

REKOMBINANT DNA TEKNOLOJİSİ



Giriş

- ❑ Kethleen Danna ve Daniel Nathans tarafından 1971'de yayınlanan bir makale, rekombinant DNA çağının başlangıcına işaret etmiştir.
- ❑ Makale, bir bakteri suşundan bir enzimin ayrıştırılmasını ve enzimin viral DNA'yı özgül nükleotit dizilerinden kesmek için kullanılmasını tanımlamaktaydı.
- ❑ Makale, restriksiyon enzimleri olarak adlandırılan bu proteinlerle kesilmiş DNA'nın ilk fotoğrafını da içermektedir.

Giriş

- ❑ Rekombinant DNA teknolojisi, bir genomdaki binlerce ya da onbinlerce gen arasından tek bir genin;
 - ❑ Ayrıştırılmasını,
 - ❑ Tanımlanmasını ve
 - ❑ Bu genin klonlanmış DNA molekülü olarak büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılmaktadır.

- ❑ Ayrıca klonlanmış gen, şifrelediği ürünü sentezleyecek hücrelere de aktarılabilir.

Giriş

- Bu ürün daha sonraki araştırmalarda, tıpta ya da endüstride kullanılmak üzere ayrıştırılarak saflaştırılır.
- Klonlar, tek bir atadan kök alan, birbirine özdeş organizmalar, hücreler ya da moleküllerdir.
- Bir genin klonlanması;
 - Bir genin yapısının ve organizasyonunun araştırılması ya da söz konusu genin şifrelediği proteinin ticari üretimi gibi sayısız amaçlar için kullanılmak üzere, o genin birçok özdeş kopyasının üretilmesidir.

Rekombinant DNA teknolojisi çeşitli deneysel teknikleri kapsar

- ❑ Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin kombinasyonunu ifade eder.
- ❑ Krossing over gibi genetik süreçlerde de rekombinant DNA molekülleri oluşturulabilir.
- ❑ Ancak rekombinant DNA terimi daha çok, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA'ların birleştirilmesiyle elde edilen moleküller için kullanılır.
- ❑ Rekombinant DNA teknolojisi, bakteri ve virüslerle yapılan çalışmalarda geliştirilen genetik teknikleri ve nükleik asit biyokimyası metotlarını birlikte kullanır.

Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları

- ❑ Bu teknoloji, bir genin potansiyel olarak sınırsız miktarda üretilmesi için güçlü bir araçtır.
- ❑ İşin içinde birçok yöntem olsa da, temel işlem aşağıdaki basamakları içerir.
- ❑ 1. Klonlanacak DNA doku ya da hücrelerden izole edilir.
- ❑ 2. Özgül DNA parçalarının oluşturulması için restriksiyon enzimleri denilen proteinler kullanılır.
 - ❑ Bu enzimler DNA moleküllerini özümlü nükleotit dizilerinden tanır ve keser.

Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları

- 3. Restriksiyon enzimleri ile oluşturulan DNA parçaları, vektör ya da taşıyıcı molekül adı verilen diğer DNA molekülleri ile birleştirilir.
 - Bir DNA parçasıyla birleşmiş olan vektör, bir rekombinant DNA molekülüdür.
- 4. Rekombinant DNA molekülü, bir konak hücreye aktarılır.
 - Konak içerisinde rekombinant molekül kendini eşler ve rekombinant molekülün birbirine özdeş düzinelerce kopyası ya da klonları oluşur.

Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları

- 5. Konak hücre kendisini eşlerken, rekombinant DNA molekülleri de tüm yavru hücrelere geçer.
 - Her biri klonlanmış DNA dizisinin kopyalarını taşıyan konak hücre topluluğu oluşur.
- 6. Klonlanmış DNA konak hücrelerden izole edilebilir ve incelenebilir.

Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları

- 7. Klonlanmış DNA daha sonra transkripsiyona uğratılabilir.
 - mRNA'sı translasyona sokulabilir.
 - Kodlanan gen ürünü izole edilerek araştırma için ya da ticari amaçlarla satılmak için kullanılabilir.

Rekombinant DNA teknolojisi genom analizinin temelidir

- ❑ Rekombinant DNA ve gen-klonlama teknolojisi, bilim adamlarına;
 - ❑ Büyük ve karmaşık genomlardan özel genleri;
 - ❑ Ya da diğer DNA dizilerini çeşitli yöntemlerle büyük miktarlarda elde etme olanağı tanır.
- ❑ Örneğin insan genomu, üç milyarın üzerinde nükleotit ve 25.000 ila 30.000 civarında gen içerir.

Restriksiyon enzimleri ne yapar?

- ❑ Restriksiyon enzimleri genomu;
 - ❑ İzole edilebilen,
 - ❑ Kopyalanabilen,
 - ❑ Ayrı ayrı çalışılabilen,
 - ❑ Üzerinde oynanabilen küçük parçalara böler.

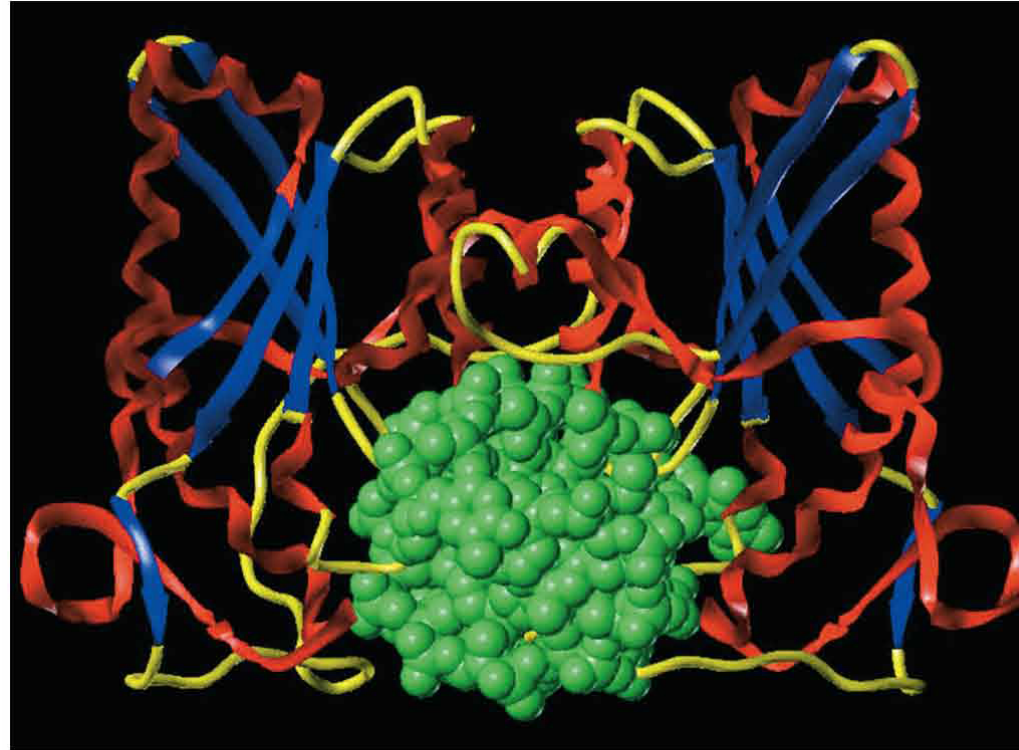
Restriksiyon enzimlerinin avantajları

- Bu durum, araştırmacılara;
 - Gen organizasyonunu,
 - Fonksiyonunu,
 - Gen ifadesini düzenleyen faktörleri,
 - Genler tarafından Őfrelenen proteinlerin işlevlerini ve doğasını araştırmalarına olanak sağlar.

Restriksiyon enzimleri aslında bakterilerin savunma mekanizmasıdır !

- ❑ Restriksiyon enzimleri bakteriler tarafından virüs istilasına karşı bir çeşit savunma mekanizması olarak üretilirler.
- ❑ 200'den fazla restriksiyon enzimi tanımlanmıştır.
- ❑ Bunlardan yaklaşık 100 kadarı araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır.
- ❑ Enzim DNA'ya, tanıma dizisi denilen özgül nükleotit dizisini tanıyarak bağlanır.

Restriksiyon enzimleri DNA'yı özgül tanıma dizilerinden keserler



ŞEKİL 19-1 DNA molekülüne (yeşil) bağlanmış restriksiyon enzimi *Bam*HI. Restriksiyon enzimleri DNA'yı özgül bölgelerden keser.

Restriksiyon enzimleri fragmentler oluşturur !

- ❑ Enzim, bu tanıma dizisi içinden, DNA'nın iki zincirini özgül bir kesim kalıbı oluşturacak şekilde keser.
- ❑ Restriksiyon enzimlerinin klonlama işlemindeki faydası, genomik DNA'yı her zaman doğru bir şekilde keserek restriksiyon parçaları denilen fragmentler oluşturma özelliğinden gelmektedir.
- ❑ Restriksiyon parçalarının büyüklüğü, söz konusu restriksiyon enzimlerinin DNA'yı ne kadar sıklıkla kestiğine göre hesaplanır.

Restriksiyon enzimleri fragmentler oluşturur !

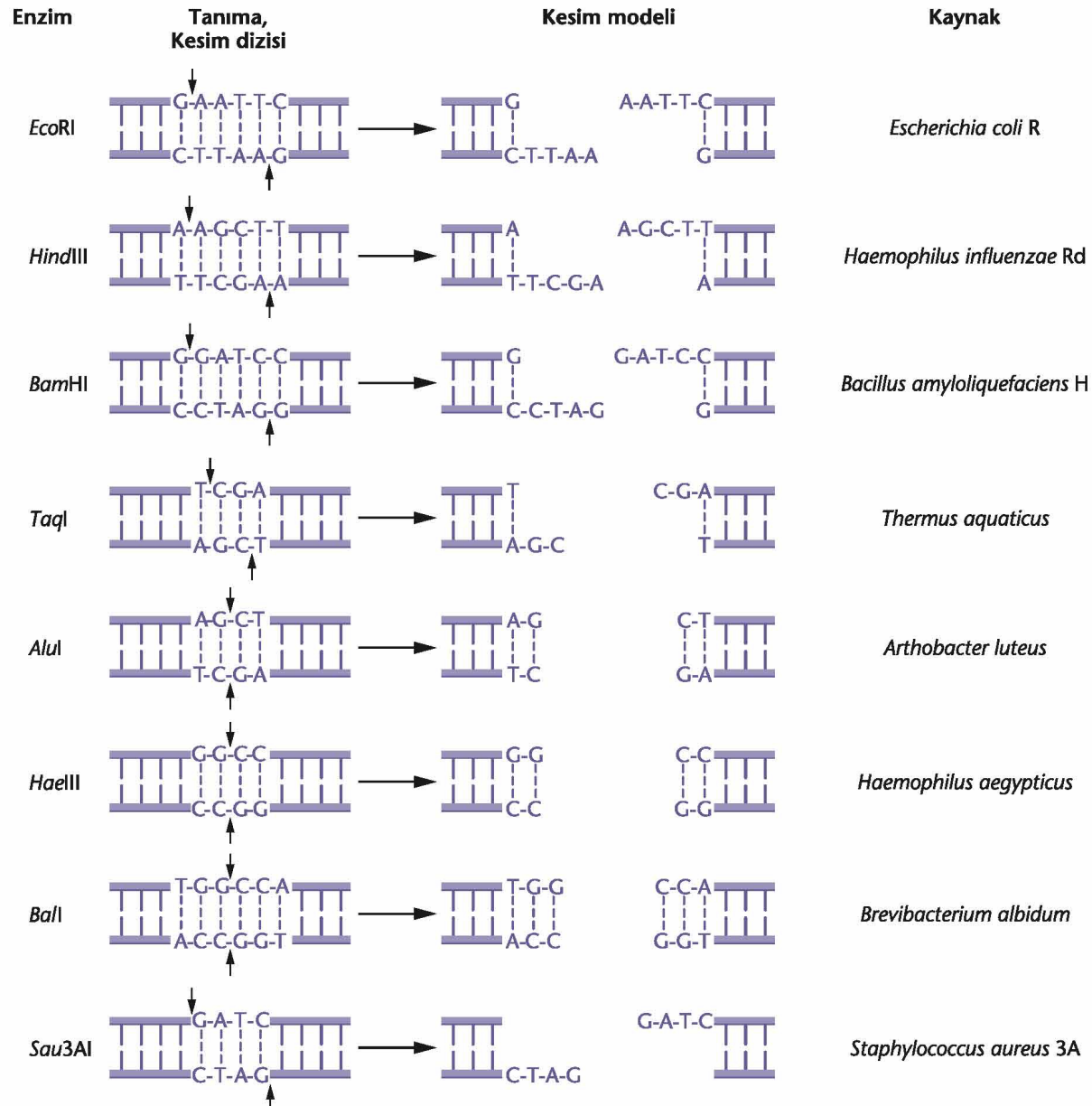
- ❑ Dört baz tanıma dizisi olan Alu I (AGCT) gibi enzimler ortalama her 256 baz çiftinde bir kesecektir.
- ❑ Eğer dört nükleotid eşit oranlarda bulunuyorsa birçok küçük parça oluşacaktır.
- ❑ Not I gibi sekiz nükleotitlik tanıma dizisine (GCGGCCGC) sahip olan enzimler DNA'yı ortalama her 65.500 baz çiftinde bir keserek irili ufaklı fragmentler oluşturur.

Palindromik (ters tekrar) tanıma dizileri

- ❑ Belirli bir restriksiyon enziminin DNA'yı kesmesi ile oluşturduğu parçaların gerçek büyüklükleri değişkenlik gösterir.
- ❑ Çünkü, DNA'daki tanıma dizilerinin sayısı ve yerleşimi her zaman geliş güzel değildir.
- ❑ Tanıma dizilerinin çoğunda öyle bir simetri vardır ki, nükleotid dizisi DNA'nın iki zincirinde de 5' den 3' yönüne doğru benzer şekilde okunur (bir palindrom).

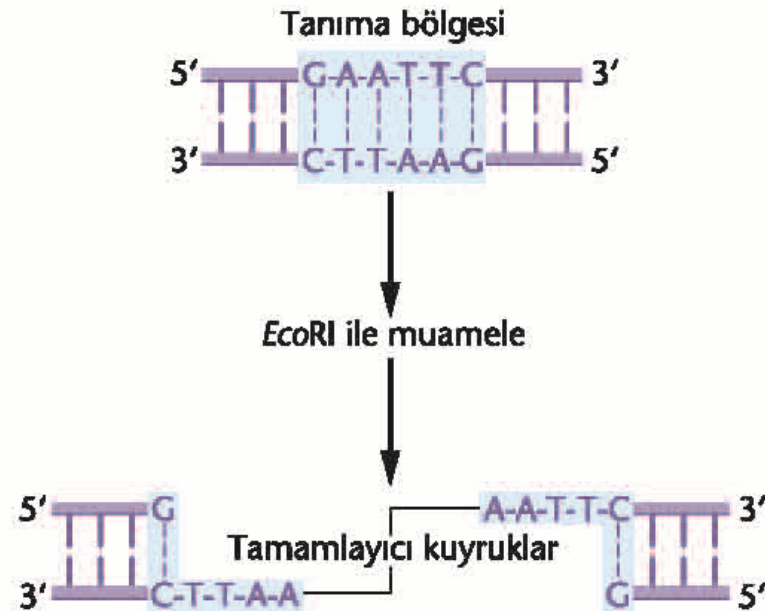
Küt uç-Yapışkan uç

- Her restriksiyon enzimi DNA'yı kendisine özgü kesim modeline göre keser.
- Birçok restriksiyon enzimi DNA'yı asimetrik olarak keserek tek zincirli kuyrukları olan parçalar (yapışkan uçlar) oluşturur ya da,
- Palindromik tanıma dizisinden iki zinciri simetrik bir şekilde keserek küt uçlu parçalar oluşturur.



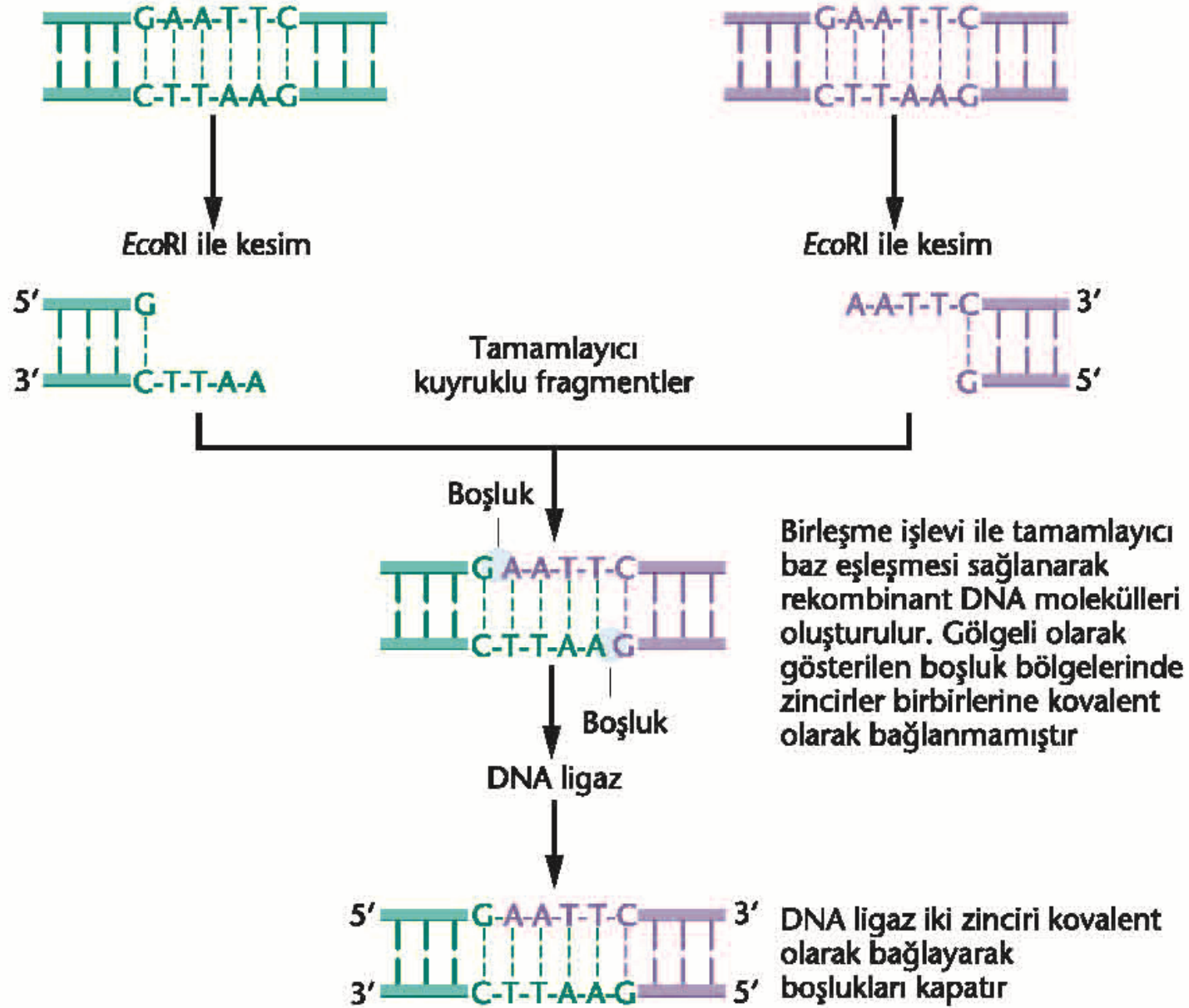
Eco RI

- Tanımlanan ilk restriksiyon enzimlerinden biri *E. coli*'nin R suşundan izole edilmiş olan Eco RI'dir.



