Orhan ERDOĞAN, Ercüment AKSAKAL
[1]Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü, 25240 ERZURUM

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VERİTABANLARI VE KULLANIMLARI

Giriş

Moleküler tekniklerin gelişmesine paralel olarak elde edilen bilgilerin değerlendirilmesinde kullanılan paket programlar ve veri tabanları da hızlı bir şekilde değişmekte ve gelişmektedir. İnsandan, balık, bakteri ve virüslere kadar birçok canlı türün genetik bilgisi internet ortamındaki gen bankalarından elde edilebilir. Organizmalara ait istenilen gen dizilim bilgisinin değerlendirilmesinde kullanılan, çeşitli mikro markır, primer, prob, protein dizilimi gibi birçok bilgiye, veri tabanları ve paket programlar kullanılarak ulaşılabilmektedir. Yapılması planlanan çalışmanın başlangıç aşaması olan bu adım, çalışılacak organizmaya ait gen bilgisi ve kullanılacak genetik işaretleyicilerin belirlemesi nedeniyle büyük önem arz etmektedir. Bu veritabanları ve paket programlar ile;

- Organizmalara ait istenilen gen dizilim bilgisinin elde edilmesi ve değerlendirilmesi
- Bir oligonükleotidin (primerin) baz dizilimi ve bağlanma sıcaklığı,
- Genler arasındaki homoloji,
- Bir gen veya nükleotid diziliminin RFLP amacıyla kesim pozisyonu,
- PCR ürününe ait bant konsantrasyonuyla kantitatif gen analizi, belirlenebilir.

Bu bölümde moleküler biyolojide kullanılan bazı önemli veritabanları ve paket programların kullanım amaçları ve çalışma prensipleri ile ilgili bilgiler verilmiştir.

Clustalw programı

Bu program genlerin homolojilerinin belirlenmesinde ve oligonükleotid dizaynında kullanılan bir programdır. Programın kullanımını Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda HSP-70 (Heat shock protein-Isı stres proteini) geninin çalışılacağını düşünerek örneklendirelim. Çalışılmak istenilen organizma

ve buna ait gen internet ortamındaki http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ gen bankasından, organizma ve gen adı birçok alternatif yazım şekli kullanılarak (Örneğin; *Oncorhynchus mykiss* and Heat shock protein veya Rainbow trout and HSP70) bulunur (Tablo 1, 2, 3). Burada Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'na ait HSP70 geninin üç farklı tipinin olduğu görülmektedir. Bu üç genden (HSP70a, HSP70b ve HSP70) yalnızca bizim amplifiye etmeyi istediğimiz genin elde edilmesinde kullanılacak oligonükleotidin dizaynında veya diğer genlerle benzerlik derecesinin (homolojisinin) hangi ölçüde olduğunun belirlenmesinde Clustalw programından http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/ yararlanılır.

Tablo 1. >gi|57157614|dbj|AB176854.1| *Oncorhynchus mykiss* HSP70a mRNA for heat shock 70kDa protein, complete cds

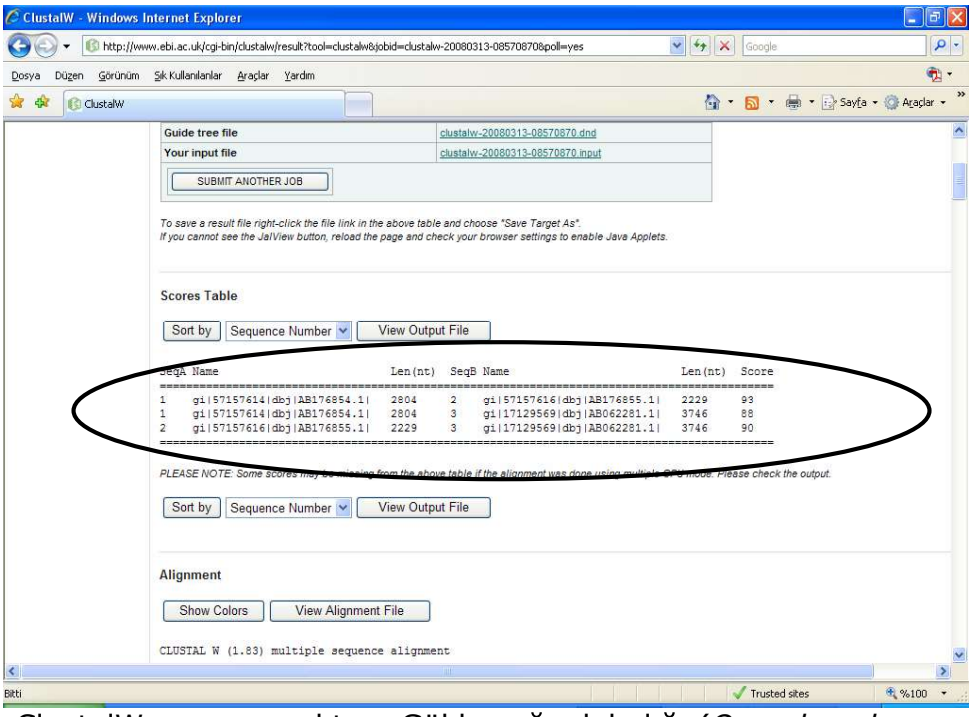
```
      1 aacgagaata ctaaagggaa aagaaagaaa gcaagaaaag agaagagcca cgcccgaaag
     61 acctctacat tcataaactg caactaactc caaaccatca agatgtcatc agctaaaggc
    121 ccgtctatcg ..........................................................
   2701 .......................................................... attgttggac attgcaaata
   2761 aaatgtattg aaataaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
```

Tablo 2. >gi|57157616|dbj|AB176855.1| *Oncorhynchus mykiss* HSP70b mRNA for heat shock 70kDa protein, complete cds

