
REKOMBİNANT DNA TEKNOLJİSİNİN TEMEL PRENSİPLERİ



Klonlama

- Birçok moleküler genetik tekniğinin kalbi gendir.
- Gen, genetik manipülasyonlarda kullanılmadan önce izole edilmeli ve iyi karakterize edilmelidir.
- İlgilenilen DNA'nın izolasyonu ve çoğaltılmasında kullanılan metotlardan biri genin taşıyıcı veya vektör yardımıyla DNA içerisine yerleştirilmesi olan klonlamadır.

Klonlama

- Farklı kaynaklardan alınan iki DNA birleştirildiğinde sonuç rekombinant DNA molekülüdür.
- Burada molekül, başka bir konak içine (örneğin *Escherichia coli*) taşınarak yeniden üretilir.
- Hücreler bölündüklerinde kolonideki her hücre yada klon rekombinant DNA molekülünden bir yada daha fazla kopya içerir.
- Böylece rekombine molekül içinde bulunan DNA klonlanmış olur.

Klonlama

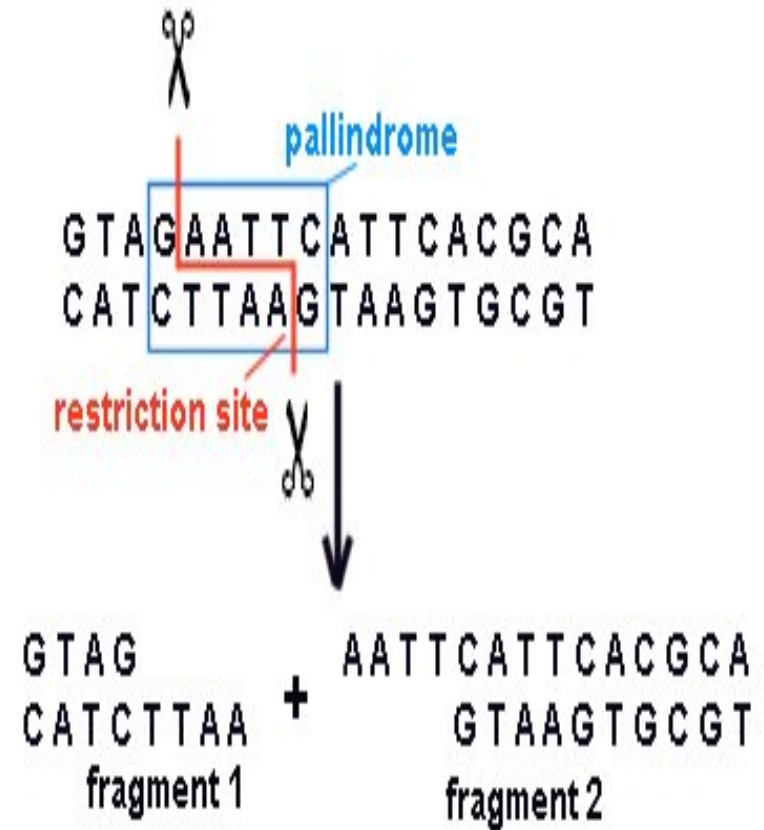
- Gen klonlama pek çok amaçla kullanılabilir.
- Bunlardan birkaçı;
 - DNA daha ileri çalışmalarda birçok kopya elde etmek için konak hücrelerde çoğaltılabilir,
 - Önemli protein ürünlerin elde edilmesi için ilgili gen ifade edilebilir,
 - Herhangi bir gen ve onun ifadesi canlı hücrede incelenebilir.

DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

- Enzimlerin iki büyük sınıfı rekombinant DNA hazırlanmasında ve izolasyonunda önemli araçlardır.
 - Restriksiyon endonükleaz
 - DNA ligaz

DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

- Restriksiyon endonükleazlar makas gibi davranarak DNA'yı spesifik bölgelerinden keserler.
- Restriksiyon endonükleaz DNA'daki şeker fosfat omurgayı her iki iplikten keser.



DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

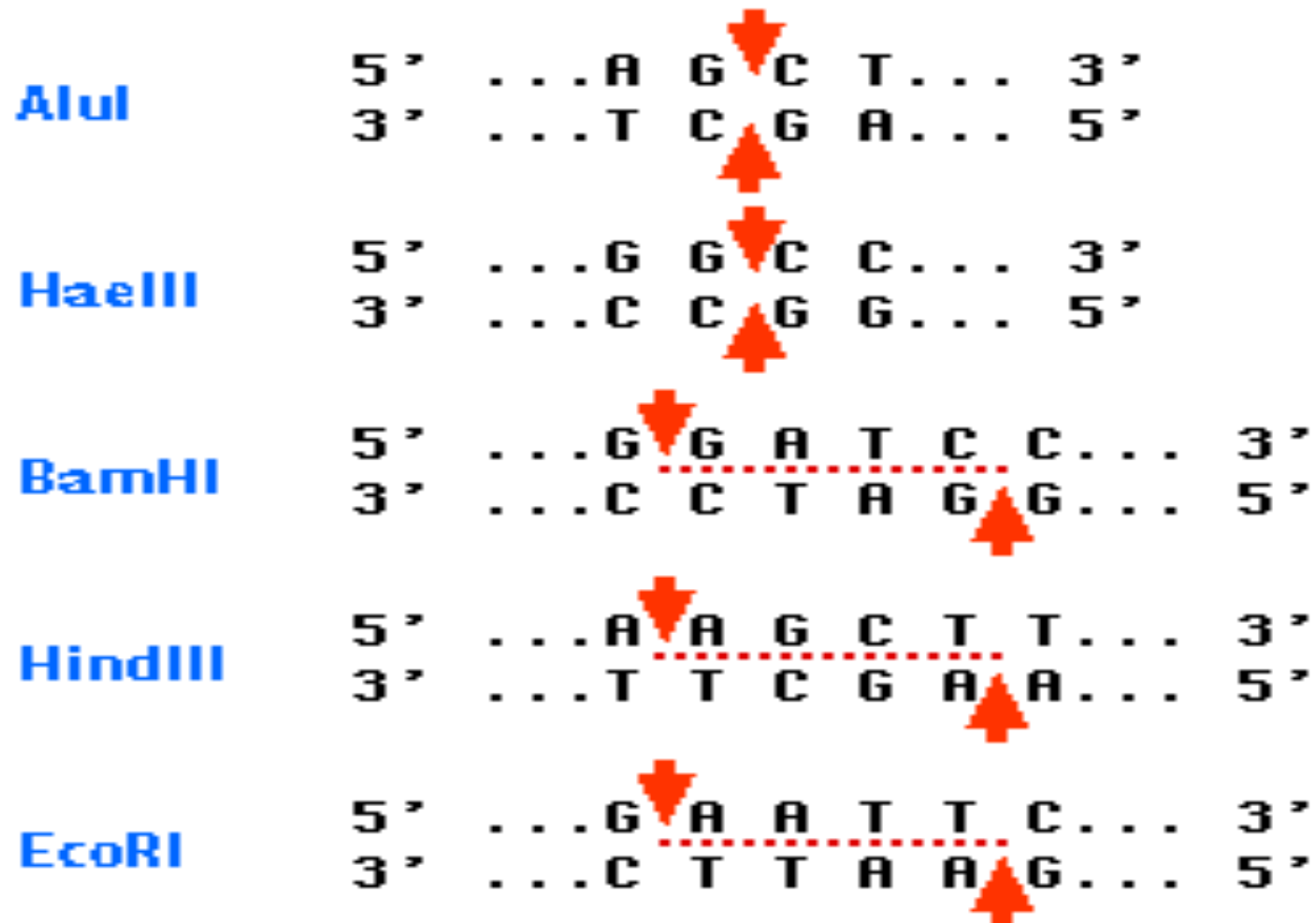
- Her bir restriksiyon enzimi spesifik DNA dizilerini tanır ve bu dizinin içindeki belli bir yerden keser.
- Enzim, bir deoksiribonükleotidin fosfat grubu ve komşu deoksiribonükleotidin şeker grubu arasındaki kovalent bağların kırılmasıyla DNA'yı çift ipliğinden keser.

DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

- Restriksiyon enzimler izole edildiği organizmanın ismi kullanılarak adlandırılırlar.
- Örneğin EcoRI, E. coli RY13'den izole edilmiştir.
- Eco cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfinden gelmektedir.
- R nesil tipi için, I bu tipin ilk enzimi için kullanılır.

DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

- Restriksiyon endonükleaz şeker-fosfat omurgayı ayırarak küt ya da yapışkan uçlu, çift iplikli DNA fragmenti oluşturabilir.
- Küt uçta; molekülün her iki ipliği aynı yerden kesilmiştir yani uçlar düz ve nükleotidlerin her biri eşlenmiş şekildedir.
- Yapışkan uçta; molekülün her ipliği farklı pozisyonlardan kesilmiştir.
- İplikteki birkaç nükleotit çıkıntı oluşturur, bu tek iplikli uçlar kendiliğinden birbirleri ile baz çifti oluşturabilirler.

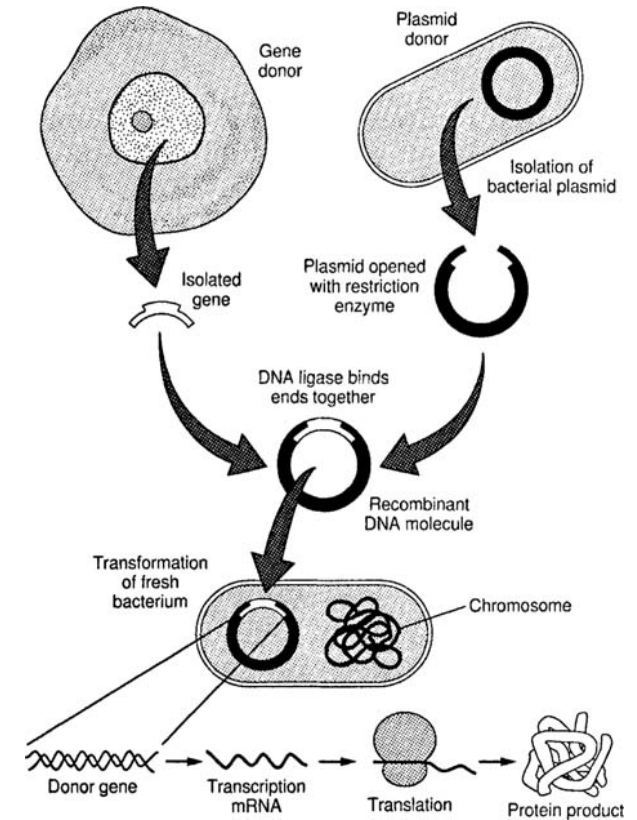


AluI and **HaeIII** produce blunt ends

BamHI **HindIII** and **EcoRI** produce "sticky" ends

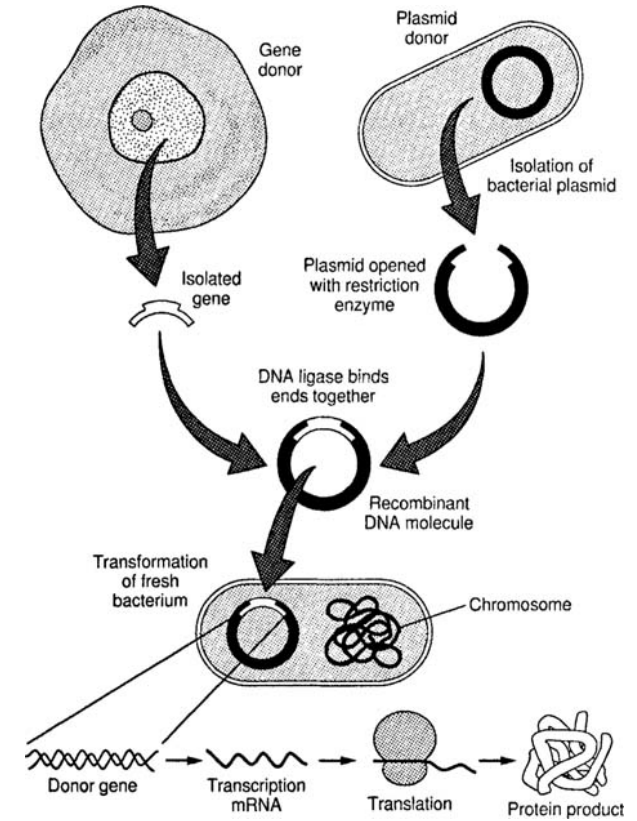
DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

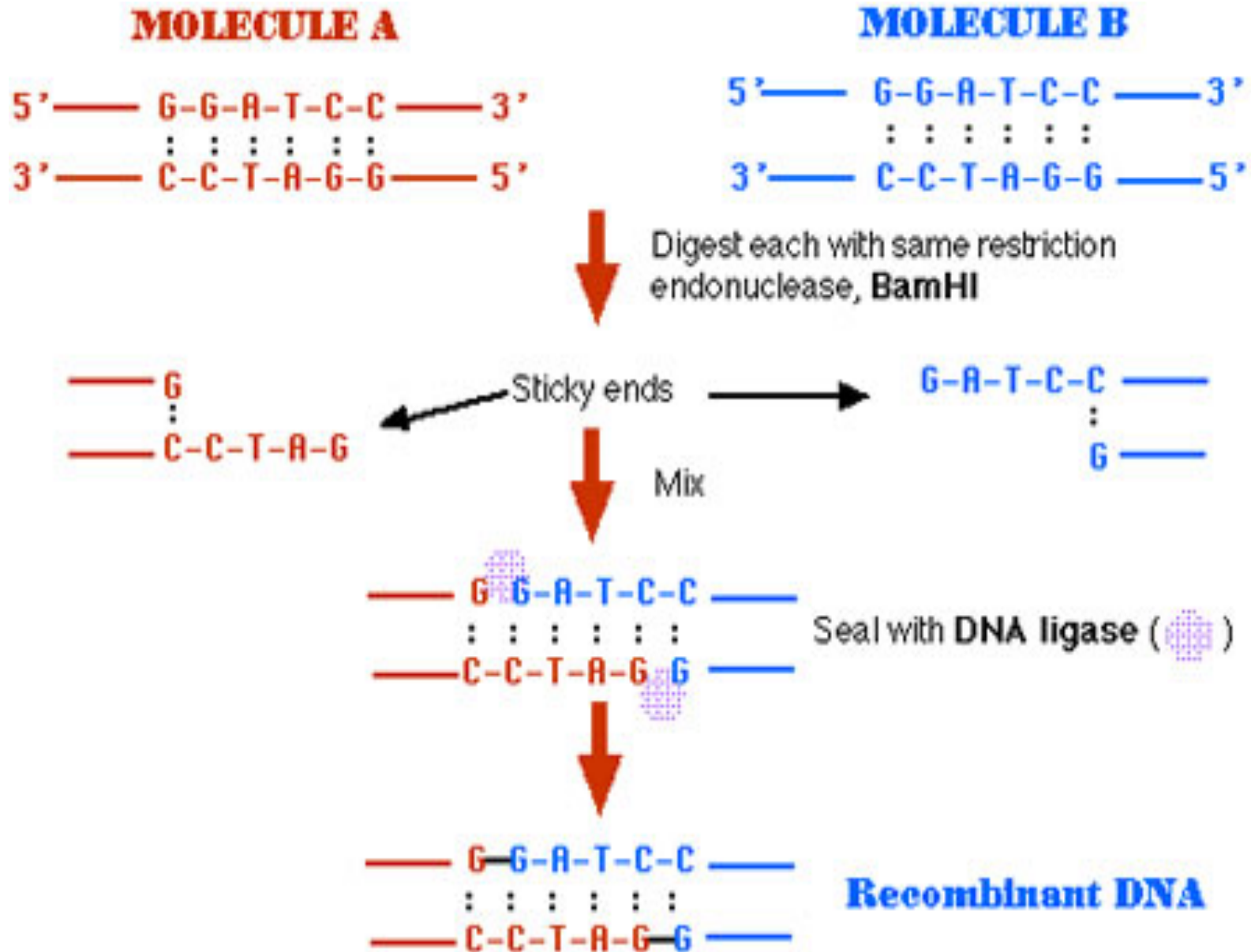
- DNA ligaz enzimi, DNA fragmentlerini, küt ya da yapışkan tamamlayıcı uçlardan birleştirebilir.
- Ligaz farklı kökenleri olan DNA'lar arasında bir ayırım yapmaz.
- Böylece iki DNA fragmenti restriksiyon endonükleaz tarafından iki farklı organizmanın kromozomlarından kesilir ve DNA ligaz tarafından birleştirilir.



