikleri kataloglarında belirtmekte iseler de, hassas testler kullanılarak yapılan deneyler özellikle hekzokinaz içinde bulaşık nükleaz etkinliği olduğunu göstermektedir. Benzeri nükleazların T<sub>1</sub>-RNaz içinde de olması mümkündür. Bu nedenle projenin diğer bir amacı T<sub>1</sub>-RNaz ve Hekzokinaz enzimlerini nükleaz etkinliklerinden arındırmak olacaktır.

## 2. GEREKLER ve YÖNTEMLER

### 2.1. Maddeler

$\gamma$ - $^{32}$ P-ATP (15.4 Ci/m.mol) Amersham firmasından Sento kanalıyla sağlandı. % 50 lik alkol içindeki radyoaktif ATP'nin önce çözücüsü uçuruldu, sonra radyoaktif olmayan ATP ekliyerek özgül etkinliği 5-10 kez azaltıldı. Ekmek mayası RNA karışımı Boehringer (F.Almanya); 2.3 cm çapındaki Whatman 3 MM filtreleri A. Thomas (USA); DEAE-selüloz reçinesi Whatman Inc. (İngiltere); DEAE-selüloz elektroforez kağıdı ve selüloz asetat şeritleri (3 x 55 cm) Schleicher-Schüll (F.Almanya); Röntgen filmleri (30 x 40 cm) Kızılay Kurumu; I ve II nolu film banyoları Derman eczanesi (Koyun Pazarı, Ankara); ApUpG üçlüsü P.L. Biochemicals (USA); E. coli alkalin fosfat (BAP), Hekzokinaz ve T<sub>4</sub>-polinükleotidkinaz enzimleri, Boehringer (F.Almanya); T<sub>1</sub>-RNaz, Sankyo Inc. (Japonya) firmasından temin edildi. Kullanılan kimyasal maddeler analitik derecede saf olup çoğunlukla E. Merck (F.Almanya) veya Sigma Inc. (USA) ürünleridir.

### 2.2. Yöntemler

#### 2.2.1. Oligonükleotidlerin $^{32}$ P ile işaretlenmesi ve işaretlemenin ölçümü:

Ekmek mayası RNAsı sübstrat olarak kullanıldığı zaman işaretleme 20 mikrolitrelik (ul) bir hacim içinde şöyle yapıldı

	<u>Hacim(ul)</u>	<u>Son derişiklik</u>
Ekmey mayası RNAsı (0.2 A <sub>260</sub> )	5	10 A <sub>260</sub> /ml
$\gamma$ - $^{32}$ P-ATP (330 uM)	5	0.082 mM
Tris. HCl pE=7.5 (0.5 M)	1	25 mM
MgCl <sub>2</sub> (0.2 M)	1	10 mM

	<u>Hacim(ul)</u>	<u>Son derişiklik</u>
Merkaptoetanol (0.3 M)	1	15 mM
damıtık su	3	-
T <sub>4</sub> -polinükleotidkinaz	4	200 birim/ml

Enzim eklendikten sonra karışım 37°C de 30 dakika süreyle tepkimeye bırakıldı. Tepkime sonucunda, karışım çeyrek büyüklükteki Whatman ( $\emptyset = 2.3$  cm) filtrelerine emdirildi. Tepkime fazlası radyoaktif  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP nin az da olsa filtrelere tutunmasını önlemek amacıyla, filtreler daha önceden 25 ul (10 mM) radyoaktif olmayan ATP çözeltisi emdirilerek doyuruldu. İşaretleme karışımı emdirilmiş filtreler, Hoskinson-Khorana<sup>(16)</sup> yöntemine göre önce 200 ml %5 lik soğuk Trikloro Asetik Asit (TCA) içine atıldı ve karıştırılarak 10 dakika yıkandı. Aynı yıkama işlemi, taze 200 ml. lik soğuk çözeltiler kullanarak önce 2 kez %5 lik TCA ile sonrada 2 kez saf alkol ile tekrarlandı. Filtreler kurutuldu ve <sup>32</sup>P etkinliği sintilasyon sıvısı kullanmadan Cherenkof yöntemine göre<sup>(17)</sup> Packard Tricarb aygıtı içinde sayıldı.

### 2.2.2. T<sub>1</sub>-RNaz etkinliğinin ölçümü ve T<sub>1</sub>-RNazın kolon kromatografisi:

a- T<sub>1</sub>-RNaz etkinliği: Uchida-Egami<sup>(18)</sup> yöntemine göre yapıldı. Yöntem, RNA nın T<sub>1</sub>-RNaz ile küçük boyda oligonükleotidlere bölünmesi ve bunların asit ile çökelmeme ilkesine dayanmaktadır. Tepkime;

0.250 ml 0.20 M Tris HCl pH 7.5

0.100 ml 0.020 M EDTA

0.250 ml RNA çözeltisi (12 mg/ml)

TÜRKİYE  
BİLİMSEL ve TEKNİK  
ARAŞTIRMA KURUMU  
KÜTÜPHANESİ

karışımına 0.1 ml  $T_1$ -RNaz eklenerek başlatıldı. Karışım  $37^{\circ}\text{C}$  de 15 dakika tepkidikten sonra buna 0.250 ml % 0.75 lik uranil-asetat (% 25 lik perklorik asit içinde) eklendi ve uzun RNA lar çöktürüldü. Oluşan çökelek 2 dakika  $15,000 \times g$  de santrifüjlendi ve çökelek üstü sıvı ayrılarak bunun 260 nm de ışığı soğurması kontrol deneyindeki üst sıvıya karşı ölçüldü.

b-  $T_1$ -RNaz'ın DEAE-selüloz kolon kromatografisi: 20 gr DEAE-selüloz reçinesi (DE-23) 1 litre 0.5 M HCl içinde karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Karışım Buchner süzgeci kullanarak süzüldü ve pH 5.0-6.0 oluncaya kadar bolca damıtık su ile yıkandı. Islak reçine süzgeçten alınarak 1 litre 0.5 M NaOH içine alındı ve 30 dakika sonra tekrar süzgeç üzerinde süzüldü ve pH 8.0-8.5 oluncaya dek damıtık su ile yıkandı. Yıkanan reçine süzgeçten alındı ve 1 litre 5 mM sodyum-fosfat, 0.1 mM EDTA pH=6.0 tamponu içine bırakılarak dengelendirildi. Dengelenen reçine 0.8 x 20 cm.lik bir kolona dolduruldu ve kolon 100 ml 5 mM sodyum fosfat 0.1 mM EDTA tamponu (pH=6.0) ile  $+4^{\circ}\text{C}$  de yıkandı.

Amonyum sülfat süspansiyonu içinde bulunan  $T_1$ -RNaz, kolona emdirilmeden önce DEAE-selüloz reçinesine tutunmasını önleyecek olan  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuzundan diyaliz yapılarak arıtıldı. Diyaliz için; 100 ul.  $T_1$ -RNaz (1 mg/ml), 1 ml 5 mM sodyum fosfat -0.1 mM EDTA pH=6.0 tamponu ile karıştırılarak 0.6 x 10 cm. lik bir diyaliz torbasına kondu ve 2 litrelik aynı tampona karşı 49 saat diyaliz edildi. Bu süre içinde diyaliz tamponu 3 kez taze tampon ile değiştirildi.

Diyalizlenen  $T_1$ -RNaz, DEAE-selüloz kolonuna emdirildi ve kolon lineer bir gradiyentle yıkanmaya başlandı. Gradiyent



3 depodan oluşturuldu. Birinci depoya 100 ml 5 mM sodyumfosfat 0.1 mM EDTA pH=6.0; ikinci ve üçüncü depoya 100 er ml 0.25 M sodyum fosfat-0.25 M NaCl - 0.1 mM EDTA pH=6.0 kondu ve kolon birinci depoya bağlanarak dakikada 0.1 ml.lik bir hızla 2 şer ml. lik hacimler toplandı.