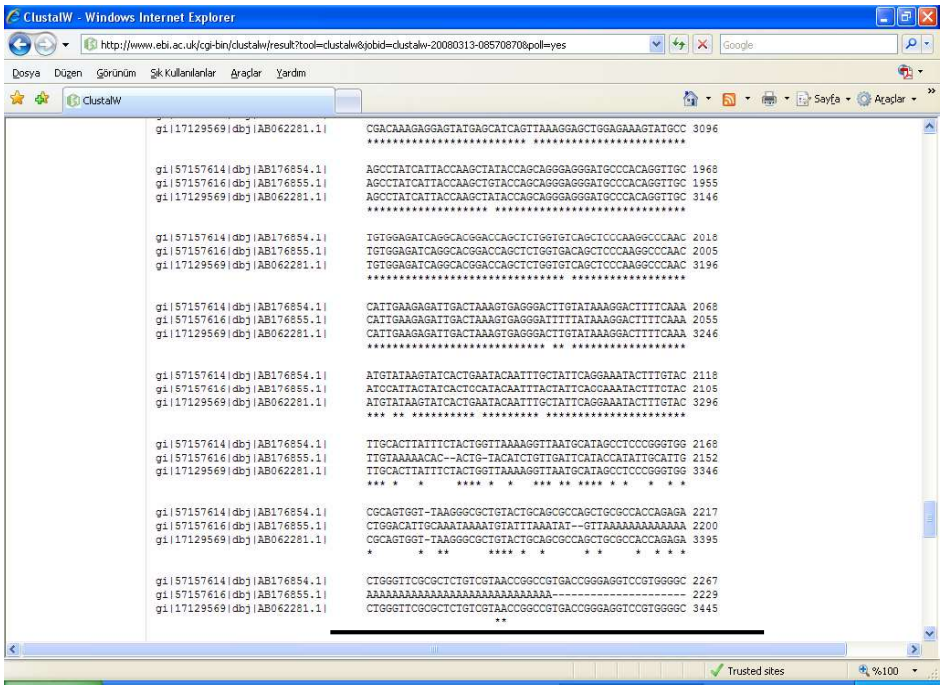
```
      1 caacgagaat actaaaggga aaagaaagca agaaaagaga agagatacgt tcaacattca
     61 taaactgcaa ctaactccaa accatcaaga tgtcatcagc taaaggcccg tctatcggca
    121 ttgacctggg ..........................................................
   2101 .......................................................... tgattcatac catattgcat tgctggacat
   2161 tgcaaataaa atgtatttaa atatgttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
   2221 aaaaaaaaa
```

Tablo 3. >gi|17129569|dbj|AB062281.1| *Oncorhynchus mykiss* gene for stress protein HSP70, complete cds

```
      1 ctgcagcgtc accgatagac tgaaacgtcg actgaataag gttgactcgt atgctattcc
     61 atttgtgttg acatttgaat cattaactgt ttcgattatt ttaatcaaga caagtaacgg
    121 tttcattatt ..........................................................
   3601 ..........................................caggacgcat gactttcaac ctttgtctct
   3661 cccgagcccg tacgggagtt gtagcgatga gacaagatag tagctactaa aacaattgga
   3721 taccacgaaa ttggggagaa aaaggt
```



Şekil 1. ClustalW program çıktısı: Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'na ait HSP70 geninin üç farklı tipi (HSP70a, HSP70b ve HSP70) arasındaki homolojinin ve genlerin baz uzunlukları belirlenebildiği görülmektedir.



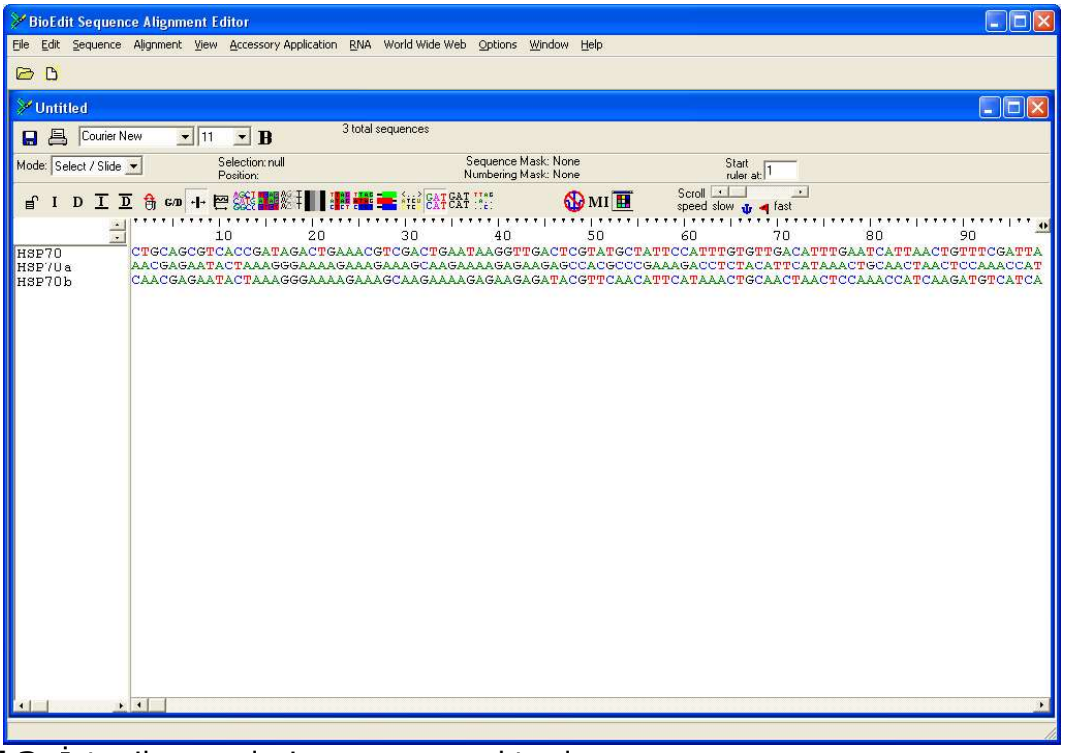
Şekil 2. Benzer olmayan bölümlerin elde edilmesi: Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'na ait HSP70 geninin üç farklı tipine (HSP70a, HSP70b ve HSP70) ait baz dizilimlerinin benzer olan bölümleri "*" işaretiyle işaretlenmiş, farklı bölümler ise boş bırakılmıştır.

Bu program çıktısı istenilen amaca göre değerlendirilir. Örneğin eğer bu üç gen birbirinden ayırt edilmek isteniyorsa primerler homolojinin daha az görüldüğü noktalardan seçilmelidir. Bazı durumlarda bir primerle bu üç genin hepsinin amplifiye edilmesi de istenebilir. Bu amaçla homolojinin yüksek olduğu bölgeler seçilir.