DNA'nın kesilmesi ve birleştirilmesi

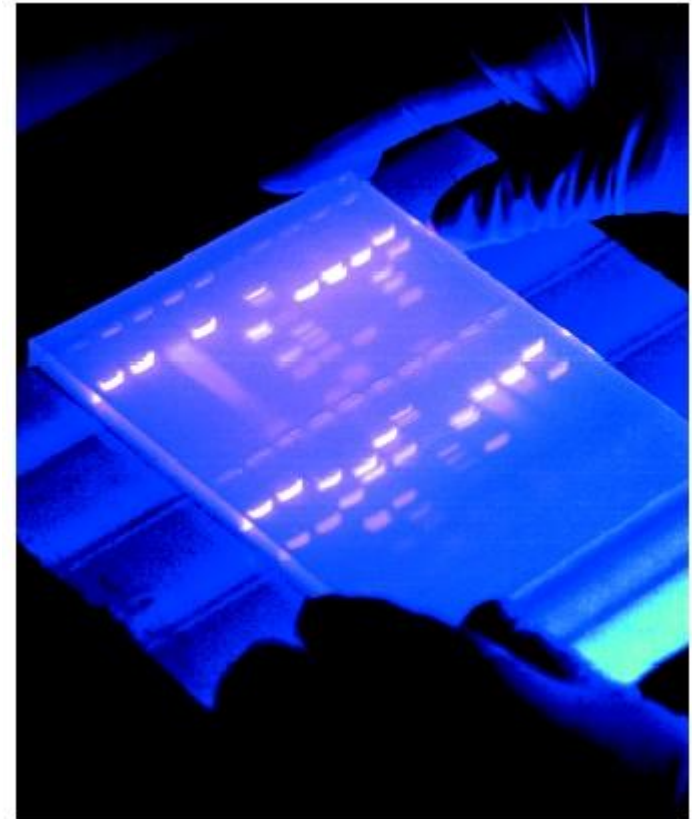
- İki fragment artık tek bir DNA molekülü olmuştur.
- Bu kes-yapıştır tekniği rekombinant DNA molekülünü oluşturur.
- Bu daha sonra konak hücreye aktarılır, burada daha ileri çalışmalar için çoğaltılır.
- Bu süreç, DNA klonlama olarak adlandırılır.





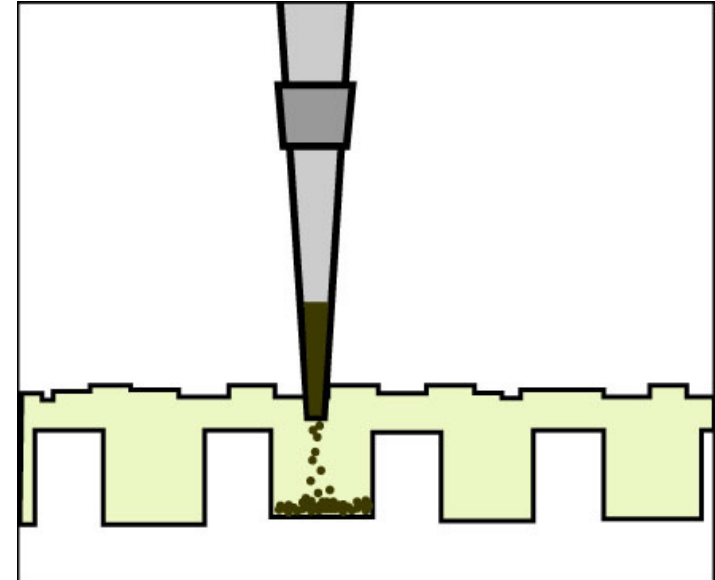
Restriksiyon fragmentlerinin ayrılması ve DNA'nın görüntülenmesi

- Restriksiyon enzim kesimini ve diğer manipülasyonların sonuçlarını doğrudan görmek mümkündür.
- Agaroz jel elektroforezi, DNA fragmentlerini büyüklüğüne ve boyama sonrası görünürlüğüne göre ayırmak için kullanılan bir tekniktir.



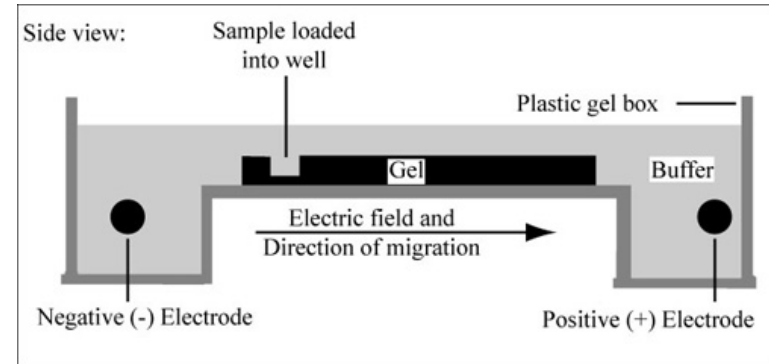
Agaroz jel elektroforezi

- Jelatinli agar; saflaştırılmış agar tozu ve tampondan oluşan bir karışımdır.
- Kaynatılır ve bir kalıp içine dökülür, levha halinde katılaşır.
- Bir dişli tarak, agaroz eriyiğine, kuyu şekillerini oluşturmak için takılır.
- Agaroz katılaşınca kuyulara örnekler yüklenir.



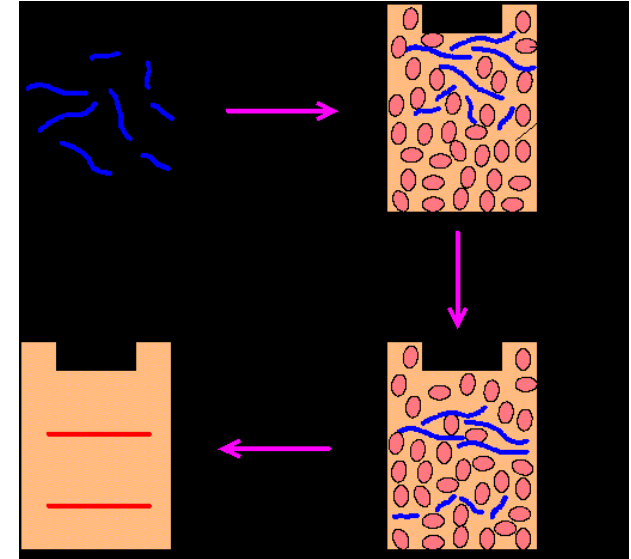
Agaroz jel elektroforezi

- Agaroz levha bir tampon çözeltisine daldırılır ve levhanın karşıt uçlarındaki elektrotlara uygulanan elektrik akımı jel ve tampon içinde bir elektrik alanı oluşturur.
- Çünkü şeker-fosfat omurgası negatif yüklüdür, DNA fragmentleri pozitif elektroda doğru göç ederler.



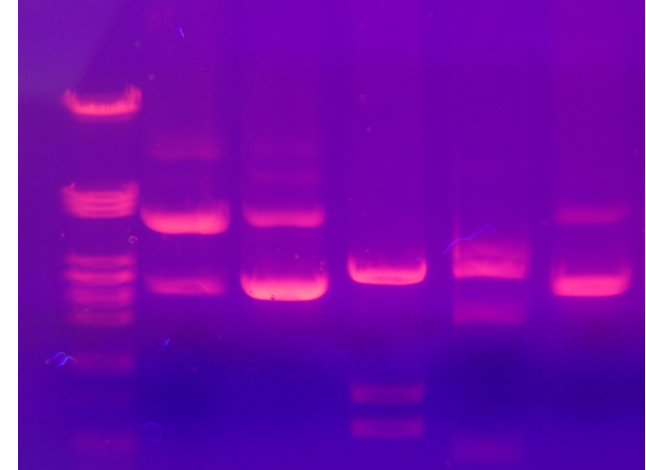
Agaroz jel elektroforezi

- Agaroz molekülleri arasındaki gözenekler bir elek gibi davranarak boyutuna göre molekülleri ayırır.
- Büyük moleküller küçük moleküllerden daha yavaş hareket ederler.



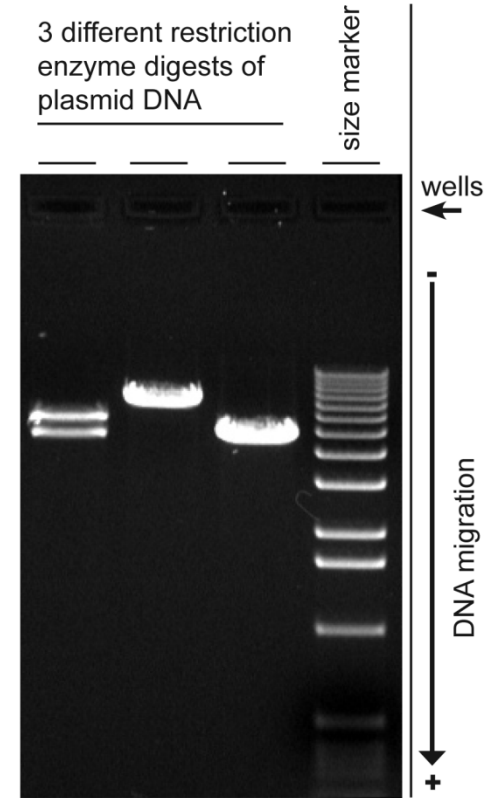
Jeldeki DNA'nın görüntülenmesi

- DNA, jel içinde tek başına görünür değildir.
- Genellikle bantları görünür hale getirmek için etidyum bromid eklenir.
- Ancak birçok araştırma laboratuvarında etidyum bromid sıklıkla kullanılmaktadır.
- Çünkü çok duyarlıdır ve DNA'nın çok küçük miktarlarda bile fark edilmesini sağlar.



Marker'ler ile karşılaştırma

- DNA parçalarının, jeldeki uzunlukları bilinen DNA'lara göre jel üzerindeki konumlarının karşılaştırılması ile uzunlukları tespit edilebilir.
- Bu nedenle agaroz jel elektroforezi, restriksiyon fragmenti uzunluklarını belirlemede oldukça yararlıdır.



DNA klonlama

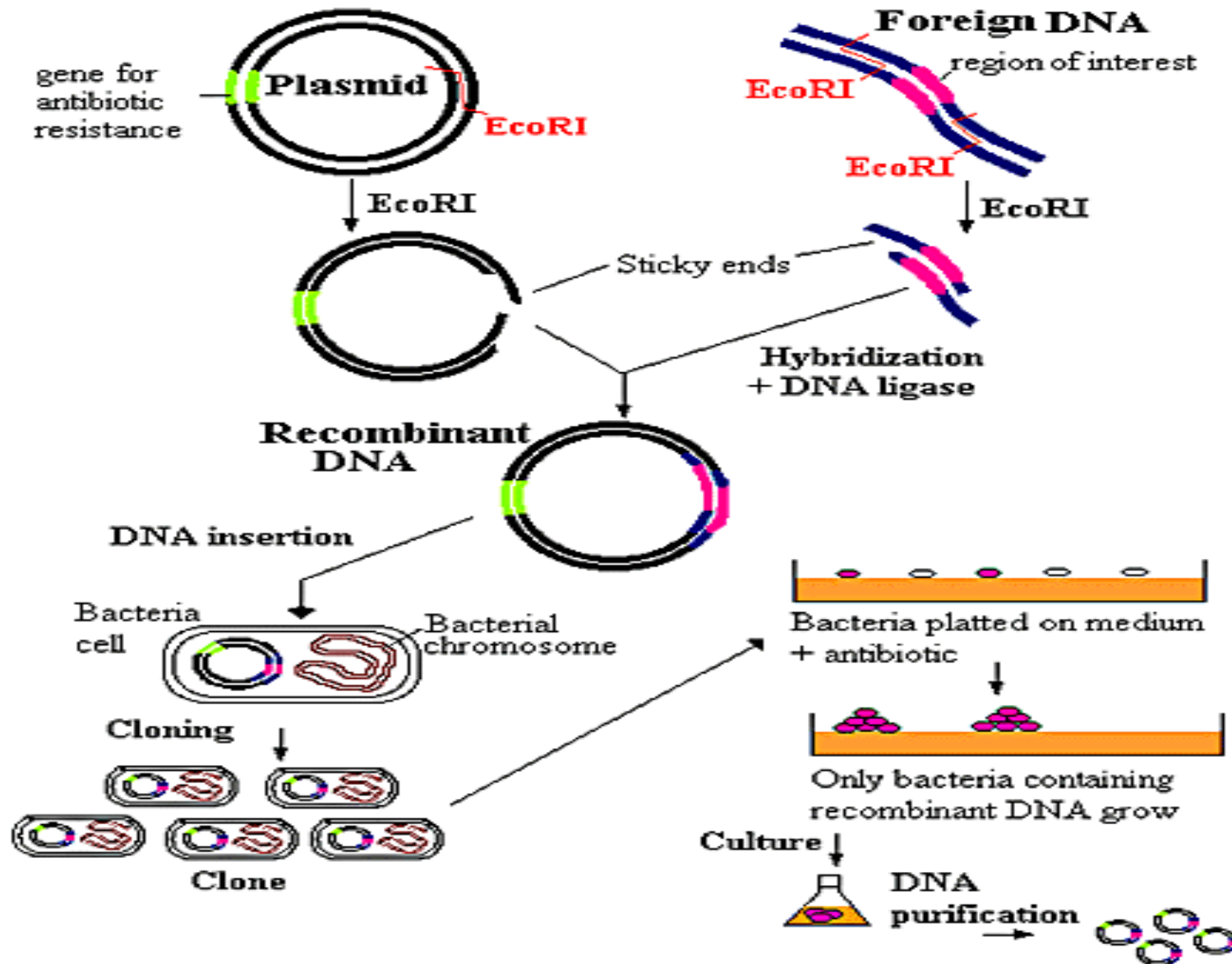
- Gen klonlama birçok basamak gerektirir.
- Her bir basamakta, aşağıdaki şartlara bağlı olarak değişebilen spesifik metodolojiler kullanılır:
 - Kullanılan DNA çeşidi,
 - Konak hücre tipi (bakteri, bitki vb)
 - DNA klonlarının nihai hedefi

Vektör seçimi

- Genden ürün elde etmek isteniyorsa (örneğin; insülin ya da büyüme hormonu gibi), genin taşıyıcı hücrede salgılanmasına olanak sağlayan bir vektör kullanır.
- Vektör, transkripsiyon için önemli olan promotor dizilerine ve diğer translasyon dizilerine sahip olmalıdır.

Gen klonlama basamakları

- DNA izolasyonu
- DNA'nın vektör içine yerleştirilmesi
- Rekombinant DNA'nın konak hücreye transformasyonu
- Rekombinant DNA'yi barındıran konak hücrelerin seçimi
- Uygun protein ürünü üreten hücreleri görüntüleme



Cloning into a plasmid

Klonlama vektörünün özellikleri

- Replikasyon orjinine sahip olmalıdır, böylelikle DNA, konak hücre içinde replike olabillir.
- Saflaştırma sırasında bozulmaya uğramadan izole edilebilecek kadar küçük olmalıdır.
- Birçok özgün restriksiyon bölgesine sahip olmalıdır, böylece yalnızca özgün olan bölgeden kesilecektir.
- Klonlama aracının hücre içine transfer olup olmadığını belirlemek ve yabancı DNA'nın vektör içine alınıp alınmadığını göstermek için seçilebilir markerlara sahip olması gerekir.

Bakteriyel vektörler

- Klonlama vektörlerinin büyük çoğunluğu E. coli için geliştirilmiştir.
- Bunun yanı sıra, *Bacillus subtilis* gibi bakteriler, maya, mantar, hayvanlar ve bitkiler için de vektörler mevcuttur.

Plazmitler

- Plazmitler, ekstra kromozomal, çift iplikli, dairesel DNA molekülleridirler ve bakterilerde barınırlar.
- Genellikle hücre içinde çoklu kopyalar halinde bulunurlar.
- Plazmitler çeşitli fonksiyonlara sahiptir.

Plazmitlerin fonksiyonları

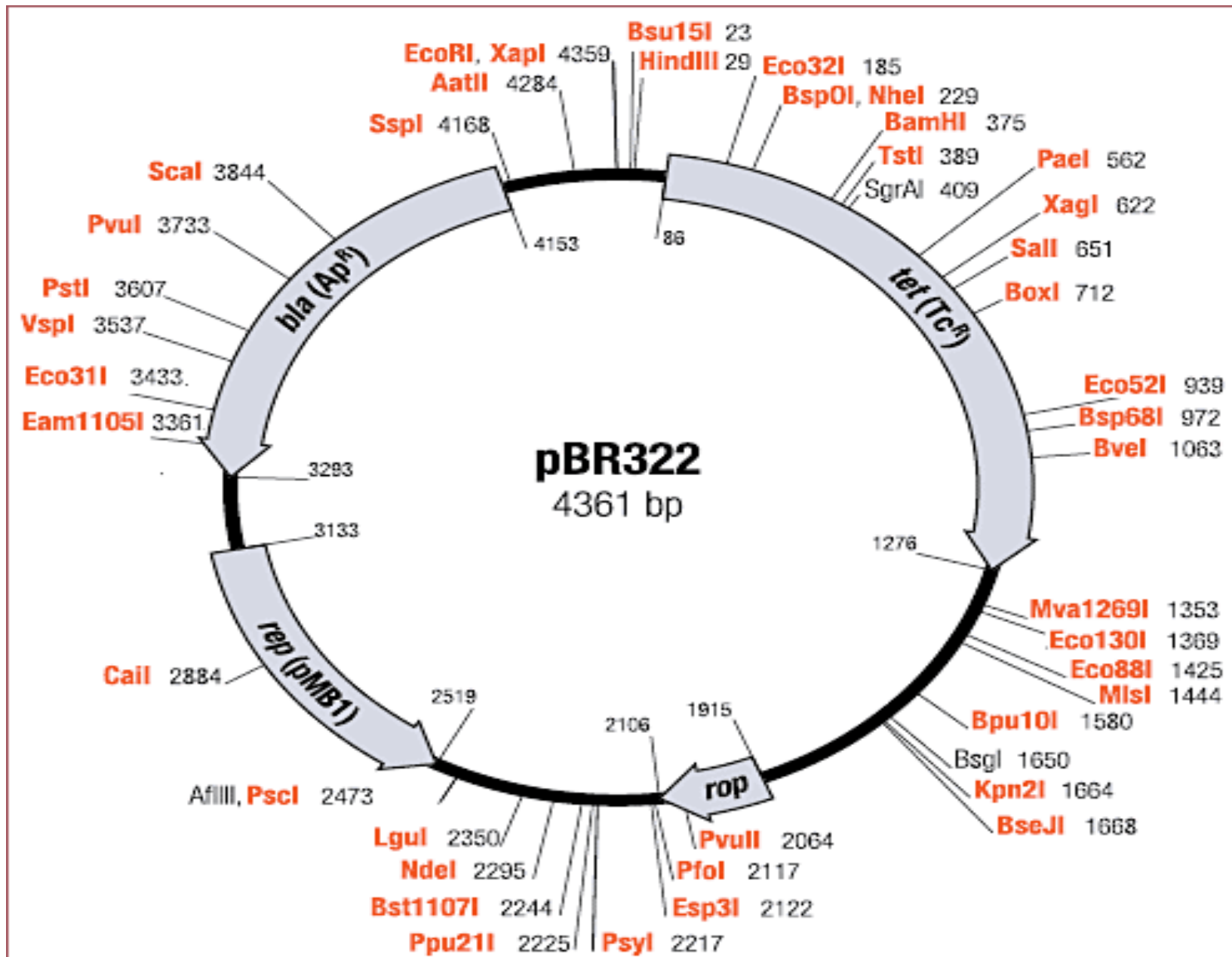
- Antibiyotiklere ve bakteriyosinlere direnç için çeşitli maddeler kodlarlar.
- Pigment üretimi, çeşitli bileşiklerin parçalanması ve azot fiksasyonu gibi fizyolojik fonksiyonları gerçekleştirirler.
- Toksin üreten virülans plazmidler, endotoksinleri ve hemolizinleri kodlar.
- Ayrıca bazı plazmidler; civa, kadmiyum, nikel, çinko gibi metaller karşı direnç kazandırırılar.