2.2.3. Hekzokinaz etkinliğinin ölçümü ve hegzokinaz'ın kolon kromatografisi:

a- Hekzokinaz etkinliği; Darrow-Colowick yöntemine göre yapıldı. (19) Ölçüm için;

2.5 ml çözelti A

0.1 ml Hekzokinaz

0.4 ml 0.2 glukoz çözeltileri

3 ml lik bir kuvartz küvet içinde karıştırıldı ve 560 nm dalga boyundaki ışığın soğurulması spektrofotometrede okundu.

A çözeltisi her gün taze olarak aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

<u>Çözelti A</u>	<u>Hacim</u>
% 0.006 kresol kırmızısı, % 1.6 MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	7 ml
0.1 M ATP	1.5 ml
Karışımın rengi morunsu-kırmızı olma dek 0.1 M NaOH eklendi (yaklaşık 1.4 ml pH = 9.3)	
0.1 M glizil-glizin-NaOH tamponu pH 9.0	3 ml

Karışımın hacmi damıtık su ile 30 ml ye tamamlandı.

b- Hekzokinaz'ın sephadex G-50 kolon kromatografisi:

Ammonyum sülfat süspansonu içinde bulunan hegzokinaz önce (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tuzundan arıtıldı. Bu iş sephadex G-50 ile yapıldı.

0.5 ml hegzokinaz (2 mg/ml) 1 ml 5 mM suksinat - 0.1 mM EDTA pH 6.0 tamponu ile seyreltildi ve 1 x 45 cm lik sephadex G-50 kolonuna emdirildi. (Sephadex G-50 daha önce aynı tampon içinde 3 gün bırakılarak şişirilmiştir.) Sephadex kolonu 5 mM suksinat - 0.1 mM EDTA pH 6.0 tamponu ile yıkandı. 1 ml lik hacimler her beş dakikada toplandı. Tüplerden 0.050 ml alınarak hegzokinaz etkinlik testi yapıldı (2.2.3.a) ve böylece enzimin hangi tüplerde olduğu saptandı. Ayrıca enzimin  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuzundan ayrılıp ayrılmadığını anlamak için sülfat testi(20) yapıldı.

c- Sülfat testi: Tüplerden 10 ul alınarak buna 1 ml 0.2 M  $\text{BaCl}_2$  (0.01 N HCl içinde) eklendi ve beyaz çökeleğin oluşup oluşmadığı izlendi.

d- DEAE-selüloz kolon kromatografisi:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  tuzundan ayrılmış olan hegzokinaz 1 x 45 cm ebadındaki DEAE-selüloz kolonuna emdirildi. DEAE-selüloz (DE-23) daha önce 2.2.2.b kısmında belirtildiği gibi asit ve baz ile yıkanmış, sonra da 5 mM suksinat - 0.1 mM EDTA pH 6.0 tamponu içinde dengelenmiştir. Kolon, dengelenen reçine ile dolduruldu ve 100 ml suksinat - EDTA tamponu ile yıkandı. Enzimin kolondan akıtılması için pH gradiyenti yapıldı. Birinci depoya 150 ml 5 mM suksinat - 0.1 mM EDTA pH 6.0; ikinci depoya 150 ml 5 mM suksinat 0.1 mM EDTA pH 4.5 tamponu konup, kolon birinci depoya bağlandı ve her on dakikada 2 ser ml lik tüpler toplandı. Tüplerden 100 ul alınarak 2.2.3.a kısmında belirtildiği şekilde hegzokinaz etkinlik testi yapıldı.

2.2.4. ApUpG nin  $^{32}\text{p}$  ile işaretlenmesi:

İşaretleme 2.2.1 bölümündeki gibi yapıldı, ancak sübstrat olarak RNA yerine 0.1 A<sub>260</sub> birimi ApUpG kondu. 37°C de 30 dakika tepkimeden sonra karışımdaki kullanılmayan radyoaktif ATP yi yok etmek için; 4 ul 10 mM glukoz ile 1 ul heksokinaz (0.2 ug) eklendi, ve 37°C de tepkime 5 dakika uzatıldı. Buna 1 ul 5 mM ATP eklendi ve tepkime 37°C de 10 dakika daha uzatıldı. Tekrar 1 ul 5 mM ATP eklenip, 37°C de 10 dakika tepkimeden sonra karışım 100°C de 2 dakika bekletildi ve hemen arkasından buz içinde soğutularak -20°C de saklandı.

2.2.4.1.  $^{32}\text{p}$ ApUpG'nin kağıt elektroforezi:

$^{32}\text{p}$  ile işaretlenmiş olan AUG karışımı (2.2.4) 20 x 60 cm lik bir DEAE selüloz kağıdınının 50.inci santimetresine 3 cm lik bir band halinde emdirildi. Elektroforez kağıdı % 7 lik formik asit ile ıslatıldı ve aynı tampon içinde Savant elektroforez cihazı kullanılarak 300 voltluk bir gerilim altında 16 saat elektroforez edildi. Kağıt kurutuldu ve karanlık odada otoradyografisi yapıldı.

2.2.4.2. Otoradyografi:

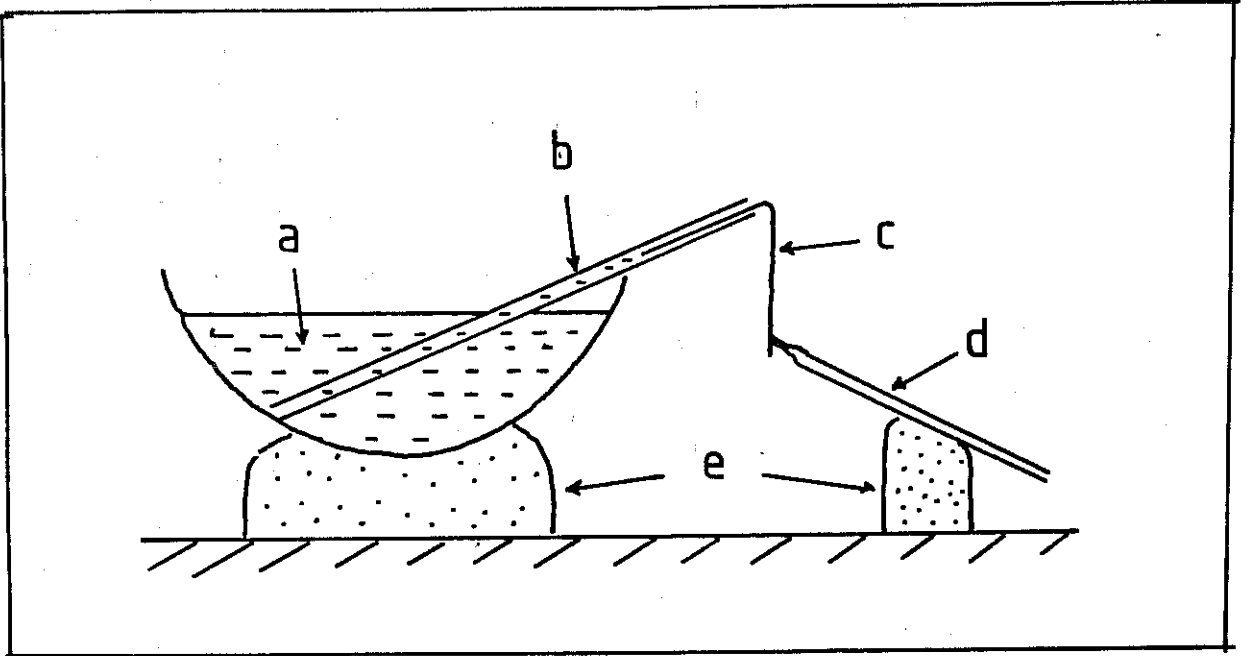
Kurutulan DEAE-selüloz kağıdı üzerinde radyoaktif oligonükleotidlerin yerini saptamak amacıyla, DEAE-selüloz kağıdı karanlık odada Dupont x-ray röntgen filmi ile örtüldü ve 17 saat bekletildi. Bu süre sonunda, film beşer dakika önce developer, sonra fikser ve su tanklarına bırakılarak banyo edildi.