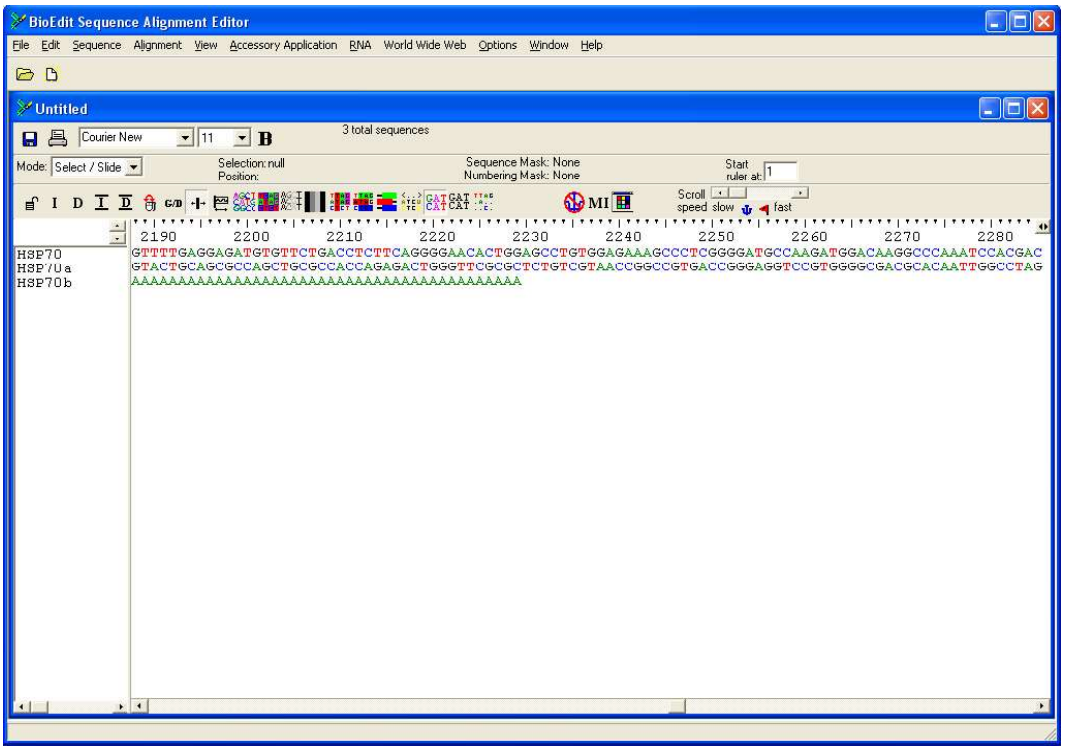
Bio Edit programı

Kullanım alanı çok geniş olan bir sekans analiz programıdır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesindeki kolaylığı ve ücretsiz kullanılabilir olması nedeniyle en çok tercih edilen programlardan biridir. Bu program ile;

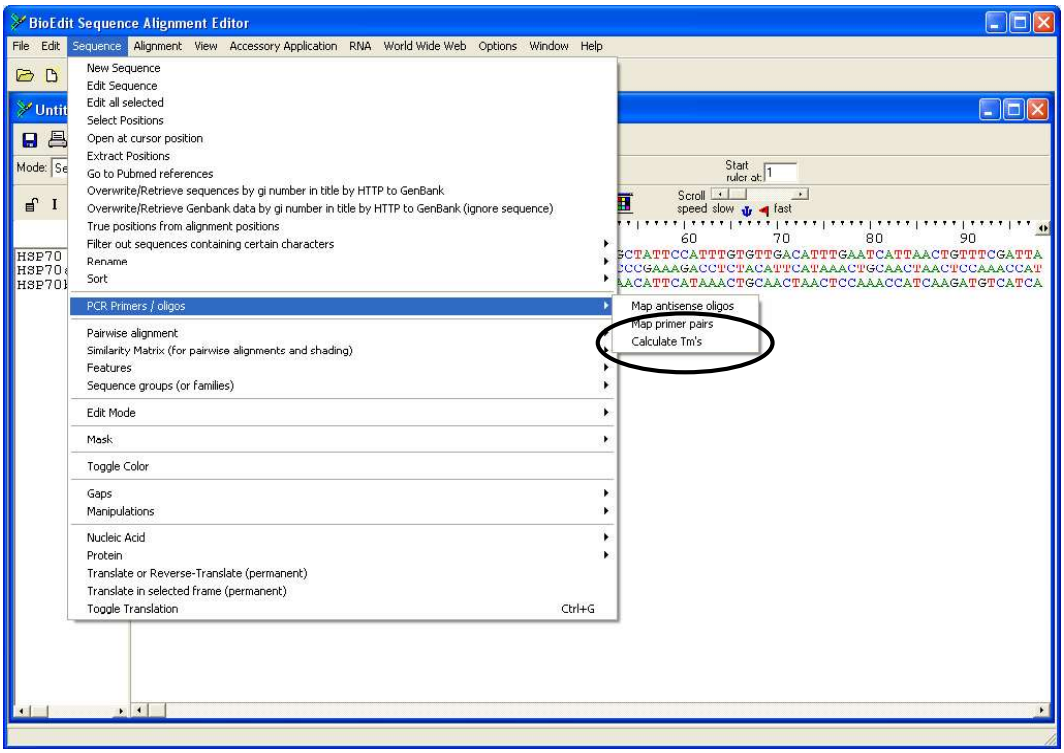
- Genlere ait baz diziliminin uzunluğu görülebilir (Şekil 4),
- Bir oligonükleotidin bağlanma sıcaklığı hesaplanabilir (Şekil 5),
- Bir gen diziliminin aminoasit kompozisyonu belirlenebilir (Şekil 6,7),
- Birkaç gen için bir Consensus (ortak) dizilim oluşturulabilir (Şekil 8,9),
- DNA dizilerini hizalama (alignment) yapılabilir,
- Gen bilgilerinin depolandığı bir programdır,
- ClustalW programında olduğu gibi genler arasındaki homolojinin bulunduğu bölgeler görülebilir,
- ClustalW, bu programdan alınan baz dizilim kopyasını kabul eden bir uyumda olduğundan, bu iki program birlikte kullanılabilir.