Yapışkan uçların birleşmesi kolaydır !

- ❑ Eco RI kesimi ile ortaya çıkan DNA parçalarının çıkıntı yapan tek zincirli uçları (yapışkan uçlar), herhangi bir kaynaktan gelen DNA parçalarının komplementer tek zincirli kuyruklarıyla hidrojen bağları oluşturulabilir.
- ❑ Eğer farklı iki kaynaktan gelen bu parçalar uygun koşullarda kariştirilirse, yapışkan uçlar arasındaki hidrojen bağlardan ötürü rekombinant (yenibileşen) moleküller ortaya çıkar.
- ❑ Parçalar DNA ligaz enzimi ile kovalent olarak bağlanarak rekombinant DNA molekülleri oluşturulur.



Vektörler klonlanacak DNA parçalarını taşırlar

- ❑ Kopyalanacak olan DNA restriksiyon parçaları konak hücre sine doğrudan giremezler.
- ❑ Ancak bir restriksiyon parçası, vektör adı verilen başka bir DNA molekülü ile birleşirse,
- ❑ Klonlanmış bir çok kopyasının oluşabileceği konak hücreye girebilir.
- ❑ Vektörler, kendilerine takılan DNA parçasını nakleden ve replike eden taşıyıcı DNA molekülleridir.

Birçok farklı klonlama vektörü vardır

- Konak özgüllüğü,
- Taşıyabildikleri parçanın büyüklüğü,
- Oluştukları kopya sayıları,
- Klonlama için sahip oldukları tanıma dizilerinin sayıları ve
- Marker genlerinin tipi ve sayıları

gibi bir takım özellikleri açısından değişiklik gösteren birçok farklı klonlama vektörü vardır.

Vektörler tanıma dizileri içermelidir

- ❑ Bir DNA molekülünün vektör olarak kullanılabilmesi için, kendini ve taşıdığı herhangi bir DNA parçasını bağımsız olarak replike edebilmesi gerekir.
- ❑ Vektör ayrıca, klonlanacak DNA parçasının insersiyonuna olanak tanıyan birçok tanıma dizisi de içermelidir.

Vektöre gen insersiyonu !

- ❑ Bir DNA parçasını vektöre takmak için;
 - ❑ Vektör, restriksiyon enzimi ile kesilir ve aynı enzimle kesilerek oluşturulmuş DNA parçaları ile karıştırılır.
 - ❑ Araya eklenen fragmenti taşıyan vektörler rekombinant vektör olarak adlandırılır.
 - ❑ Bu yapı, her biri farklı iki kaynaktan gelen DNA'ların birleşmesi ile oluşmuş rekombinant DNA molekülüne bir örnektir.

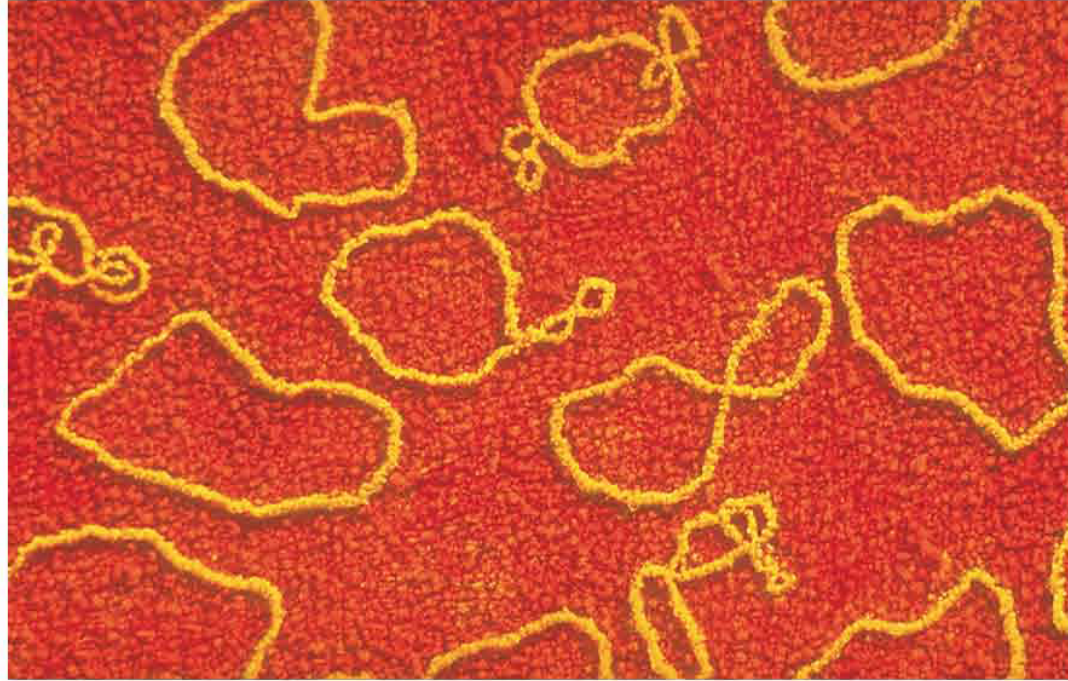
Rekombinantların seçimi

- ❑ Vektörleri taşıyan konak hücrelerini, vektör taşımayanlardan ayırmak için,
- ❑ Vektörde, seçicilik sağlayan bir marker gen (genellikle antibiyotik direnç genleri ya da konakta bulunmayan enzimlere ait genler) bulunmalıdır.

Plazmit vektörler

- ❑ İlk geliştirilen vektörler, genetik olarak değişikliğe uğratılmış plazmitlerdir.
- ❑ Hala klonlama için yaygın olarak kullanılmaktadır.
- ❑ Bu plazmit vektörler,
 - ❑ Bakteri hücreleri içinde doğal olarak bulunan,
 - ❑ Bağımsız olarak replike olabilen,
 - ❑ Bakteri kromozomunun dışında, çift zincirli DNA molekülleridir.

Plazmit vektörler



ŞEKİL 19-5 *E.coli* bakterisinden elde edilen halkasal plazmit molekülünün renklendirilerek kuvvetlendirilmiş mikrofrafı. Genetik olarak değiştirilmiş plazmitler DNA klonlamasında vektör olarak kullanılmaktadır.

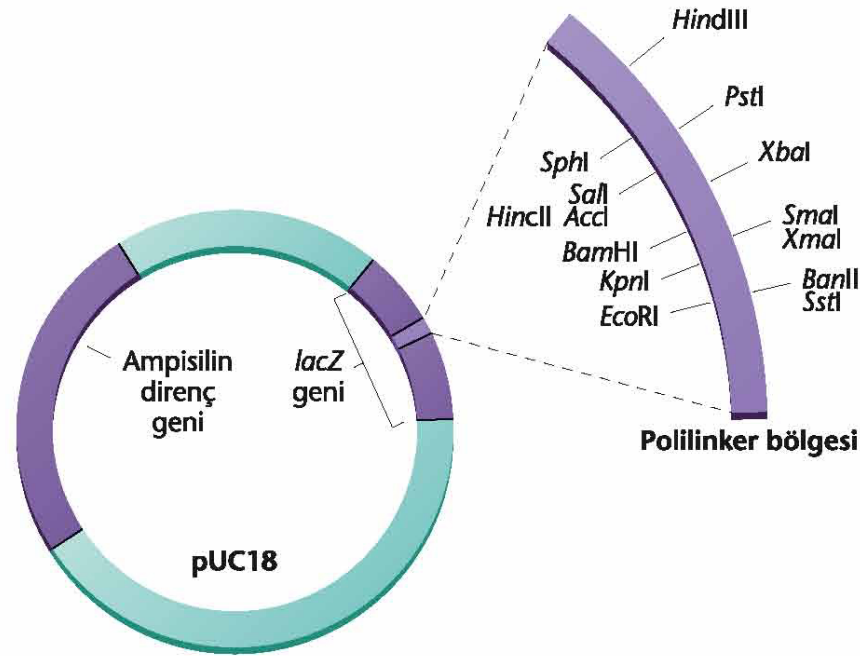
Plazmitler çoğalır

- ❑ Plazmitler, klonlama vektörü olarak kullanılabilmeleri için genetik mühendisliği ile çok fazla değişikliğe uğratılmıştır.
- ❑ Genellikle tek bir plazmit bakteri konak hücre sine girmesine rağmen, bir kere girince, bazı plazmitler kopya sayılarını binlerce kopya olacak şekilde artırırlar.
- ❑ Vektör olarak bu plazmitler, klonlanmış DNA'nın birçok kopyasının oluşmasına da olanak verir.

pUC18

- ❑ Vektörler, çok sayıda restriksiyon enziminin tanıma dizilerini ve marker genleri içerecek şekilde dizayn edilebilirler.
- ❑ Bu tür plazmitlerden biri, vektör olarak birçok yararlı özelliği bulunan pUC18'dir.

Plazmit vektörler



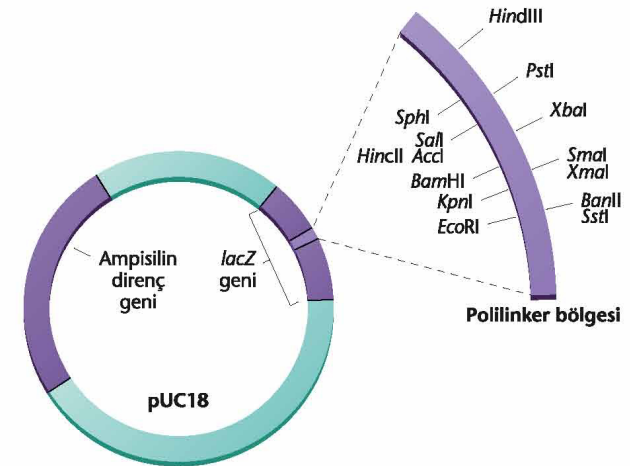
ŞEKİL 19-6 *lacZ* geninin içinde bulunan klonlama (polilinker) bölgesini gösteren pUC18 plazmitinin şeması. Polilinker bölgesine DNA sokulduğu zaman, *lacZ* geni bozulur ve oluşan beyaz koloniler, klon DNA parçasını taşıyan kolonilerin doğrudan saptanmasını sağlar.

pUC18

- Bu plazmit küçüktür (2686bç) ve bu nedenle, daha büyük DNA parçalarını taşıyabilir.
- Replikasyon orijini vardır ve araya sokulan DNA'nın hücre başına 500 kadar kopyasını oluşturabilir.
- pUC18 üzerindeki çoklu-bağlayıcı (poli-linker) olarak adlandırılan bir bölge, çok sayıda restriksiyon enziminin tanıma dizisini kapsayacak şekilde düzenlenmiştir.

pUC18, lac Z geni taşıyıcı

- pUC18, bakteriyel *lacZ* gen parçasını taşımaktadır ve çoklu-bağlayıcı bölge bu parçanın içine sokulmuştur.
- *lacZ*'nin ifade olması, pUC18'i taşıyan bakteri konak hücrelerinin *Xgal* adı verilen maddeyi içeren ortamda üretildiğinde mavi koloniler oluşturmasına neden olur.



ŞEKİL 19-6 *lacZ* geninin içinde bulunan klonlama (polilinker) bölgesini gösteren pUC18 plazmidinin şeması. Polilinker bölgesine DNA sokulduğu zaman, *lacZ* geni bozulur ve oluşan beyaz koloniler, klon DNA parçasını taşıyan kolonilerin doğrudan saptanmasını sağlar.

Lac Z'nin insersiyonal inaktivasyonu

- Eğer DNA parçası, çoklu-bağlayıcı bölgeye takılırsa, lac Z geni etkisiz hale gelir.
- Yabancı DNA parçasını taşıyan pUC18 plazmitini içeren konak hücreler, tanınması kolay olan beyaz koloniler oluşturur.

Plazmit vektörler

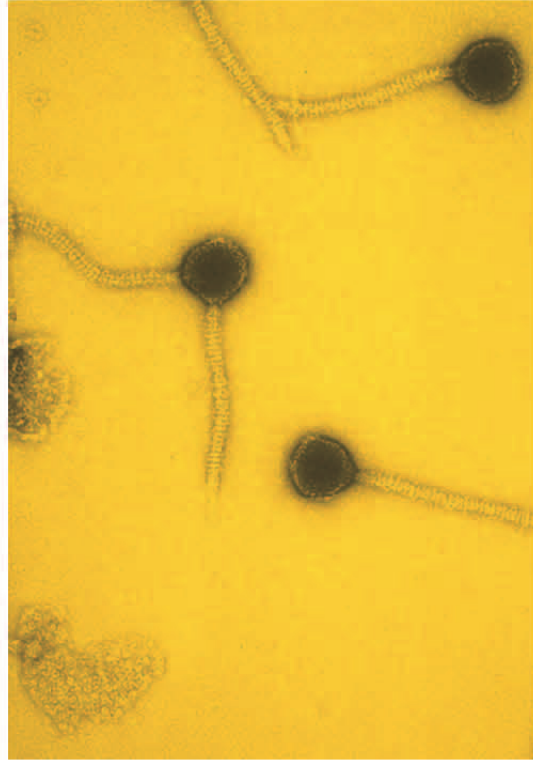


ŞEKİL 19-7 Rekombinant plazmiti almış olan bakteri hücrelerinin bulunduğu petri kabı. Petri kabındaki üreme ortamı X-gal bileşiği içermektedir. pUC18 vektöründeki araya eklenen (insert) DNA, mavi kolonilerin oluşmasını sağlayan geni bozmuştur. Beyaz koloniler DNA parçasını taşıyan vektörü içerirken, mavi koloniler herhangi bir insert DNA parçasını taşımamaktadır.

Lambda (λ) faji vektörleri

- ❑ Plazmit vektörler genellikle 10 kb'a kadar yabancı DNA taşıyabilir.
- ❑ Ancak birçok deneyde daha büyük DNA parçaları gereklidir.
- ❑ Bu nedenle λ fajının genetik olarak değiştirilmiş suşları vektör olarak kullanılır.

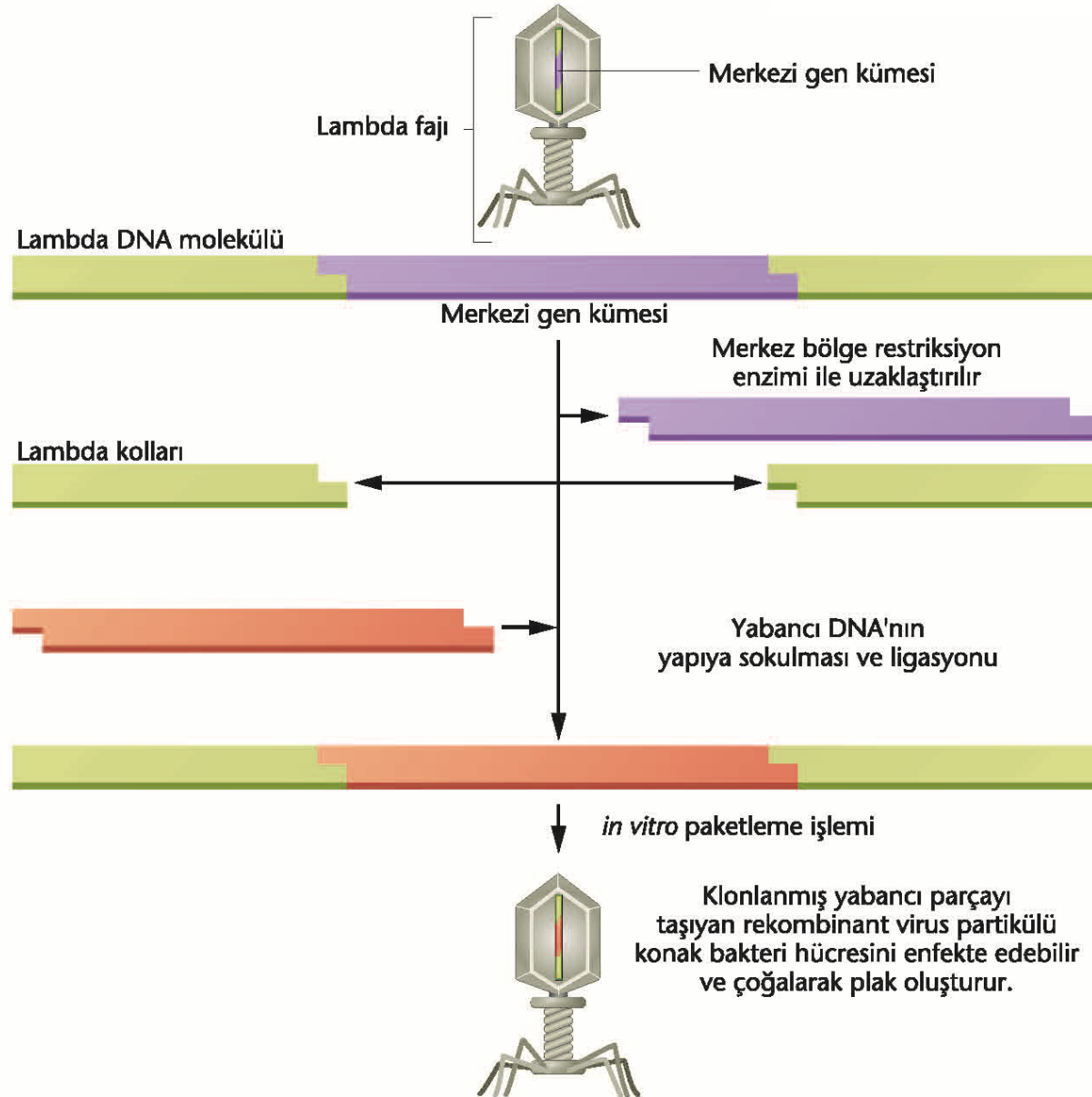
Lambda (λ) fajı vektörleri



ŞEKİL 19-8 Rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılan λ fajının renkli elektron mikrofrafı.

Lambda (λ) fajı vektörleri

- Vektör olarak kullanılması için, lambda kromozomunun ortasında yer alan genomun üçte birlik kısmı, fajın hücreleri enfekte etmesini ve plak oluşturmasını engellemeden, yabancı bir DNA ile değiştirilebilir.



Lambda (λ) fajı ile gen aktarımı

- Bu vektörü kullanarak DNA klonlaması yapmak için önce faj DNA'sı ayrıştırılır.
- Daha sonra EcoRI gibi bir restriksiyon enzimi ile kesilerek, sol kol, sağ kol ve vazgeçilebilir orta bölüm olmak üzere üç kromozomal parça oluşturulur.
- Sol ve sağ kollar izole edilir.
- EcoRI ile kesilmiş ve yabancı DNA ile karıştırılır.

