Orhan ERDOĞAN[1], Hasan ÖZDEMİR[2], Ercüment AKSAKAL[1],
[1]Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü, 25240 ERZURUM
[2]Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 25240 ERZURUM

RACE VE REVERS TRANSCRİPTAZ İLE cDNA ÜRETİMİ

Giriş

DNA'dan kopyalanan mRNA'lar izole edildikten sonra tek zincirli şekilden çift zincirli yapıya dönüştürülmektedir ki bunlar komplementer DNA'lar (cDNA) olarak adlandırılırlar. Elde edilen bu yapıların bir organizmada hemen hemen bütün gen yapısını ihtiva edebilecek bir kütüphaneye dönüştürülmesi işlemine ise cDNA kütüphanesinin oluşturulması denilmektedir. Elde edilen bu kütüphanenin çeşitli markırlarla taranması sonucu istenen bir gen spesifik olarak elde edilebilmektedir. cDNA kütüphanesi birçok metotla sentezlenebilmektedir. Bu bölümde cDNA kütüphanesi oluşturulmasında yaygın olarak kullanılan RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ve RT (Revers Transcriptaz) yöntemleri gösterilmiştir.

Revers Transcriptaz ile cDNA Üretimi

Gerekli Kimyasallar

1. Oligo dT_{20}
2. dNTP Mix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM)
3. ddH_2O
4. 5xFirst-Strand Buffer
5. DTT
6. RNaseOUT™
7. SuperScript™ III RT

Yöntem:

1. Steril bir mikrosantrifüj tüpüne;

1. 1 µL 50 µM Oligo dT_{20} veya
    a. 200-500 ng Oligo dT_{12-18} veya
    b. 50-250 ng Rastgele (Random) primer veya
    c. 2 pmol Gene spesifik primer
2. 10 pg-5 µg total RNA veya 10 pg-500 ng mRNA
3. 1 µl 10 mM dNTP Mix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM)
4. 13 µl'ye ddH_2O ile tamamlanır.

2. Karışım 65°C'de 5 dakika ısıtılır ve buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edilir.

3. Karışım kısa süreli santrifüjlenir ve üzerine aşağıdaki kimyasallar eklenir;

- 4 µl 5xFirst-Strand Buffer
- 1 µl 0.1 M DTT
- 1 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Cat. no. 10777-019, 40 units/µl).

    Not: RNA 50 ng'dan daha az kullanılırsa, RNaseOUT™ mutlaka eklenmelidir.
- 1 µl SuperScript™ III RT (200 units/µl)

Not: Eğer gene spesifik bir primer yada oligo $(dT)_{20}$ kullanılarak 50□C'nin üzerindeki bir sıcaklıkta oluşturulan cDNA 5 kb'dan daha uzun ise ürünü arttırmak için SuperScript™ III RT'nin miktarı 400 U (2 µl)'ye kadar çıkarılabilir.

4. Karışım hafif bir pipetleme ile karıştırılır. Random primer kullanılırsa, karışım 25°C'de 5 dak. inkübe edilir.

5. Karışım 50°C'de 30-60 dak. inkübe edilir. Gene spesifik primer için reaksiyon sıcaklığı 55°C kadar arttırılmalıdır. Bazı zor kalıplarda reaksiyon sıcaklığı 55°C'ye kadar arttırılmalıdır.

6. Karışım 70°C'de 15 dak. ısıtılarak reaksiyon durdurulur.

RACE ile cDNA Üretimi

Gerekli Kimyasallar

1. DEPC Su
2. Adaptör Primer (AP)
3. 10X PCR buffer
4. $MgCl_2$ (25 mM)
5. dNTP mix (10 mM)
6. DTT (0.1 M)
7. SuperScript™ II RT
8. RNase H

Yöntem: Bu prosedür sonunda**,** RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) yöntemiyle 1-5 µg Total RNA, 1.zincir cDNA'ya dönüştürülmüş olur.

1. Kullanımdan önce her bir bileşen vorteksle karıştırılır ve kısa süreli santrifüj yapılır.
2. 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine 1-5 µg of Total RNA konulur ve toplam hacim 11 µl ye DEPC Su ile tamamlanır.
3. 10 µM konsantrasyonundaki Adaptör Primer'den (AP) 1 µl eklenir, vorteksle hafifçe karıştırılır ve mikrosantrifüjde kısa süreli santrifüj yapılır.
4. Karışım PCR cihazında (su banyosu da olabilir) 70°C'de 10 dak bekletilir. Hemen ardından 1 dakika 4°C de (kar üzerinde) bekletilir ve kısa süreli santrifüj yapılır.
5. Daha sonra sırasıyla
6. 2 µl 10X PCR buffer,
7. 2 µl 25 mM $MgCl_2$,
8. 1 µl 10 mM dNTP mix
9. 2 µl 0.1 M DTT ardı ardına eklenir.
10. Karışım kısa süreli santrifüj yapılır.
11. 42°C'de 5 dak su banyosunda bekletilir.