Plazmitlerin özellikleri

- Plazmitler küçük ve kolay işlenebilir yapılardır.
- Yaklaşık olarak 10 kilobaz uzunluğundaki yabancı DNA fragmentlerinin yerleştirilmesi için benzersiz restriksiyon bölgelerine sahiptirler.
- Bakteri hücreleri içine taşındığı zaman, yüksek kopya sayısına ulaşırlar.

Örnek bir vektör: pBR322

- Modifiye bir plazmittir.
- pBR322 adı aşağıdaki gibi elde edilmiştir:
 - 'p' plazmit molekülünü ifade eder
 - 'BR', vektörün yapan kişiyi belirtir (Bolivar ve Rodriges)
 - '322' ise spesifik plazmidin elde edilmiş sıra sayısını belirler (diğer örnekler; pBR325, pBR327, pBR328).



pBR322 nasıl elde edilmiştir?

- pBR322, doğal olarak bulunan üç plazmidin çeşitli bölgelerinin birleşiminden elde edilmiştir:
 - Plazmid R1 'den amfisilin direnç geni
 - pSC101 'den tetrasiklin direnç geni
 - pMB1 'den replikasyon başlama bölgesi

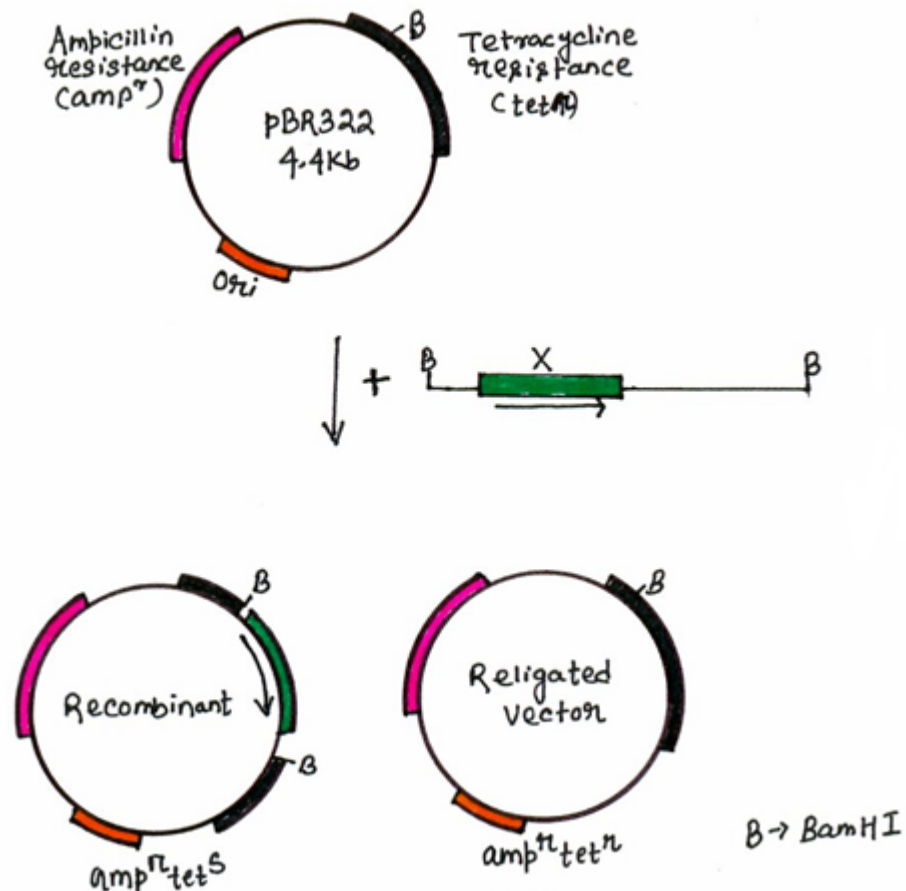
pBR322 plazmidinin tercih edilme nedenleri

- Yakın zamana kadar pBR322 birkaç nedenden dolayı en sık kullanılan plazmidlerden biriydi:
 - Molekül küçüktür, sadece 4363 baz çiftine sahiptir ve kolaylıkla izole edilebilir. Dolayısıyla bu vektör, 5-10 kb'a varan DNA barındırabilir.
 - pBR322 birçok özgün restriksiyon bölgesine sahiptir.

İnversiyonal inaktivasyon (rekombinantların seçimi)

- Tetrasiklin (tetr) ve amfisiline (ampr) direnci kodlayan genler, rekombine plazmitlerin seçimi için marker olarak kullanılır.
- İlgilenilen DNA fragmanın içine antibiyotik direnç genlerinden biri sokularak gen inaktivasyonu gerçekleştirilir.

İnversiyonel inaktivasyon (rekombinantların seçimi)



İnversiyonal inaktivasyon (rekombinantların seçimi)

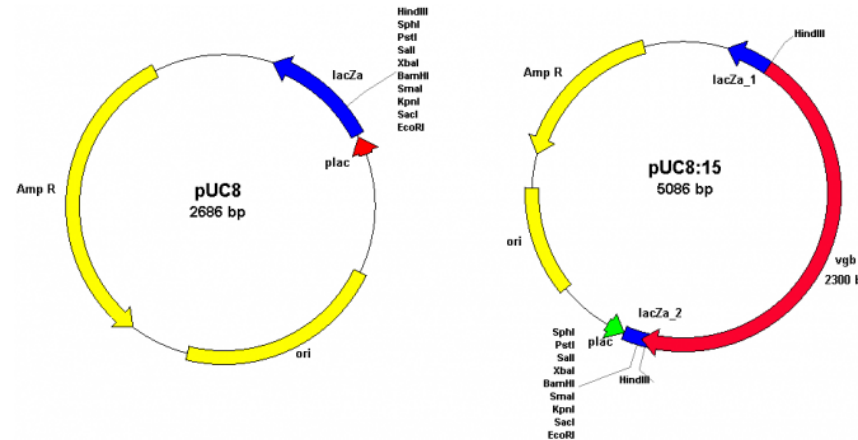
- Eğer tetrasiklin geni içine yabancı DNA sokulmuşsa, böyle bir plazmidi içeren bakteriler tetrasikline duyarlı olacaklardır.
- Bu süreç, seçilebilir bir markerın inversiyonal inaktivasyonu olarak ifade edilir.
- Artık kolaylıkla antibiyotik direnci için hücreler görüntülenebilecektir.
- İnversiyonal inaktivasyon, vektörün, hedef DNA'yı içirip içirmediğini belirlemek için güçlü bir yoldur.

Gen transferinde ortaya çıkacak olasılıklar

- Gen transferi sırasında aşağıdaki olasılıklar ortaya çıkabilir:
 - Bakteri, rekombinant vektörü almış olabilir,
 - Bakteri, rekombinant vektörü almamış olabilir
 - Vektör hücreye girmemiş olabilir.

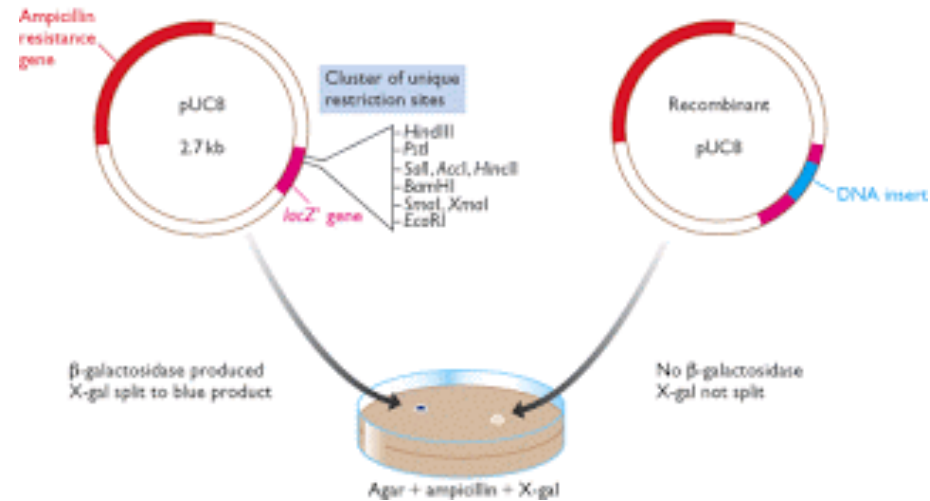
Bir başka plazmit: pUC

- pBR322'ye göre daha yaygın olarak kullanılan küçük plazmidlerdir.
- Bu küçük vektörler çoklu restriksiyon bölgeleri içerirler.
- Plazmidin seçimi için amfisilin direnç geni içerirler.



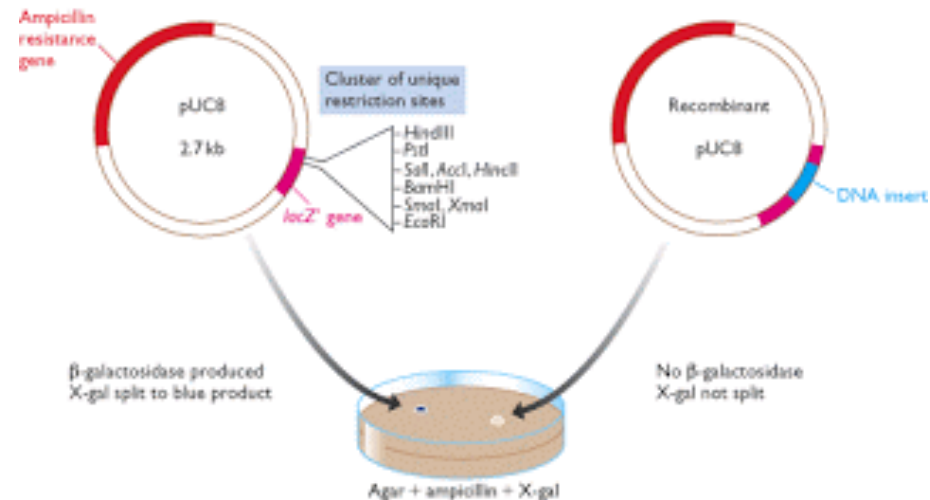
pUC plazmidinde rekombinantların seçimi

- Bu vektör lacZ genini kodlamaktadır.
- Eğer lacZ' bölgesi, yabancı DNA tarafından kesintiye uğramazsa amino uç kısmındaki β -galaktosidaz polipeptidi (lacZ) sentezlenir.



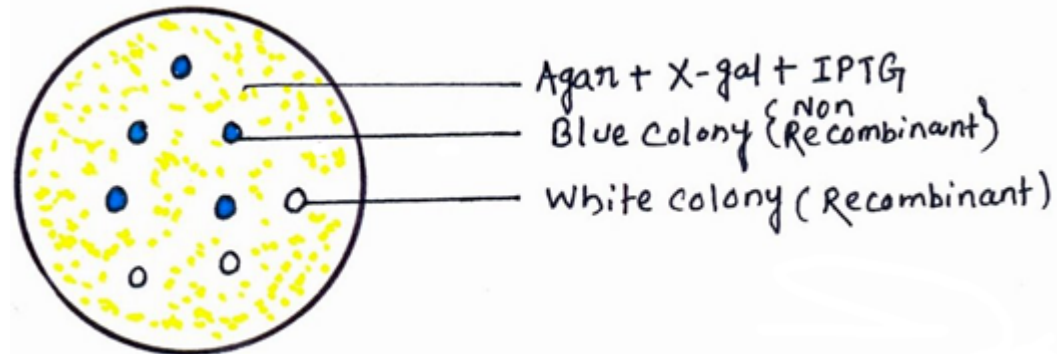
pUC plazmidinde rekombinantların seçimi

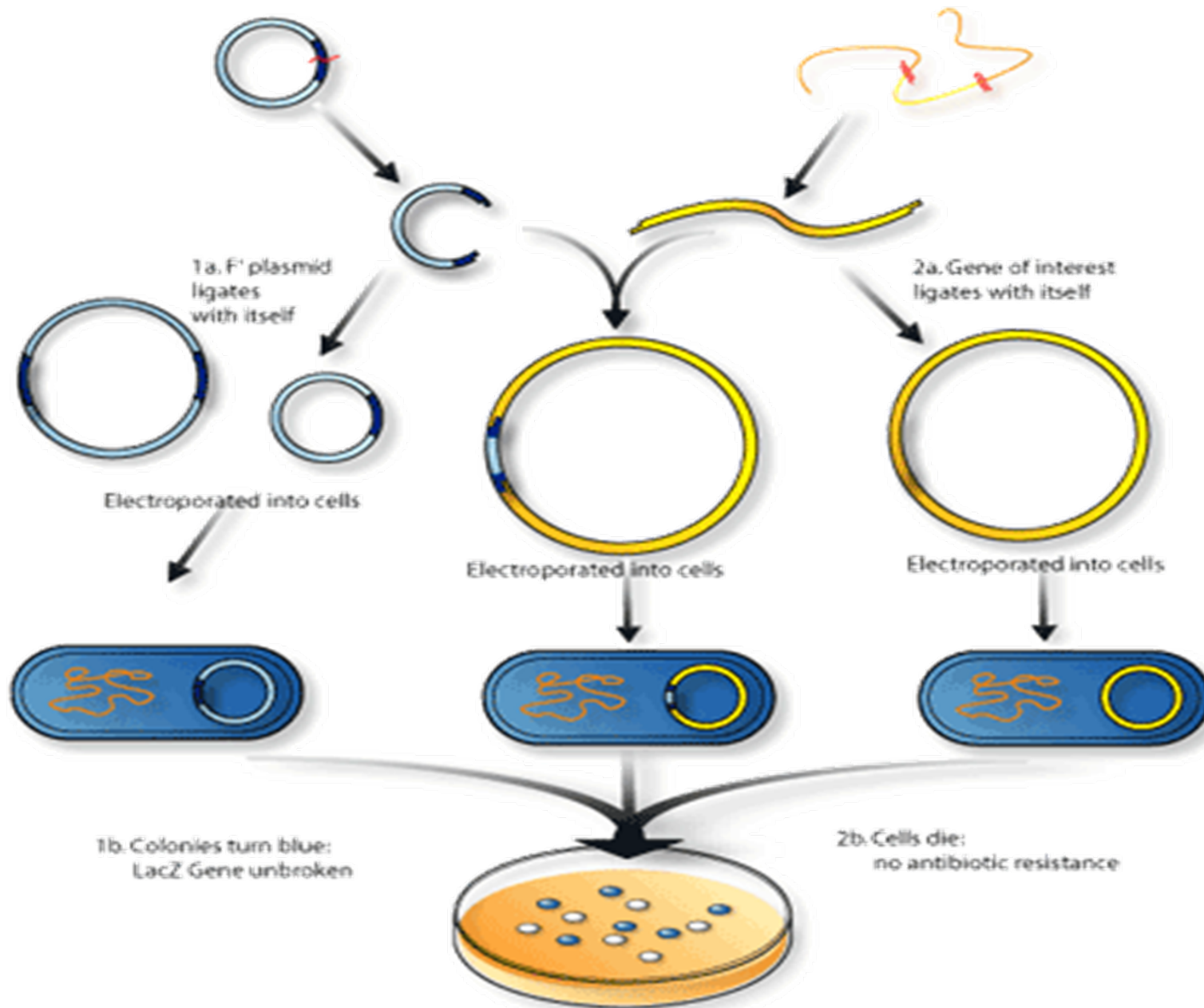
- Hücrede β -galaktosidaz normal olarak galaktozun, laktoz ile glukozu hidrolizini katalizler.
- Kodlama yapmayan lacZ plazmidini, enzimatik olarak aktif β -galaktosidaz üretemeyecektir.



pUC plazmidinde rekombinantların seçimi

- Üreme ortamına eklenen kromojenik laktoz analogu olan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indoil- β -D-galaktopiranozid), β -galaktozidaz tarafından parçalandığında mavi renk oluşturur.
- LacZ geni, bir yabancı DNA'nın yerleştirilmesi ile kesintiye uğradığında, koloniler ortamda beyaz görünür.