Lambda (λ) faji ile gen aktarımı

- Parçaların DNA ligaz ile birleştirilmesiyle rekombinant vektörler oluşur.
- Rekombinant λ vektörleri fajın protein kafası içine paketlenir.
- Konak bakteri hücrelerine sokulur.
- Bakterinin içinde vektörler çoğalır ve her biri yabancı DNA taşıyan çok sayıda faj kopyası oluşur.

Lambda (λ) faji ile gen aktarımı

- Fajlar oluştuğunda konak bakteri hücrelerini parçalar.
- Petri kabında plak olarak bilinen berrak lekeler şeklinde yapılar oluşur.
- Bu plaklardan klon DNA'lar ayrıştırılır.
- Faj vektörler yaklaşık 20kb büyüklüğündeki DNA parçalarını taşıyabilir.
- Bu büyüklük, plazmitlerin taşıdığı DNA parçasının iki katından daha fazladır.

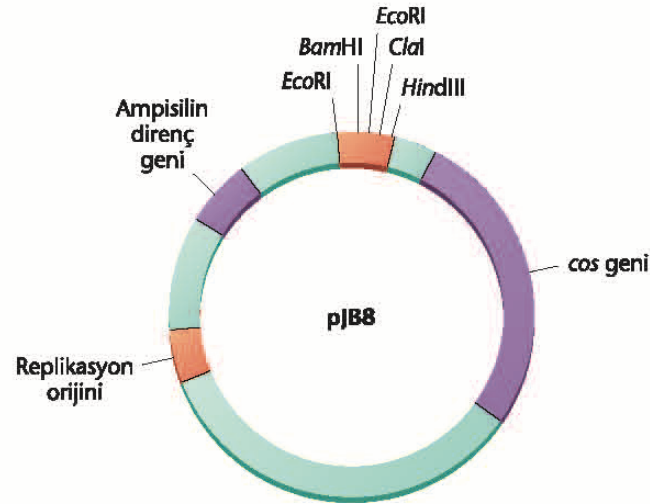
Lambda (λ) faji ile gen aktarımı

- Bu özellik, büyük genlerin klonlanmasında önemli bir avantajdır.
- Ayrıca bazı faj vektörleri birkaç düzüne ya da birkaç yüz nükleotit uzunluğunda olan DNA parçalarını kabul ederler.

Kozmit (hibrit) vektörler

- Kozmitler, lambda kromozomunun bir kısmı ile plazmitin bir kısmının birleştirilmesi ile oluşturulmuş melez (hibrit) vektörlerdir.
- Kozmitler, lambda fajının faj protein kılıfına paketlenmesi için gerekli olan cos dizileri ile plazmitin replikasyon için gerekli dizileri içerir.
- Ayrıca, rekombinant kozmitleri taşıyan konak hücrelerin tespitine yarayan plazmit kökenli antibiyotik direnç geni de içerirler.

Kozmit vektörler



ŞEKİL 19–10 Kozmit vektör pJB8; bir bakteriyel replikasyon orijini (*ori*), tek bir *cos* bölgesi (*cos*), bir ampisilin direnç geni (*amp^R*; kozmidi taşıyan kolonileri seçmek için) ve dört tane klonlama bölgesi (*Bam*HI, *Eco*RI, *Cla*I ve *Hind*III) içerir. Vektör küçük olduğu için (5.4 kb uzunluğunda), 33 ila 46 kb uzunluğunda insert DNA parçalarını taşıyabilir. *Cos* dizisi, yabancı DNA parçası taşıyan kozmitin lambda viral protein kılıfına sanki kendi viral kromozomu gibi paketlenmesini sağlar. Kozmiti taşıyan viral kılıf uygun konak bakteri hücrelerini enfekte eder ve insert DNA'yı taşıyan vektör konak hücreye aktarılır. Bir kere hücre içerisine girdiğinde *ori* dizisi kozmitin hücre içinde bakteriyel plazmit gibi kendisini çoğaltmasını sağlar.

Kozmit (hibrit) vektörler

- Kozmit, bir bakteri konak hücrenin içine girdikten sonra plazmit gibi replike olur.
- Lambda genomunun çok küçük bir kısmını içerdiği için kozmitler, lambda vektörlerinin taşıdığından daha büyük DNA parçalarını taşıyabilirler.
- Kozmitler yaklaşık 50kb büyüklüğünde DNA parçaları taşıyabilirken, faj vektörleri yaklaşık 10-15 kb büyüklüğünde DNA parçaları taşıyabilirler.

Mekik vektörler

- Değişik kaynaklardan türetilen ve kendi replikasyon orijinlerini içeren diğer hibrit vektörler birden fazla konak hücrede replike olabilirler ve mekik vektörler olarak adlandırılırlar.
- Örneğin, SV40 gibi hayvan virüsleri.
- Bu vektörler genellikle iki tip konak hücre içinde ayırt edilebilen genetik marker içerirler.

Mekik vektörler

- Taşıdıkları DNA'yı *E. coli* ile maya gibi diğer konak hücre arasında taşımak için kullanılır.
- Bu vektörler genellikle gen ifadesi çalışmalarında kullanılırlar.

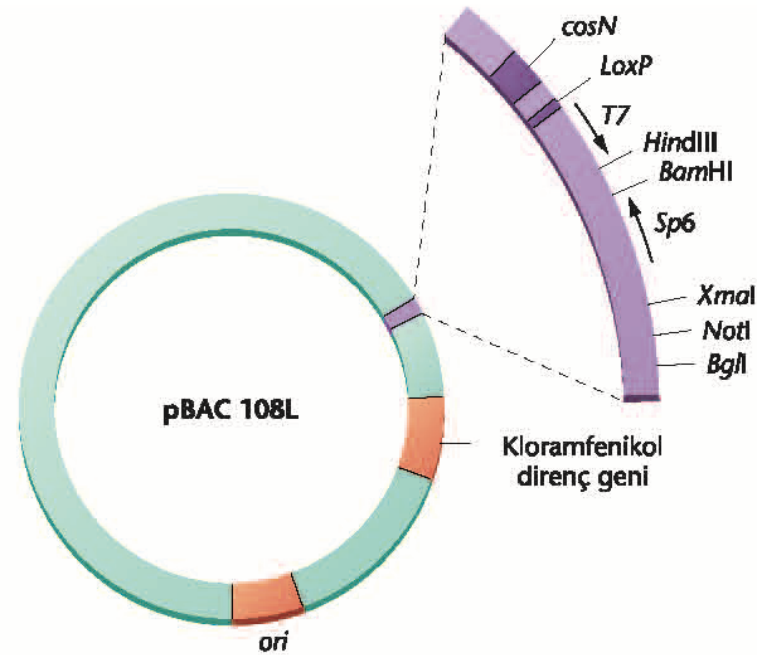
Bakteri yapay kromozomları (BAC): F faktörleri !

- Karmaşık yapılı ökaryotik genomların analizi ve haritalaması için gerekli olan vektörler, çok büyük DNA parçalarını taşıyabilmelidirler.
- Bazı insan genlerinin uzunluğu 2000 kb'dan daha uzundur.
- Bu genleri taşımak için klonlama kapasitesi daha büyük vektörlere gereksinim vardır.

Bakteri yapay kromozomları (BAC): F faktörleri !

- Büyük klonlama kapasitesine sahip vektörlerden biri, bakteriden üreme plazmiti (F faktörü) ile oluşturulmasına dayanır.
- F faktörleri, 1 Mb uzunluğuna kadar olan bakteri kromozomlarını taşıyabildiklerinden, ökaryotik DNA parçaları için vektör olarak düzenlenmişlerdir.
- Yaklaşık 300 kb uzunluğundaki bir parçayı taşıyabilirler.

Bakteri yapay kromozomları (BAC): F faktörleri !



ŞEKİL 19-11 Bir bakteri yapay kromozomu (BAC). Klonlama bölgesi yabancı DNA'nın sokulabilmesini sağlamak için pekçok özgül bölge taşır. T7 ve Sp6 ile gösterilen oklar promotor bölgeleridir ve bu bölgeler arasına girmiş olan genlerin ifadesini sağlar.

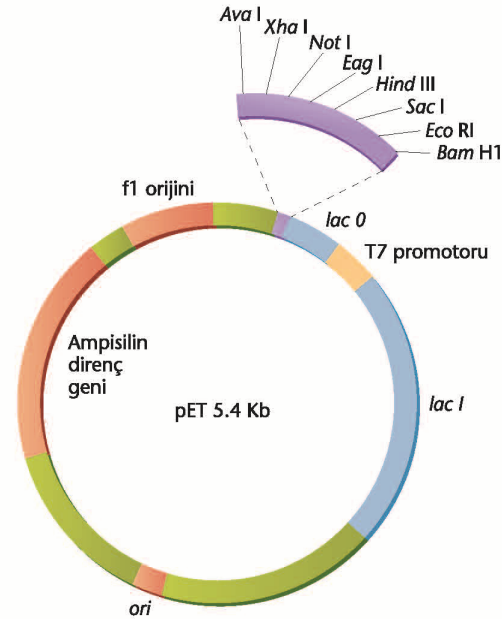
Bakteri yapay kromozomları (BAC): F faktörleri !

- BAC vektörler,
 - Replikasyon ve kopya sayısı için gerekli olan F faktör genlerini,
 - En az bir tane antibiyotik direnç marker genini ve
 - Klonlanacak yabancı DNA'nın sokulabileceği restriksiyon tanıma dizilerinin kümelendiği polil-inker bölgesini içerir.

İfade vektörleri

- ❑ İfade vektörleri, seçilen bir proteinin birçok kopyasını konak hücrede üretmek için düzenlenmiş olan vektörlerdir.
- ❑ İfade vektörleri hem prokaryotik hem ökaryotik konak hücrelerinde kullanılabilir.
- ❑ pET *E. coli* konak hücrelerinde kullanılan bir ifade vektörüdür.

İfade vektörleri



ŞEKİL 19-12 pET ifade vektörü. Bu sistem, genetik mühendisliği ile oluşturulmuş bir konak hücre kullanır. Konak hücre, *lac* promotor ve operatörünün kontrolü altında olan viral T7 DNA polimeraz geni taşımaktadır, böylece, laktoz analogu IPTG ile indüklenebilmesi sağlanmıştır. Hedef genin ifadesi için, hedef geni taşıyan pET vektörleri konak hücreye aktarılır. Konak hücrenin IPTG varlığında üremesiyle T7 RNA polimeraz geni ve pET vektöründeki hedef gen (*lac O*'nun kontrolü altındadır) üzerindeki baskı kalkar ve hedef genin ifadesi gerçekleşir. Bu sistemde, sıkı bir kontrol altında olan kuvvetli bir promotor bulunur ve ifade sadece IPTG'nin varlığında gerçekleşir.

İfade vektörleri

- Bu vektörü kullanmak için;
- İfade edilecek olan gen, vektörün poli-linker bölgesindeki tanıma dizisi içine klonlanır.
- Bir T7 viral promotorunun ve bakteri lac operatörünün yanına yerleştirilir.

T7 polimerazı

- Konak hücre genomu T7 viral polimerazı, lac promotoru ve lac operatörü taşıyacak şekilde değiştirilmiştir.
- Rekombinant plazmit konak hücreye sokulduktan sonra, laktoz yerine geçen (analog) IPTG'nin ortama ilave edilmesiyle genlerin ifadesi indüklenir.
- IPTG, baskılayıcı proteini lac operatöründen uzaklaştırarak, bakteri kromozomundaki T7 polimeraz geninin ve çoklu-bağlayıcı (polil-inker) bölgesindeki genin aktivasyonunu sağlar.

T7 polimerazı

- T7 polimeraz, T7 promotoruna bağlanır.
- Poli-linker bölgeye sokulmuş olan geni transkribe ederek söz konusu proteinin büyük miktarlarda sentezini sağlar.

DNA ilk defa prokaryotik konak hücrelerinde klonlanmıştır

- Çoğalma, rekombinant molekülün konak hücreye aktarılmasından sonra gerçekleşir.
- Bu, geliştirilen ilk klonlama yöntemi olup, hücre-tabanlı klonlama olarak bilinir.
- Klonlanmış DNA yaratmak için çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

DNA ilk defa prokaryotik konak hücrelerinde klonlanmıştır

- En yaygın kullanılan prokaryotik konak, K12 olarak bilinen *E. coli*'nin bir laboratuvar suşudur.
- K12 gibi suşların genetik özellikleri çok iyi bilinmektedir ve çok çeşitli vektörler için konak olarak kullanılmaktadır.

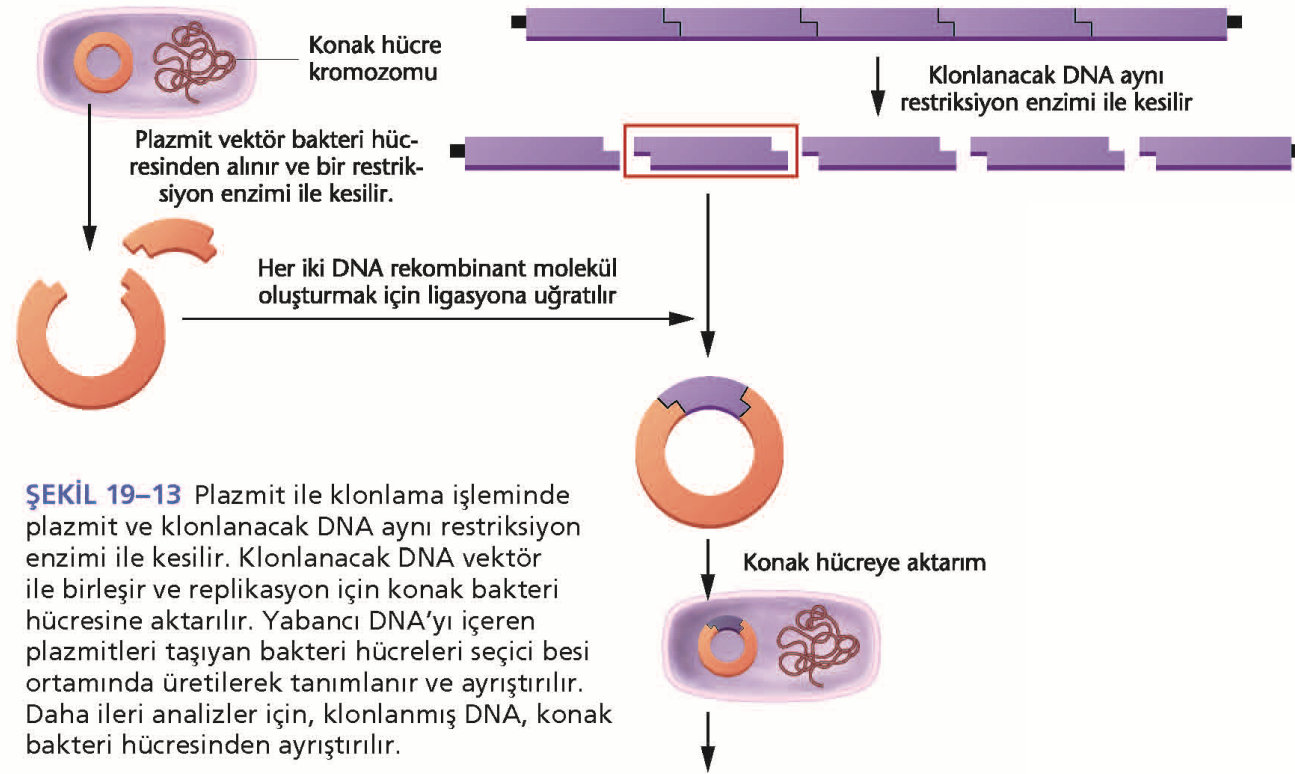
E. coli: Klonlamanın basamakları

- Rekombinant DNA molekülü yaratmak ve bu moleküllere klonlanacakları *E. coli* konak hücrelerine aktarmak için aşağıdaki basamaklar gereklidir.
- 1. Klonlanacak DNA izole edilir ve özgül baz dizilerine sahip uçlar yaratmak için restriksiyon enzimleriyle muamele edilir.
- 2. DNA parçaları, rekombinant vektör molekülü oluşturmak üzere, aynı enzimle muamele edilmiş plazmit molekülleri ile birleştirilir.

DNA ilk defa prokaryotik konak hücrelerinde klonlanmıştır

- 3. Rekombinant vektör, *E. coli* konak hücrelerine aktarılır ve rekombinant plazmit düzinelerce kopyasını oluşturmak üzere orada kendini eşler.
- 4. Besiyerine konulan bakteriler koloni oluşturur ve rekombinant plazmitleri içerenleri seçmek üzere koloniler taranır.

DNA ilk defa prokaryotik konak hücrelerinde klonlanmıştır



ŞEKİL 19-13 Plazmit ile klonlama işleminde plazmit ve klonlanacak DNA aynı restriksiyon enzimi ile kesilir. Klonlanacak DNA vektör ile birleşir ve replikasyon için konak bakteri hücresine aktarılır. Yabancı DNA'yı içeren plazmitleri taşıyan bakteri hücreleri seçici besi ortamında üretilerek tanımlanır ve ayrıştırılır. Daha ileri analizler için, klonlanmış DNA, konak bakteri hücresinden ayrıştırılır.

Bakterilerin renk indikatörü ya da antibiyotik içeren besi ortamlarında üretilmelerine dayalı olarak rekombinant plazmitleri taşıyan hücrelerin seçilimi yapılır

DNA ilk defa prokaryotik konak hücrelerinde klonlanmıştır

- Her bir kolonideki hücreler aynı atasal hücreden oluştuğu için, kolonideki tüm hücreler ve içerdikleri plazmitler genetik olarak özdeş klonlardır.

Maya hücreleri klonlamada ökaryotik konak hücreleri olarak kullanılır

- *Saccharomyces cerevisiae* mayası beş nedenden ötürü ökaryotik genlerin ifadesi ve klonlanması için uygun bir konak hücredir.
- 1. Maya ökaryotik bir organizma olmasına rağmen bakteri hücreleri gibi manipüle edilebilir (yönlendirilebilir) ve üretilebilir.
- 2. Maya genetiği ayrıntılı olarak çalışılmıştır ve geliştirilmiş bir genetik haritası ve saptanmış mutasyonlarını gösteren geniş bir kataloğu vardır.

Maya hücreleri klonlamada ökaryotik konak hücreleri olarak kullanılır

- 3. Ayrıca, mayanın tüm genomunun dizi analizi yapılmış ve organizmadaki genlerin çoğu belirlenmiştir.
- 4. Bazı ökaryotik proteinlerin işlevlerini çalışmak için, translasyon sonrası değişiklikleri yapabilen ve böylece proteinin işlevsel bir şekilde katlanmasını sağlayan bir konak hücreye gereksinim vardır.
- Bakteri konak hücreleri bu tür değişiklikleri yapamaz ve yanlış katlanan proteinleri hızla parçalar.

Maya hücreleri klonlamada ökaryotik konak hücreleri olarak kullanılır

- 5. Maya, ekmek yapımında ve mayalı içki endüstrisinde yüzyıllar boyunca kullanılmaktadır ve aşılar ve tedavi edici ajanlar için proteinlerin üretilmesinde güvenli bir organizma olarak kabul edilmiştir.