12. Üzerine 1 µl SuperScript™ II RT eklenir ve 42°C'de 50 dk su banyosunda (ısı bloku veya PCR cihazıda olabilir) bekletilir. Kısa süreli santrifüj yapılır

13. Karışım PCR cihazında 15 dakika 70°C lik sıcaklığa maruz bırakılır.

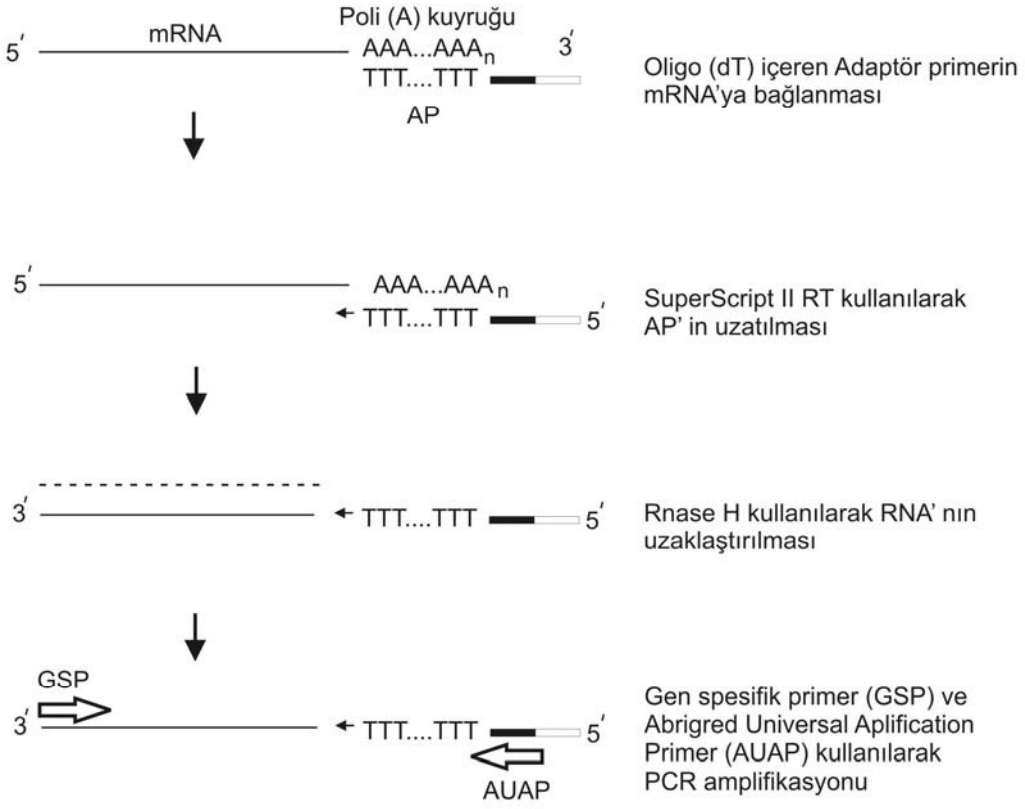
14. Hemen ardından 1 dakika 4°C de (kar üzerinde) bekletilir ve kısa süreli santrifüj yapılır.

15. 1 µl of RNase H ilave edilir.

16. 37°C'de 20 dk su banyosunda bekletilir.

17. Oluşturulan karışım cDNA –20°C de saklanır.

18. Daha sonra ki aşamalarda oluşturulan 1. zincir cDNA ile, gene spesifik primer ve AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) kullanılarak PCR amplifikasyonu gerçekleştirilecektir.



Şekil 1. RACE yönteminin prensibi

Kaynaklar

1. Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P., and Gerard, G.F. (1985). Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli. Gene ; 35(3): 249-58.
2. Gerard, G.F., D'Alessio, J.M., Kotewicz, M.L., and Noon, M.C. (1986). Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy- terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. DNA 5, 271-279.
3. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, A., and Beard, J.W. (1979). Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. J. Virol. Feb;29(2):517–522.
4. Frohman, M.A., M.K. Dush, and G.R. Martin. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8998-9002.
5. Frohman, M.A. 1990. RACE: Rapid amplification of cDNA ends. In PCR protocols: A guide to methods and applications (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White), pp. 28-38. Academic, San Diego.
6. Frohman, M.A. and G.R. Martin. 1989. Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. Technique 1: 165-170.
7. Ohara O, Dorit RL, Gilbert W. One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Aug;86(15):5673–5677.
8. Loh EY, Elliott JF, Cwirla S, Lanier LL, Davis MM (1989). Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. Science. 1989 Jan 13;243(4888):217–220.