

DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektrofrez (Komet Yöntemi)

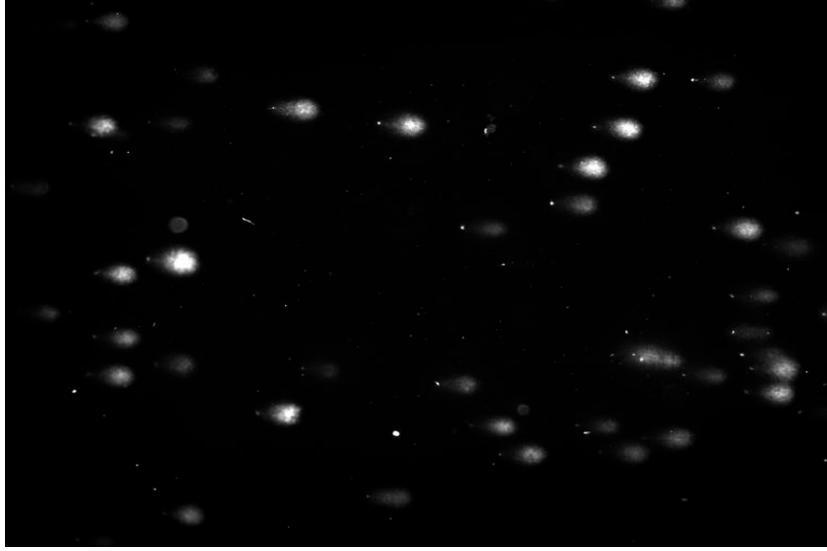
*Dr. Ayşen DURMAZ**
*Prof.Dr. Nurten DİKMEN**
*Doç.Dr. Cumhur GÜNDÜZ***

1.Giriş

Tek hücre jel elektrofrez ya da diğer bir adıyla Komet Yöntemi ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını hücre bazında saptayabilen duyarlı, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Hücre bazındaki DNA hasarını saptayan ilk araştırmacılar Rydberg ve Johanson'dır. Bu araştırmacılar, hücreleri parçalayıp agaroz içerisine gömdükten sonra agarozu lam üzerine aktararak alkali koşullarda DNA'nın açılmasını sağlamışlardır. Nötralizasyon işlemi sonrasında ise hücreleri akrinin oranj ile boyayarak DNA hasarını fotometre aracılığı ile yeşil renkli floresansın (çift zincirli DNA'yı ifade eder) kırmızı renkli floresansa (tek zincirli DNA'yı ifade eder) oranı şeklinde ölçmüşlerdir¹. 1984 yılında Ostling ve Johanson yöntemin duyarlılığını arttırmak için mikrojel elektrofrez tekniğini geliştirmişlerdir. Araştırmacılar agaroz jel içerisine yerleştirdikleri hücreleri lam üzerine aktardıktan sonra deterjanlar ve yüksek tuz konsantrasyonları kullanarak parçalamışlar, bu şekilde açığa çıkan DNA'ya, nötral şartlarda elektrofrez uygulayarak elektrofrez sonunda DNA'yı floresans bir boya (etidyum bromür) ile boyadıklarında jelde baş ve kuyruktan oluşan ve kuyruklu yıldız benzeyen görüntülerin oluştuğunu görmüşler bu nedenden ötürü de tekniğe "COMET ASSAY" adını vermişlerdir² (Şekil 1). Nötral şartlarda DNA çift iplikli olduğundan bu teknik yalnızca çift-zincirli DNA'daki kırıkların tespitine olanak sağlarken, RNA artifakta neden olmaktadır¹.

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ADANA

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İZMİR



Şekil 1. Komet Yöntemine ait jel görüntüsü.

Bugün için Komet Yönteminin iki farklı şekli kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi Singh ve ark.'nın 1988 yılında geliştirdiği alkali elektroforez ($\text{pH} > 13$) tekniğidir³. Alkali koşullarda DNA tek iplikli olduğundan bu teknik ile tek zincir DNA kırıkları ve alkali labil bölgeler tespit edilebilmektedir. Bu yöntem Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) olarak bilinmektedir fakat kronolojik sıralamadan dolayı birçok araştırmacı bu yöntemi de "Komet Yöntemi" olarak adlandırmaktadır. 1990 yılında ise Olive ve ark.'ları Ostling ve Johanson'ın nötral tekniğini geliştirerek alkali muamelesi ile hücreleri parçaladıktan sonra nötral ya da orta alkali koşullarda elektroforez uygulayarak tek zincir kırıklarını tespit edebildiklerini bildirmişlerdir^{4,5}.