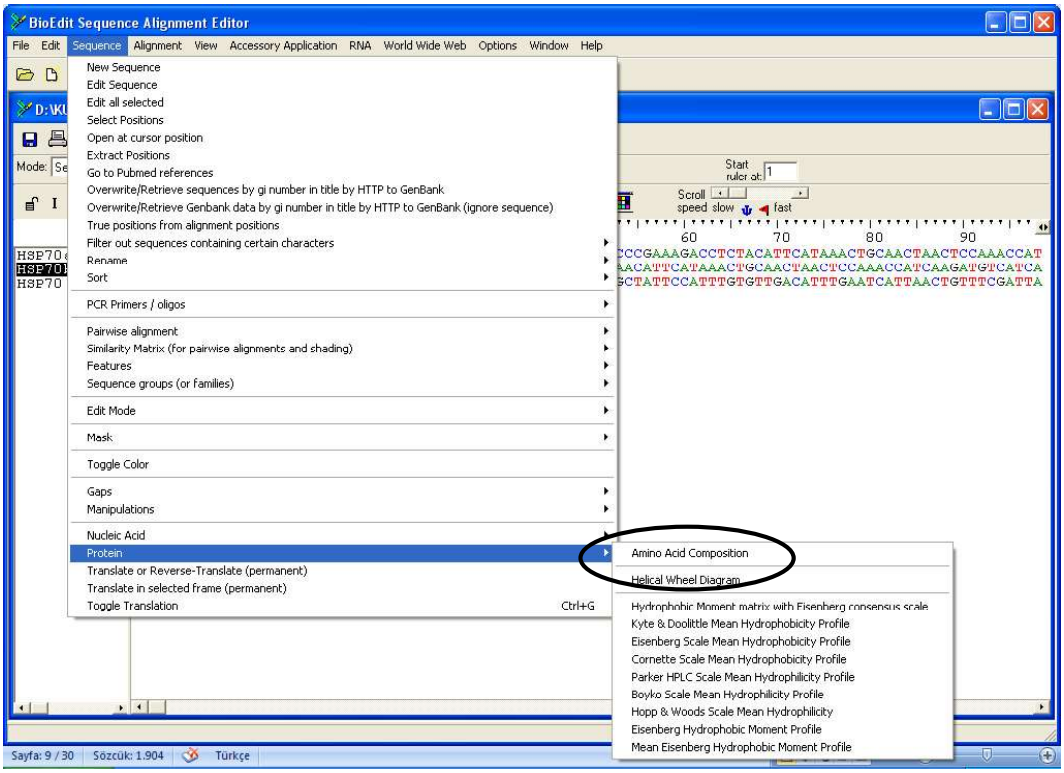
Şekil 3. İstenilen genlerin programa aktarılması



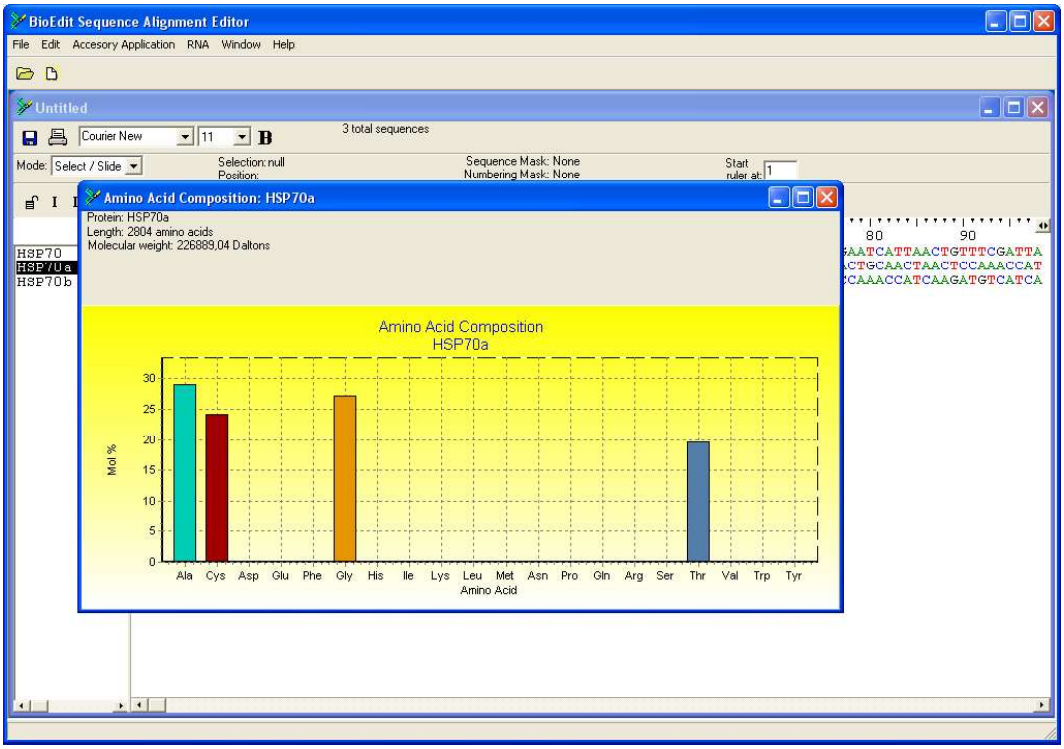
Şekil 4. Elde edilen dizilimin baz uzunluğunun görülmesi



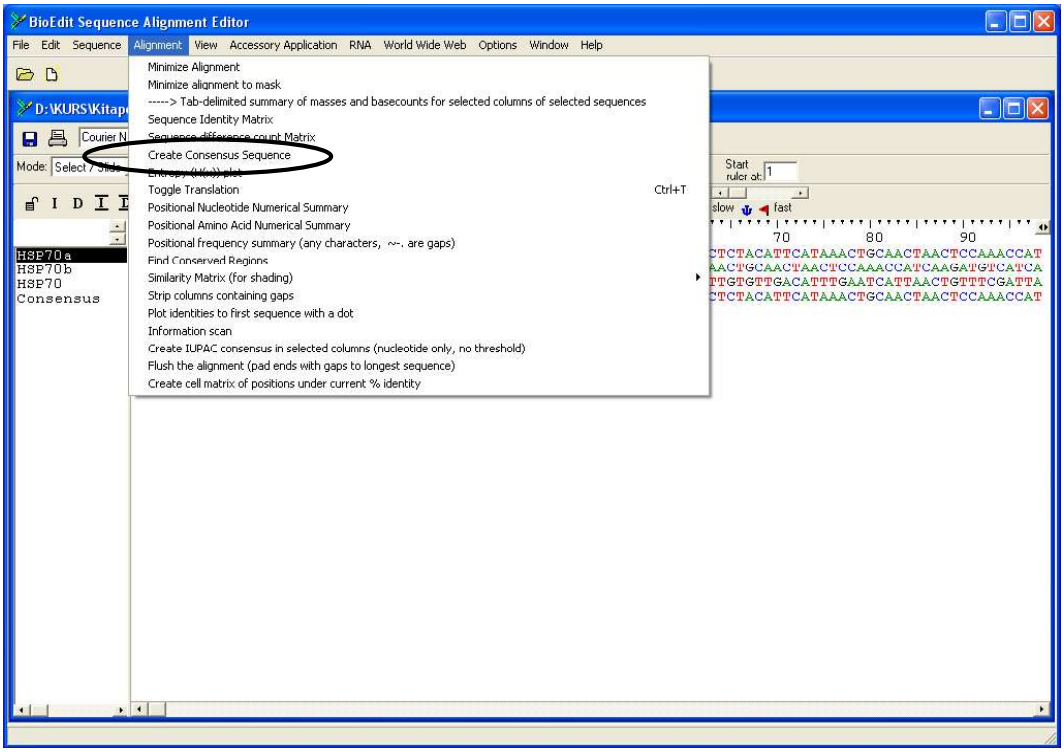
Şekil 5. Bir oligonükleotidin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi



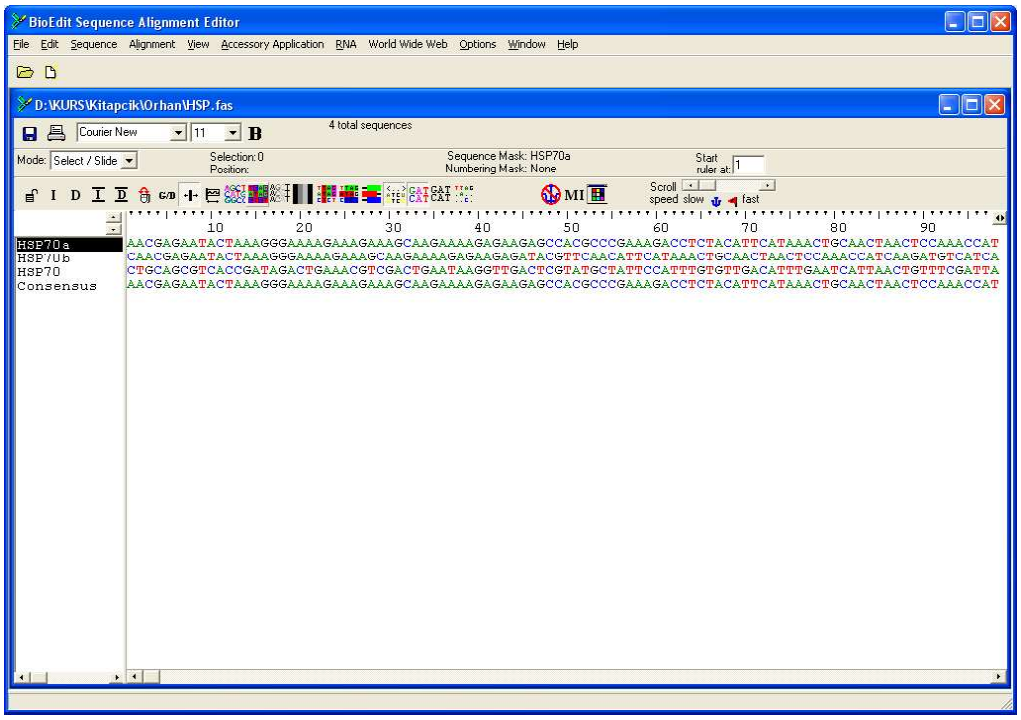
Şekil 6. Aminoasit kompozisyonunun belirlenmesi



Şekil 7. Amino asit kompozisyonunun şematize edilmesi



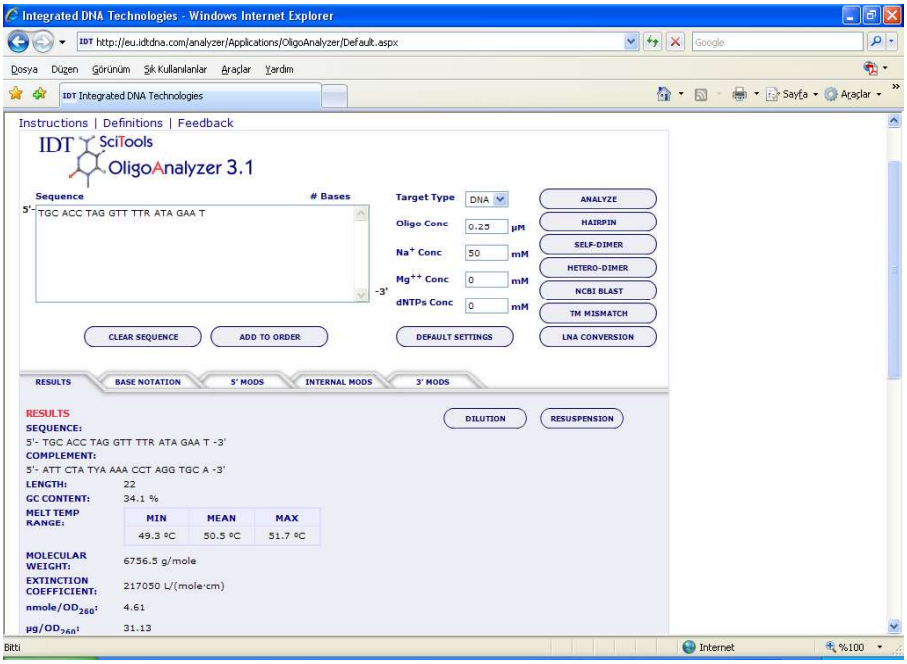
Şekil 8. Konsensüs dizilimin oluşturulması



Şekil 9. Konsensüs dizilim

Oligo Analyzer programı

PCR uygulamalarında hedeflenen gen veya baz dizilimi bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan oligonükleotidin (primer) bağlanma sıcaklığının belirlenmesi (Tm) çok büyük önem arz etmektedir. Elde edilen primer dizilimi bu program yardımıyla değerlendirilerek bağlanma sıcaklıkları belirlenebilenebillir. Diğer taraftan, ticari olarak siparişle firmalardan alınan primerler için önerilen Tm sıcaklığı bazen sonuç vermeyebilir. Bu sorunu aşmak için Primer Tm sıcaklığı hesaplayan programlar kullanılabilir. Bu programlardan biri olan Oligo Analyzer'da baz dizilimi programı kullanılabilir. Bizilim programa yazıldıktan sonra, analiz butonu tıklanarak bağlanma sıcaklığı (Tm) hesaplanır. Yine, karışık bazlı oligonükleotidlerinde bağlanma sıcaklıklarıda bu program kullanılararak belirlenebilir (http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) (Şekil 10). Eğer PCR ürünü spesifik olarak elde edilemezse tüm bilgiler kullanılarak Gradientli PCR'da aynı anda ± 10 °C lik bir sıcaklık aralığı taranarak en uygun Tm sıcaklığı tespit edilebilir.