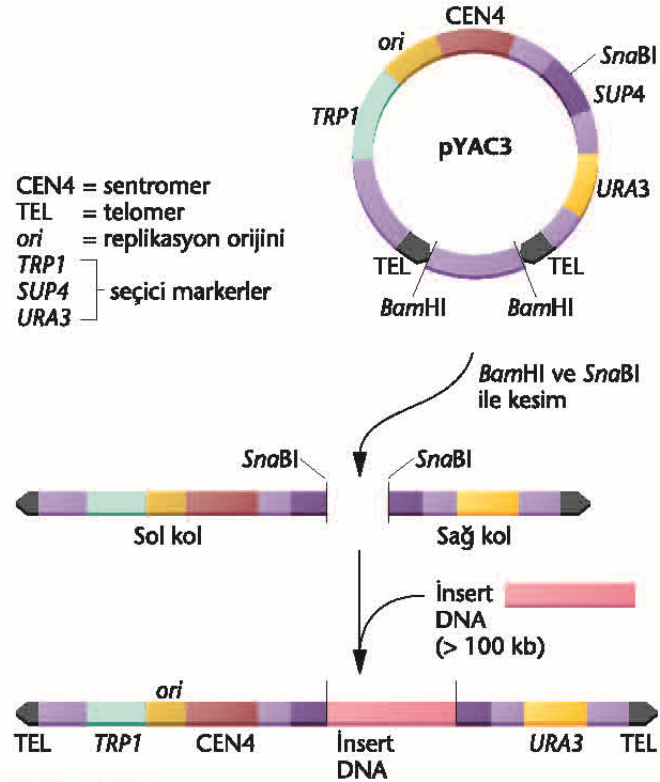
TABLO 19.1

MAYA HÜCRELERİNDE SENTEZLENEN REKOMBİNANT PROTEİNLER

Hepatitis B virüsü yüzey proteini
Sıtma parazit proteini
Epidermal büyüme faktörü
Trombosit'den elde edilen büyüme faktörü
 α_1 -antitripsin
Pıhtılaşma faktörü XIIIa

Maya yapay kromozomu

- Çok çeşitli maya klonlama vektörleri geliştirilmiş olup, bunlardan biri maya yapay kromozomudur (Yeast artificial chromosome ; YAC).



ŞEKİL 19-14 Maya yapay kromozomu olan pYAC3, telome dizileri (TEL), 4 numaralı maya kromozomundan türetilmiş olan bir sentromer (CEN4) ve bir replikasyon orijini (*ori*) içerir. Bu elementler vektöre, bir kromozomda var olan bazı özellikleri sağlar. Kromozomun sol ve sağ kolları için seçici markerler olan *TRP1* ve *URA3* maya genleridir. *SUP4* geni içinde *SnaB1* enzimine ait restriksiyon tanıma dizisi bulunur. İki tane *BamH1* tanıma dizisi arasında bir ara bölge bulunur. *SnaB1* ve *BamH1* ile yapılan kesim ile yapay kromozom iki kola ayrılır. Klonlanacak DNA *SnaB1* ile muamele edilerek birçok parçalar oluşturulur. Parçalar ve kollar birbirleri ile birleştirilir ve yapay kromozom maya konak hücrelerine sokulur. Maya kromozomu büyük olduğundan, yapay kromozom milyon baz çifti büyüklüğünde olan parçaları yapısına alabilir.

Maya yapay kromozomu

- Bir YAC molükülü; doğal kromozomlarda olduğu gibi her iki uçta telomer yapısı, bir replikasyon orijini (DNA sentezini başlatır) ve bir sentromer içerir.
- Kromozom, iki seçici marker gene (TRP1 ve URA3) ve yabancı DNA'nı girebilmesini sağlayan, restriksiyon enzimi tanıma dizilerinin küme halinde bulunduğu bölgeye bağlıdır.

Maya yapay kromozomu

- Maya kromozomlarının büyüküğü 230-1900 kb arasında değişebilir.
- Böylece, 100-1000 kb arasındaki büyüklükte olan DNA parçalarının YAC içine klonlanması mümkün olur.

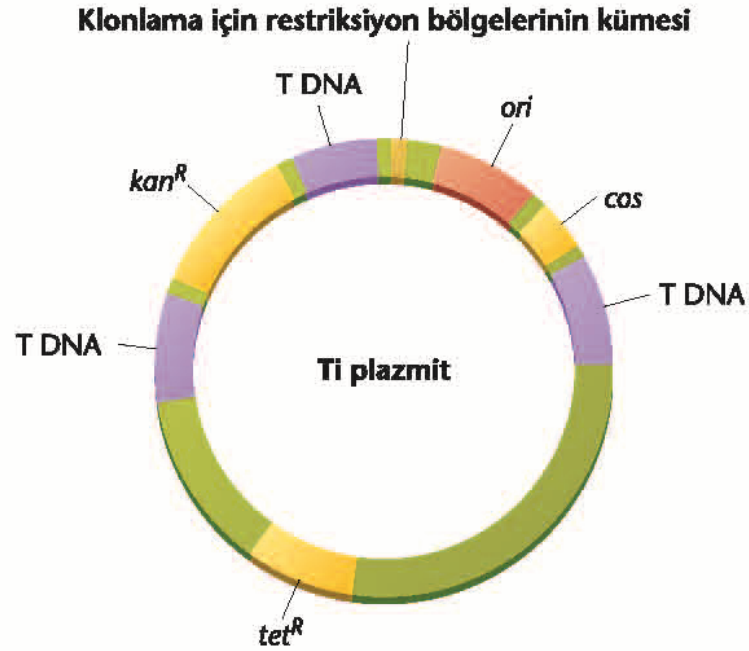
Genler ökaryotik hücrelere aktarılabilir Transformasyon-Transfeksiyon

- Mayanın yanı sıra, hem bitki hem de hayvan hücreleri, çevrelerinden DNA moleküllerini içlerine alabilirler.
- Dahası YAC gibi çok farklı tipteki vektörler, ökaryotik hücrelere DNA aktarımında kullanılabilir.
- Eğer vektör bir plazmit ise, DNA aktarımı 'transformasyon' olarak adlandırılır.
- Eğer vektör bir virüs ise 'transfeksiyon' terimi bir konağa DNA aktarımını tanımlar.

Ti plazmidi

- Yüksek yapılı bitkilere gen aktarmak için bakteriyel plazmitler vektör olarak kullanılır.
- Toprak bakterisi *Agrobacterium tumifaciens*, bitki hücrelerine enfekte eder.
- Birçok farklı bitki türlerinde 'gal' adı verilen tümörler oluşturur.
- Tümör oluşumu, bakterinin taşıdığı tümör-indükleyici (Ti) plazmit sayesinde olur.

Konak bitki hücreleri



ŞEKİL 19–15 Bitkilere klonlama yapmak için düzenlenen bir Ti plazmiti. T DNA'sının yapıya katılımı için gerekli bölgesi ile klonlama bölgesi ve antibiyotik direnç genlerini (kan^R ve tet^R) içeren bakteriyel DNA parçası birleştirilir. Oluşturulan bu vektör, ayrıca, replikasyon orijini (ori) ve klonlanmış parçanın konak bitki hücrelerinden alınmasını sağlayan lambda cos dizisi de içerir.

Ti plazmidi

- Ti plazmiti taşıyan bakteriler bitki hücrelerini enfekte ettiğinde, Ti plazmitinin T-DNA olarak bilinen kısmı, konak bitki hücresinin genomuna aktarılır.
- T-DNA'sındaki genler tümör oluşumunu ve enfekte eden bakterinin büyümesi için gerekli olan bileşenlerin sentezini kontrol eder.

Ti plazmidi-Kallus oluşumu

- Yabancı genler, T-DNA parçasının içine sokulabilir.
- A. tumifaciens enfeksiyonu ile rekombinant plazmit bitki hücrelerine aktarılabilir.
- Hücreye girilince, T-DNA konak hücre kromozomuna katıldığında, yabancı DNA da bitki genomuna girmiş olur.
- Rekombinant Ti plazmiti taşıyan bitki hücreler, kültür ortamında kallus (callus) olarak bilinen hücre kitlesi oluşturarak büyüyebilir.

Ti plazmidi-Kallus oluşumu

- Kültür ortamını değiştirerek, kallus'ların kök ve sürgün oluşturması ve giderek yabancı geni taşıyan olgun bitkinin oluşumu sağlanabilir.
- Yabancı DNA taşıyan canlılar transgenik organizmalar olarak adlandırılır.

Konak memeli hücreleri

- DNA, memeli hücrelerine çeşitli yollarla aktarılabilir.
- Örneğin, endositoz ile ya da yapay zar yapıları (lipozomlar) içine hapsedilen DNA'nın hücre zarından füzyonu ile memeli konak hücresi içine aktarımı gerçekleştirilebilir.
- Ayrıca, YAC'lar ya da retrovirüsler ile oluşturulan vektörler kullanılarak da DNA aktarımı yapılabilir.

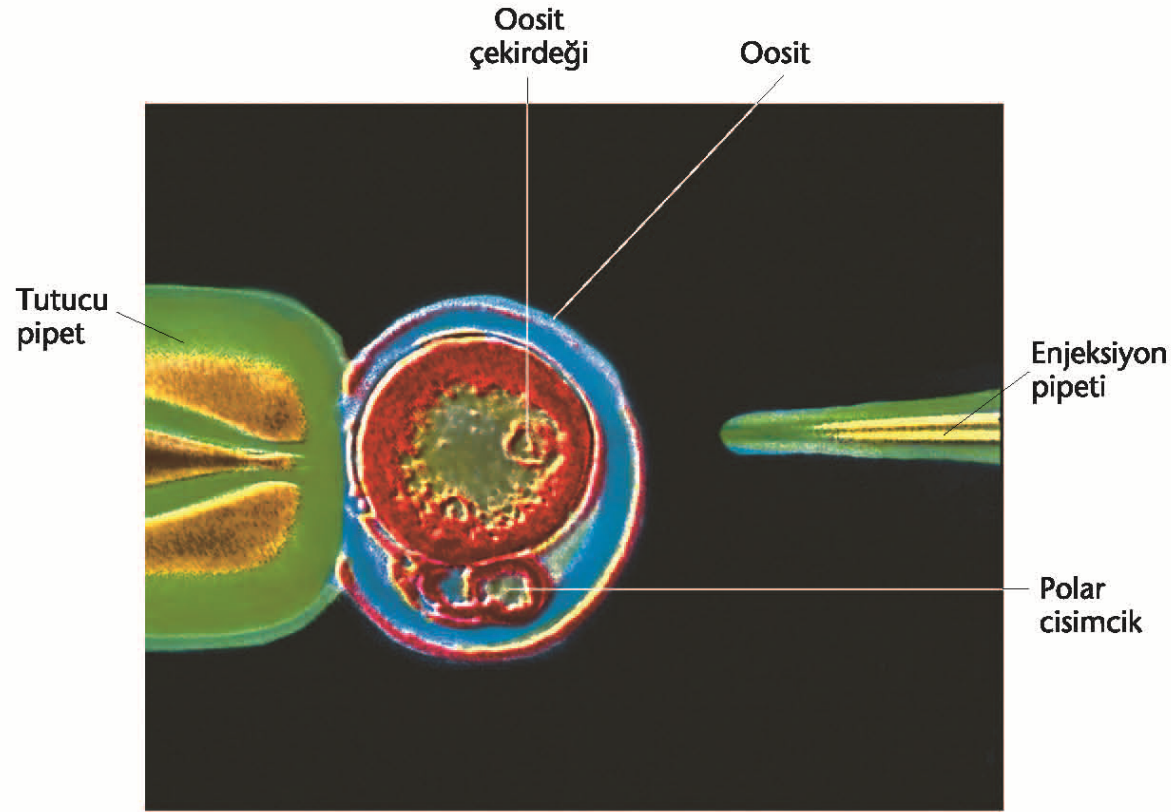
YAC neden avantajlıdır ?

- YAC'lar çeşitli nedenlerden ötürü vektör olarak kullanılır.
- Bu nedenlerden birisi, farelerin eşey hücrelerine gen aktarımının verimliliğini artırmaktır.
- Transgenik fare oluşturmak için ilk adım, döllenmiş yumurta ya da embriyonik kök hücre gibi uygun bir fare hücresi çekirdeğine rekombinant YAC'ın aktarılmasıdır.

YAC aktarımı

- Bunu daha sonra DNA'nın kromozoma katılması takip eder.
- YAC'lar farelere çeşitli yollarla aktarılır.
- Birincisi, saf YAC DNA'sının fare yumurta hücresine mikroenjeksiyon yoluyla sokulmasıdır.

Mikroenjeksiyon



ŞEKİL 19-16 Klonlanmış DNA memeli yumurta hücreesine (oosite) doğrudan, enjeksiyonla aktarılabilir.

YAC aktarımı

- Transgenik zigot daha sonra, gelişmesi için üvey anneye implante edilir.
- İkincisi, YAC'lar aynı zamanda fare embriyonik kök hücrelerine (embryonic stem ; ES) aktarılır.
- Bu transgenik ES hücreleri daha sonra, erken dönem fare embriyo hücrelerine aktarılır.
- Orada eşey hücreleri de dahil yetişkin dokuların oluşumuna katılması sağlanır.

Retrovirüsler ile memelilere aktarım

- Memeli hücreleri için kullanılan diğer vektörler, genetik mühendisliği ile oluşturulmuş olan kuş ve fare retrovirüsleridir.
- Bu retrovirüslerin tamamı tek zincirli RNA'dan oluşur.

Retrovirüsler ile memelilere aktarım

- Konak hücreyi enfekte ettikten sonra RNA, revers transkriptaz enzimi ile çift zincirli DNA (çzDNA, dsDNA) molekülüne çevrilir.
- Bu çzDNA, konak genomuna katılır.
- Hücre bölünmesi sırasında yavru hücrelere aktarılır.

Retrovirüsler ile memelilere aktarım

- Retroviral genomu, çok sayıda virüs geninin çıkarılmasıyla, yabancı DNA'yı taşıyacak vektörler haline getirilir.
- Bu vektörler, genetik hastalıkların tedavisinde (gen terapisi) kullanılır.

Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- 1986 yılında, polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction ; PCR) adı verilen diğer bir teknik geliştirilmiştir.
- PCR, DNA klonlaması için hızlı bir tekniktir.
- Bu nedenle rekombinant DNA araştırmalarının gücü artmış ve DNA klonlamak için konak hücre gereksinimini ortadan kaldırmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- Hücreye dayalı klonlama hala kullanılmasına rağmen, PCR; moleküler biyoloji, insan genetiği, evrim, gelişme biyolojisi, koruma ve adli tıp gibi birçok alanda kullanılan bir yöntemdir.
- PCR, bir seri *in vitro* reaksiyon boyunca özgül bir DNA dizisinin bir çok kopyasını yapar.
- Farklı DNA molekülleri karışımında, yok denecek kadar az miktarda bulunan hedef DNA dizisini çoğaltabilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- PCR için ön koşul, klonlanacak DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgilerin gerekliliğidir.
- Dizi bilgisi, iki oligonükleotit primerin sentezi için kullanılır:
- Klonlanacak DNA dizisinde, biri 5' ucu için, diğeri de 3' ucu için olmak üzere iki primer gereklidir.
- Tek zincirli duruma getirilmiş bir DNA örneğine primerler ilave edilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- Primerler klonlanacak dizideki eşlenik nükleotitlere bağlanır (hibridizasyon).
- Hibridizasyondan sonra ortama ısıya dayanıklı DNA polimeraz ilave edilir.
- DNA'nın ikinci zinciri sentezlenir.
- Bu adımların tekrarıyla DNA'nın bir çok kopyası oluşturulur.

PCR'nin basamakları

- Pratikte, PCR'da üç adım vardır.
- 1. Klonlanacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir.

PCR'nin basamakları

- Bu DNA;
 - Genomik DNA,
 - Mumya kalıntıları,
 - Fosiller,
 - Kurumuş kan,
 - Semen gibi adli örnekler,
 - Tek bir saç teli, ya da
 - Tıbbi kayıtlara ait kurumuş örnekler gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir.

PCR'nin basamakları

- Çift zincirli DNA'nın 90-95 °C'de ısıtılması onu tek zincirli hale getirerek denatüre eder (genellikle yaklaşık 5 dakika süre ile).
- 2. Sıcaklık 50 °C ila 70 °C arasında bir değere düşürülür.
- Bu birleşme (annealing) sıcaklığında primerler tek zincirli DNA'ya bağlanır.
- Primerler yapay oligonükleotidlerdir (15-30 nükleotit uzunluğunda).
- Çoğaltılacak hedef DNA'nın uçlarındaki dizilere eşleniktir (komplementer).

PCR'nin basamakları

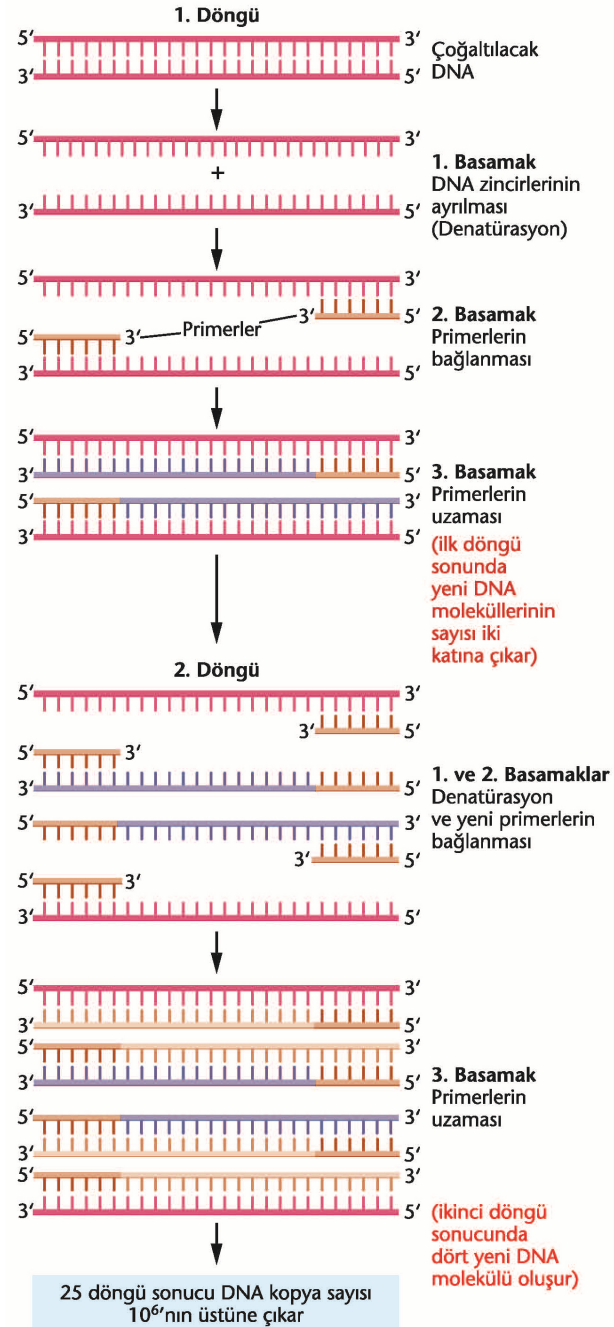
- Primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.
- 3. DNA polimeraz'ın ısıya dayanıklı bir formu (Taq polimeraz) reaksiyon karışımına ilave edilir.
- DNA sentezi 70 °C ila 75 °C arasında gerçekleşir.
- Taq polimeraz, nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar.
- Hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını yapar.