Singh ve Olive'in geliştirmiş olduğu metodlar prensipte aynı pratikte ise benzerdir. Fakat Singh'in yöntemi daha duyarlı gibi görünmektedir¹.

Singh'in yönteminde düşük erime noktalı agaroz (LMA) içerisinde hazırlanan hücre süspansiyonu lam üzerine, agar jel ile sandviç modeli oluşturacak şekilde aktarılıp $\text{pH} 10$ 'da deterjanlar ve yüksek tuz

konsantrasyonları kullanılarak parçalama işlemi gerçekleştirilmektedir. Daha sonra ise alkali koşullar altında kısa bir süre elektroforez uygulanmaktadır. Parçalama işlemi ile nükleer materyal dışındaki hücre bileşenleri uzaklaştırılmış olur. Çok küçük miktardaki non-histon protein varlığında bile DNA süpersarmal halinde iken, alkali koşullarda kırıkların bulunduğu bölgelerden açılmaya başlar. DNA hasarı yüksek olan hücrelerdeki DNA göçü daha fazladır ve bu göç kuyruklu yıldız benzer¹.

Parçalama işleminde ve elektroforezde kullanılan pH değeri tekniğin duyarlılığını değiştirir. Her iki değişken için de nötral pH kullanıldığında çift zincirli DNA'daki kırıklar tespit edilirken pH 12,3'de tek zincir kırıkları ve delay tamir bölgeleri, pH 13'de ise alkali labil bölgeler, tek zincir kırıkları ve delay tamir bölgeleri tespit edilebilmektedir¹.

2. Yöntem

Komet Yöntemi birçok yayında detaylı bir şekilde anlatılmıştır^{3,6,7}. İlk olarak hücreler 37°C'de %0,5'lik LMA ile süspanse edilip daha önceden üzeri %0,5'lik normal erime noktasına sahip agaroz (NMA) ile kaplanmış lam üzerine aktarılır. Katılaştıktan sonra 3. tabaka olarak üzerine yine %0,5'lik LMA ilave edilir. Bu üç tabakalı jel hazırlandıktan sonra hücreler deterjanlı solüsyon içerisinde en az 1 saat bekletilerek parçalanır. Daha sonra lam alkali ya da nötral bir tampon içeren elektroforez tankına yerleştirilip, DNA'nın açılması için bir süre beklendikten sonra elektroforez gerçekleştirilir. Elektroforez sonrasında lam nötralizasyon tamponu ya da PBS ile yıkanıp florokrom bir boya ile boyanır¹.

Son birkaç yıldır yayınlarda Komet Yönteminin çeşitli modifikasyonları kullanılmıştır. Lizis solüsyonunun içeriği ve pH'sı, elektroforez tamponunun içeriği ve pH'sı, elektroforez koşulları (voltaj, amper, elektroforez süresi) değiştirilerek yöntemin duyarlılığı değiştirilebilmektedir¹.

3. Lizis Solüsyonu

Çalışmanın amacına uygun olan lizis solüsyonu seçilmelidir. Nötral lizis solüsyonları çift zincir kırıklarının tespitinde, alkali lizis solüsyonları ise tek

zincir kırıklarının tespitinde kullanılmaktadır. Literatürlerde en çok kullanılan alkali lizis solüsyonudur. pH 10-12'de yüksek tuz konsantrasyonu ve deterjan içeren lizis solüsyonunda hücreler en az 1 saat bekletilir¹. McKelvey- Martin ve ark. lizis solüsyonunun içeriğinde bazı modifikasyonlar yapmışlardır. Bu araştırmacılar deterjan karışımına N-laurilsarkozin eklemişler ve sonuçta bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir⁶. Rojas ve ark. ise artık protein kalıntılarının uzaklaştırılması için lizis solüsyonuna proteinaz K eklediklerini bildirmişlerdir⁸.