2.2.4.3.  $^{32}$ pApUpG'nin DEAE-selüloz kağıdından elde edilmesi:

DEAE-selüloz kağıdı üzerindeki radyoaktif oligonükleotidlerin yeri otoradyografi filmleri yardımı ile bulundu ve kağıdın o bölgesi kesilerek kapsadığı radyoaktif oligonükleotid Şekil 2 de görülen düzenek kullanılarak kağıttan aktıldı. Kağıt üzerinden geçerken beraberinde radyoaktif oligonükleotidi de taşıyan TEAB tamponu ince kapiller cam boru içinde toplandı. Kağıdın her santimetrekaresi için yaklaşık 100 ul sıvı toplandı. Toplanan sıvı 1.5 ml lik eppendorf tüpleri içine alındı ve su aspiratörüne bağlı desikatör kullanılarak TEAB tamponu uçuruldu. Her defasında 100 ul damıtık su koyarak, uçurma işlemi 3 kez yinelendi.

2.2.5.  $^{32}$ p-ApUpG'nin  $T_1$ -RNaz ve heksokinaz ile tepkimesi:

10 ul radyoaktif  $^{32}$ p-ApUpG ( 50,000 cpm) 2 ul  $T_1$ -RNaz veya 2 ul heksokinaz ile karıştırıldı ve  $37^{\circ}\text{C}$  de 30 dakika tepkileştirildi. Tepkime sonucunda, karışımlar hemen  $100^{\circ}\text{C}$  de 2 dakika bekletildi ve buz içinde soğutulduktan sonra 2.2.4.1 kısmında olduğu gibi DEAE-selüloz kağıdı üzerinde elektroforez edildi. Elektroforez sonucunda kurutulan kağıtlar otoradyografiye tabi tutuldu ve radyoaktivitenin yeri saptandı (2.2.4.2). Tespit edilen bandlar kağıttan kesilerek içerdikleri radyoaktivite miktarı Cerenkov yöntemine<sup>(17)</sup> göre ölçüldü.



Şekil 2 -  $^{32}\text{pApUpG}$  nin DEAE-selüloz kağıdından izole edilmesi: (a) 1M TEAB tampon pH 8.0 içeren depo, (b) mikroskop lamı, (c) DEAE-selüloz kağıdı, (d) ince kapiller cam boru, (e) kil sütunları.

### 3. BULGULAR

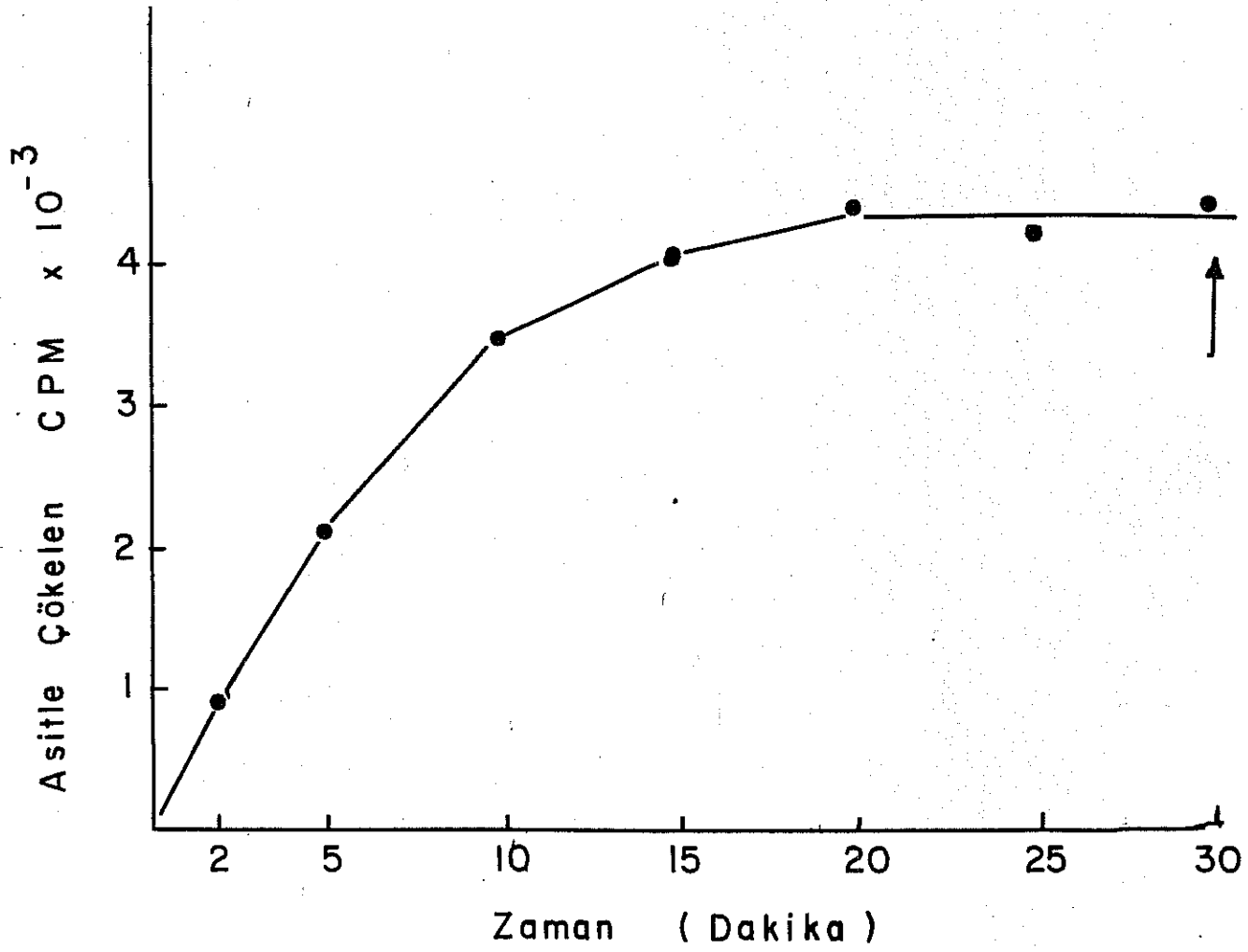
#### 3.1. Oligonükleotidlerin $^{32}\text{P}$ ile işaretlenmesi ve işaretlemenin optimizasyonu

##### 3.1.1. Zaman optimizasyonu:

Ekmek mayası RNA sı sübstrat olarak kullanıldı ve  $^{32}\text{P}$  ile işaretlendi. İşaretlemenin zamana göre değişimini ve optimum olduğu süreyi saptamak amacıyla 0.2  $A_{260}$  birimi, 20 ul lik bir hacim içinde  $^{32}\text{P}$  ile işaretlemeye bırakıldı (Bkz. Yöntemler 2.2.1), ve karışımdan 2 şer ul lik hacimler 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 uncu dakikalar da alınarak işaretlemenin miktarı Hoskinson-Khorana filtre yöntemi<sup>(16)</sup> kullanılarak ölçüldü (Yöntemler 2.2.1). Elde edilen neticeler Şekil 3 de görülmektedir. Şekildeki ok, daha önce Richardson<sup>(21)</sup> tarafından DNA işaretlemesinde kullanılan zamanı göstermektedir. Deneysel noktalar 30 dakikanın RNA yı işaretlemek için de yeterli olduğunu açıkça göstermektedir. Ayrıca, işaretlemenin 20 inci dakikaya kadar artış gösterişi fakat bundan sonra plato halinde sabit kalışı, işaretleme süresininin azaltılabileceğini vurgulamaktadır.