PCR'nin basamakları

- Üç basamaklı her reaksiyon seti;
 - Çift zincirli DNA'nın tek zincirli hale getirilmesi (denatürasyon, denaturation),
 - Primerlerin bağlanması (annealing, annealing) ve
 - Polimeraz enzimi ile zincirin uzaması (ekstensiyon, extencion) basamaklarından oluşur.

PCR'nin basamakları

- PCR bir zincir reaksiyonudur.
- Çünkü, yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar.
- Eski zincirlerle beraber yeni zincirler de bir sonraki döngüde kalıp görevi görür.
- Yaklaşık beş dakika süren bir döngü birçok kez tekrar edilir.
- Üç saatten daha az bir zamanda (25-30 döngü sonunda), DNA miktarı milyon kattan daha fazla artar.



Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- Bu işlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları otomatik olarak programlanarak gerçekleştirilir.
- Bu sayede;
 - Klonlama,
 - Dizi analizi,
 - Klinik tanı ve
 - Genetik taramalargibi birçok amaç için kullanılan özümlü DNA dizileri bol miktarda elde edilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- PCR ile yapılan klonlama işlemi hücre-temelli klonlamadan daha avantajlıdır.
- PCR hızlıdır ve konak hücre ile yapılan klonlama işlemleri günler sürerken, PCR ile yapılan klonlama birkaç saat içinde tamamlanır.
- İlave olarak, PCR primerleri, bilgisayar program destekli aletlerde yapılır.

PCR'nin kullanıldığı alanlar

- Ticari olarak sentezlenmesi de ucuz ve ekonomiktir.
- PCR çok hassastır; örneğin, tek bir hücrenin içindeki çok küçük miktarlardaki özümlü DNA dizisini çoğaltabilir.
- PCR'in bu özelliği onun, genetik testler, adli vakalar ve moleküler paleontoloji gibi birçok alandaki değerini paha biçilmez yapar.

Polimeraz zincir reaksiyonu konak hücre olmadan DNA kopyaları yapar

- Kısmen parçalanmış, başka maddelerle bulaşmış ya da herhangi gibi bir ortamda gömülü olan ve dolayısıyla klasik metodlarla klonlanması zor hatta imkansız olan DNA örnekleri de kullanılabilir.

PCR'nin sınırları

- PCR çok değerli bir teknik olmasına rağmen, onun da bazı sınırları vardır.
- Hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler bilinmelidir.
- Diğer DNA kaynaklarından çok küçük bir miktarda bir bulaşma bile sorunlara neden olabilir.

PCR'nin sınırları

- Örneğin, araştırmacıdan dökülebilecek deri parçaları bir fosilden ya da suç mahallinden alınan DNA örneğine bulaşabilir ve doğru sonuç alınması engelleyebilir.

PCR'nin diğer uygulamaları

- PCR ile DNA klonlaması moleküler biyoloji ve genetikte en çok kullanılan tekniklerden birisidir.
- PCR yöntemi ile gen haritalaması çalışmalarında genetik belirteç (marker) olarak kullanılan ardışık tekrarlanan DNA dizi varyasyonları ve restriksiyon enzimi tanıma dizisi değişiklikleri kolayca saptanabilir.
- Gene-özel primerler, genomik DNA'daki mutasyonların taranması ve buna bağlı olarak da mutasyonun doğasının kolaylıkla saptanmasını sağlar.

PCR'nin diğer uygulamaları

- Rastgele primerler (random primers) DNA'yı ayırım yapmadan çoğaltır.
- Özellikle bilinen bir bölgeye komşu olan karakterize edilmemiş bir DNA bölgesine araştırmak için uygundur.
- PCR belirli balina türlerine ait ürünlerin dünya çapında satılması yasağını uygulamak için ve saf kan köpeklerin soyağacı geçmişleri ile ilgili tartışmaları çözmek için de kullanılmaktadır.
- Kısaca PCR, modern genetiğin birçok alanında en fazla kullanılan bir tekniktir.

Kütüphaneler klonlanmış dizilerin bir koleksiyonudur

- Bir organizmanın genomunun küçük bir kısmını elde edebilmek için bile büyük klon koleksiyonlarına ihtiyaç vardır.
- Tek bir bireyden türeyen klon DNA takımı bir klon kütüphanesidir.
- Bu kütüphaneler tüm genomu, tek bir kromozomu ya da tek bir hücrede ifade olan genler takımını temsil eder.

Genomik kütüphaneler

- Bir genomik kütüphane, bir organizmanın genomundaki tüm diziler bulunur.
- Genomik kütüphaneler, konak hücre klonlama yöntemleri kullanılarak hazırlanır.
- Çünkü, PCR ile klonlanmış DNA parçaları göreceli olarak oldukça küçüktür.
- Genomik kütüphane yaparken, DNA, hücrelerden ya da dokulardan ayrıştırılır.

Genomik kütüphaneler

- Restriksiyon enzimleri ile kesilir ve parçalar vektörlere takılır.
- Bazı vektörler (plazmitler gibi) sadece bir kaç bin bp büyüklüğünde yabancı DNA taşıdığı için, genomik kütüphanenin hazırlanmasında tüm genomu en az sayıda klonlarla oluşturabilecek uygun vektör seçimi önemlidir.

İnsan genom kütüphanesi hazırlamak

- İnsan genomundaki tüm dizileri %99 oranında içerecek kadar büyük bir insan genomu kütüphanesi hazırlamak istediğinizi varsayın.
- İnsan genomu çok büyük olduğundan böyle bir kütüphanenin hazırlanmasında öncelikle vektör seçimi dikkate alınmalıdır.

İnsan genom kütüphanesi hazırlamak

- Eğer ortalama taşıma büyüklüğü 5 kb olan plazmit vektörleri kullanarak bir kütüphane oluşturursak, genomdaki herhangi bir diziyi %99 olasılıkla alabilmemiz için 2.4 milyondan fazla klon ihtiyaç vardır.
- Büyüklüğünden ötürü bu kütüphanede ilgili gen için etkin bir tarama yapmak oldukça güçtür.
- Taşıma büyüklüğü ortalama 17 kb olan faj vektörleri kullanılacak olursa, bu durumda herhangi bir insan dizisini %99 olasılıkla bulmak için 800.000 klon gereklidir.

İnsan genom kütüphanesi hazırlamak

- Bu miktar plazmit kütüphanesinden çok daha az olmasına rağmen bu büyüklükteki faj kütüphanesinin taranması işlemi hala aşırı yoğun iş gücü gereken sıkıcı bir iştir.
- Ancak kütüphane, ortalama yabancı DNA taşıma kapasitesi 1Mb olan YAC vektörle hazırlanırsa, kütüphane taranma işlemi görece daha kolay olan sadece 14.000 YAC'tan oluşur.
- YAC gibi büyük klonlama kapasitesine sahip vektörler İnsan Genom Projesinin temel parçasını oluşturur.

Kromozom-özel kütüphaneler

- Genomun büyük parçasından, örneğin tek bir kromozomdan oluşan bir kütüphane, özel genlerin klonlanmasında ve kromozom organizasyonu çalışmalarında büyük önem taşıyabilir.
- *Drosophila*'da X kromozomunun yaklaşık 50 politen bandına karşılık gelen küçük bir parçası mikro ayrıştırım ile izole edilmiştir.

Kromozom-özel kütüphaneler

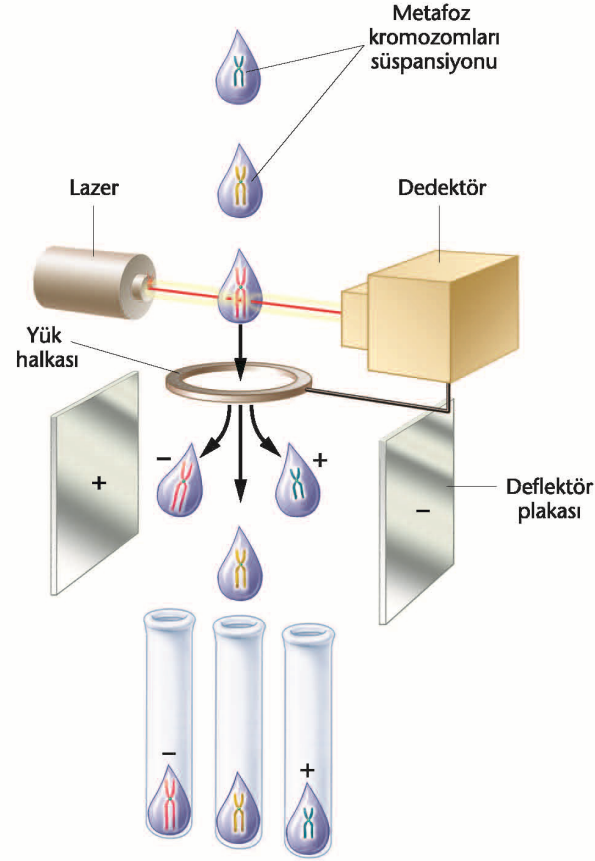
- Bu kromozomal parçadaki DNA ayrıştırılmış, bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve lambda vektörüne klonlanmıştır.
- Bu X kromozomu bölgesi; white, zeste ve Notch genlerinin yanı sıra;
- Bir kromozom parçasını, genomda dağılmış 100'den fazla bölgeye taşıyabilen ve yer değiştirebilen bir elementin (elementin) (transposable element) girme (insersiyon) bölgesini içerir.

Kromozom-özel kütüphaneler

- Teknik açıdan zor olmasına rağmen, bu işlem sonucu, sadece ilgili genleri ve onlara komşu olan genleri içeren bir kütüphane hazırlanmıştır.
- Her bir insan kromozomundan hazırlanan klonlanmış kütüphaneler, akış sitometri (flow cytometry) denen bir teknikle oluşturulur.

Flow cytometri ile kromozomların ayrıştırılması

- Her bir kromozomu elde etmek için mitotik hücreler toplanır.
- Metafaz kromozomları, floresan boyalar ile boyanır.
- Boyanan kromozomlar, lazer ışın demetinin önünden geçirilerek ışımaları sağlanır.
- Bir fotometre onları bağladıkları boya ve yaydıkları ışınlara göre ayırarak gruplandırır.



ŞEKİL 19–18 Kromozom sınıflamasında, metafaz kromozomları iki floresan boya ile boyanır; biri AT baz çiftlerini boyarken diğeri GC baz çiftlerini boyar. Boyanmış kromozomları içeren mikrodamlalar, boyaların floresan ışımalarını indükleyen lazer önünden geçirilir. İki boyanın birleşimi ile yayılan floresan, her bir kromozoma özgü sinyaller oluşturur ve bu sinyaller bir dedektör tarafından okunur. Damlalar halkanın içinden akarken, taşıdığı kromozoma bağlı olarak elektrik yüküyle yüklenir. Damlalar onları küçük tüplere yönlendiren deflektör plakalarının önünden geçerler ve bu şekilde ayrı tüplerde toplanan kromozomlar kromozoma özgü kütüphane oluşturmak için DNA kaynağı olarak kullanılır.

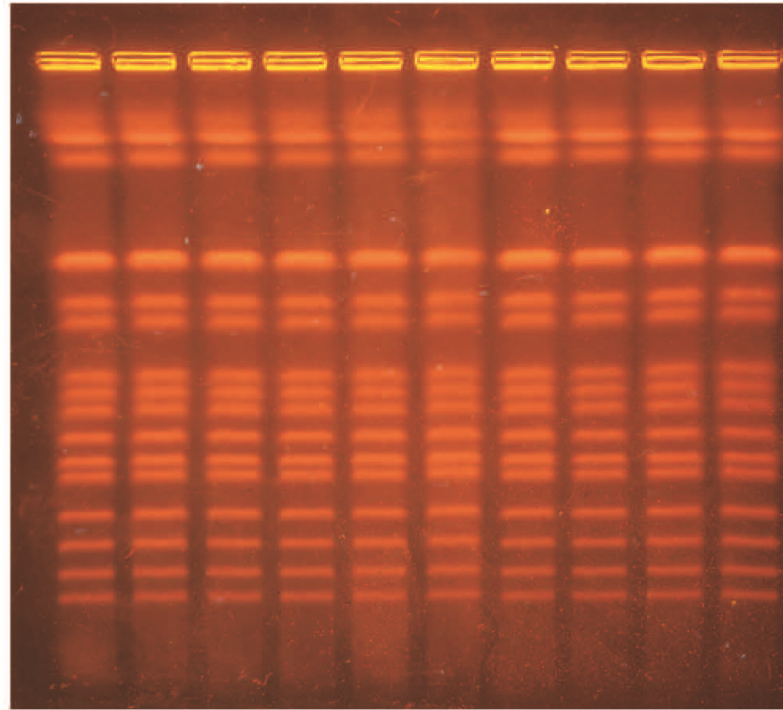
Kromozom-özel kütüphaneler

- Kromozomlar izole edildikten sonra DNA ayrıştırılır.
- Restriksiyon enzimi ile kesilir ve DNA parçaları bir vektöre klonlanır.
- İnsan kromozomlarının her biri için klon kütüphaneleri hazırlanmış ve kütüphaneler İnsan Genom Projesinde önemli rol oynamıştır.

Pulsed-field elektroforezi

- Diğer yöntemler kullanılarak da kütüphane hazırlamak için her bir kromozom saflaştırılabilir.
- Pulsed-field (atımlı-alan) jel elektroforezi olarak bilinen bir elektroforez çeşidi, kromozoma özgül kütüphanelerin hazırlanabilmesi için maya kromozomlarının izolasyonunda kullanılmıştır.

Pulsed-field elektroforezi



ŞEKİL 19–19 Atımlı jel elektroforezi (pulsed field gel electrophoresis) yöntemiyle ayrıştırılmış maya kromozomları. Her bir hatta, en büyük olanı tepede olmak üzere, büyüklüklerine göre ayrılmış 16 maya kromozomundan 15'i görölmektedir.

Pulsed-field elektroforezi: Maya Genom Projesi

- Mayanın III. kromozomunun (315kb) klon kütüphanesinin oluşturulması Maya Genom Projesinin başlangıç noktası olmuştur.
- Bu kromozomu ve maya genomunun geriye kalan dizilerinin analizi bir laboratuvarlar konsorsiyumu tarafından gerçekleştirilmiştir.
- Kromozom III'ün dizi analizinin beklenmeyen sonuçlarından biri, bu kromozomdaki genlerin yaklaşık yarısının daha önceden bilinmediğinin ortaya çıkarılmasıdır.

Tek kromozom kütüphaneleri

- Mutagenез ve genetik analizler gibi klasik metotların başarısız olduğu ve mRNA problemlerinin ya da gen ürünlerinin olmadığı ya da bilinmediği durumlarda, bir genetik bölgenin incelenmesinde tek-kromozom kütüphaneleri çok değerlidir.
- Ayrıca, kromozom-öзгöl kütüphaneler, genomdaki belirli bir bölgedeki moleküler organizasyonunda, hatta nükleotid dizisi çalışmalarında da büyük yarar sağlamaktadır.

cDNA kütüphaneleri: Aktif mRNA'ların tespiti

- Gelişim, hücre ölümü, kanser ve diğer biyolojik süreçlerdeki özgül olayları çalışmak için belirli bir zamanda belirli bir hücre tipinde ifade olan genomun belirli kısımlarına ait bir kütüphane çok değerli bir araç olabilir.
- Genomik kütüphaneler ve kromozom kütüphaneleri bir genomdaki ya da bir kromozomdaki tüm genleri içerir.
- Fakat bu koleksiyonlar bir hücredeki transkripsiyonel olarak aktif olan genleri bulmak için doğrudan kullanılmaz.

cDNA kütüphaneleri: Aktif mRNA'ların tespiti

- Bir cDNA kütüphanesi, belirli bir zamanda, hücre topluluğunda bulunan ve kütüphanenin hazırlandığı zaman hücrede transkripsiyonel olarak aktif olan genlere ait mRNA moleküllerinden yapılan DNA kopyalarını içerir.
- Burada elde edilen DNA, mRNA'nın nükleotit dizisine eşleniktir (komplementer).

cDNA kütüphaneleri: Aktif mRNA'ların tespiti

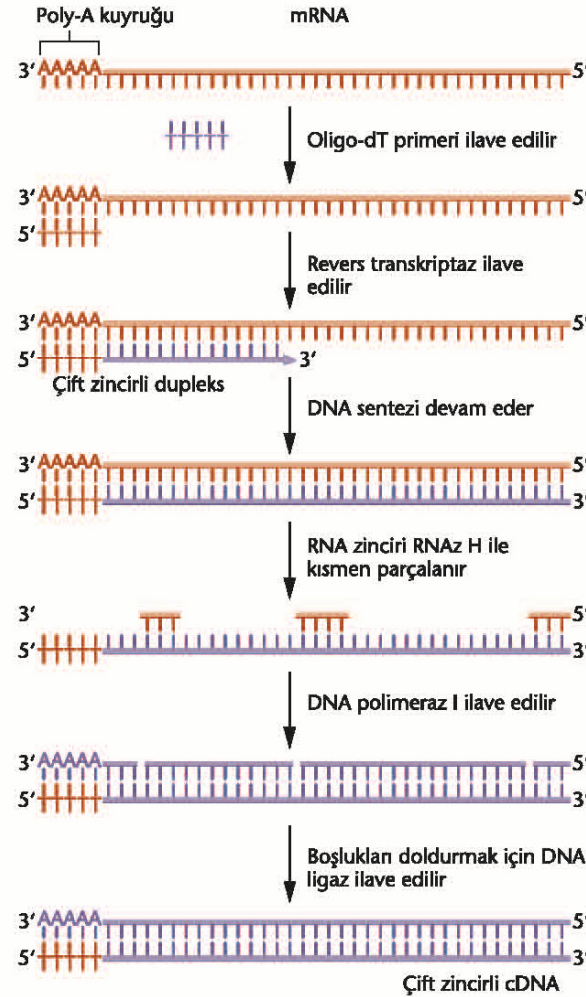
- cDNA kütüphanesindeki klonlar genomik kütüphanedeki klonlarla aynı değildir.
- Ökaryotik mRNA öncül mRNA'nın işlenmesiyle ortaya çıkar.
- İşlenme sırasında intron dizileri ortadan kaldırılmaktadır.
- Ayrıca, genlerin yakınında yerleşim gösteren ve genin aktivitesini düzenleyen dizileri de içermez.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

- cDNA kütüphanesinin oluşturulması bir hücre topluluğundan mRNA izolasyonu ile başlar.
- Hemen hemen tüm ökaryotik mRNA molekülleri 3' uçlarında poli-A kuyruğu taşıdıkları için mRNA izolasyonu mümkündür.
- Poli-A kuyruğu olan mRNA'lar ayrıştırılır ve komplementer DNA molekülünün (cDNA) sentezi için kalıp olarak kullanılır.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

- cDNA molekülleri daha sonra vektörlere klonlanarak belirli bir zamanda transkripsiyonel olarak aktif olan genleri gösteren cDNA kütüphaneleri oluşturulur.
- cDNA kütüphanesi yapmak için ilk adım, poli-A kuyrukları olan mRNA'ları, poli-A kuyrukları ile birleşerek kısmi çift zincirler oluşturan oligo-dT primerleri ile karıştırmaktır.