4. Elektroforez Tamponu

Elektroforezden önce lamlar alkali elektroforez solüsyonunda bir süre dengelenir. Bu solüsyon deterjan içermez, tuz konsantrasyonu düşük, pH değeri ise yüksektir. Dengeleme ve elektroforez süresi çalışılan hücre tipine ve DNA hasarına göre değişir. Bu adımlarda yapılan değişiklikler önemli olup yüksek voltaj kullanılarak ya da elektroforez süresi uzatılarak daha büyük sürüklenmeler/kuyruklar (kometler) elde edilebilir. Dengeleme süresi uzadıkça yöntemin duyarlılığı artar. Green ve ark. dengeleme süresinin 40 dk. dan uzun olması durumunda komet oluşumun arttığını bildirmişlerdir. Dengeleme ve elektroforez sıcaklığının artırılması da duyarlılığı arttırırken aynı zamanda kontrol grubunda da komet formasyonuna neden olmaktadır. 15°C'de maksimum ayırımın sağlanabileceği, bu sıcaklıkta ve 40 dk. dengeleme süresi ile de maksimum duyarlılığın elde edilebileceği bildirilmektedir¹.

5. Lam Hazırlama

Lam hazırlamada iki temel prosedür kullanılmaktadır, bunlardan ilki tek tabakalı lam diğeri ise daha yaygın olarak kullanılan üç tabakalı (sandviç modeli) lam modelidir¹.

5.1. Tek tabakalı lam modeli

LMA içerisinde süspanse edilmiş hücreler, ticari olarak hazırlanmış özel lamlar üzerine aktarılarak tek tabakalı lam hazırlanmış olur¹.

5.2. Üç tabakalı lam modeli (Sandeviç modeli)

Bu teknikte özel lamaların kullanılmasına gerek yoktur, rutin analizlerde kullanılan rodajlı lamalar ile sandeviç modeli oluşturulabilmektedir. İlk olarak lam yüzeyi NMA ile kaplanır, bu ilk tabakayı oluşturur. İkinci tabaka olarak LMA ile süspansedilmiş hücreler lam üzerine aktarılır. Üçüncü tabaka olarak da yine LMA eklenerek üç tabakalı lam hazırlanmış olur¹.

İlk tabakadaki agaroz düz bir zemin oluştururken ikinci ve üçüncü tabakaların daha sıkı bir şekilde tutunmasını sağlar. Etkin bir analiz için ikinci tabakada bulunan hücre miktarı ve agaroz konsantrasyonu önemlidir. Genellikle ~1,000-50,000 hücre 10µL PBS veya kültür medyumunu ile süspansedilip son konsantrasyon %0,5-1 olacak şekilde, 35-45°C'de, 75 µL LMA ile karıştırılır. Eğer ikinci tabakadaki hücre sayısı fazla olursa görüntüleme işlemi zorlaşır. Üçüncü tabaka ise yalnızca hücreleri korumak için eklenir¹.

6. Nötralizasyon süresi

Elektroforez sonrası lamalar pH 7,5 Tris tamponunda 5'er dakika 3 defa yıkanarak nötralize edilir. Nötralizasyon süresi uzadıkça artefakt yoğunluğu azalmaktadır¹.

7. Lamaların saklanması

Lam üzerine ilk tabakadaki agaroz ilave edildikten sonra 40-50°C'deki fırında birkaç dakika bekletilerek agaroz dehidrate edilir⁹ ve sonraki adımlar aynen yukarıda anlatıldığı şekilde uygulanır. Nötralizasyon işlemi sonrasında da yine diğer agaroz tabakalarının dehidrate edilmesi için iki kez 5'er dakika saf etanolde bekletilir¹⁰.

8. Boyama

Bu teknikteki son adım DNA spesifik bir boya ile DNA'nın boyanarak görüntülenmesidir. En çok kullanılan boyalar etidyum bromür, propidyum iyodür ve DAPI'dir¹. Singh ve ark. YOYO-1 ve gümüş yeşili boyalarının duyarlılığı arttırdığını bildirmişlerdir¹¹.