Bakteriyofajlar / Lambda fajı (litik döngü)

- Bakterileri enfekte eden virüslere bakteriyofaj adı verilir.
- Viral DNA, klonlama vektörü olarak kullanılmak üzere tasarlanabilir.
- Litik döngüde, faj oluşumu sonrası konak hücre lizise uğrar, virüs soyları serbest kalır.
- Litik fajlar, ilgilenilen DNA'yı çoğaltmak ve klon oluşturmak için kullanır.

Bakteriyofajlar / Lambda fajı

- Lizis sonucunda besiyerinde ortaya çıkan plaklar, izole edilebilir rekombinant faj parçacıkları içerir.

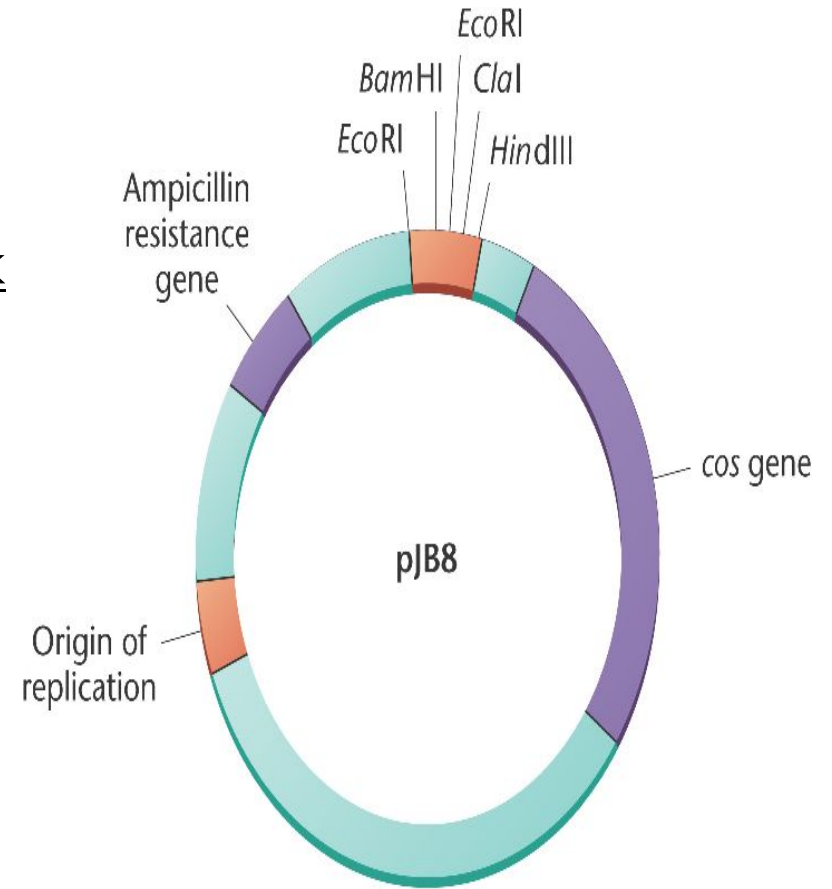


Bakteriyofajlar / Lambda fajı (lizogenik döngü)

- Lizojenik döngüde, bakteriyofaj genomu, konak hücredekine entegre olur.
- Hücrede liziz meydana gelmez ve faj genomu konak genomu ile birlikte replike olur.
- Bu yol, gen terapisinde, hayvan virüslerine yerleştirilmiş terapötik genleri genom içine entegre etmek için kullanılır.

Kozmid'ler !!!

- Plazmid ve bakteriyofaj gibi vektörlerin en önemli dezavantajı, nispeten küçük bir DNA parçasını taşıyabiliyor olmalarıdır.
- Daha büyük DNA fragmanları, faj DNA'sı ve plazmitlerin hibritleri olan kozmid'ler kullanılarak klonlanabilir.



Kozmid'ler !!!

- Kosmid vektör, bakteriyofajlarda olduğu gibi, protein bir kılıf içerisine paketlenir.
- Paketlenmiş DNA, *E. coli* konak hücrelerini enfekte eder.
- Bakteri hücrelerine giren DNA, plazmid gibi replike olur.
- Hücreleri lizise uğratmaz.

Diğer organizmalar için vektörler

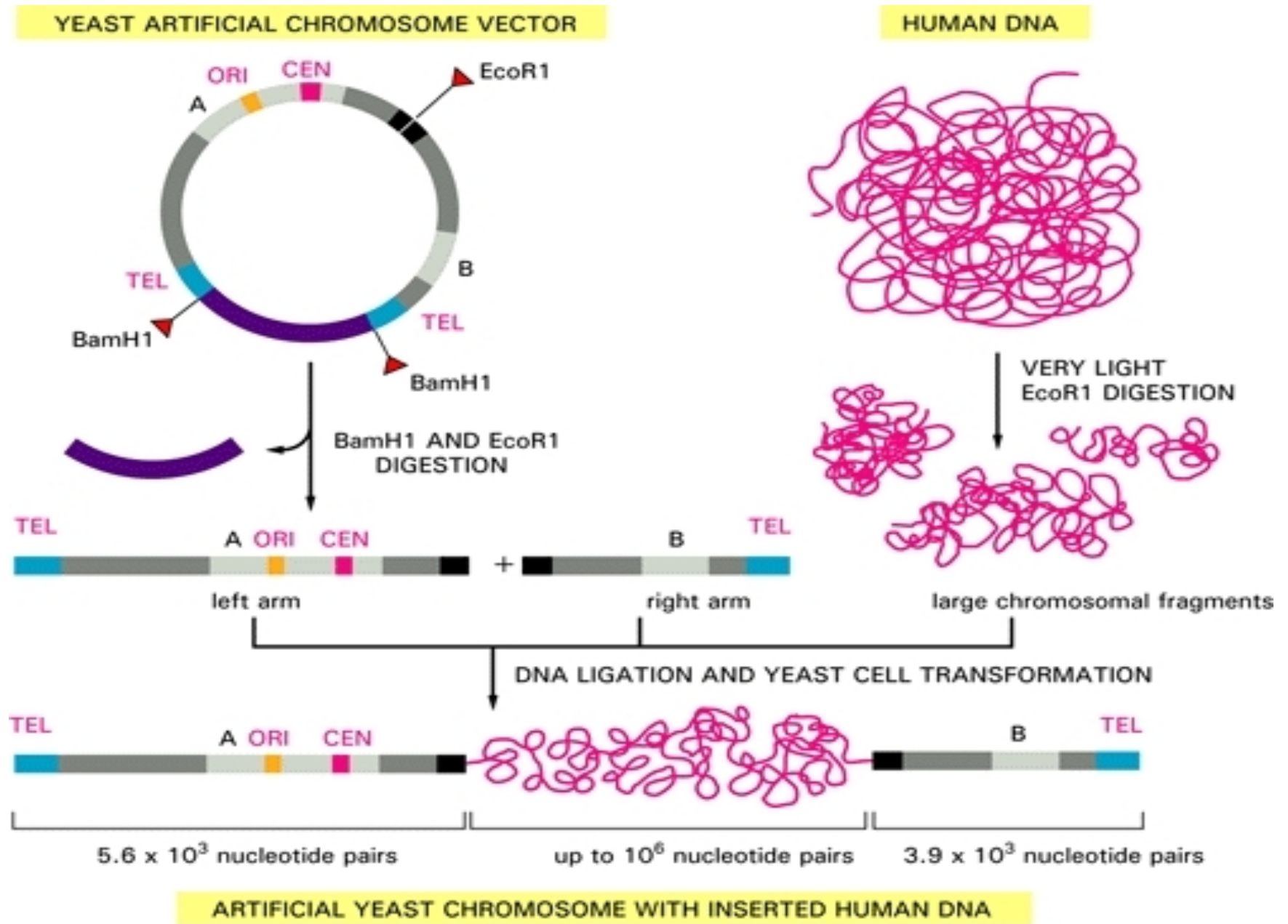
- Gen aktarımı çalışmalarında diğer organizmaların kullanılmaya başlanması, farklı tipteki klonlama vektörlerini gerektirmiştir.
- Klonlama vektörleri;
 - Maya ve diğer mantarlar,
 - Bitkiler,
 - Böcekler,
 - Balıklar,
 - Memeliler için
de kullanılabilir.

Maya yapay kromozomları (YACs)

- Maya yapay kromozomları (YACs) ökaryotik moleküler çalışmalar için kullanışlıdır.
- Maya kromozomunun sonunda bulunan telomerler, bozulmaya karşı koruma sağlar.
- Bu kromozomlar, otonom olarak kopyalayabilen bir dizi molekülün (ARS) çoğaltılmasına olanak sağlayan spesifik DNA dizilerinden oluşur.

Maya yapay kromozomları (YACs)

- YACs, büyük DNA parçalarının klonlanması için kullanışlıdır.
- Çalışılan birçok hayvan geni 200 kb veya daha fazla büyüklüktedir.
- Bu boyutlar, çok büyük parçalarını barındıran klonlama vektörlerini gerektirir.



Maya yapay kromozomları (YACs)

- Birçok vektör, oldukça küçük DNA parçalarını barındırır.
- YAC vektörleri, 200-1500 kb arasındaki parçaları taşıyabilir.
- YAC kütüphaneleri, insan genomu gibi büyük genomlar için oldukça kullanışlıdır.
- Bu vektörler, araştırmacıların, genomun spesifik bölgelerini izole etmelerini ve dizilemelerini sağlar.

Bakteriyel yapay kromozomlar (BACs)

- Bakteri yapay kromozomları (BACs) sentetik vektörlerdir.
- Geniş çaplı DNA klonlama sistemlerinde, büyük genomların dizileme projeleri için kullanılırlar.
- Ortalama boyutu 150 kb olan (100- 300 kb DNA) DNA parçalarını klonlamak için kullanılmıştır.
- Bakteriyofaj ve kosmid vektörlerinin aksine, hiçbir paketleme sınırlaması yoktur, rekombinant vektör elektroporasyon ile hücre içine verilir.

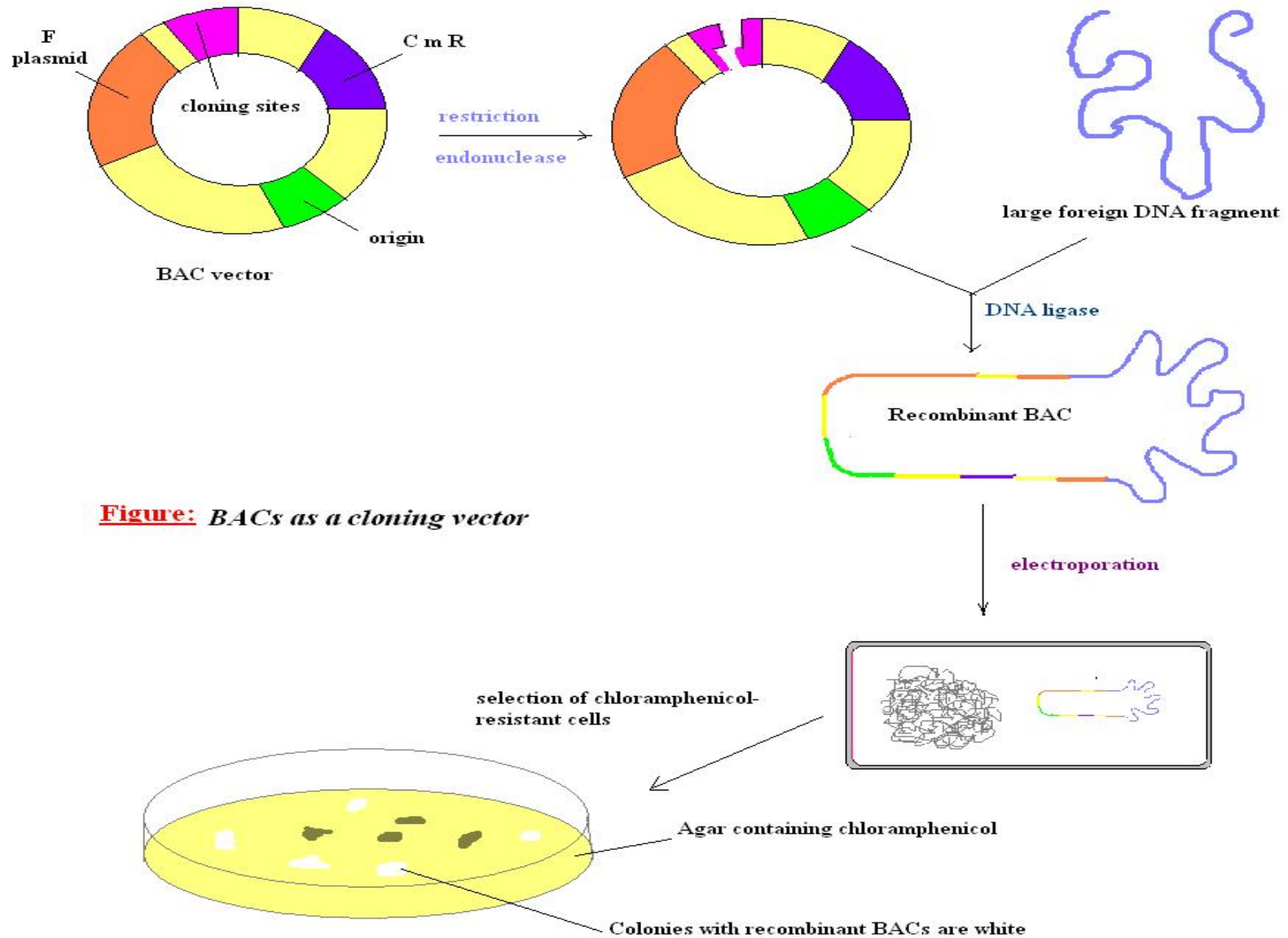


Figure: *BACs as a cloning vector*

Bakteriyel yapay kromozomlar (BACs)

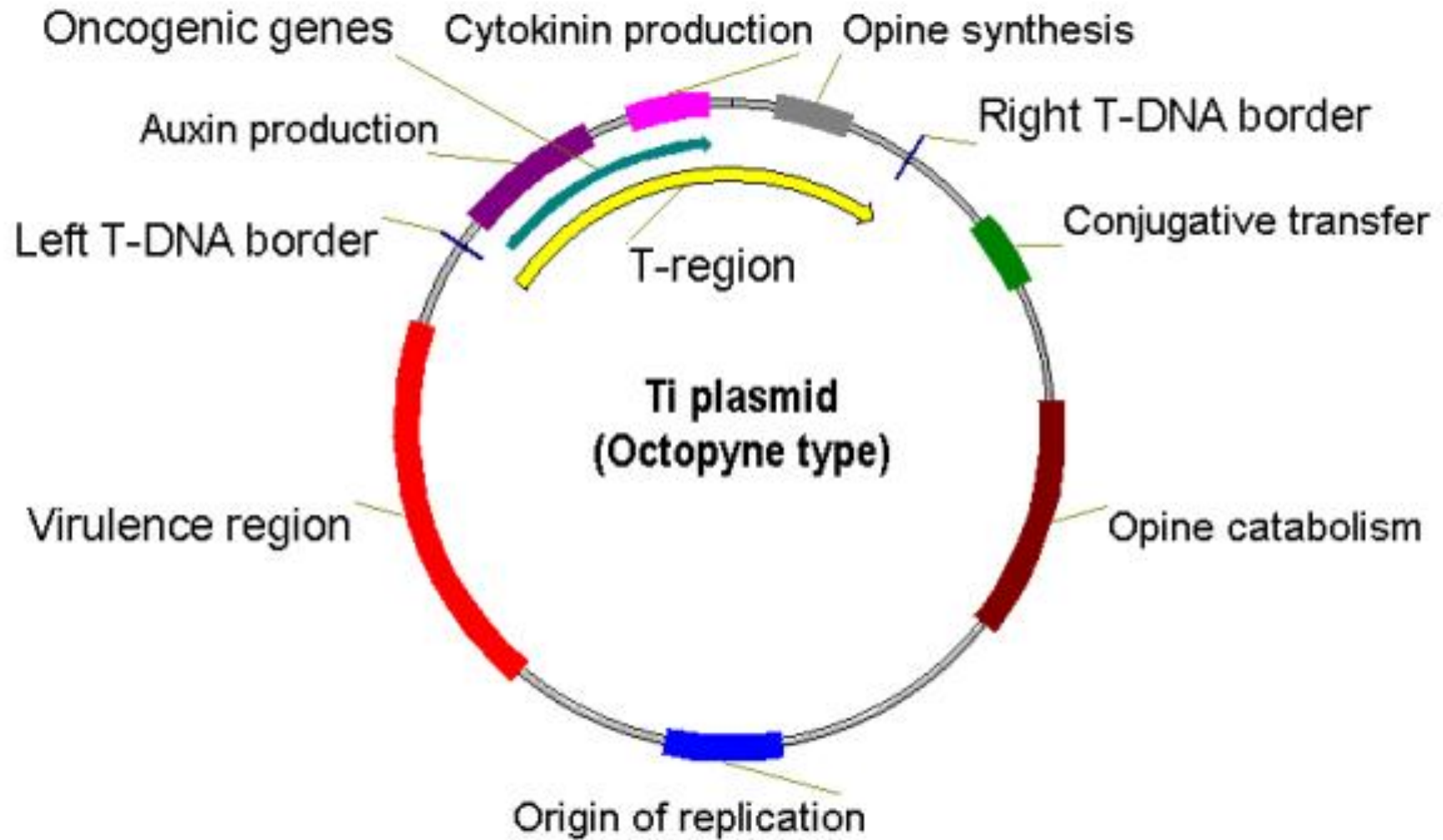
- BAC konlama sistemi, YACs'den daha kararlıdır.
- Bu tip vektörler;
 - Kompleks genomların büyük bir kısmının ve
 - Genomik bölgelerin fiziksel haritalarının yapımının için kullanışlıdır.