ŞEKİL 19-20 mRNA'dan cDNA hazırlanması. Birçok ökaryotik mRNA, 3' uçlarında değişik uzunlukta çoklu adenin kuyruğu (A) içerdiğinden, kısa bir oligo-dT buraya bağlanabilir ve revers transkriptaz enzimi için primer görevi görür. Revers transkriptaz, tamamlayıcı DNA zincirinin sentezi (cDNA) için mRNA'yı kalıp olarak kullanır ve bir mRNA/cDNA çift zincirli molekülü oluşturur. mRNA, RNAz H enzimi ile RNA zincirinde çentikler oluşturularak parçalanır. Kalan RNA'nın 3' ucu, DNA polimerazın ikinci DNA zincirini sentezleyebilmesi için primer olarak görev görür. Sonuçta bir kütüphaneyi taramak için prob olarak kullanılmak üzere ya da uygun bir vektöre klonlanmak üzere çift zincirli cDNA molekülü oluşur.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

- Revers transkriptaz (geri transkriptaz) adı verilen enzim, primerleri uzatır.
- mRNA dizisinin komplementeri olan DNA kopyasını sentezler.
- Bu reaksiyonun ürünü mRNA-DNA çift zinciri olan melez bir moleküldür.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

- RNAz H enziminin işlevi ile RNA zincirinde kesikler oluşturularak RNA'nın kısmi parçalanması sağlanır.
- Geriye kalan RNA parçaları DNA polimeraz I ikinci DNA zincirini sentezler.
- RNA primerlerini uzaklaştırarak çift zincirli cDNA oluşturur.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

- cDNA molekülünün ucuna bağlayıcı (linker) dizileri takılırsa, cDNA, bir plazmit ya da faj vektöre klonlanabilir.
- Linker dizileri bir restriksiyon enziminin (ör. EcoRI) tanıma dizisini içeren, kısa çift zincirli oligonükleotitlerdir.
- Bağlayıcı dizi cDNA'ya takıldıktan sonra EcoRI ile kesilir.
- Aynı enzimle işlem görmüş vektörle birleştirilir.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulması

- Gelişimin özgül aşamalarındaki doku ve hücrelerden ya da beyin, kas, böbrek gibi farklı organlardan hazırlanmış birçok cDNA kütüphaneleri vardır.
- Bu kütüphaneler, belirli bir zamanda, bir hücrede aktif olan tüm genlere ait hazır bir katalogdur.

RT-PCR ile kütüphane oluşturulması

- Bir cDNA kütüphanesi, PCR'nin bir çeşidi olan revers transkriptaz PCR (RT-PCR) yöntemi kullanarak da hazırlanabilir.
- Bu işlemde, revers transkriptaz, mRNA moleküllerinin tek zincirli cDNA kopyalarını oluşturur.
- Bu reaksiyonu, PCR ile tek zincirli DNA'nın çift zincirli moleküle çevrilmesi ve birçok kopyasının oluşturulması işlemi takip eder.
- Tek zincirli cDNA'ya Tag polimeraz ve rastgele primerler (random primers) (belirli bir gene özgül olmayan) ilave edilir.

RT-PCR ile kütüphane oluşturulması

- Primerlerin bağlanmasından sonra Tag polimeraz primerleri uzatarak çift zincirli cDNA yapar.
- PCR'in ilave döngüleri ile cDNA'nın birçok kopyası oluşturulur.
- Çoğaltılan cDNA , plazmit vektörlere klonlanarak cDNA kütüphanesi elde edilir.

RT-PCR ile kütüphane oluşturulması

- RT-PCR, klasik cDNA hazırlanmasından daha duyarlıdır.
- Hücrede sadece bir ya da iki kopya bulunan mRNA'ları belirlemek için güçlü bir araçtır.

Özgül klonlar bir kütüphaneden elde edilebilir

- Bir genomik kütüphane genellikle yüzbinlerce klondan oluşur.
- Özgül bir geni bulmak için, sadece bu geni içeren klon ya da klonları belirlememiz ve ayrıştırmamız gerekir.
- Ayrıca, klonun çalışacağımız genin tamamını mı yoksa bir kısmını mı içerdiğini de saptamamız gerekir.

Problar özgül klonları saptar

- Problar, özgül bir gene ait klonları elde etmek amacıyla bir kütüphaneyi taramak için kullanılır.
- Prob, kütüphanedeki klonlanmış bir dizinin bir kısmına eşlenik (komplementer) olan ve bir şekilde işaretlenmiş DNA ya da RNA dizileridir.
- Hibridizasyon reaksiyonunda kullanılan prob, bir ya da daha fazla klonda bulunan komplementer DNA dizlerine bağlanır.

Problar özgül klonları saptar

- Bir kütüphanedeki özgül klonun yerini saptamak için problar radyoaktif izotoplarla ya da kimyasal veya renk reaksiyonuna giren bileşiklerle işaretlenebilir.
- Problar çok çeşitli kaynaklardan hazırlanabilir.
- Hatta, eğer DNA dizisi türler arasında büyük oranda korunmuş ise, ilgili gen diğer türlerden ayrıştırılıp, elde edilerek, prob olarak kullanılabilir.

Problar özgül klonları saptar

- Örneğin, Afrika tırnaklı kurbağası *Xenopus laevis*'e ait ribozomal RNA genleri santrifüj ile ayrıştırılır ve plazmit vektörlere klonlanır.
- Eğer bir genomik kütüphaneden, belirli bir tip hücrede ifade olan bir gen elde edilecekse, cDNA probları kullanılabilir.
- Bu teknik, bir gen ürününün mRNA'sının elde edilmesinde özellikle çok yararlıdır.

Problar özgül klonları saptar

- Örneğin, kırmızı kan hücrelerinin belirli gelişim aşamalarında, β -globin mRNA konsantrasyonu çok fazladır.
- Bu hücrelerden elde edilen mRNA, prob olarak kullanmak için revers transkriptaz ile cDNA molekülüne çevrilebilir.

Bir kütüphanenin taranması

- Bir plazmit kütüphanesinin taranması için, klonları taşıyan bakteriler nutrient agar plaklarda üretilir.
- Yüzlerce hatta binlerce koloni oluşur.

Bir kütüphanenin taranması

- Kolonilerin kopyalarının alınması için plak yüzeyine naylon bir filtre yavaşça bastırılır.
- Bu işlem, bakteri kolonilerinin plaktan filtreye aktarılmasını sağlar.
- Filtre, bakteri hücrelerini parçalamak, parçalanan hücrelerden salınan çift zincirli DNA'yı denatüre ederek tek zincirli hale getirmek ve bu zincirleri filtreye bağlamak için işlemlerden geçirilir.

Bir kütüphanenin taranması

- Filtredeki DNA, işaretli bir nükleik asit probu ile inkübe edilerek taranır.
- Filtre üzerindeki klonlanmış DNA'lardan herhangi biri üzerindeki nükleotit dizisi prob'un tamamlayıcısı (komplementeri) ise, çift zincirli hibrit bir molekül oluşacaktır.

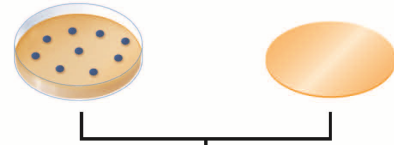
Bir kütüphanenin taranması

- Prob ile filtrenin inkübasyonundan sonra filtre yıkanarak, bağlanmamış ve/veya fazla prob molekülleri filtreden uzaklaştırılır.
- Filtrede hibrit moleküllerinin olup olmadığını saptamak üzere filtre incelenir.
- Eğer radyoaktif bir prob kullanılmış ise, filtrenin üzerine bir röntgen filmi yerleştirilir.

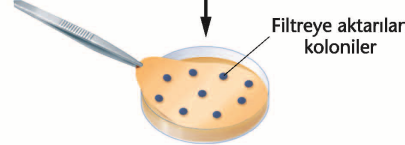
Bir kütüphanenin taranması

- Filtre üzerindeki DNA'ya bağlı prob'daki radyoaktif ışımaya, banyo edildiğinde koyu lekeler oluşturacak şekilde röntgen filmine yansır.
- Bu lekeler, klonlanmış ilgili geni içeren plaktaki kolonileri göstermektedir.
- Film üzerindeki lekelerin konumlarını rehber olarak, ilgili geni içeren bakteri kolonisi orijinal nutrient plakta belirlenir ve plaktan alınır.

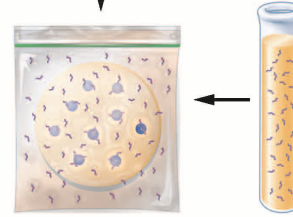
1. Plazmit kütüphanesinin kolonileri üzerine DNA-bağlayan filtre konur



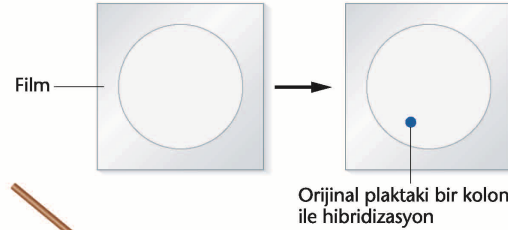
2. Koloniler filtreye aktarılır ve sonra parçalanır ve DNA (denatüre) edilir.



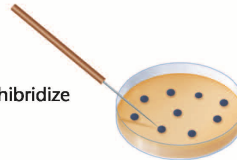
3. Filtre içinde işaretli probun bulunduğu çözelti içeren bir torbaya konur, torbanın açıklığı ısıyla yapıştırılarak kapatılır, prob kolonilerdeki denatüre DNA ile hibridize olur



4. Fazla probu uzaklaştırmak için filtre yıkanır, sonra kurutulur, otoradyografi için üzerine röntgen filmi konur



5. Orijinal plak kullanılarak, proba hibridize olan kolonilerden hücreler alınır



6. Hücreler üretilmek ve ileri analizler yapmak için bir besiyerine aktarılır



ŞEKİL 19-21 Klonlanan geni bulmak için bir plazmit kütüphanesinin taranması. Kütüphanenin bulunduğu petri kabındaki bakterilerin üzerine, DNA-bağlayan filtre kağıdı konur ve koloniler filtre kağıdına aktarılır. Filtre kağıdındaki koloniler parçalanır ve açığa çıkan DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Filtre kağıdı, bir tampon çözeltiyle beraber hibridizasyon torbasına konur ve işaretli tek zincirli prob ilave edilir. İnkübasyon sırasında prob, filtre kağıdı üzerinde kendisinin tamamlayıcısı olan dizilerle birleşerek çift zincirli melez (hibrit) molekül oluşturur. Filtre kağıdı torbadan çıkarılır ve fazla probu uzaklaştırmak için yıkanır. Hibrit molekülleri tespit etmek için filtre kağıdının üzerine bir röntgen filmi konarak kısa bir süre beklenir. Film banyo edilir ve hibridize olan bölgeler film üzerinde koyu noktalar olarak görünür. Film üzerindeki noktaların orijinal petri kabındaki yerlerine göre, prob ile hibridize olan yabancı DNA parçasını içeren koloniler belirlenir. Bu koloniden alınan hücreler yeni besi yerlerinde tekrar üretilir ve daha ileri analizler için kullanılır.

Plak hibridizasyonu

- Faj kütüphanesini taramak için kullanılan farklı bir yöntemdir.
- DNA parçasını taşıyan faj çözeltisi, plakta üreyen bakterilerin üzerine yayılır.
- Fajlar, plaktaki bakteri hücrelerini enfekte ederler ve kendilerini eşlerken plak oluştururlar.

Plak hibridizasyonu

- Her plak, parlak ve belirgin noktalar halinde görünür.
- Tek bir fajdan meydana gelmiş nesilleri temsil eder ve dolayısıyla bir klondur.
- Bu plaklar naylon membranlara aktarılır.

Plak hibridizasyonu

- Fajlar parçalanır ve filtre üzerindeki DNA tek zincirli hale getirilip işaretli prob ile hibridize edilerek taranır.
- Faj plakları plazmit kolonilerinden çok daha küçüktürler.
- Tek bir filtre ile çok daha fazla plak taranabildiğinden, büyük genomik kütüphaneler için bu metot daha uygundur.

Klonlanmış diziler çeşitli yollarla tanımlanabilir

- Klonlama ya da PCR ile genlerin ve diğer özgül DNA bölgelerinin elde edilebilmesi ve tanımlanabilmesi, genomik yapı ve fonksiyon çalışmalarını için önemli bir araç olmuştur.
- İnsan Genom Projesi bu tip tekniklere dayanmaktadır.

Restriksiyon haritalaması

- Bir klon DNA'nın tanımlanmasındaki ilk adım, bir restriksiyon haritasının çıkarılmasıdır.
- Restriksiyon haritası;
 - Klonlanmış bir DNA parçası üzerindeki restriksiyon enzimi kesim bölgesinin sayısını,
 - Sıralanışını ve
 - Aralarındaki uzaklıkları ortaya çıkarır.

Restriksiyon haritalaması

- Klonlanmış farklı DNA'lara ait restriksiyon haritaları, genellikle, söz konusu klon için bir kimlik görevi görecek kadar farklıdır.
- Harita birimleri; baz çifti (bç) (base pairs, bp) olarak ya da daha uzun mesafeler için kilobaz (kb) çifti (kilobase, kb) olarak ifade edilir.
- Restriksiyon haritaları, klonlanan DNA parçasının uzunluğu ve restriksiyon enzim kesim bölgelerinin yerleri hakkında da bilgi sağlar.

Restriksiyon haritalaması

- ❑ Bu bilgi, bir gen parçasının tekrar klonlanmasını ya da klonlanmış parçanın iç organizasyonunu klonlanmış diğer dizilerinki ile karşılaştırılmasını sağlar.
- ❑ DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu oluşturulan parçalar jel elektroforezi ile ayrılabilirler.

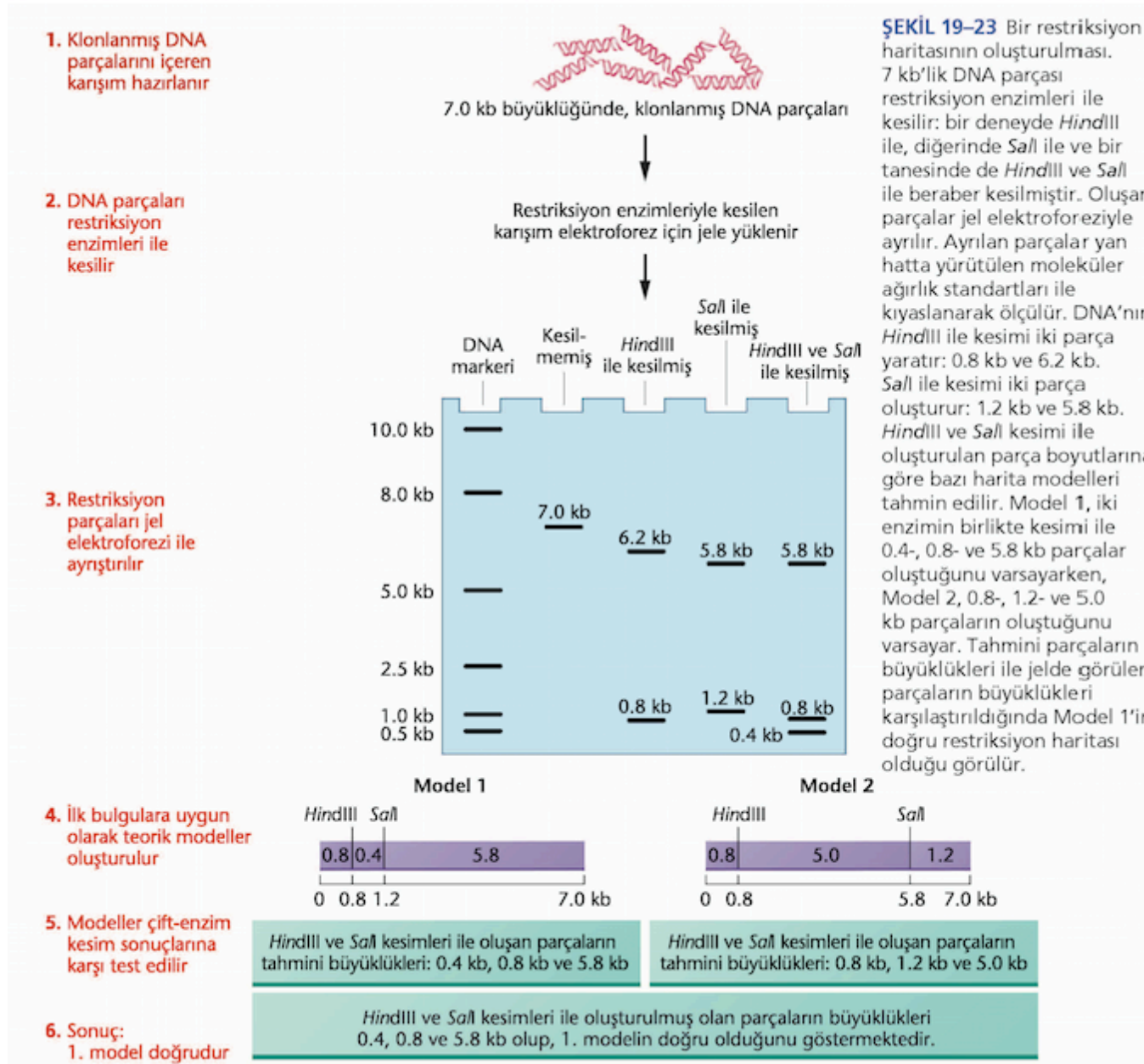
Restriksiyon haritalaması

- ❑ Bu metot, DNA parçalarını büyüklüklerine göre ayırır.
- ❑ Küçük parçalar daha hızlı hareket ederler.
- ❑ Jelde ayrılan DNA parçaları etidyum bromür ile boyanıp, ultraviyole ışığı altında incelendiğinde, bir seri bantlar halinde görünürler.

Restriksiyon haritalaması



ŞEKİL 19–22 Bir boya (etidyum bromür) ile boyanarak ultraviyole ışığı altında görüntülenen DNA parçalarının birbirlerinden ayırımını gösteren agaroz jel. Küçük parçalar daha hızlı hareket ederek büyük parçalardan daha uzağı giderler ve sonuçta parçalar birbirinden ayrılır.



Restriksiyon haritalaması

- ❑ Şekil 19-23, klonlanmış bir DNA parçasının restriksiyon haritasının oluşturulmasını göstermektedir.
- ❑ Bu harita için elimizde 7.0 kb büyüklüğünde klonlanmış bir DNA parçası olduğunu varsayalım.
- ❑ Bu DNA parçasının üç ayrı tüpte, restriksiyon enzim kesimi gerçekleştirilir.