##### 3.1.2. ATP Optimizasyonu:

İşaretleme tepkimesinde,  $T_4$ -polinükleotid kinaz enziminin sübstratları olan ATP ve RNA ikilisinden RNA, ATP ye göre daha düşük bir derişimde tutulmakta ve böylece RNA nın tümünün işaretlenmesine çalışılmaktadır. En iyi işaretleme verimini sağlayacak olan ATP derişimini bulmak amacıyla ekmek mayası RNA karışımı (0.2  $A_{260}$  birim, 20 ul lik hacim içinde ve değişik radyoaktif ATP derişikliklerinde işaretlendi. İşaretlemenin miktarı 20 dakika sonra Hoskinson-Khorana filtre



Şekil 3 - Oligonükleotidlerin <sup>32</sup>P ile işaretlenmesinde zaman optimizasyonu.

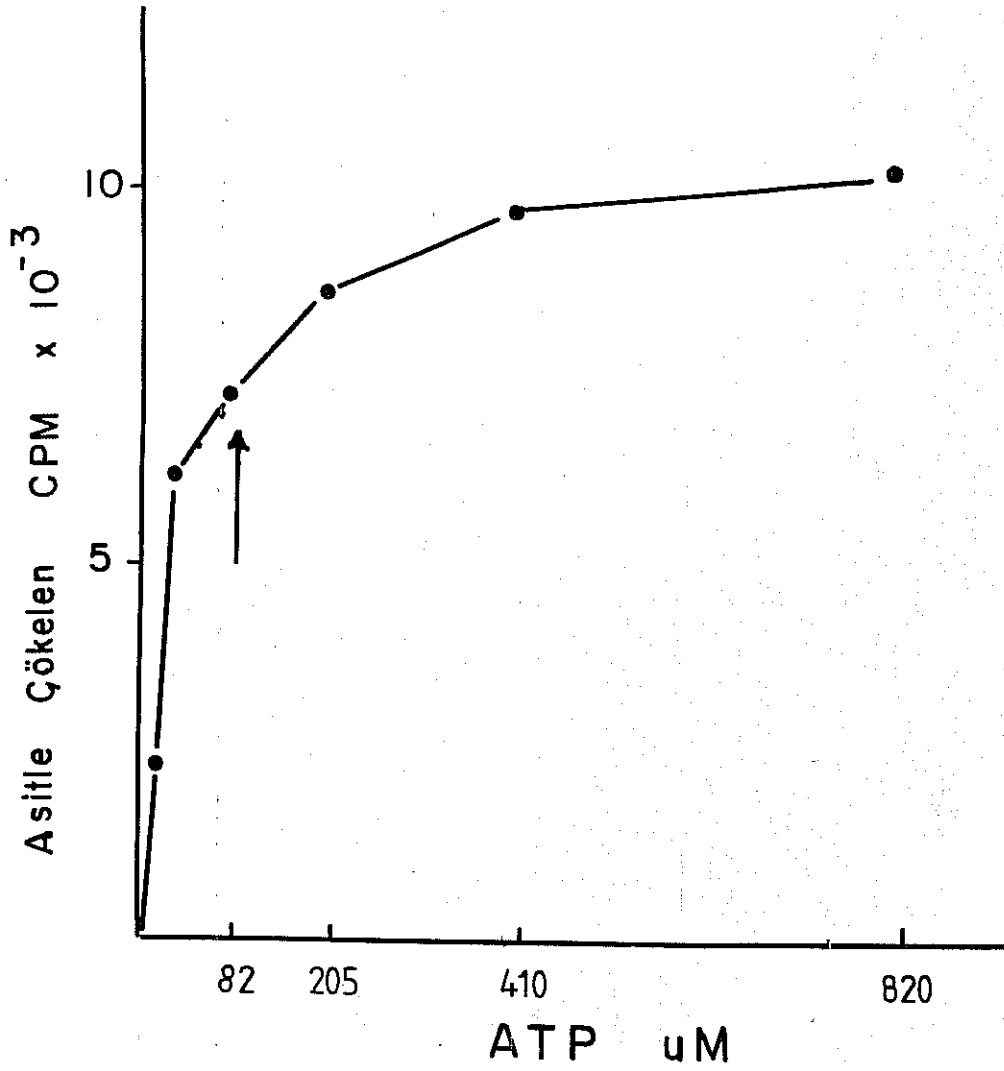
değeri (16) uyarınca saptandı. Elde edilen neticeler Şekil 4 de sunulmuştur. Şekildeki ok, daha önce diğer gruplar (9,15) tarafından kullanılan ATP derişimini göstermektedir (82 uM). Bu ATP derişimin optimum işaretleme için yeterli olmadığı açıkça görülmektedir. ATP miktarı arttıkça buna bağlı olarak işaretleme seviyesi de yükselmekte ve yüksek ATP derişimlerinde bir platoya erismektedir. Platodaki işaretleme miktarı daha önceki değerlerden yaklaşık % 70 daha fazladır. Bu artışın sağlanması için ATP nin önceki değere göre yaklaşık 10 kat daha fazla kullanılması gerekmektedir.

### 3.2. T<sub>1</sub>-RNaz ve Hekzokinaz'ın bulaşık enzim etkinliklerinden arındırılması

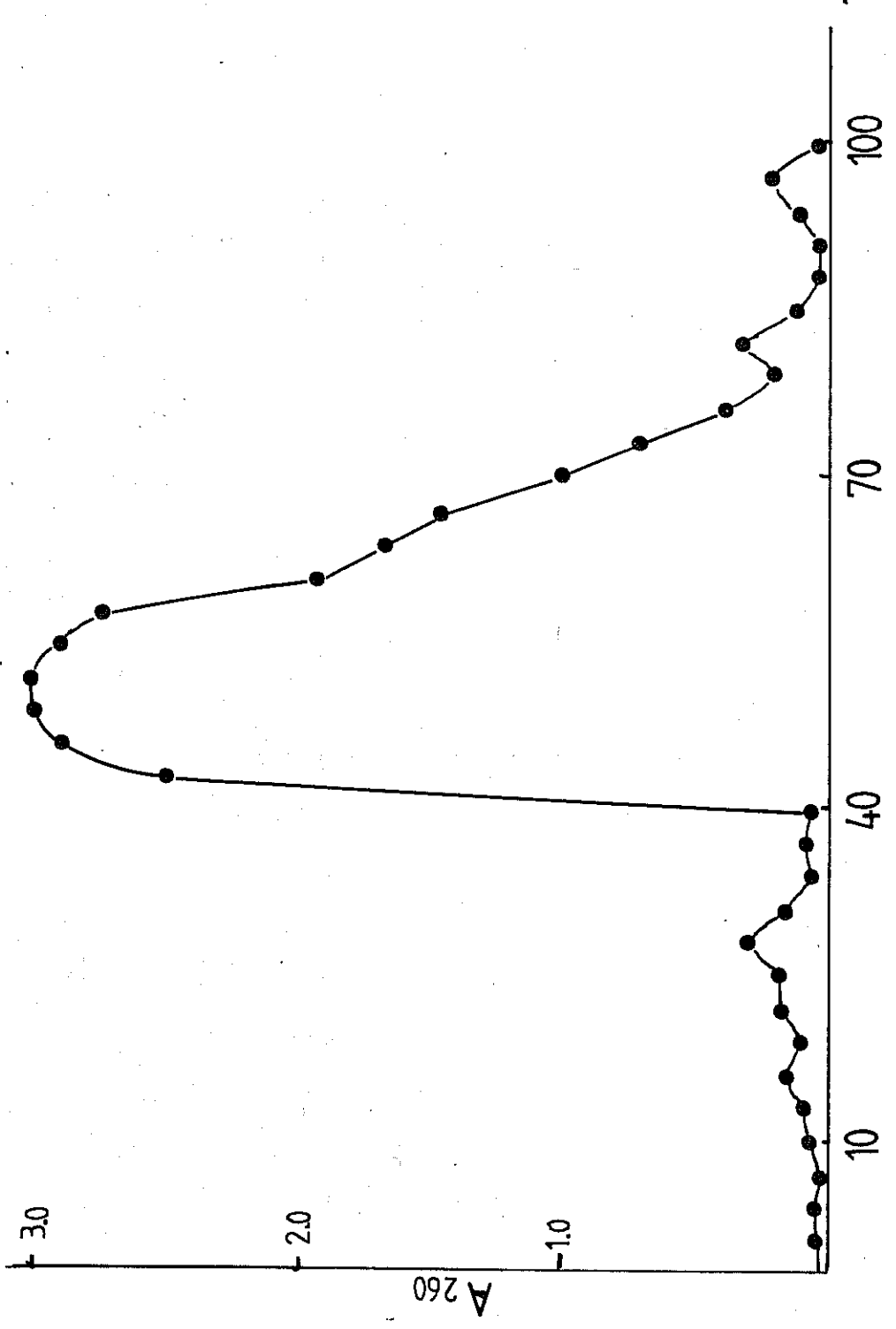
#### 3.2.1. T<sub>1</sub>-RNaz'ın kolon kromatografisi:

Amonyum sülfat süspansiyonu içinde bulunan T<sub>1</sub>-RNaz, DEAE-selüloz kolonuna emdirilmeden önce reçineye emilmesini önleyecek olan amonyum sülfat tuzundan diyaliz edilerek arıtıldı (Bkz. Yöntemler 2.2.2a). Diyalizlenen T<sub>1</sub>-RNaz 0.6 x 80 cm lik bir DEAE-selüloz kolonuna emdirildi ve lineer bir gradiyent ile yıkanmaya başlandı. T<sub>1</sub>-RNazın hangi fraksiyonlara dağılım gösterdiğini saptamak için Uchida-Egami (18) yöntemi uygulandı. Bu yöntemde asit ile çökelek veren uzun RNA lar T<sub>1</sub>-RNaz ile daha küçük parçalara bölündüğünde, bu küçük parçalar asit ile çökelek vermeyen ve çökelek üstü sıvıda kalan oligonükleotid miktarı T<sub>1</sub>-RNaz etkinliği ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Şekil 5 de Uchida-Egami





Şekil 4 - Oligonükleotidlerin <sup>32</sup>p ile işaretlenmesinde ATP optimizasyonu.

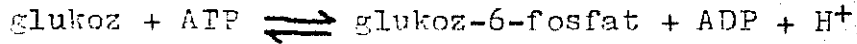


Şekil 5 - T<sub>1</sub>-RNaz'ın DEAE-selüloz kolon kromatografisi.

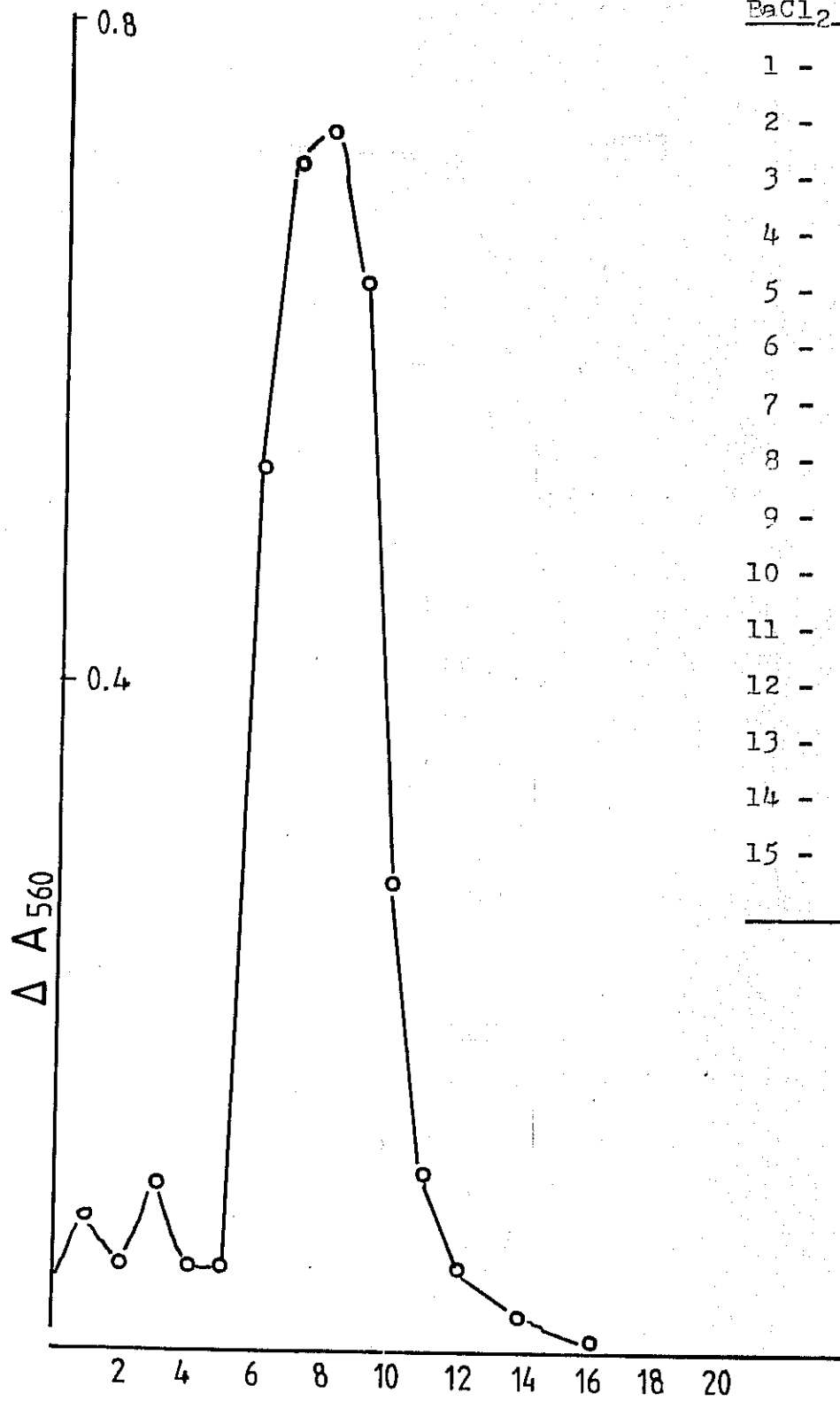
yöntemine göre elde edilen neticeler T<sub>1</sub>-RNaz'ın kolon fraksiyonlarına dağılımını göstermektedir. En fazla etkinlik gösteren tüpler (Tüp No. 46-58) birleştirildi ve kullanıllana dek -20°C de saklandı.