Bitki klonlama vektörleri

- Bitkilere birçok amaçla DNA klonlanmaktadır:
 - Pestisit ve herbisitlere karşı direnç oluşturmak
 - Ürün verimini, saflık derecesini ve kalitesini artırmak
 - Yeni süs bitkileri geliştirmek
 - Birçok meyve ve sebzenin raf ömrünü artırmak

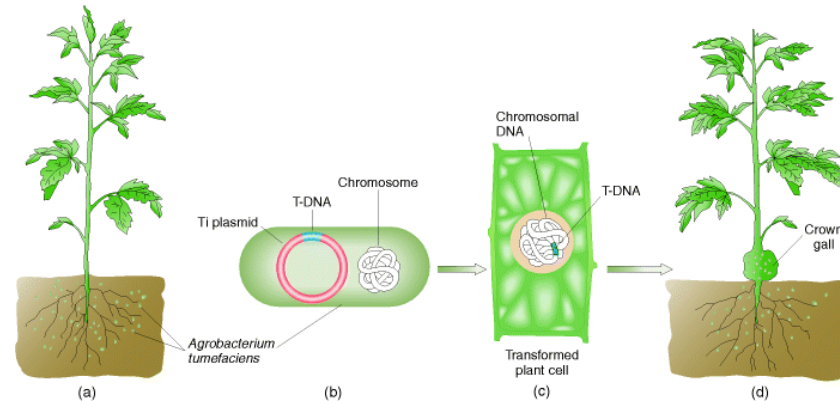
Bitki klonlama vektörleri

- Bitki hücrelerine verimli bir şekilde DNA aktarımını sağlayan birçok klonlama vektörü oluşturulmuştur.
- En sık kullanılan bitki virüsleri,
 - Tütün mozaik virüsü(TMV) ve
 - Agrobacterium tumefaciens adlı toprak bakterisinin Ti (tümör indükleyen) plazmididir.



Ti plazmidi

- *A. tumefaciens*, dikotil bitkilerin birçok türünde, bitki uru oluşumunu indükleyen bir toprak mikroorganizmasıdır.
- Bu bakteri bitkilerde doku yaralarına neden olur.
- Bunun sonucunda bitki hücreleri hızla çoğalarak enfeksiyon bölgesinde tümör oluşumu gerçekleşir.



T DNA ve opinlerin sentezi

- Plazmitteki özel bölge olan T-DNA (transfer DNA), bitkinin genomunun içine entegre edilebilen, yaklaşık olarak 8 geni kapsar.
- Bu genlerden bazıları, bakteri hücrelerinin büyümesi için besin olarak kullanılan ve opinler denilen, alışılmadık bileşenlerin sentezini sağlarlar.
- Böylece *A. tumefaciens*, kendi kullanımı için bitki konak hücresi içinde transkripsiyon ve translasyonu yönetir.

Biyoteknolojik Ti plazmitleri modifiye edilmiştir !!!

- Ti plazmitinin bu özelliği, bazı bitkilerde onu etkili bir klonlama vektörü haline getirmiştir.
- Bitki kromozomu içine entegre olan T-DNA, bitkilere yabancı gen transferi için kullanılabilir.
- Biyoteknolojik kullanım için tasarlanmış Ti plazmitleri, kanser oluşumuna yol açan genler çıkarılarak modifiye edilmişlerdir.

Bir bitkinin bütün hücrelerine yabancı DNA aktarmak ???

- Bilim adamlarının karşı karşıya kaldıkları sorunlardan biri, bir bitkinin bütün hücrelerine yabancı DNA'nın aktarılmasında etkili yöntemlerin geliştirilmesidir.
- Bunun bir yolu, yabancı DNA'nın, bütün bitkiyi rejenere edebilecek kapasiteye sahip birkaç bitki hücresinin içine entegre olmasıdır.

Bir bitkinin bütün hücrelerine yabancı DNA aktarmak ???

- Diğer bir yolu, tohum ya da bitki tomurcuklarını rekombinant *A. tumefaciens* içeren bir çözelti içinde ıslatarak, embriyo hücrelerine yabancı DNA'yı transfer etmektir.
- Marker genler, yabancı gen barındıran bitkilerin seçilmesine olanak sağlar.

Memeli hücre vektörleri: SV40

- En çok çalışılan virüslerden biri olan simian virüs 40 (SV40), küçük, halkasal, çift iplikli DNA virüsüdür.
- Virüs, sınırlı sayıda memeli hücrelerini enfekte edebilir.
- Sınırlı büyüklükte yabancı DNA parçasını taşıyabilir.

Memeli hücre vektörleri: SV40

- Eklene yabancı DNA için yer sağlamak amacıyla, bazı genler SV40 vektörlerinden silinmiştir.
- Bu nedenle, gerekli olan genleri içeren bir yardımcı virüs, rekombinant SV40 virüsünü yaymak ve paketlemek için gereklidir.
- Bu vektör ile aktarımı yapılan yabancı genin ekspresyonu geçicidir.

Retrovirüsler

- Memeli hücrelerine gen aktarımı için kullanılan diğer virüsler, retrovirüsler ve adenovirüslerdir.
- Retrovirüsler tek iplikli RNA virüsleridir, insan da dahil olmak üzere birçok hayvan hücrelerine gen aktarımı için umut vaat etmektedirler.
- Viral genom, çift iplikli RNA molekülü içerir.

Retrovirüsler

- Virüs, çift iplikli DNA molekülü yapmak için, revers transkriptaz enzimini kullanır.
- Taşıdığı genleri, konak hücre kromozomlarının içine entegre eder (provirüs).

Adenovirüsler

- Adenovirüs, çift iplikli DNA virüsüdür.
- Retrovirüse benzer, hücreleri yüksek verimlilikte enfekte eder ve geniş bir konak yelpazesine sahiptir.
- İnsan için patojenitesi düşüktür, bu özellik, adenovirüsü, gen terapisi için istenen vektör yapar.
- Retrovirüsten farklı olarak, adenovirüs, bölünen hücreleri enfekte etmek zorunda değildir.

Ökaryotik proteinlerin sentezi daha kompleks şartlar gerektirir !!!

- Ökaryotik proteinlerin sentezi (insan ya da fare gibi), daha kompleks süreçler gerektirir.
- Genellikle ökaryotik gen ürünlerinin zorunlu modifikasyonları olan,
 - Posttranslasyonal bölünme
 - Glikozilasyon
 - Amino asit modifikasyonları
 - Fosforilasyon
 - Asetilasyon
 - Sülfasyon
 - Açılasyonbakteri hücrelerinde mümkün değildir.

Klonlanan genler intron ve ekzon içermektedir!!!

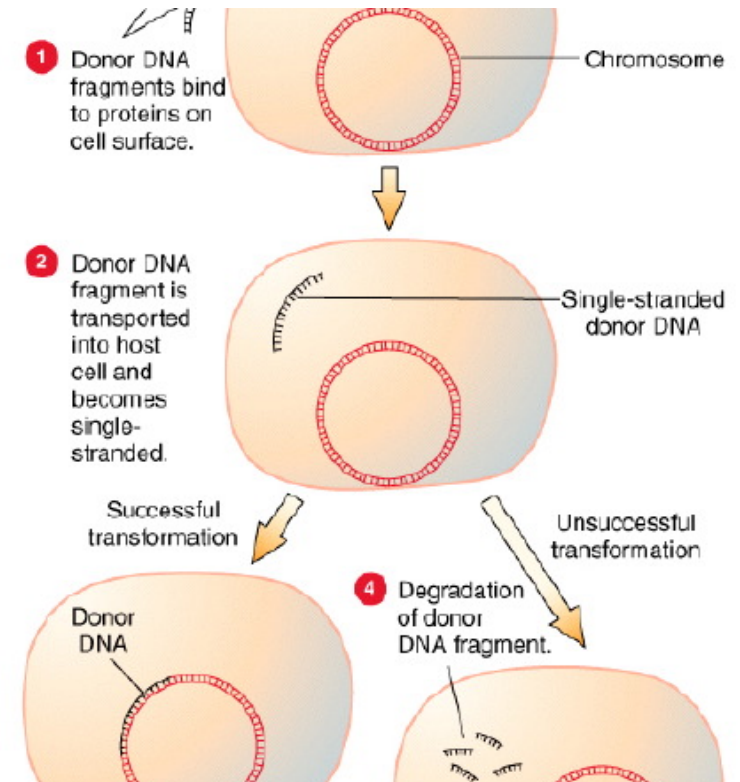
- Memeli proteinlerini kodlayan genler intron ve ekzon bölgelerinden oluşmaktadır.
- Bu da, mRNA'nın olgunlaştırılması sürecinde, intronların ayıklanmasını gerektirir (mRNA splicing).
- Birçok hayvan proteini yalnızca ökaryotik hücrelerde üretilmektedir.
- Çünkü yalnızca bu hücreler, RNA ve protein işleme yeteneğine sahiptir.

Terapötik değeri olan ürünlerin üretimi

- Terapatik değere sahip birçok önemli farmasötik bileşen bu yolla üretilmiştir.
- Bunların arasında:
 - Pıhtılaşma faktör proteinleri,
 - İnterferonlar,
 - Büyüme hormonu ve
 - Eritropoetinlerbulunmaktadır.

Hücre transformasyonu

- Transformasyon; bir hücrenin içine yabancı bir DNA'nın girmesi, bu DNA'nın genomun parçası haline gelmesi ve DNA'daki genlerin ifade olması sonucu, o hücrenin değişime uğramasıdır.



Gen transfer yöntemleri

- Organizmaların içine yeni DNA'yı sokmak ya da gen klonlamak amacıyla konakçıları kullanmak için gen transfer yöntemleri gereklidir.
- Çeşitli yöntemler; bakteri, maya, bitkiler ve yabancı DNA içeren hayvanların transformasyonu için uygundur.

Kompetent bakteriler

- Bazı bakteriler doğal olarak kompetenttir, yani ekstrasellular DNA'yı alma yetenekleri vardır.
- Buna rağmen kompetent olması için birçok bakterinin
 - kalsiyum klorit gibi bir tuz solüsyonuna maruz bırakılması ve
 - DNA varlığında ısı şoku uygulanmasıDNA'nın hücreler içine transforme olması için yeterlidir.
- Ancak ökaryotlar daha karmaşık yöntemlere gereksinim duyar.

Mikroprojektil bombardımanı (Biyolistik)

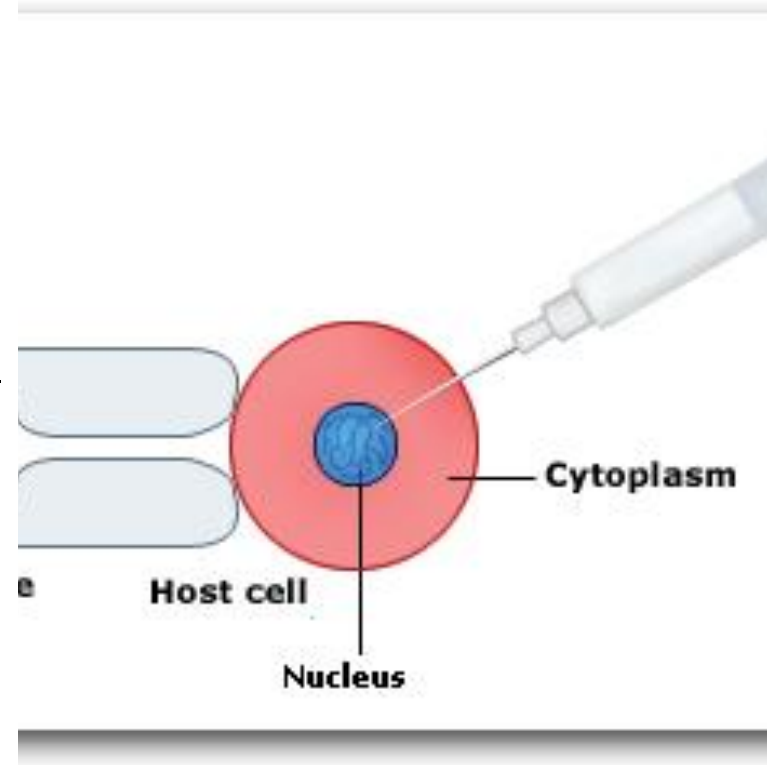
- Diğer bir hücre transformasyonu yöntemi mikroprojektil bombardımanı ya da biyolistiktir.
- Altın veya tungstenden yapılmış çok küçük mikroprojektiler DNA ile kaplanmıştır ve hücrelerin ya da dokuların içine bir parçacık tabancasından yüksek hızda atış yapılır.
- Hücre duvarı yıkılmak zorunda değildir çünkü mermiler hücre içine nüfuz eder.
- Biyolistik, gen terapisi açısından çok ümit vericidir.

Elektroporasyon

- Hücre duvarı içermeyen hücrelere sıklıkla uygulanır.
- Kalsiyum fosfat solüsyonuyla hücre yüzeyi üzerine DNA'nın tortulaşması sağlanarak hücre transforme edilebilir.

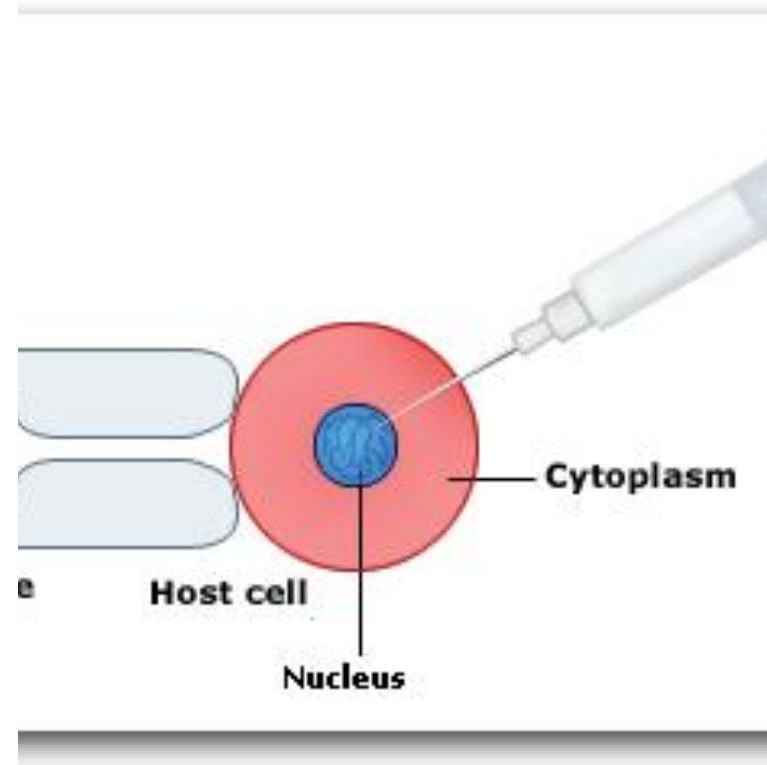
Mikroenjeksiyon

- Çok hücreli bir hayvanın tüm hücrelerinin içine gen girişi mikroenjeksiyon denilen bir başka yöntem gerektirir.
- Bir hayvanın tüm hücrelerinde bir geni ifade etmek için, yani transgenik bir organizma oluşturmak için, döllenmiş yumurta ya da erken embriyo, mikroenjeksiyon ile transforme edilir.



Mikroenjeksiyon

- DNA, son derece ince bir pipetle direk hayvan hücresi nükleusuna enjekte edilir.
- DNA hücre içine aktarıldıktan sonra, transforme döllenmiş yumurta gelişiminin tamamlanması için bir hayvan içine aşılanır.



DNA kütüphanesinin oluşturulması ve taranması

- DNA kütüphanesi; hücrenin bütün genomunun DNA parçalarını kapsayan koleksiyondur.
- Kütüphanenin taranması; istenilen özelliklere sahip DNA parçasının hangi klonda bulunduğu tespit edilmesi işlemidir.
- Vektörler, farklı organizmaların genomlarından izole edilmiş DNA fragmentlerinin kütüphanesinin oluşturulmasında kullanılır.

DNA kütüphanesi oluşturulmasının basamakları

- DNA , spesifik bir restriksiyon enzimi ile kesilir.
- DNA fragmentleri oluşturulur.
- Bu fragmentler vektör moleküllerinin içine aktarılır ve rekombinant moleküller oluşturulur.
- Rekombinant moleküller konak hücreye aktarılır.
- Bütün DNA moleküllerinin toplamı kütüphaneyi oluşturur.