Şekil 10. Oligo analyzer programında bir Oligonükleotidin (primerin) Bağlanma sıcaklığının (Tm) belirlenmesi

Model Organizma Olarak Kullanılan Balıklara Ait Veritabanları

Genomik model organizma olarak en çok kullanılan balık türleri Zebrafish (*Danio reiro*), Medaka fish (*Oryzias latipes*) ve Balon balığı (Şişen balık) (*Fugu rubripes*)'dır. Bu organizmalar; yetiştiricilik şartlarının kolay oluşu, generasyon aralığının kısa oluşu, genom büyüklüğünün kısa olması nedeniyle transgenik çalışmalarda, hastalıkların tanı ve tedavisinde model organizma olarak kullanılmaktadırlar.

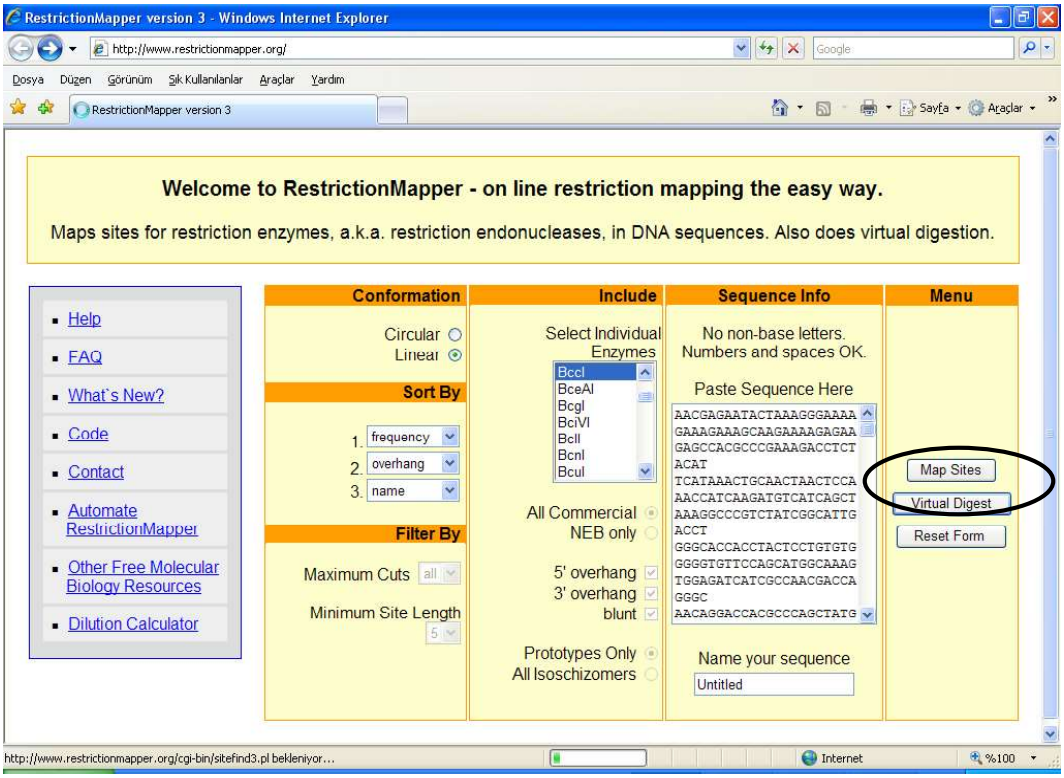
Tablo 4. Gen bankalarında bilgileri bulunan bazı balıkların gen bilgisine erişimi sağlayan veritabanları internet adresleri

Balığın adı	**Veritabanı internet adresi**
Zebrafish	http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB_home.apg
Fugu	http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html
Fishbase	http://www.fishbase.org/search.php
Pufferfish Tetraodon nigroviridis	http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetraodon/
Poeciliid fish Xiphophorus	http://www.xiphophorus.org/
Medakafish	http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/
Rainbow trout	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html

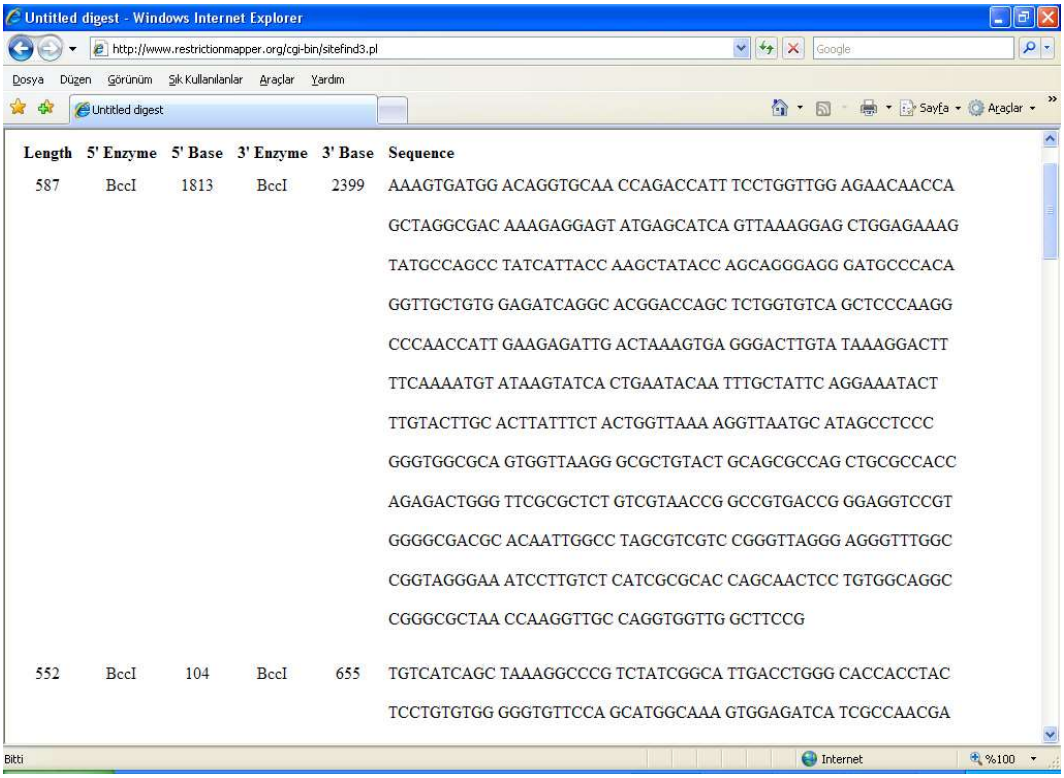
RFLP için kullanılan veritabanı

RFLP (Restriction Fragment Length polymorphism-Restriksiyon Parçacık Uzunluk Polimorfizmi) nDNA veya mtDNA üzerindeki bölgelerin PCR aracılığıyla çoğaltıp bir restriksiyon enzimi ile kesilmesi tekniğidir. RFLP uygulamalarında kullanılabilecek 3000 civarı restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Bunlardan hangilerinin kullanılacağı hakkında önceden iyi bir araştırma yapılmalıdır. Bu amaçla birçok veritabanı kullanılmaktadır. Bu bölümde "Restriction Mapper" veritabanı http://www.restrictionmapper.org/ kullanımı anlatılmıştır.