### 3.2.2. Hekzokinaz'ın arıtılması:

Arıtılma işlemi için DEAE-selüloz kolon kromatografisi yapıldı. Enzimin değişik tüplerdeki dağılımını saptamak Darrow et.al. yöntemine göre yapıldı.<sup>(19)</sup> Bu yöntemin esası hegzokinazın katalizlediği;



denkleminde H<sup>+</sup> iyonu çıkmasına ve bunun kresol kırmızısı ile titre edilmesine dayanmaktadır. (Bkz. Yöntemler 2.2.3a.) Arıtılma işlemine amonyum sülfat tuzu içinde bulunan hegzokinaz'ın bu tuzdan ayrılması ile başlandı. Bu iş sefhadeks G-60 kolon kromatografisi yapılarak sağlandı. Elde edilen profil Şekil 6'da sunulmuştur. Düzgün ve sivri bir doruk halinde kolondan çıkan hegzokinazın amonyum sülfat tuzundan ayrılıp ayrılmadığını saptamak için her bir fraksiyon sülfat testine<sup>(20)</sup> tabi tutuldu (Bkz. Yöntemler 2.2.3.c). Şekil üzerinde tuz içeren ve dolayısıyla BaCl<sub>2</sub> çözeltisi ile BaSO<sub>4</sub> çökeleği veren tüpler artı ile çökelek vermeyenler de eksi ile belirtilmiştir. Görüleceği gibi amonyum sülfat tuzu hegzokinazdan tümüyle ayrılmış bulunmaktadır. Hekzokinaz etkinliğini içeren tüpler (6-10) birleştirildi ve DEAE-selüloz kolon kromatografisine tabi tutuldu (Yöntemler 2.2.3.d). Enzimin



Şekil 6 - Hekzokinazın sephadex G-50 kolon kromatografisi

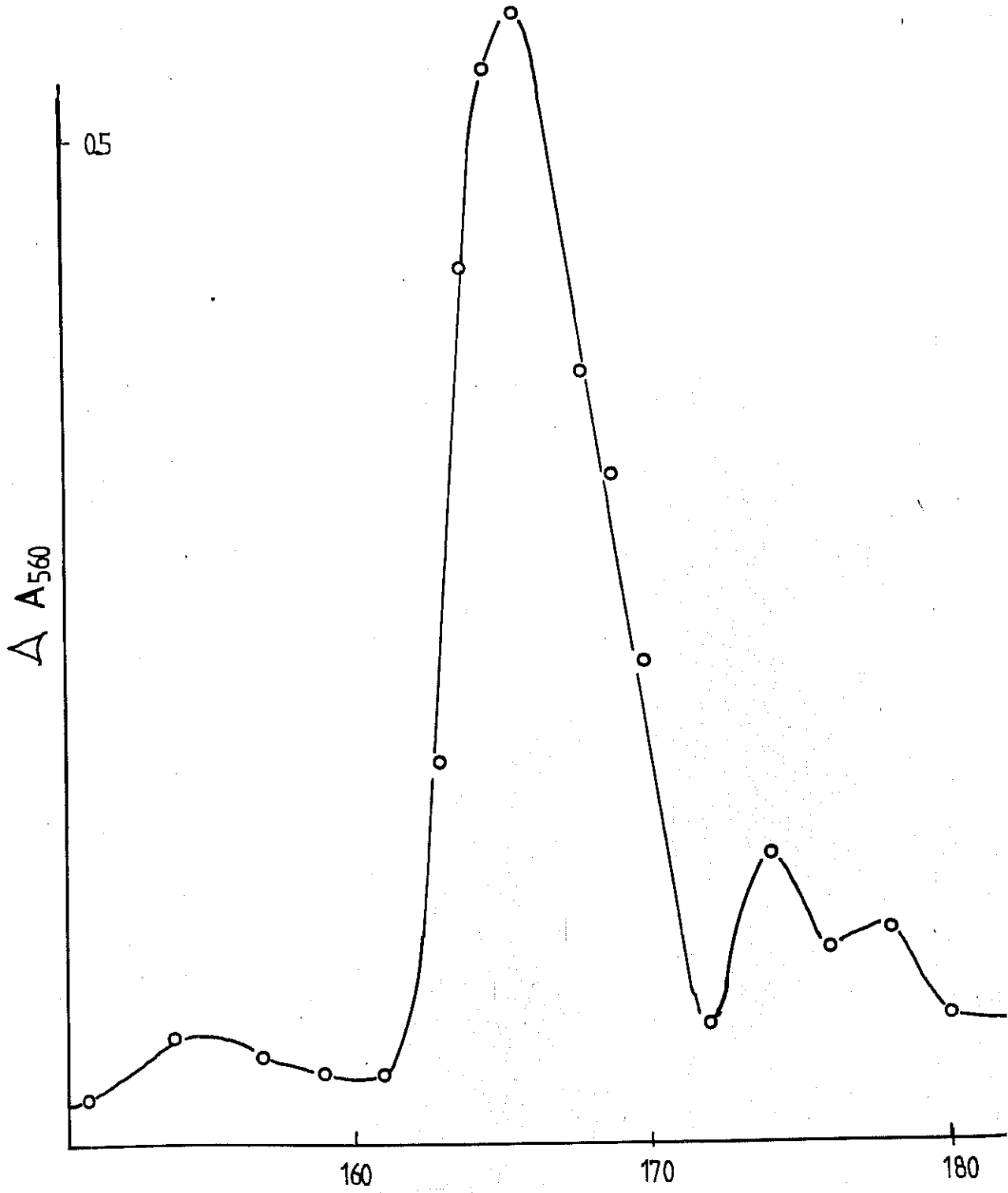
kolondan akıtılması pH gradiyenti ile yapıldı ve hangi tüplere dağılım gösterdiği heksokinaz etkinlik testi yapılarak bulundu. Elde edilen netice Şekil 7 de görülmektedir. Enzim etkinliğinin % 90 dan fazlasının düzgün ve simetrik bir doruk altında olduğu izlendi. Daha sonraki deneylerde en fazla etkinlik içeren 166 nolu tüp kullanıldı.

### 3.3. T<sub>1</sub>-RNaz ve heksokinazın saflık derecesinin incelenmesi

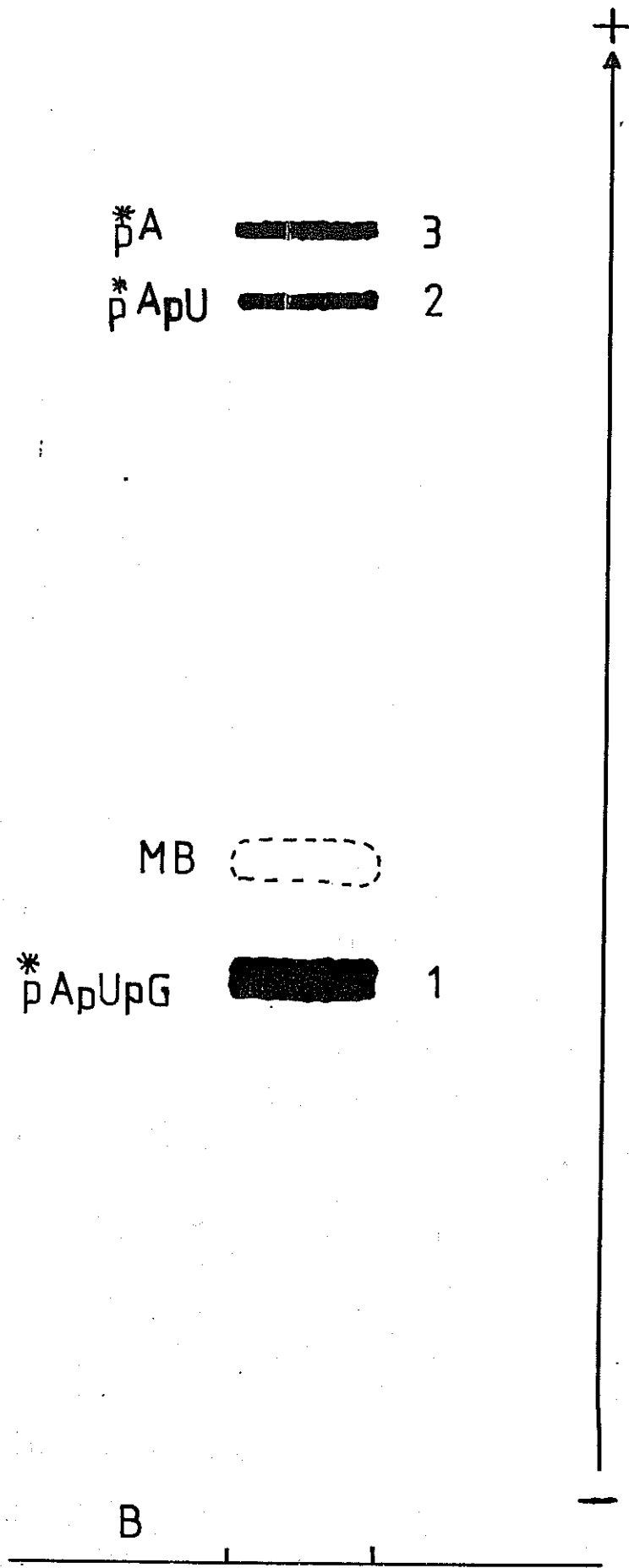
Daha önceki bölümlerde değişik kolon kromatografileri kullanarak arıtmaya çalışılan T<sub>1</sub>-RNaz ve heksokinaz enzimlerinin bulaşık nükleaz etkinliği taşıyıp taşımadıklarını incelemek için kullanılacak testin çok hassas olması gerekmektedir. Çünkü her iki enzimde de bulunabilecek bulaşık nükleaz etkinlikleri çok düşük bir seviyede bulunmakta ve ancak radyoaktif temel dayanan testler kullanılırsa incelenebilmektedir. Bu nedenle projede radyoaktif fosfor (<sup>32</sup>p) ile işaretlenmiş sübstrat kullanıldı.