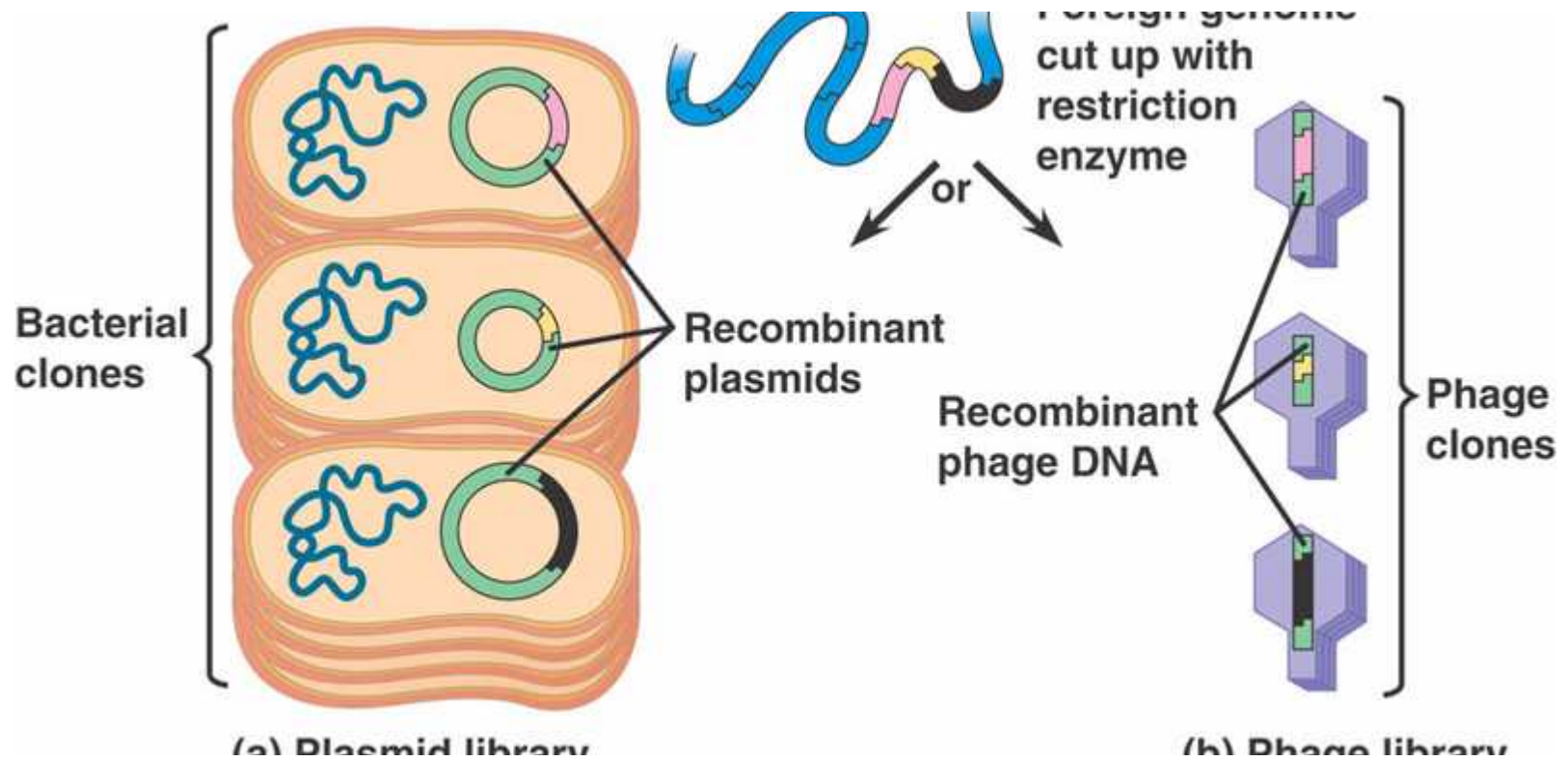
DNA kütüphanesinin oluşturulması

- Bilim insanları;
 - Genlerin organizasyonu ve düzenlenmesi hakkında daha fazla bilgi sağlamak ve
 - Çeşitli organizmaların genomlarını haritalamak ve dizilemek için kütüphaneleri inşa etmişlerdir.

DNA kütüphanesi tipleri

- Spesifik bir DNA'nın izolasyonunda iki tip kütüphane kullanılabilir;
 - Genomik kütüphane
 - cDNA kütüphanesi

Genomik kütüphane, bir organizmadaki tüm genomu temsil eden DNA fragmanlarını içerir



Genomik kütüphane nasıl oluşturulur?

- Soya fasulyesi, genomik kütüphanenin nasıl oluşturulduğunu göstermek için örnek olarak kullanılabilir.
- Soya hücresinden total nükleer DNA izole edilir.
- DNA, spesifik restriksiyon enzimi ile kesilir.
- Aynı zamanda vektör de (plazmit, kozmit ya da bakteri fajı) aynı enzim ile kesilir.
- Böylece vektör lineerleştirilir (düzlemsel hale getirilir).

Genomik kütüphane nasıl oluşturulur?

- Bu iki DNA (genomik DNA parçaları ve vektör) bir test tüpünde karıştırılır.
- Rekombinant moleküller oluşturmak için ortama ligaz eklenir.
- Bu rekombinant DNA molekülleri konak hücreye aktarılır.

Genomik kütüphane nasıl oluşturulur?

- Rekombinant plazmitler ya da kozmitler içeren transforme bakteri kolonileri, besi ortamında seçime tabii tutulurlar.
- Her koloni, vektör içine klonlanmış spesifik soya DNA parçalarını içerir.
- *E. coli* hücrelerinin lizis olduğu kolonilerde oluşan plaklar, soya genom parçaları taşıyan rekombinant virüsler içerir.

Genomik kütüphane nasıl oluşturulur?

- Genomun tüm DNA parçalarını içeren koloniler ya da plak toplulukları kütüphaneyi oluşturur.
- Örneğin; insan genomu 100.000'den fazla kozmit klondan ya da yaklaşık olarak 10.000 YAC klonlarından oluşmaktadır.

Genomik kütüphane nasıl oluşturulur?

- Soya genomik kütüphanesi genellikle fragmentlere bölünmüş ve *E. coli* hücrelerine girmiş tam bir soya genomu içerir.
- Vektör içine girmiş DNA'nın ortalama boyutundan ve organizmanın genomunun boyutundan basit bir hesaplama, araştırmacılara tüm genomun temsil edilmesi için kaç tane kütüphane klonunun gerektiğini söyler.

cDNA kütüphaneleri daha avantajlıdır

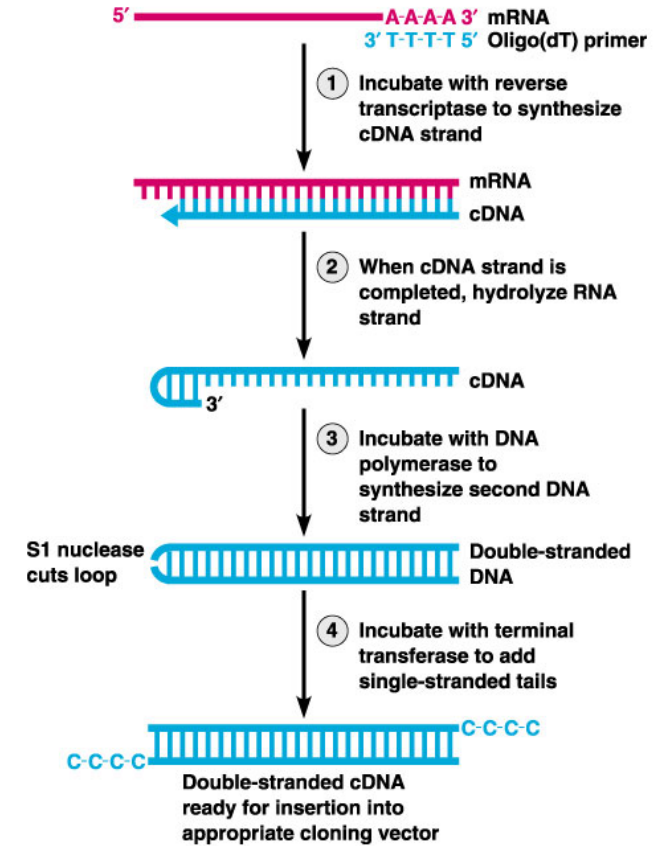
- Bazı organizmalar çok büyük genomlara sahiptir.
- Kütüphane, özellikle hayvan ya da bitkideki belirli bir gen için taranmak zorunda olduğunda, taranan klonların sayısı çok fazla olduğundan kontrol edilemez.
- Bu nedenle sadece belirli hücre tiplerinden eksprese olan genleri içeren bir kütüphane daha uygun olabilir.

cDNA kütüphaneleri

- Bu kütüphane, klonlanmış DNA miktarını büyük ölçüde düşürür.
- Her hücre tam bir gen setine sahip olmasına rağmen sadece spesifik bir gen seti eksprese olur ve diğerleri sessiz kalır.

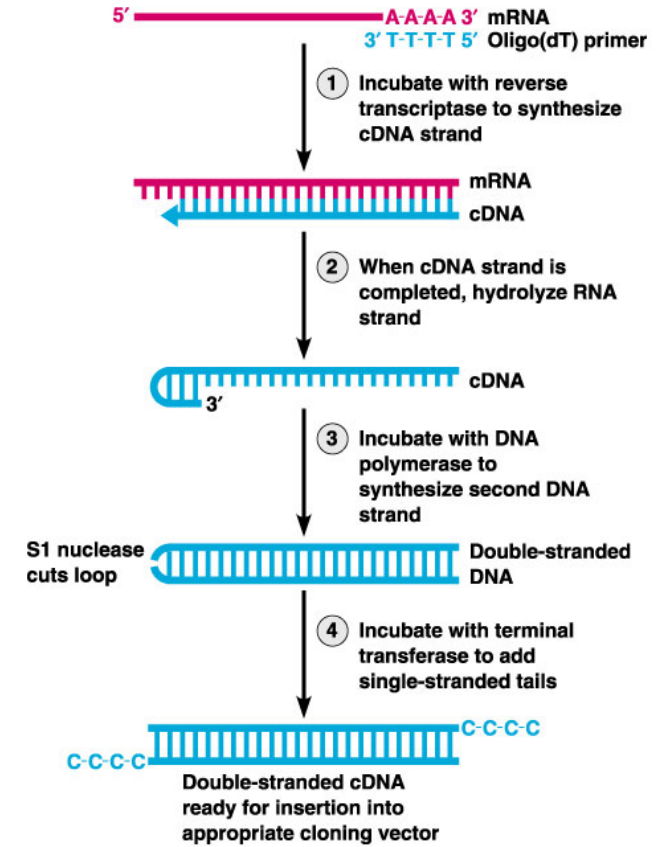
Soya cDNA kütüphanesi nasıl oluşturulur?

- Yaprak hücrelerinden RNA izole edilir.
- cDNA sentezi ile DNA oluşturmak için mRNA kalıp olarak kullanılır.
- mRNA kalıptan cDNA'nın geriye sentezini revers transkriptaz katalizler.

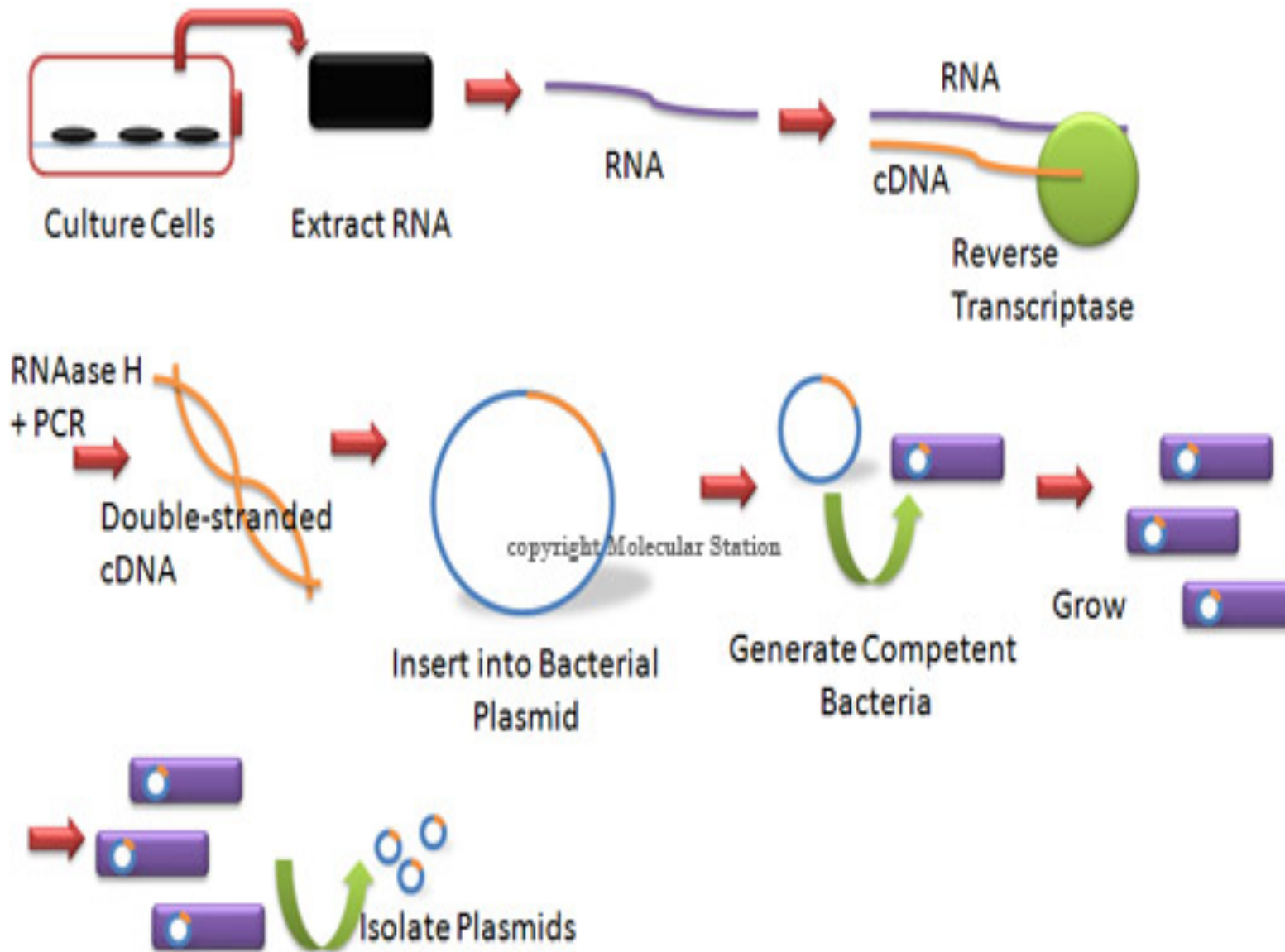


Soya cDNA kütüphanesi nasıl oluşturulur?

- DNA polimeraz ikinci DNA ipliğinin sentezinde kullanılır.
- Çift iplikli cDNA elde edilir.
- cDNA, klonlama vektörüne aktarılır.
- Rekombinant vektör bakteri içine girer.
- Kütüphane, soya yaprak hücrelerinden elde edilen mRNA'ların cDNA'larından oluşur.



©Addison Wesley Longman, Inc.



Genomik ve cDNA kütüphaneleri arasındaki farklar

- Çoğu ökaryotik genler içindeki kodlanmayan intronlar cDNA'ya dahil edilmez.
- Çünkü mRNA, cDNA sentezi için izole edilmeden önce post transkripsiyonel modifikasyon geçirmiştir.

Genomik ve cDNA kütüphaneleri arasındaki farklar

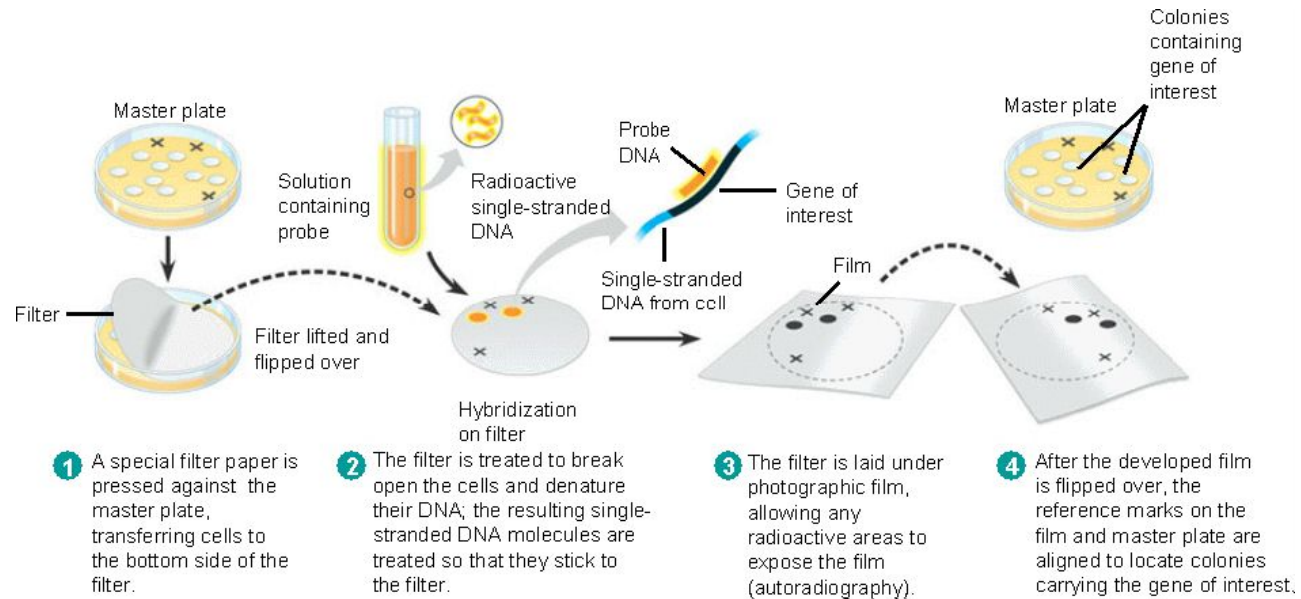
- Üstelik cDNA kütüphaneleri; promotorlar, güçlendiriciler gibi genlere bitişik düzenleyici yapılar içermezler.
- Az sayıda klonla kütüphane oluşturulmasıyla tarama aşamaları daha kolay olur ve daha az zaman alır.

Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Kütüphane bir kez oluşturulduğunda, spesifik DNA parçası içeren rekombinant klonlar, nükleik asit hibridizasyonu olarak adlandırılan tarama yöntemiyle saptanabilir.
- Tarama için spesifik bir DNA dizisi, uygun hedef dizi içeren klonları ya da plakları belirleyen prob olarak kullanılır.

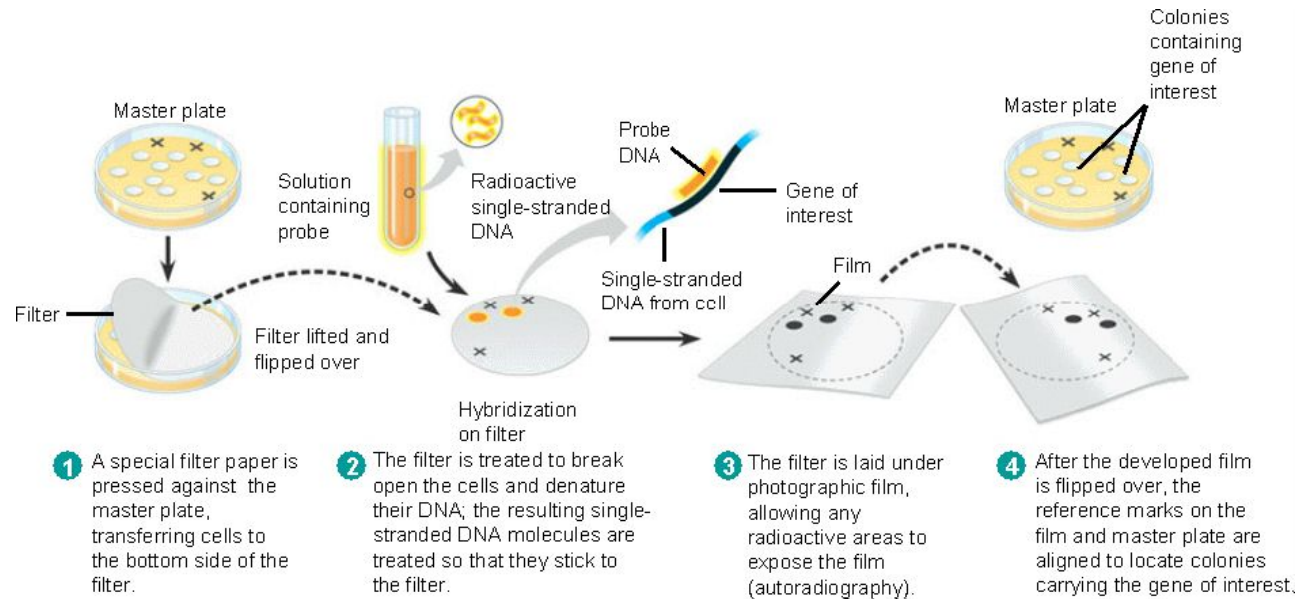
Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Bakteri klonları ya da plakları petri kabından nitroselüloz ya da naylondan yapılmış zarlara transfer edilir.



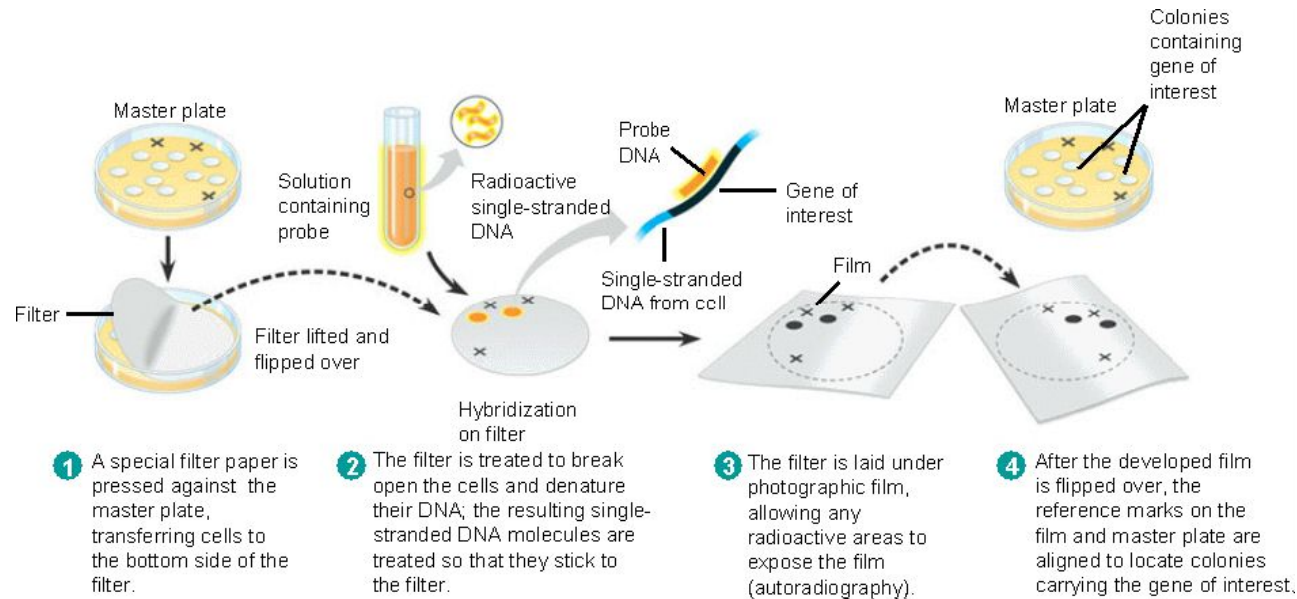
Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Membran, koloniler ya da plakların üzerine yerleştirilir, koloniler ya da plakların zara geçmesi için baskı uygulanır ve zar çekilir.



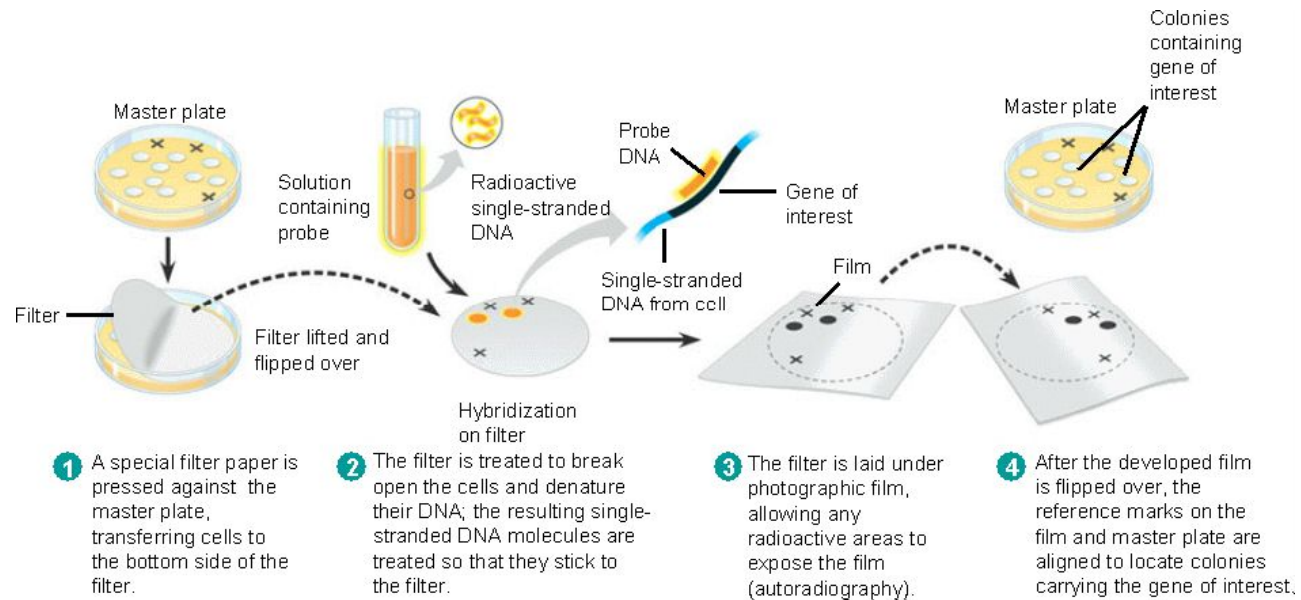
Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Kütüphanenin içinde ilgilenilen DNA'yı içeren bir ya da birkaç koloni ya da plak olabilir.



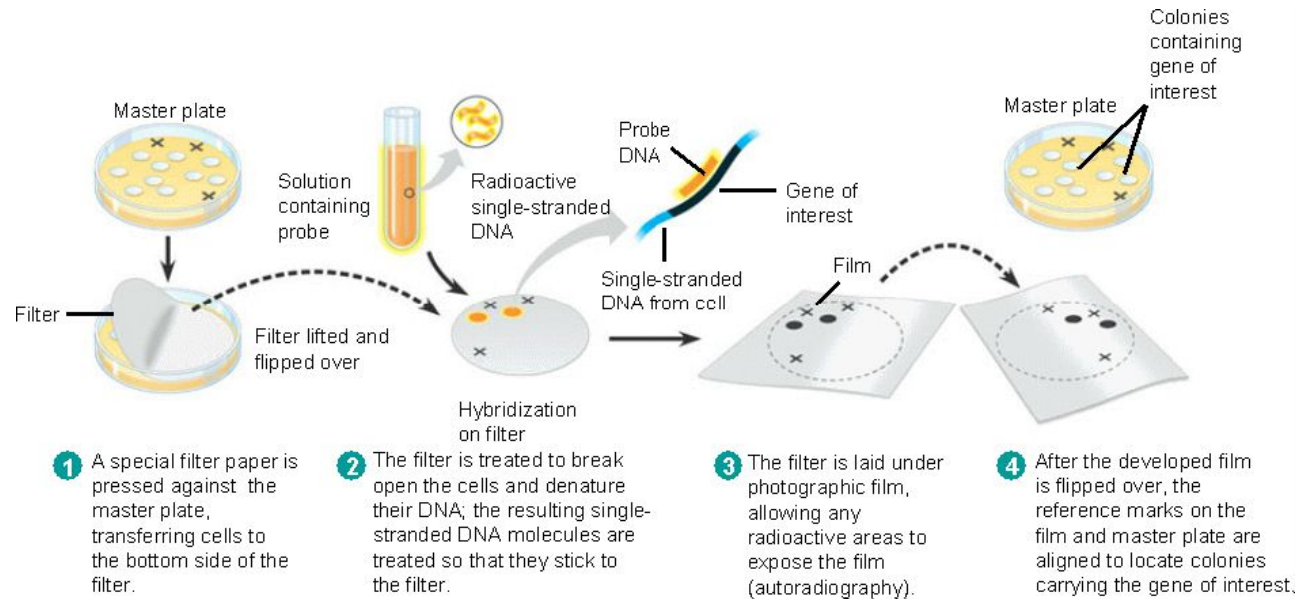
Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Tek iplikli DNA probu hedef DNA ile baz eşleşmesi yapmak için tasarlanmıştır.



Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Bir hedef DNA ipliği prob DNA ipliğine hidrojen bağıyla bağlanır ve hibrid DNA oluşur.



Kütüphaneden ilgilenilen genin tespiti: Nükleik asit hibridizasyonu

- Membrana bağlı hedef DNA ve prob DNA'nın hibridize olup olmadığını belirlemek için, prob radyoaktif olarak işaretlenir.
- Hibridizasyondan sonra membran X-ray filmine maruz bırakılır.
- Hibridizasyonun gerçekleştiği bölgelerde radyoaktif DNA otoradyografik bir resim oluşturur.

Ekspresyon kütüphanesi

- Ekspresyon kütüphaneleri, gen ekspresyonu için gerekli düzenleyici elementler içeren klonlama vektörleriyle yapılır (Örn; promotör bölgeleri gibi).
- Yabancı bir gen ya da cDNA, bir ekspresyon vektörüne klonlandığında gen transkribe edilir.

Raportör gen

- Bir raportör gen, yabancı bir gen ya da cDNA'nın ifade edilip edilmediğini belirlemek için kullanılır.
- Birçok raportör gen, kodlanmış enzimlerin aktivitelerinin hızla analiz edilmesi için kullanılmaktadır.

Lusiferaz raportör gen olarak kullanılır

- Ateş böceğinden alınan lusiferaz geni, günümüzde kullanılan önemli bir raportör gendir.
- Ateş böceği lusiferaz geni biyoluminesans yayar.
- Hedef gene bitişik halde aktarılan lusiferaz geni, ilgili genin hedef organizmada ifade edildiğini doğrular.



Raportör genlerin sunduğu avantajlar

- Raportör genler araştırmacıya;
 - Ekspresyon seviyesinin ölçülmesi,
 - Farklı promotorlardaki ekspresyon seviyelerinin test edilmesi ve
 - Dokuda hangi genlerinin eksprese olduğunu belirlenmesi için kolaylık sağlar.

- Raportör genler bitkiler, memeliler, balıklar ve bakteriler gibi birçok farklı organizmanın hücrelerinde gen ifadesinin araştırılması için kullanılmıştır.

Yeşil floresan proteini (GFP)

- Kullanılan diğer bir raportör genidir.
- Denizanası tarafından üretilir ve fotoprotein akuorin ile etkileşime girerek yeşil florasan renk oluşturur.
- Protein mavi ya da ultraviyole ışıqla uyarıldığında, GFP doğal olarak yeşil florasan ışığı yayar.

Yeşil floresan proteini (GFP)

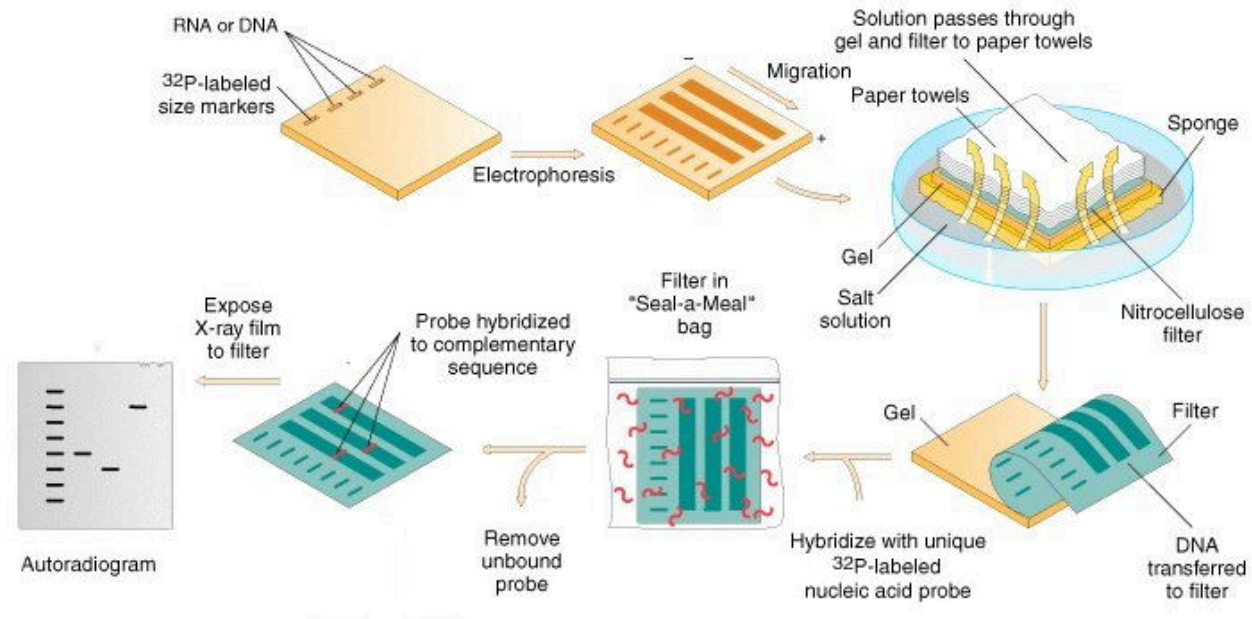
- GFP farklı dalga boylarındaki floresan ışığı yaymak için tasarlanmıştır.
- Yoğunluğuna rağmen, sinyal nispeten zayıf olduğu için, GFP'nin ifadesi çok kuvvetli promotorlar ya da diğer düzenleyici dizilerinin kullanılması gerektirir.
- GFP kullanılarak spesifik proteinler izlenebilir.

Southern Blot

- 1970'lerin ortasında Edward Southern, Southern Blotlama olarak adlandırılan basit bir teknik geliştirmiştir.
- Bu teknikte DNA fragmentleri, jelden, hibridizasyon için kullanılan özel bir membrana transfer edilir.
- Blotlama sırasında bu fragmentler alkali tamponda denatüre edilir ve tek iplikler nitroselüloz membrana transfer edilir.