Restriksiyon haritalaması

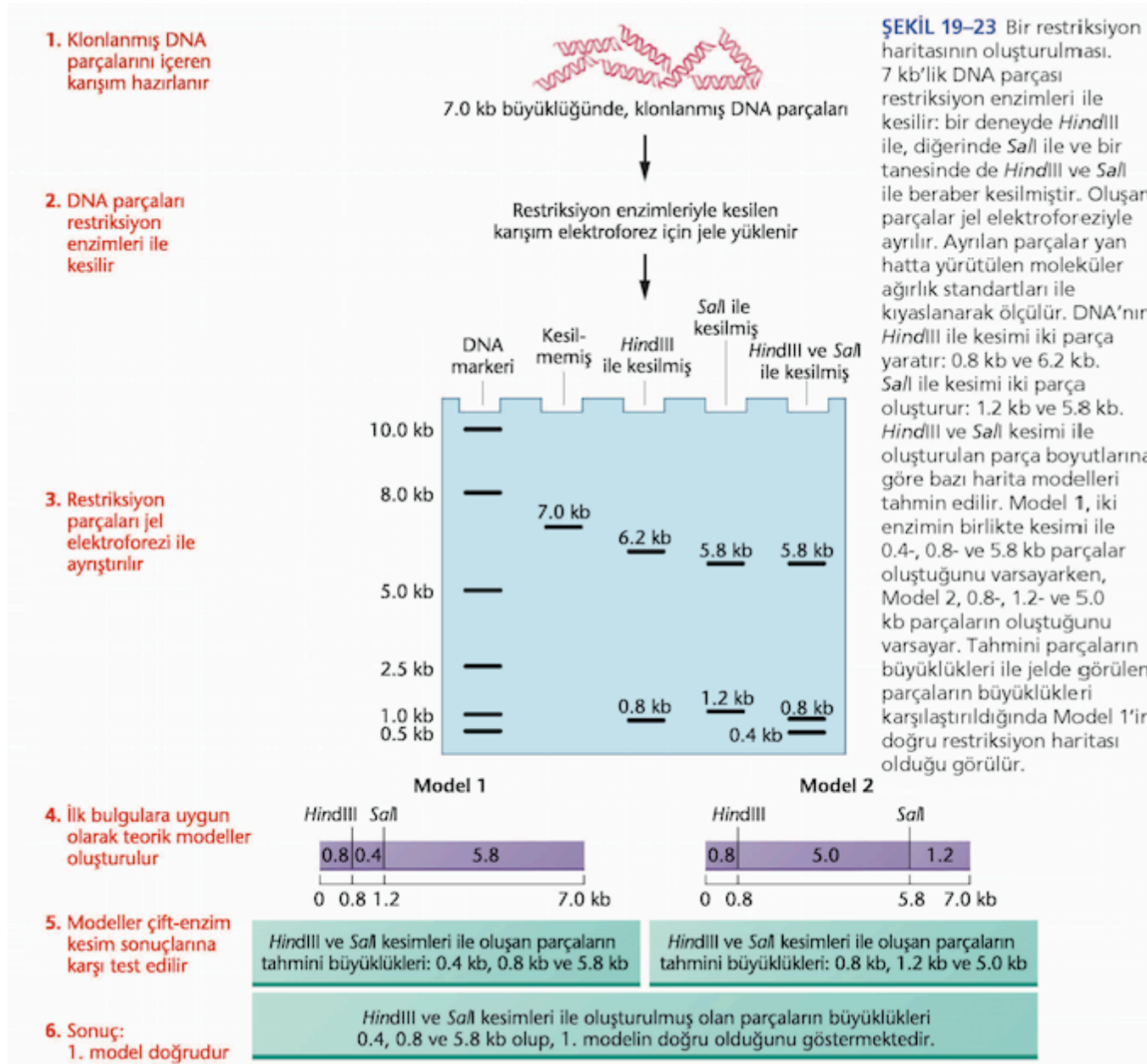
- ❑ DNA birinci tüpte Hind III, ikincide Sal I ve üçüncüde hem Hind III hem de Sal I ile kesilir.
- ❑ Kesim sonucunda oluşan parçalar jel elektroforezi ile ayrılır ve etidyum bromür ile boyanır.
- ❑ Jel üzerinde oluşan bantların resmi çekilir ya da analiz için bu bantlar taranır.

Restriksiyon haritalaması

- ❑ Parçaların büyüklüğü, aynı jelde yan hatta yürütülen moleküler ağırlık standartları ile karşılaştırılarak hesaplanır.
- ❑ Restriksiyon haritası, parçaların sayı ve büyüklük bakımından analiz edilmesiyle ortaya çıkarılır.
- ❑ DNA Hind III ile kesildiğinde, klon DNA'nın büyüklüğünün 7.0 kb olduğunu gösteren iki parça (0.8 ve 6.2 kb büyüklüğünde) elde edilir.

Restriksiyon haritalaması

- ❑ Bu bize, Hind III enziminin sadece bir kesim bölgesi (DNA'nın bir ucundan 0.8 kb uzaklıkta) olduğunu gösterir.
- ❑ DNA Sal I ile kesildiğinde, iki parça (1.2 kb ve 5.8 kb büyüklüğünde) elde edilir.
- ❑ Bu da, klonlanmış DNA parçasının bu enzim için bir uçtan 1.2 kb uzaklıkta sadece bir kesim noktası olduğunu gösterir.
- ❑ Bu sonuçlar, DNA'nın her iki enzim için birer kesim noktası içerdiğini gösterir.



Restriksiyon haritalaması

- ❑ Restriksiyon haritaları klonlanmış DNA'nın karakterizasyonu için çok önemlidir.
- ❑ Restriksiyon haritalamaları;
 - ❑ Bir genin sınırlarının belirlenmesi,
 - ❑ Gen içi ve onun etrafındaki ara bölgelerin organizasyonu ve
 - ❑ Gen içindeki mutasyon taşıyan bölgelerinin yerlerinin belirlenmesiamacıyla kullanılabilir.

Restriksiyon haritalaması

- Restriksiyon haritaları özgül kromozomlardaki insan genlerinin haritalanması ve her bir kromozomdaki yerlerinin belirlenmesinde çok önemli rol oynamıştır.

Restriksiyon haritalaması

- Diğer yandan, eğer restriksiyon tanıma dizisi mutant allel ile yakın bağlantılı ise, bu diziler;
 - Tanı testlerinde,
 - Çekinik kalıtsal bozuklukların taşıyıcılarının belirlenmesinde
 - Fetal genotipin prenatal (doğum öncesi) tanısında marker olarak kullanılabilir.

Nükleik asit blotlaması

- Buradaki tekniklerin çoğu birbirinin tamamlayıcısı (komplementeri) olan nükleik asit (DNA ya da RNA) molekülleri arasındaki hibridizasyona dayanır.

Southern blot

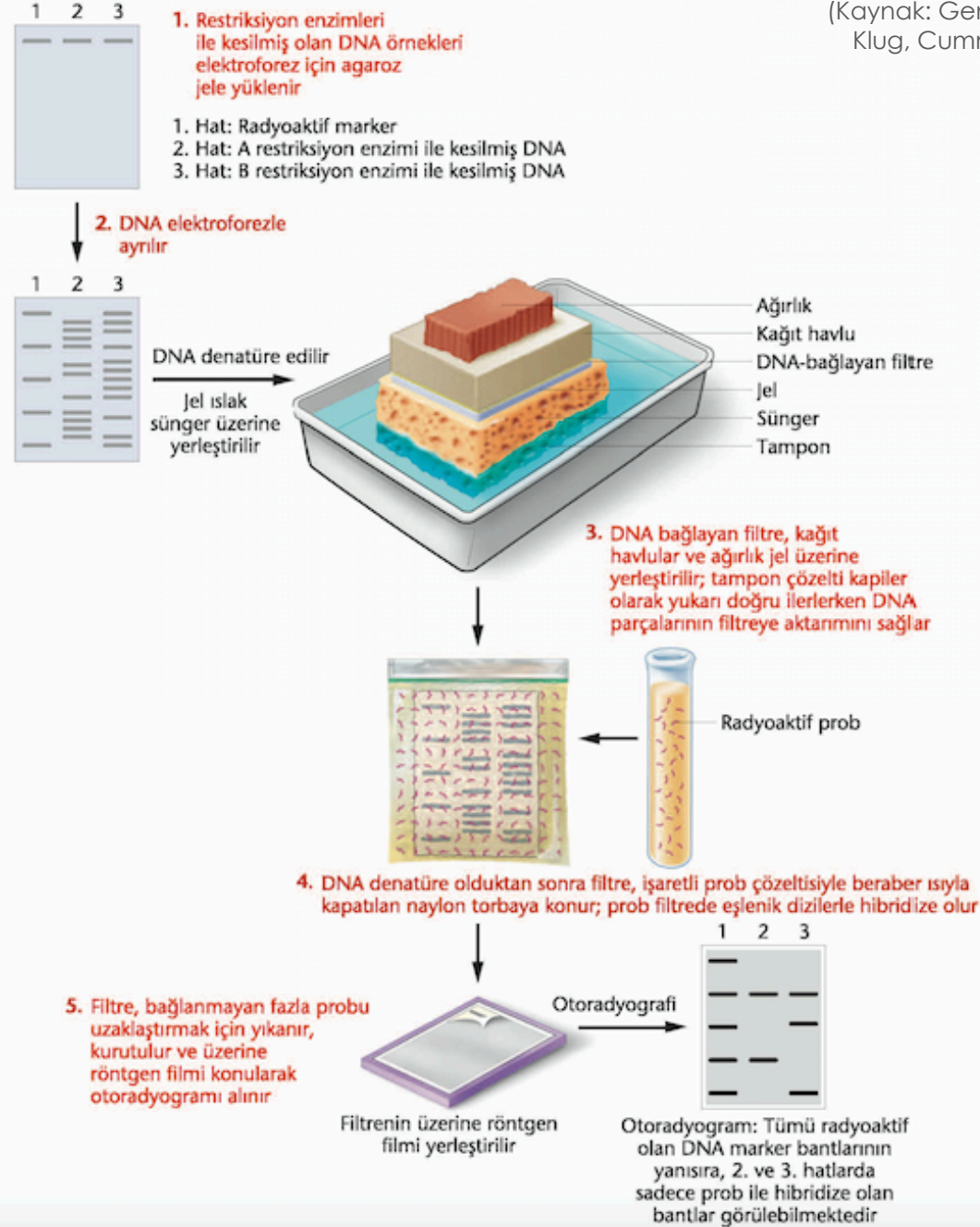
- Southern Blot yöntemi bir kütüphanedeki klonlardan hangisinin belirli bir geni (ribozomal DNA, globin geni vb. gibi) içerdiğini saptamak için kullanılır.
- Bu tekniğin iki bileşeni vardır:
 - DNA parçalarının jel elektroforezi ile ayrılması
 - Parçaların işaretli problarla hibridizasyonu

Southern blot

- ❑ Jel elektroforezi, DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucunda oluşan parçaların sayısını ve moleküler ağırlıklarını gösterir.
- ❑ Hibridizasyon, DNA parçalarındaki proba eşlenik olan dizileri gösterir.
- ❑ Southern blot hibridizasyonu ile belirlenen DNA, genomik DNA ya da bir kütüphaneden seçilmiş klonlar gibi çeşitli kaynaklara ait olabilir.

Southern blot

- ❑ Southern blot yapmak için, DNA bir ya da daha fazla restriksiyon enzim ile kesilir.
- ❑ Oluşan parçalar jel elektroforezi ile bir seri bantlar halinde ayrılır.



Southern blot

- ❑ Jeldeki DNA boyanır ve fotoğrafı çekilir ya da restriksiyon parçalarının sayısını ve moleküler ağırlığını saptamak için taranır.
- ❑ Hibridizasyon için, jeldeki DNA parçaları alkali muamelesi ile denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir.
- ❑ Daha sonra jelin üstüne, DNA bağlayan bir filtre (membran) (genellikle nitroselüloz ya da naylon) kağıt yerleştirilir.

Southern blot

- ❑ Membran ve jel, tampon çözelti içine oturtulmuş bir süngerin üzerine yerleştirilerek jeldeki DNA parçaları membrana aktarılır.
- ❑ Filtre kağıdının üzerine kağıt havlular ya da kurutma kağıtları konur.
- ❑ Onların üzerine de bir ağırlık yerleştirilir.

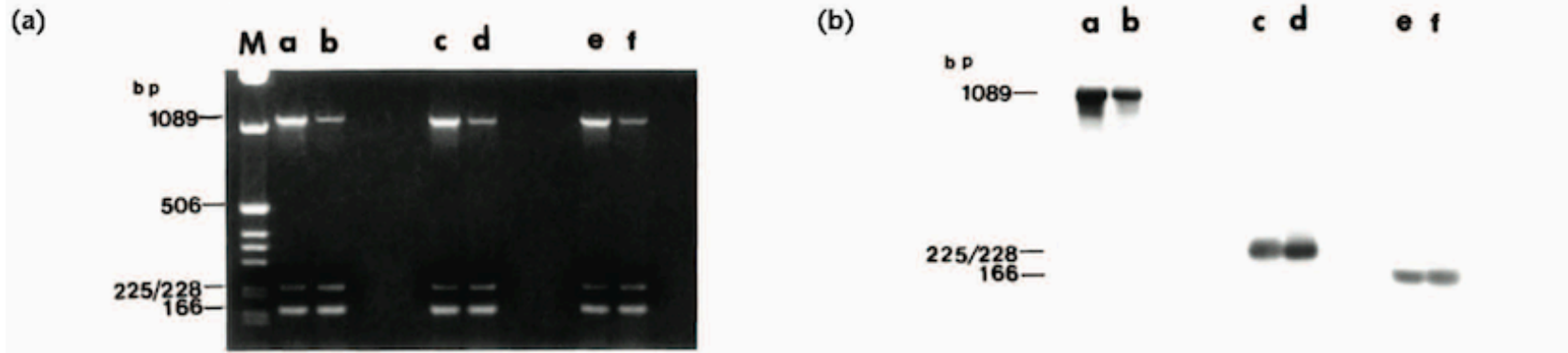
Southern blot

- ❑ Kapiler hareket tampon çözeltisini jelin içinden yukarı doğru çekerken DNA parçalarını da filtre kağıdına aktarır.
- ❑ Filtre kağıdı, hibridizasyon için tek zincirli ve işaretli prob içeren, ağız kısmı ısıyla kapatılan bir plastik torba içine konur.
- ❑ Filtre kağıdına aktarılan DNA parçalarından probun nükleotit dizisine komplementer olanlar proba birleşerek çift zincirli hibritler oluşturur.

Southern blot

- ❑ Fazla prob yıkanarak uzaklaştırılır.
- ❑ Hibridize olmuş parçalar bir film üzerinde görüntülenir.
- ❑ Böylelikle bu teknik ile, birçok DNA parçası içinden, ilgilenilen geni taşıyan tek bir parçanın belirlenmesi mümkün olabilir.

Southern blot



ŞEKİL 19–25 (a) DNA parçalarını görüntülemek üzere etidyum bromür ile boyanmış agaroz jeli. M hattı DNA boyutu markerleridir. a, c ve e hatlarında *E.coli* bakterisinin bir suşuna ait DNA vardır, b, d ve f hatlarında ise diğer suşa ait DNA bulunmaktadır. (b) (a)'daki jel ile hazırlanmış Southern blot'ın bir kısmı. Sadece proba komplementer (eşlenik) olan DNA dizilerini içeren bantlarda hibridizasyon görülür. İki suş da prob dizisini içermektedir ve bu açıdan iki suş birbirinden ayırt edilemez. Boyut markerleri radyoaktif değildir ve Southern blotta görülmez.

Southern blot

- ❑ Bu teknikle ayrıca, normal hücrelere ait bant kalıpları ile genetik bozukluğu olan ya da kanserli hastalara ait kalıpları karşılaştırarak,
 - ❑ İnsan genetik bozuklukları ve kanserle ilişkili genlerdeki genetik değişiklikleri,
 - ❑ Duplikasyonları ve
 - ❑ Delesyonlarıortaya çıkarmak içinde kullanılır.

Northern blot

- ❑ Klonlanan bir genin, belirli bir doku ya da hücre tipinde transkripsiyon açısından aktif olup olmadığınin tayini için,
- ❑ Klonlanan genin eşleniği olan mRNA'nın varlığının araştırıldığı bir blotlama tekniği uygulanır.
- ❑ Bunun için, özgün bir hücre veya dokudan mRNA elde edilir.
- ❑ Bu RNA jel elektroforezi ile ayrıştırılır.

Northern blot

- ❑ Jeldeki RNA bantları, Southern blot tekniğinde olduğu gibi bir membrana aktarılır.
- ❑ Daha sonra membran, klonlanmış genin kopyasından türetilen tek zincirli ve işaretli DNA probu ile hibridize edilir.
- ❑ Eğer DNA probuna komplementer mRNA varsa proba hibridize olacağından, film üzerinde bant şeklinde belirecektir.

Northern blot

- ❑ Orijinal blotlama (DNA'nın filtreye bağlandığı) işleme Southern blot dendiği için, bu blotlama (RNA'nın filtreye bağlandığı) işleme northern blot adı verilmiştir.
- ❑ Bunu takiben, proteinlerin bir membrana bağlandığı bir başka tekniğe de biraz ters bir mantıkla western blot adı verilmiştir.
- ❑ Northern blot, özümlenmiş genlerin ifadeleri hakkında bilgi verir.

Northern blot

- ❑ Embriyonik, kanser ve genetik bozukluk olan dokulardaki genlerinin ifadesinin araştırılmasında kullanılır.
- ❑ Northern blot ayrıca, seçenekli sıplays (splice) sonucu oluşan mRNA'ları saptar.
- ❑ Transkripsiyona uğramış mRNA ürünleri ile ilgili diğer bilgilerin elde edilmesinde kullanılır.