#### 3.3.1. ApUpG nin <sup>32</sup>p ile işaretlenmesi

0.1 A<sub>260</sub> birimi ApUpG 2.2.4 bölümünde belirtilen şekilde radyoaktif  $\gamma$ -<sup>32</sup>p-ATP ve T<sub>4</sub>-polinükleotid kinaz kullanarak işaretlendi. İşaretlenen sübstratı (<sup>32</sup>pApUpG) tepkime karışımındaki diğer komponentlerden ayırmak için DEAE-selüloz kağıdı üzerinde elektroforez yapıldı (Bkz. Yöntemler 2.2.4.1). Elektroforezden sonra kağıt kurutuldu ve otoradyografi yapılarak (Yöntemler 2.2.4.2) radyoetkinliğin kağıt üzerindeki yeri saptandı. Elde edilen neticeler Şekil 8 de görülmektedir.



Şekil 7 - Hezokinazın DEAE-selüloz kolon kromatografisi



Şekil 3 - ApUpG nin işaretlenmesi ve kağıt elektroforezi.  
MB: mavi boya, B: başlama noktası.

$^{32}\text{p}$  radyoetkinliğinin üç band halinde dağılım gösterdiği izlendi. Bunlardan  $^{32}\text{pApUpG}$ 'ye tekabül eden 1 nolu band tüm radyo etkinliğin yaklaşık % 80 den fazlasını içermekte, geriye kalan etkinlik ise  $^{32}\text{pApU}$  ve  $^{32}\text{pA}$ 'ya tekabül eden bandlar içinde yer almaktadır. MB ile gösterilen band mark edici mavi boyanın elektroforez neticesindeki yerini belirlemekte ve radyoaktif bandların niteliğini saptamada yardımcı olmaktadır. (6) Teorik olarak ApUpG nin işaretlenmesi ve elektroforezi sonucunda 2 ve 3 nolu radyoaktif bandların olmaması gerekir. Tartışma bölümünde nedeni detaylı olarak irdelenen bu husus kullanılan enzimlerin % 100 saf olmamasından ve içlerinde çok düşük seviyede bulaşık nükleaz etkinliği içermelerinden ileri gelmektedir. 3.3.2 bölümünde göreceğimiz gibi 2 ve 3 nolu bandların miktarı bulaşık nükleaz etkinliği için hassas bir test olarak kullanılmıştır. Nükleaz etkinlik testi yapabilmek için Şekil 8 deki 1 nolu radyoaktif band kağıttan kesildi ve içindeki radyoaktif  $^{32}\text{p-ApUpG}$  yöntemler kısmında belirtilen şekilde kağıttan izole edildi (Bkz. Şekil 2, Yöntemler 2.2.4.3). Elde edilen radyoaktif  $^{32}\text{p-ApUpG}$   $\text{T}_1$ -RNaz ve heksokinaz için sübstrat olarak kullanıldı.

### 3.3.2. $\text{T}_1$ -RNaz ve heksokinazın $^{32}\text{p-ApUpG}$ ile test edilmesi:

Radyoaktif  $^{32}\text{p-ApUpG}$ ;  $\text{T}_1$ -RNaz ve heksokinazın arıtılma işlemlerinden sonra içlerinde bulaşık nükleaz etkinliği taşıyıp taşımadıklarını incelemek için sübstrat olarak kullanıldı. Yöntemler bölümünün 2.2.5 kısmında belirttiği



gibi belli bir miktar radyoaktif  $^{32}\text{p-APUpG}$  alınarak  $T_1$ -RNaz ve heksokinaz ile etkileştirildi ve karışım DEAE-selüloz kağıdı üzerinde elektroforez edilerek  $^{32}\text{p-APUpG}$  ye tekabül eden band içindeki radyoaktivitenin miktarı incelendi. Elde edilen sonuçlar tablo halinde aşağıda verilmiştir.

Tablo I - Enzimlerin radyoaktif sübstrat ile incelenmesi

	Radyoaktif AUG (cpm)		Yüzde
	Deney 1	Deney 2	
1. Kontrol (enzimsiz)	47,300	47,106	100
2. $T_1$ -RNaz	45,200	45,104	95.6
3. $T_1$ -RNaz (+)	46,500	46,253	98.3
4. Heksokinaz	35,000	35,300	74.5
5. Heksokinaz (+)	44,300	45,154	95.3

(+) = saflaştırma sonunda elde edilen enzimler.

Tablodaki yüzdeleri gösteren sütun iki ayrı deney dizisinin ortalama değerleridir. Birinci sütünde radyoaktif  $^{32}\text{p-APUpG}$  nin ne tip muamele gördüğü, ikinci ve üçüncü sütunlarda (Deney 1 ve Deney 2 dizisi) ise kullanılan radyoaktif  $^{32}\text{p-APUpG}$  nin DEAE-selüloz kağıdı üzerinde elektroforezinden sonra ne kadarının AUG ye tekabül eden band I içinde bulunduğu belirtilmiştir (Bkz. Şekil 3). Band I deki radyoaktivite miktarında azalma buluşık nükleaz etkinliğini

singlelemektedir. Çünkü hem  $T_1$ -RNaz hem de hegzokinaz enzimleri % 100 saf ise sübstrat olarak kullanılan  $^{32}P$ -ApUpG ye etki etmemeleri gerekir.

Tabloda belirtilen her deney için 50,000 cpm radyoaktif AUG kullanıldı. Kontrol deneyine göre diğerleri incelendiğinde;  $T_1$ -RNaz için gerek saflaştırma öncesi, gerekse saflaştırma sonrası enzimin radyoaktif sübstratı yalnızca % 3-4 civarında etkilediği görülmektedir. Böylece  $T_1$ -RNaz Sankyo firmasının iddiasına uygun olarak oldukça saf görünmekle beraber % 100 saf durumda değildir. DEAE-selüloz kolon kromatografisi ile  $T_1$ -RNaz, beklenen teorik saflık derecesine yaklaşmış durumdadır (3 nolu sıra).

Hekzokinaz için durumun oldukça farklı olduğu görüldü. Keza saflaştırma öncesinde enzim radyoaktif AUG yi % 25 civarında etkilerken, saflaştırma sonucunda yalnızca % 4 lük bir etkileşim kalmaktadır. Bu da hegzokinazın tüm buluşuk nükleaz etkinliklerinden iyi bir şekilde arındırıldığını göstermektedir.