9. Veri Analizi

Araştırmacılar verileri değerlendirmede farklı yöntemler kullanmışlardır. Calderon ve ark. DNA hasarını migrasyon gösteren hasarlı hücreleri sağlam hücrelere oranlayarak ölçmüşlerdir. Bu yöntem ile elde edilen sonuç bize genel DNA hasarı hakkında bilgi verir, hücre düzeyindeki DNA hasarı hakkında bilgi vermez¹. Anderson ve ark. ise migrasyon oranına göre hücreleri skorlayarak hücre bazındaki DNA hasarını ölçtüklerini belirtmişlerdir¹². DNA migrasyonu genellikle μm cinsinden ifade edilmektedir. Göç uzunluğu fragmentasyon oranıyla ve dolayısıyla DNA hasarı ile ilişkilidir. Migrasyon uzunluğu çeşitli şekillerde ölçülebilir; okülerdeki mikrometre aracılığıyla, hücrelerin fotografik görüntülerinin üzerindeki cetvellerle ya da görüntüleme sistemlerindeki monitorler aracılığı ile ölçülebilmektedir^{1,13}.

Yalnızca kuyruk uzunluğu DNA hasarını doğru bir şekilde yansıtmaz ayrıca bu kuyruk bölgesinde sürüklenen DNA'nın yüzdesi de önemlidir. Olive ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda nötral pH'da ve pH 12,3'de (alkali) DNA migrasyonunun belirli bir yere kadar devam ettiğini ve bu noktadan ileriye gidemediğini bildirmişler. Buna karşılık migrasyon uzunluğunun artmamasına rağmen göç eden DNA yüzdesinin ise arttığını ifade etmişlerdir. pH >13 olduğu alkali koşullarda ise böyle bir durumun söz konusu olmadığını bu pH'da migrasyon uzunluğunun DNA hasarını doğru bir şekilde yansıttığını rapor etmişlerdir. Tüm bu karışıklığı ortadan kaldırmak için Olive ve ark. Kuyruk momenti terimin tanımlamışlardır^{1,5}.

$$\text{Kuyruk Momenti} = \text{Kuyruk uzunluğu} \times \left(\begin{array}{c} \text{Kuyruktaki floresan yoğunluğu} \\ \text{veya} \\ \text{Göç bölgesindeki DNA yüzdesi} \end{array} \right)$$

10. Kullanım Alanları

Komet yöntemi tüm canlı hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır ve uygulama alanı her geçen gün biraz daha genişlemektedir. Günümüzde Komet yöntemi en çok ;

- Genotoksik ve sitotoksik ajanların tespitinde
- Çevresel toksikoloji araştırmalarında
- Kanseri araştırmalarında
- Radyasyon biyolojisinde kullanılmaktadır^{1,14}.

Kaynaklar

1. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr*, 1999; 722: 225-54.
2. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1984; 123: 291-8.
3. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider LE. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*, 1988; 184 -91.
4. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst*, 1990; 82: 779-83.
5. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res*, 1990; 122(1): 86-94.
6. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, DeMeo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res*, 1993; 288(1): 47-63.
7. Olive PL, Durand RE, Banath JP, Evans HH. Etoposide sensitivity and topoisomerase II activity in Chinese hamster V79 monolayers and small spheroids. *Int. J. Radiat. Biol*, 1991; 60(3): 453-66.
8. Rojas E, Valverde M, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 1996; 370: 115-120.
9. Singh NP, Khan H. Acetaldehyde genotoxicity in human lymphocytes. *Mutat Res*, 1995; 337: 9-17.
10. Singh NP, Lai H, Khan A. Ethanol-induced single strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutat Res*, 1995; 345: 191-196.

11. Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol*, 1994; 66: 23- 8.
12. Anderson D, Yu TW, Philips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat Res*, 1994; 307: 261-271.
13. Agarwal A, Erenpreiss J, Sharma R. Sperm chromatin assessment. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Eds. Textbook of Assisted Reproductive Technologies. 3rd edition, India: Replika Pres Pvt. Ltd, 2009:67-84.
14. Durmaz A. İnfertil erkeklerdeki sperm DNA hasarının COMET ASSAY ile tayini. *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010

Yazışma Adresi :

Dr. Ayşen Durmaz
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, ADANA

Email: durmazaysen79@gmail.com