PCR ile spesifik olarak bilinen bir baz dizilimi amplifiye edildikten sonra kesim pozisyonu ilgili programlar kullanılarak belirlenir ve elde edilen bilgi bilinmeyen organizmada kullanılarak genetik benzerlik ve farklılık ortaya konulur. Bu amaçla bilinen bir dizilim bilgisi "Restriction Mapper" veritabanına http://www.restrictionmapper.org/ yapıştırılarak enzimlerin kesip kesmedikleri kontrol edilir (Şekil 11,12). Böylece restriksiyon enzimi seçiminde yapılacak hata minimize edilmiş olur. Ayrıca programdaki, "Map sites" butonuyla enzimlerin kesme pozisyonları ve örneğe ait baz diziliminin kesim şekli de görülebilmektedir (Şekil 13,14)

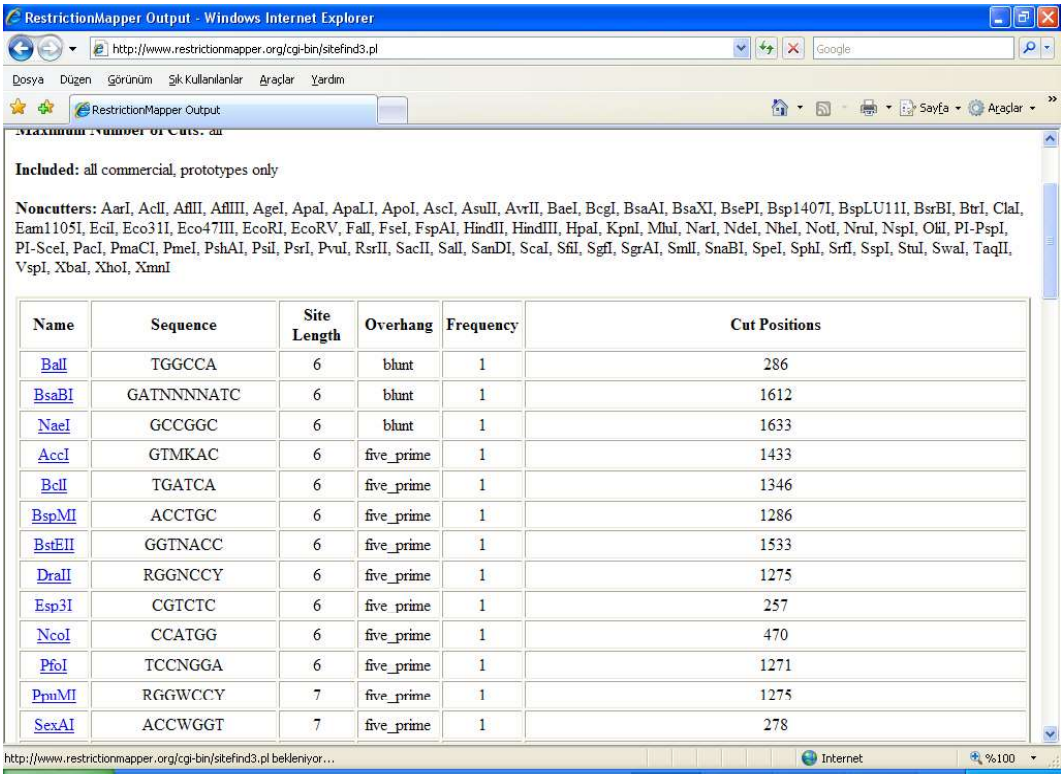


Şekil 11. Bir baz diziliminin programa konulması ve retriksiyon enziminin seçimi

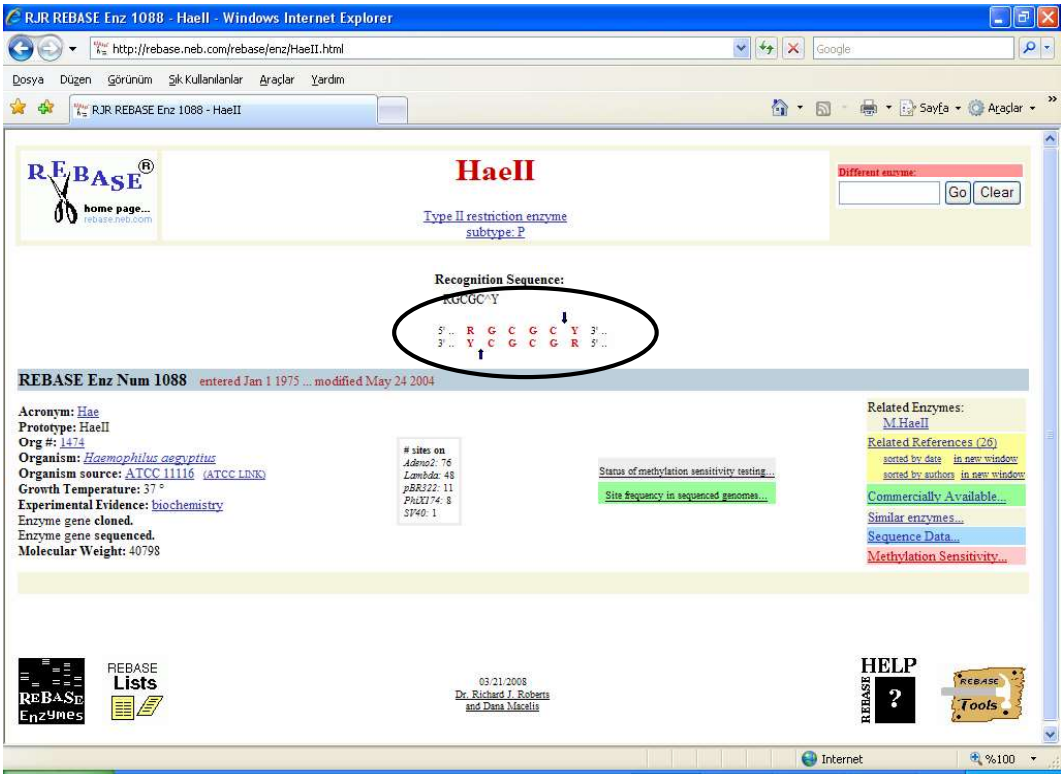


Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
587	BccI	1813	BccI	2399	AAAGTGATGG ACAGGTGCAA CCAGACCATT TCCTGGTTGG AGAACAACCA
					GCTAGGCGAC AAAGAGGAGT ATGAGCATCA GTTAAAGGAG CTGGAGAAAG
					TATGCCAGCC TATCATTACC AAGCTATACC AGCAGGGAGG GATGCCCACA
					GGTTGCTGTG GAGATCAGGC ACGGACCAGC TCTGGTGTCA GCTCCCAAGG
					CCCAACCATT GAAGAGATTG ACTAAAGTGA GGGACTTGTA TAAAGGACTT
					TTCAAAATGT ATAAGTATCA CTGAATACAA TTTGCTATTC AGGAAATACT
					TTGTACTTGC ACTTATTTCT ACTGGTTAAA AGGTTAATGC ATAGCCTCCC
					GGGTGGCGCA GTGGTTAAGG GCGCTGTACT GCAGCGCCAG CTGCGCCACC
					AGAGACTGGG TTCGCGCTCT GTCGTAACCG GCCGTGACCG GGAGGTCCGT
					GGGGCGACGC ACAATTGGCC TAGCGTCGTC CGGGTTAGGG AGGGTTTGGC
					CGGTAGGGAA ATCCTTGTCT CATCGCGCAC CAGCAACTCC TGTGGCAGGC
					CGGGCGCTAA CCAAGGTTGC CAGGTGGTTG GCTTCCG
552	BccI	104	BccI	655	TGTCATCAGC TAAAGGCCCG TCTATCGGCA TTGACCTGGG CACCACCTAC
					TCCTGTGTGG GGGTGTTCCA GCATGGCAAA GTGGAGATCA TCGCCAACGA

Şekil 12. Restriksiyon enziminin baz dizilimi kesim bölgeleri.