#### 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

##### 4.1. Oligonükleotidlerin $^{32}\text{p}$ ile işaretlenmesi ve optimizasyonu:

Ekmeek mayası RNA sında bulunan oligonükleotidler sübstrat olarak kullanılmış ve bunların  $^{32}\text{p}$  ile işaretlenmesi zaman ve ATP derişimi yönünden optimize edilmiştir. Zaman açısından, işaretlemenin 20 dakika içinde optimum seviyeye eriştiği ve değişmediği görülmüştür (Bölüm 3.1.1). Daha önce diğer grupların (3,14,21) işaretleme tepkimesini 30 dakika süre ile yaptıkları göz önüne alınırsa, bu etapta kazanılan 10 dakikalık süre işaretleme seviyesi bakımından herhangi bir değişiklik yapmamakla beraber kullanılan enzimler içinde bulunan bulaşık nükleaz etkinliklerine daha az zaman tanıyacağı için parmak izi haritalarının kalitesi arttırmakta önemli bir adım olabilir.

ATP derişimi yönünden yapılan optimizasyonda işaretlemenin seviyesi ATP derişimine göre incelenmiş ve görülmüştür ki; daha önce kullanılan ATP derişikliğinde (80  $\mu\text{M}$ ) optimum işaretleme elde edilememekte ve optimum seviyeye erişmek için ATP derişimini arttırmak gerekmektedir. Ancak radyoaktif  $\gamma$ - $^{32}\text{p}$ -ATP nin çok pahalı olması nedeniyle ATP derişiminin çok fazla artırılması ekonomik olmayacağı için yalnızca kritik önemi olan deneylerde ATP derişimi 4-5 kat arttırılarak optimum seviyeye yakın işaretleme elde edilebilir. (Bkz. Bölüm 3.1.2, Şekil 4).

##### 4.2. $T_1$ -RNaz ve Hekzokinaz'ın nükleaz etkinliklerinden artırılması:

Giriş bölümünde belirtildiği gibi, sonradan işaretleme tekniğinde kullanılan enzimler yabancı firmalar tarafından

hazırlanmakta ve satılmaktadır. Her ne kadar firmalar enzimlerinin oldukça saf olduğunu ve bulaşık nükleaz etkinliği içermediklerini belirtmekte iseler de radyoaktif substrat kullanarak yapılan testler (Bkz. Bulgular Bölümü 3.3.1, Şekil 3), Özellikle heksokinaz içinde nükleaz etkinliği olduğunu göstermektedir. Nükleaz etkinliğini enzimden uzaklaştırabilmek amacıyla DEAE-selüloz kolon kromatografisi yapıldı. Kromatografi sonucunda elde edilen  $T_1$ -RNaz ve heksokinaz enzimlerinin istenilen düzeyde saflığa eriştikleri izlendi. Şekil 5 ve 7 de görülen kromatografi profillerinde protein ölçümü yapılamamış yalnızca enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Bunun nedeni kromatografiye tabi tutulan protein miktarının 100 ug kadar az olması ve bununda çeşitli kolon fraksiyonlarına dağılımı neticesinde geniş ölçüde seyrelmesi ile spektrofotometrede  $\lambda = 280$  nm dalga boyunda protein ölçümü çabalarından sonuç elde edilememişidir. Fakat her iki enziminde firmaların belirttiği gibi oldukça saflaştırılmış olduğu dikkate alınırsa Şekil 5 ve 7 deki etkinlik çizgilerinin protein ile çakışması beklenir.

Saflaştırma işleminde DEAE-selüloz reçinesinin seçimi rasgele değil bazı varsayımlara dayanarak yapılmıştır. Çünkü, firmalar (Boehringer ve Sankyo) heksokinaz ve  $T_1$ -RNaz için saflaştırmada kullandıkları etapları ticari nedenlerle gizli tutmaktadır. Ancak, izledikleri yolun literatürdeki orijinal yayınlardan kaynaklanması ve onlara paralel olması varsayılabilir. Bu noktadan hareketle  $T_1$ -RNaz ve heksokinaz için literatür incelenmiş ve DEAE-selüloz reçinesi seçilmiştir. Aynı reçine, söz konusu firmalar tarafından kullanılmış

olduğu düşünülse bile, firmaların ticari nedenlerle, kromatografi neticesinde elde edecekleri bir kromatografi doruğunu mümkün olduğu kadar fazla tüp alacak şekilde toplamaları varsayım lanabilir. Halbuki, buradaki çalışmada elde edilen kromatografi doruklarında (Şekil 5 ve 7) yalnızca doruğun tepesini oluşturan deney tüpleri alınarak nükleaz testi yapılmıştır.

Nükleaz testinde elde edilen neticeler enzimler içindeki nükleaz etkinliklerinden ileri gelmekte ve radyoaktif  $^{32}\text{p-ApUpG}$  nin parçalanmasına neden olmaktadır. Zira ne  $\text{T}_1\text{-RNaz}$  ne de heksokinaz enzimleri ApUpG yi sübstrat olarak tanımamaktadır. Radyoaktif AUG nin parçalanmasına neden olan nükleaz etkinliğinin ne tip nükleaz olduğunu anlamak için Şekil 8 de görülen 2 ve 3 nolu bandlar içindeki radyoaktif materyal kağıttan izole edilmiş ve 5'- ucu analiz yöntemi<sup>(22)</sup> kullanılarak, niteliklerinin  $^{32}\text{pApU}$  ve  $^{32}\text{pA}$  olduğu bulunmuştur. Bu ürünlerin oluşabilmesi için radyoaktif AUG nin aşağıda oklarla belirtilen yerlerinden kırılması gerekir.



Açıkça görüldüğü gibi fosfor atomunun solundaki bağlar kırılmakta, sağındakilere ise dokunulmamaktadır. Böyle olunca, nükleaz tipi, ya 3'-ucundan başlayan ve 5'-ucuna doğru kırma yapan bir ekzonükleaz veya fosfor atomlarının solundan kırma yapan bir endonükleaz olabilir. Ancak, şimdiye dek bulunan endonükleazların çoğunluğunun fosfor atomlarının sağından kırma yaptığı göz önüne alınırsa, buradaki nükleaz tipinin ekzonükleaz olması daha kuvvetli bir olasılıktır.

5. REFERANSLAR

1. Holley et. al. (1965), Science, 147, 1462-1465.
2. McReynolds et. al. (1978), Nature, 273, 723-728.
3. Dubuy, B. and Weismann, S.M. (1971), J. Biol. Chem., 246, 747-761.
4. W. Fiers et. al. (1976), Nature, 260, 500-507.
5. Clark, B.F.C. (1977), Prog. in Nuc. Acid. Res. and Mol. Biol. 20, 1-20.
6. Sanger, F., Brownlee, G.G. and Barrel, B.G. (1965), J. Mol. Biol. 13, 373-398.
7. P.F. Agris (1975), Nuc. Acid. Res. 2, 1083.
8. M. Şimşek et.al. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 1041-1045.
9. Walker, R.T., R. J. Bhandary, U.L. (1975), Nucleic Acid Res. 2, 61-78.
10. M. Şimşek et. al. (1974), Nature, 247, 518-520.
11. A. M. Gillum et. al. (1975), Cell 6, 407-413.
12. A. M. Gillum et. al. (1975), Cell 6, 395-406.
13. M. Şimşek et. al. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2600-2604.
14. H. J. Gross et. al. (1978), Nature 273, 203-208.
15. Domdey, H. and Gross, H.J. (1979), Anal. Biochem, 93, 321-328.
16. Hoskinson, R.M. and Khorana, H.G. (1965), J. Biol. Chem. 240, 2129-2134.

17. P. H. Larsen (1971), Anal. Biochem. 39, 454-461.
18. T. Uchida, T., Egami, F. (1967), Methods in Enzymology  
Vol. XII, Part A, 223.
19. Darrow, R.A., Colowick, S.P. (1962), Methods in  
Enzymology, Vol. V, 226.
20. Kolthof, I.M., Sandel, E.B. Text book of Quantitative  
Inorganic Analysis, 3. baskı, sayfa 322  
MacMillan Co. N.Y.
21. Richardson, C.C. (1965), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54,  
158-165.
22. H. J. Gross et. al. (1977), Nucleic Acid. Res. 4,  
2021.