Northern blot

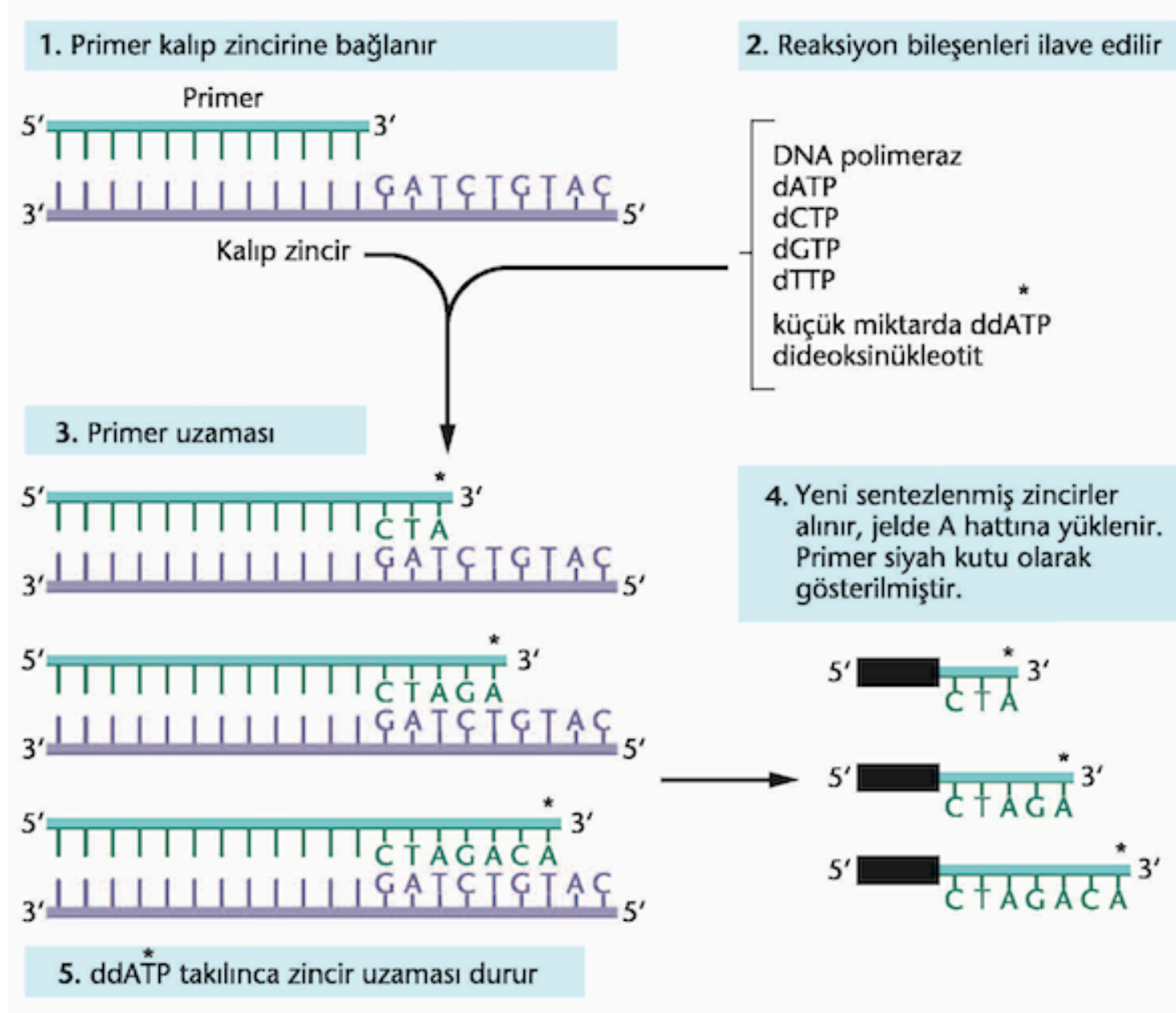
- ❑ Eğer uzunluğu bilinen marker RNA'lar kontrol olarak incelenen RNA ile aynı elektroforeze konursa, incelenen genin büyüklüğü hakkında bilgi edinilebilir.
- ❑ Northern blot, farklı hücrelerde, dokularda ya da organizmalardaki genlerin transkripsiyon aktivitesini belirler ve ölçer.

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- DNA, ancak nükleotid dizisi bilindiği zaman tam anlamıyla karakterize edilebilmektedir.
- En çok kullanılan DNA dizi analizi yöntemi, James Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilendir.

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- Bu işlemde, dizisi belirlenecek DNA molekülü bir seri eşlenik zincirlerinin sentezlenebilmesi için önce tek zincirli hale dönüştürülür.
- Bu eşlenik zincirlerden her biri; farklı, özgül nükleotidlerde gelişigüzel sonlanmıştır.



DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ Bu işlem sonucunda; elektroforezle birbirinden ayrılan bir seri DNA parçaları ortaya çıkar.
- ❑ DNA dizisinin saptanması için incelenir.
- ❑ Bu reaksiyonda ilk adım, DNA'nın ısıyla denatüre edilerek tek zincirli duruma getirilmesidir.

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

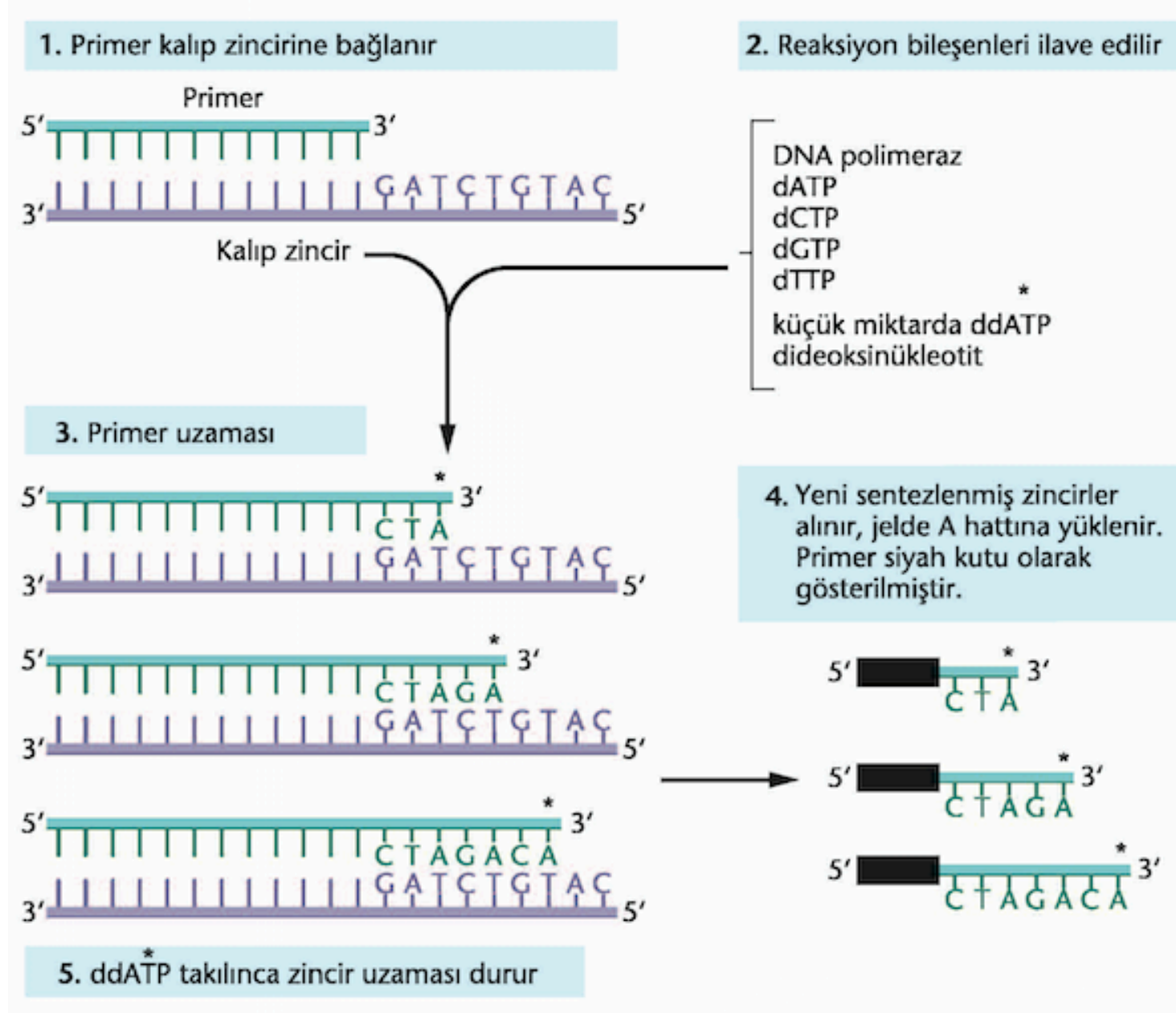
- ❑ Tek zincirli DNA, 3' ucuyla birleşecek olan primerler ile karıştırılır.
- ❑ Primer bağlı tek zincirli DNA örnekleri dört ayrı tüpe pay edilir.
- ❑ Bir sonraki adımda, tüplere DNA polimeraz ve dört tip deoksiribonükleotit trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ilave edilir.

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ Ayrıca her tüpe, dideoksinükleotit (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) denilen yapısı değiştirilmiş deoksiribonükleotitlerden bir tanesi az miktarda ilave edilir.
- ❑ Dideoksinükleotitler 3'- OH grubu yerine 3'- H içerirler.
- ❑ Deoksiribonükleotitlerden biri ya da primer daha sonra dizi analizini yapabilmek için radyoaktivite ile işaretlenir.

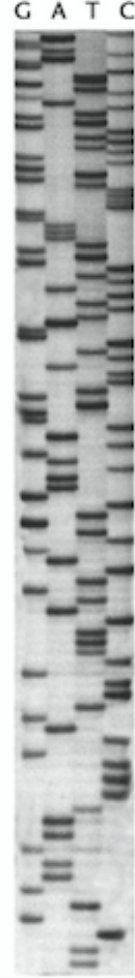
DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ Her tüpe DNA polimeraz konarak primer, kalıp zincirin komplementerini oluşturacak şekilde 5'-3' yönünde uzatılır.
- ❑ DNA sentezi gerçekleşirken polimeraz, uzayan zincire deoksiribonükleotit yerine ara sıra dideoksinükleotit katar.
- ❑ Dideoksinükleotit yapısında 3'-OH bulunmadığı için diğer nükleotit ile 3' bağı yapamaz ve DNA sentezi durur.
- ❑ Örneğin, ddATP'nin olduğu tüpte, polimeraz enzimi dATP yerine ddATP'yi zincire katınca zincirin uzaması sonlanır.



DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ Reaksiyon ilerledikçe, ddATP tüpünde A'nın bulunduğu her konumda sonlanmış olan DNA molekülleri elde edilecektir.
- ❑ Diğer tüplerde, reaksiyonlar sırasıyla, G, C ve T de sonlanacaktır.
- ❑ Her bir reaksiyon tüpündeki DNA parçaları jel elektroforezinde yan yana yüklenerek ayrıştırılır.
- ❑ Sonuçta, jelin üstüne konan filmin banyo edilmesiyle bantların merdivene benzer bir görüntüsü ortaya çıkar.



ŞEKİL 19-27 Dört ayrı DNA dizi reaksiyonu (her biri bir hatta) sonucunda oluşan yeni sentezlenen fragmentlerin ayırımını gösteren DNA dizi analizi jelinin fotoğrafı. Jel, DNA parçasının baz dizisini belirlemek üzere incelenir. Bunu yapmak için, jel alttan yukarı doğru en alt banttan başlayarak bir sonrakine ve bir sonrakine şeklinde devam ederek okunur. Örneğin, bu jeldeki DNA'nın baz dizisi TTCGTGAAGAA ile başlamaktadır.

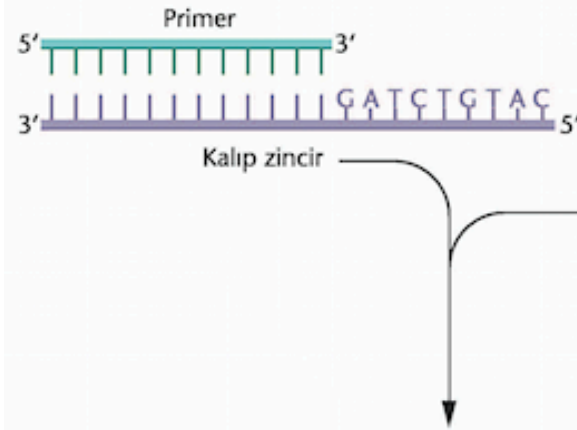
DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ DNA dizi analizi büyük çaptaki genom dizisi projelerinde otomatik hale gelmiştir.
- ❑ Bu sistemde günde yüz binlerce nükleotit dizisini belirleyebilen makineler kullanılmaktadır.
- ❑ Bu işlemde, dört dideoksinükleotit analoglarından her biri farklı floresan boya ile işaretlenmiştir.

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- Böylece, örneğın, adenozin ile sonlanan zincirler bir renkte iken, sitozin ile sonlanan zincirler başka bir renktedir.
- Bu şekilde 4 ayrı renk bulunur.

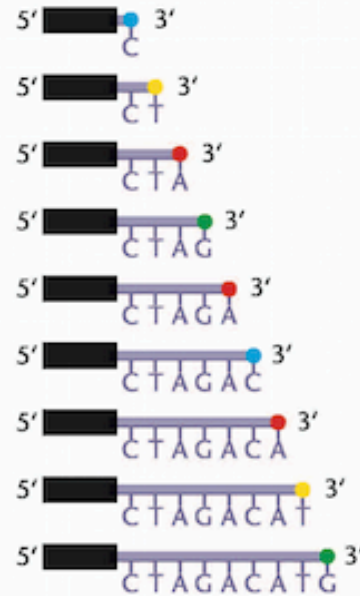
1. Primer ilave edilir



2. Reaksiyon bileşenleri ilave edilir

- DNA polimeraz
- dATP
- dCTP
- dGTP
- dTTP
- küçük miktarda florokromlu ddNTPler:
- ddATP —●
- ddCTP —●
- ddGTP —●
- ddTTP —●

3. Primer uzaması Zincir sonlanması Ürünün elde edilmesi



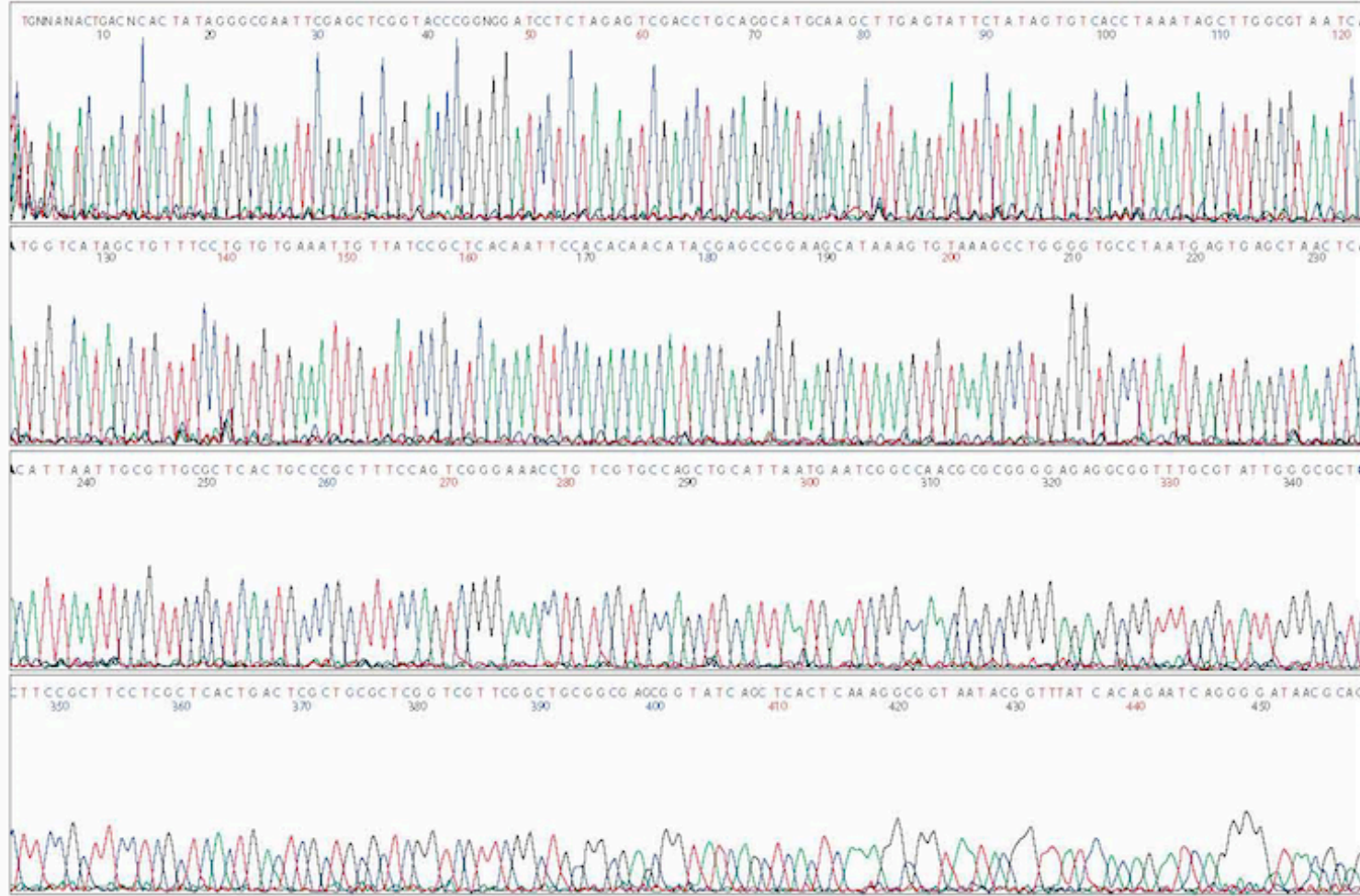
4. Elektroforez, görüntüleme, veri analizi

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ Tüm işaretli dideoksinükleotitler tek bir tüpe ilave edilir.
- ❑ Primerler DNA polimerazla uzadıktan sonra reaksiyon ürünleri jelin tek kuyucuğuna yüklenir.
- ❑ Jel, lazer ışık kaynağı ile taranarak her bantın farklı renkte ışımaya vermesi sağlanır.

DNA dizi analizi bir klonun tanımlanmasında en kesin yoldur

- ❑ Dizi makinesine bağlı bir detektör her bandın rengini okur.
- ❑ A, T, C ve G'den hangisinin olduğunu saptar.
- ❑ Aletin yazıcısından, her biri bir nükleotide karşılık gelen renkli pikler elde edilir.



ŞEKİL 19–29 Her bir baz için bir tane floresan boya kullanılarak yapılan otomatik DNA dizi analizi. Her bir pik dizideki nükleotitleri göstermektedir. Primer dizisi şeklin sol üst köşesinde ve bazların solunda yer alır, ancak burada gösterilmemiştir. N şeklinde verilen bazlar belirsizdir, kesin olarak saptanamamıştır. Bu belirsiz baz okumaları daha çok primerin yakınındaki bazlarda görülür çünkü, dizi okuma kalitesi primere yakın dizilerde bozulmaktadır. Ayrılan bazlar, soldan sağa doğru okunur. Burada dizi 5'-TGNNANACTGACNCAC ile başlamaktadır. Bazların altındaki numaralar baz çifti olarak dizinin uzunluğunu göstermektedir.

DNA dizi analizi ve genom projeleri

- ❑ DNA dizi analizi genom projelerinin kalbidir.
- ❑ Rekombinant DNA teknolojileri ve nükleotit dizi analizi birlikte kullanılarak 100'den fazla prokaryot türüne ait analizi gerçekleştirilmiştir.
- ❑ DNA dizi analizi tekniği kullanılarak birçok ökaryota ait genom projeleri de tamamlanmıştır ve düzinelerce halen analiz edilmektedir.

TEŐEKKÜR

Bu sunumun hazırlanmasındaki katkılarından dolayı aŐađıda isimleri verilen öğrencilerime teŐekkür ederim.

FATMA GÜNDOĞAN

DENİZ BABACAN