Şekil 13. Restriksiyon enziminin baz dizilimini kesme pozisyonları

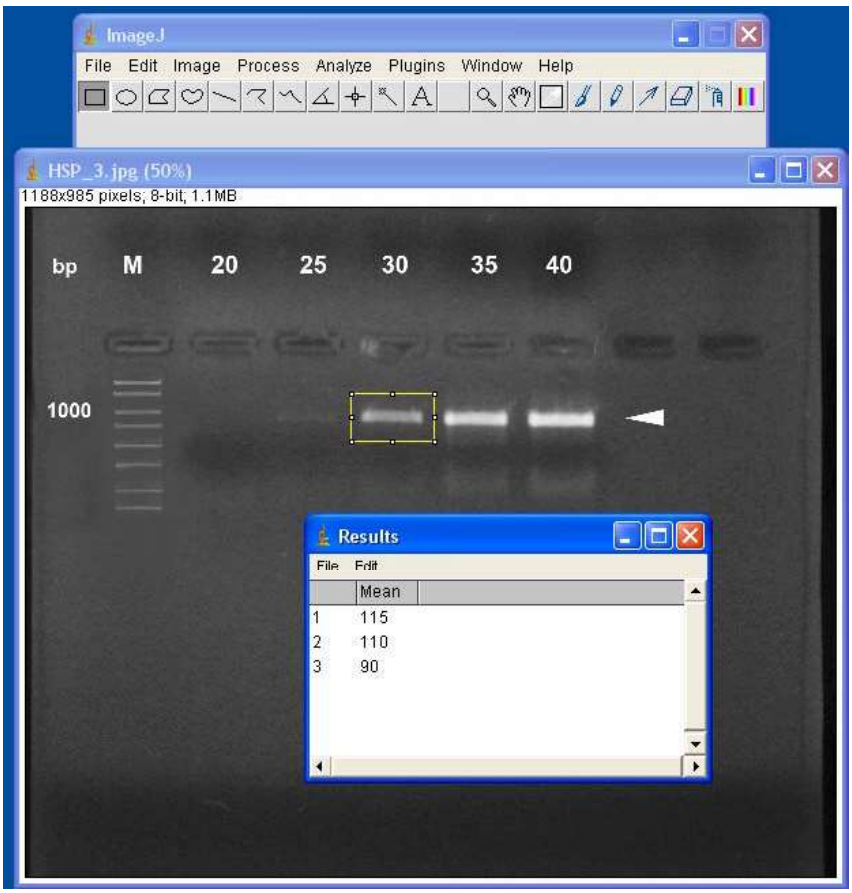


Şekil 14. Restriksiyon enziminin kesilecek dizilimi tanıma pozisyonu

3.7 ImageJ Programı

ImageJ Programı http://rsb.info.nih.gov/ij/ bir northern blot veya nektroforez jeline ait görüntüdeki bantların piksel yoğunluğunun ölçülmesiyle örnekler arasındaki kantitatif ilişkiyi belirleme esasına dayanan, bir programdır. Bu amaçla birçok paket program veya jel görüntüleme paket programları da kullanılabilir. Bu bölümde internet üzerinden ücretsiz olarak indirilebilen ve literatürlerde kullanımına sıklıkla rastlanan ImageJ Programı kullanımı verilmiştir.

Bu program vasıtasıyla jel bir bandın yoğunluğu ölçülebilmektedir. Bu amaçla bant bir kutucuk içerisine alınır ve Ctrl+M tuşuna basılarak ölçülür. Elde edilen bilgiler kantitatif analiz amacıyla kullanılır.



Şekil 15. Image Programı ile bir agaroz jel elektroforezine ait görüntüdeki bant yoğunluğunun ölçülmesi

KAYNAKLAR

1. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ 22.05.2008
2. DNA veya proteinlerde genel amaçlı kullanılan çoklu dizi hizalama programı, http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/ 22.05.2008
3. http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/ 22.05.2008
4. http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB_home.apg 22.05.2008
5. http://genome.jgi-psf.org/Takru4/Takru4.home.html 22.05.2008
6. http://www.fishbase.org/search.php 22.05.2008
7. http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetraodon/ 22.05.2008
8. http://www.xiphophorus.org/ 22.05.2008
9. http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/ 22.05.2008
10. http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html 22.05.2008
11. http://www.restrictionmapper.org/ 22.05.2008
12. http://rsb.info.nih.gov/ij/ 22.05.2008