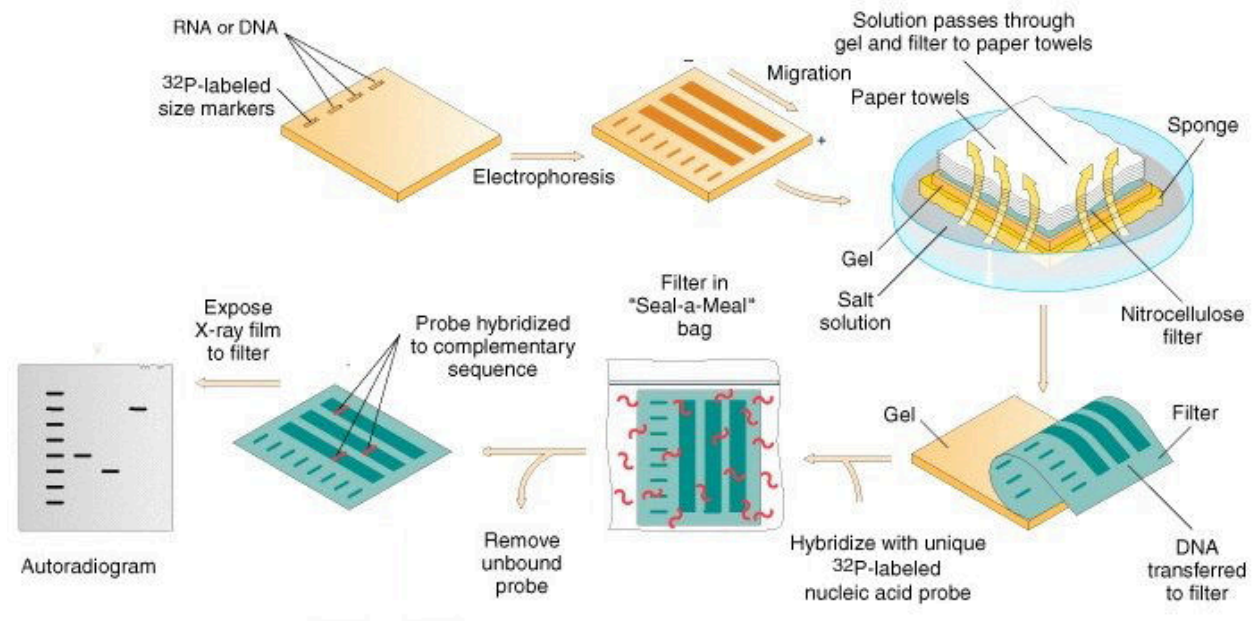
Southern Blot

- Membran, kâğıt havlu yığınının altında, jelin üstünde sıkıştırılmış olarak bulunmaktadır.



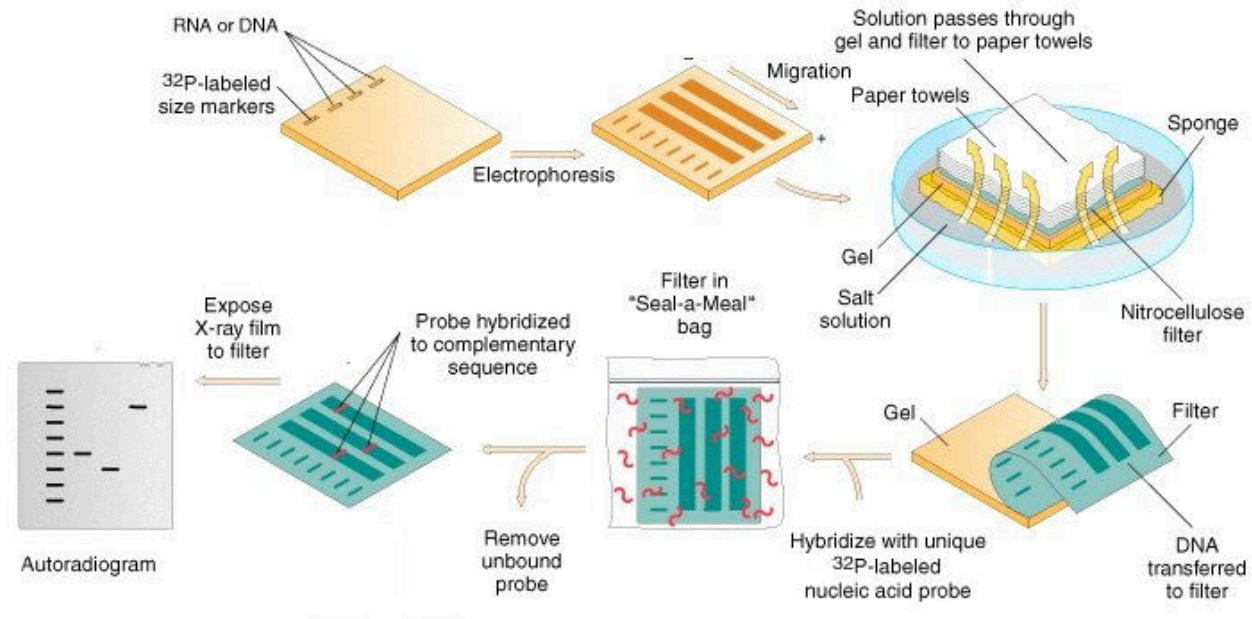
Southern Blot

- Tank içindeki tampon, jelden membrana DNA'nın transferini kolaylaştırır.



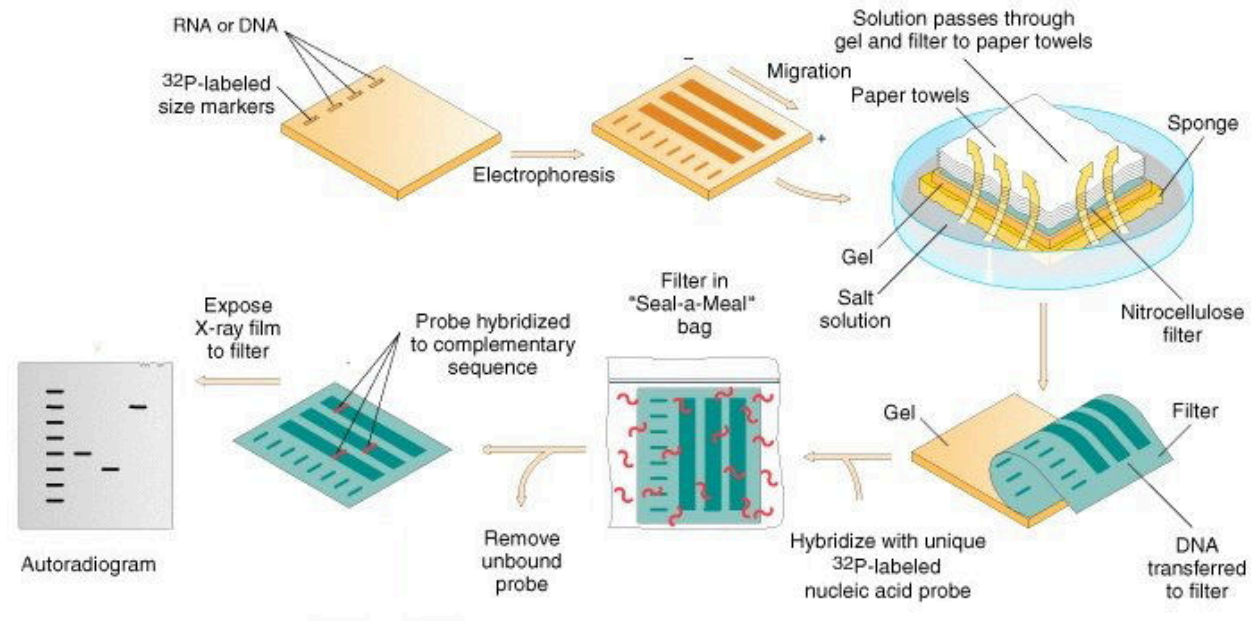
Southern Blot

- Membran, agaroz jelin kopyasıdır ve kolon veya plak hibridizasyonları için daha önce açıklandığı gibi hibritleşmede kullanılır.



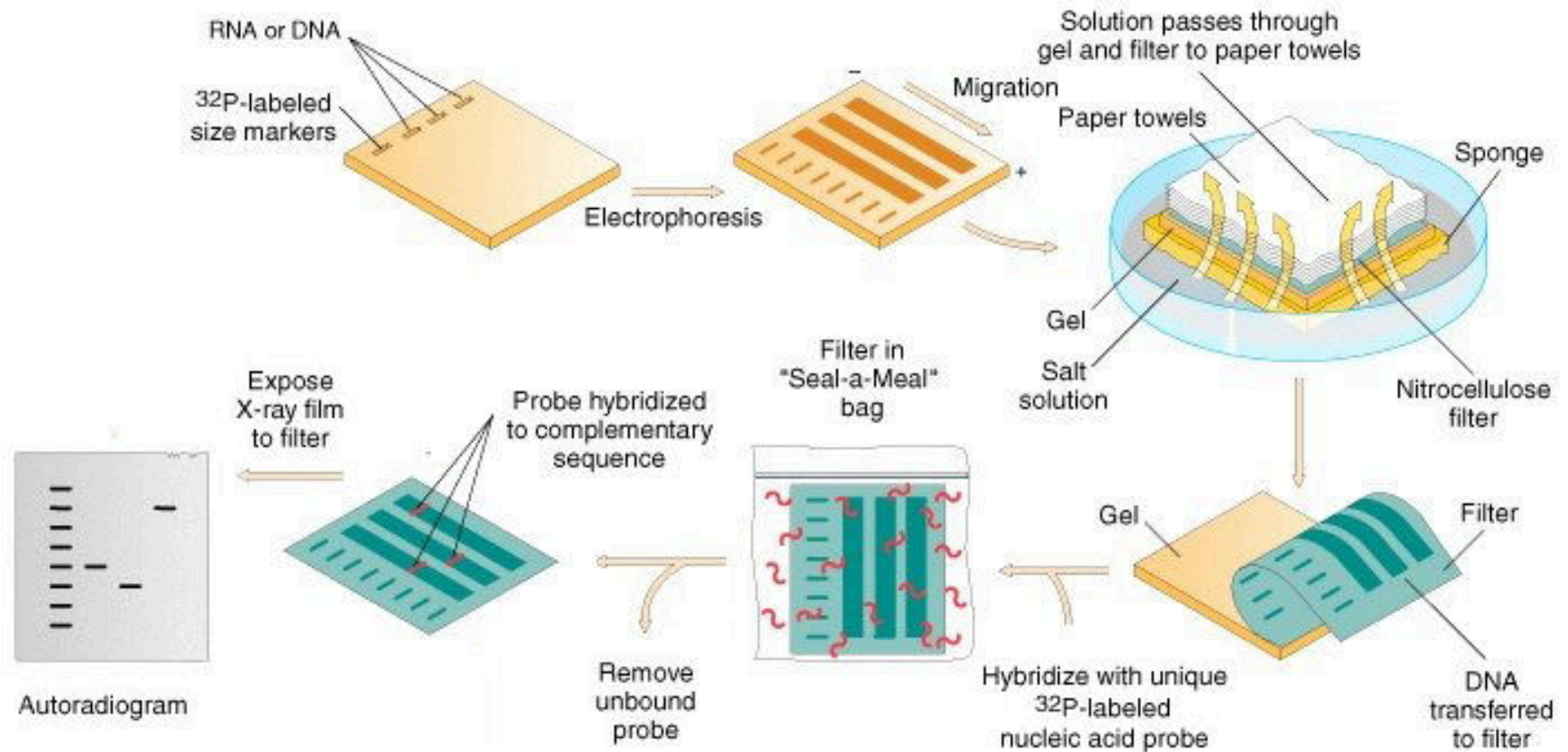
Southern Blot

- Eğer bir prob membran üzerindeki fragmentlerle hibritleştirilirse, bu bölgeler fotoğrafik filmle tespit edilebilir.



Southern Blot

- Southern Blotlama yaygın olarak jel üzerindeki birçok DNA bandından spesifik bir gen fragmentini belirlemek için kullanılır.
- Southern blotlama geleneksel bir yöntem olmasına rağmen; verimliliği, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği büyük ölçüde geliştirilmiştir.



RFLP (Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi)

- Southern blot hibridizasyon, organizmalar arasındaki veya DNA bölgeleri içindeki bantlaşma şekillerindeki farklılıkları tespit etmek için kullanılır.
- Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) denilen DNA restriksiyon fragment uzunluk farklılıkları, bireysel DNA parmak izi oluşturmak için kullanılmaktadır.
- DNA parmak izi, adli tıp analizlerinde güçlü bir araçtır.

DNA parmak izi

- Bireyler DNA parmak izleri ile belirlenebilir.
- DNA parmak iziyle, akrabalık anlaşmazlıkları çözülebilir.
- Başka bir önemli uygulama ise tıbbi teşhislerdir.
- Burada RFLP farklılıkları, kalıtsal hastalık tespit etmek için kullanılmaktadır.

DNA parmak izi

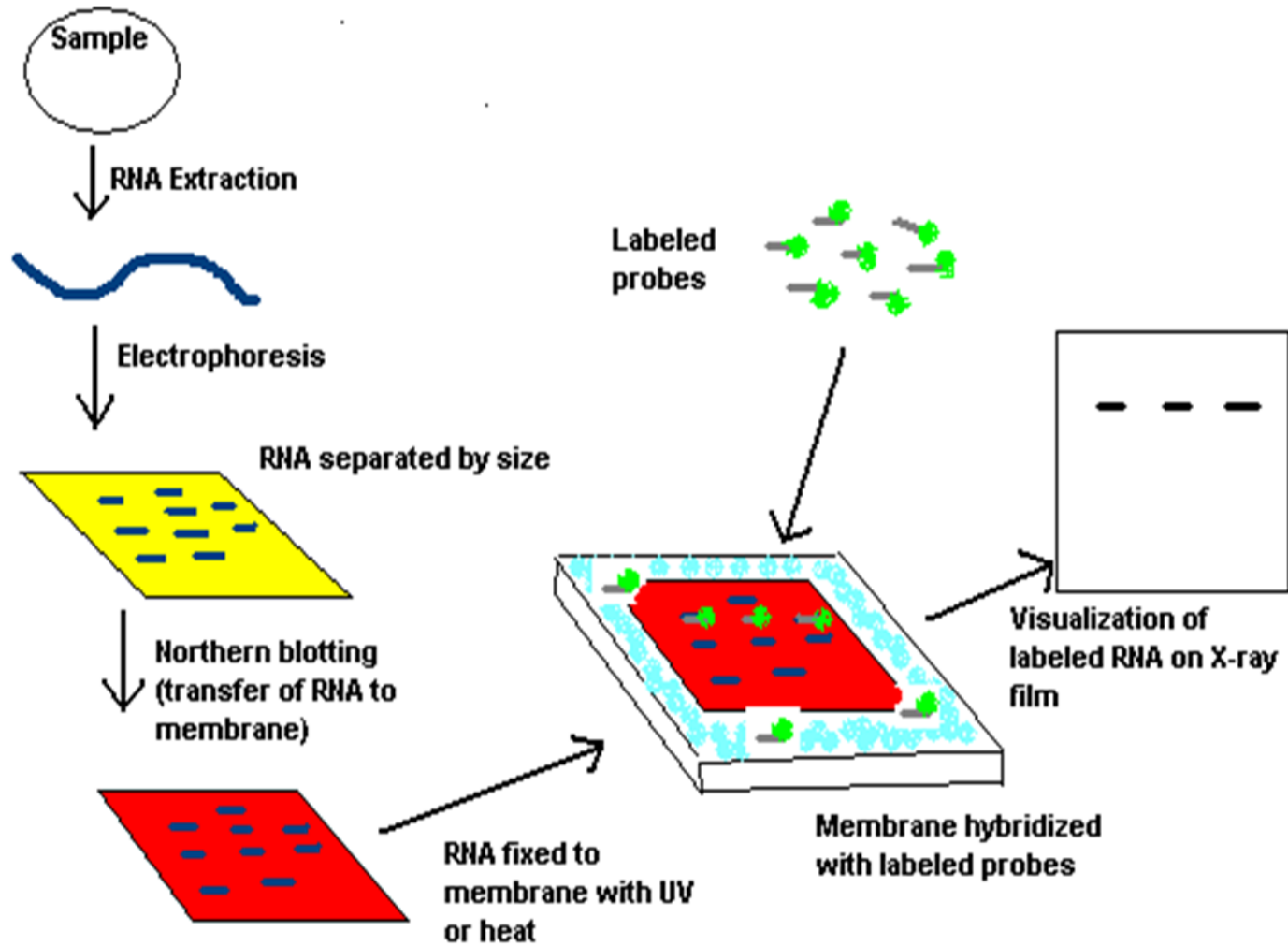
- Bazı bozuk genler, tek nükleotidden dolayı normal benzerlerinden farklıdır.
- Eğer mutasyon restriksiyon enzimi kesim bölgesindeyse, enzim DNA'yı kesemeyebilir.
- Dolayısıyla farklı bir DNA bant deseni oluşur.
- Desenlerin karşılaştırılması, bir birey içindeki, normal ve varyant genleri belirlemek için tıbbi klinisyenlere önemli ipuçları sağlar.

Northern Blot

- Northern blotlama olarak adlandırılan ve benzer yöntemde, hedef molekül RNA'dır.
- DNA transferine benzer şekilde, DNA yerine RNA jelden bir membrana transfer edilir.
- Problar DNA'dır.

Northern Blot

- Northern blot hibridizasyonu, transkribe olmuş RNA'ların boyutunu belirlemek için kullanılır.
- Bu nedenle, bu yöntem spesifik genlerin ekspresyonunun çalışılması için kullanışlıdır.



Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- 1985'te kütüphane oluşturmadan ve tarama yapmadan, araştırcının hızla spesifik DNA bölgesini izole edebileceği bir yöntem geliştirilmiştir.
- Polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılan bu metotla test tüpü içinde spesifik DNA bölgesini çoğaltmak için DNA replikasyon bileşenleri kullanılır.

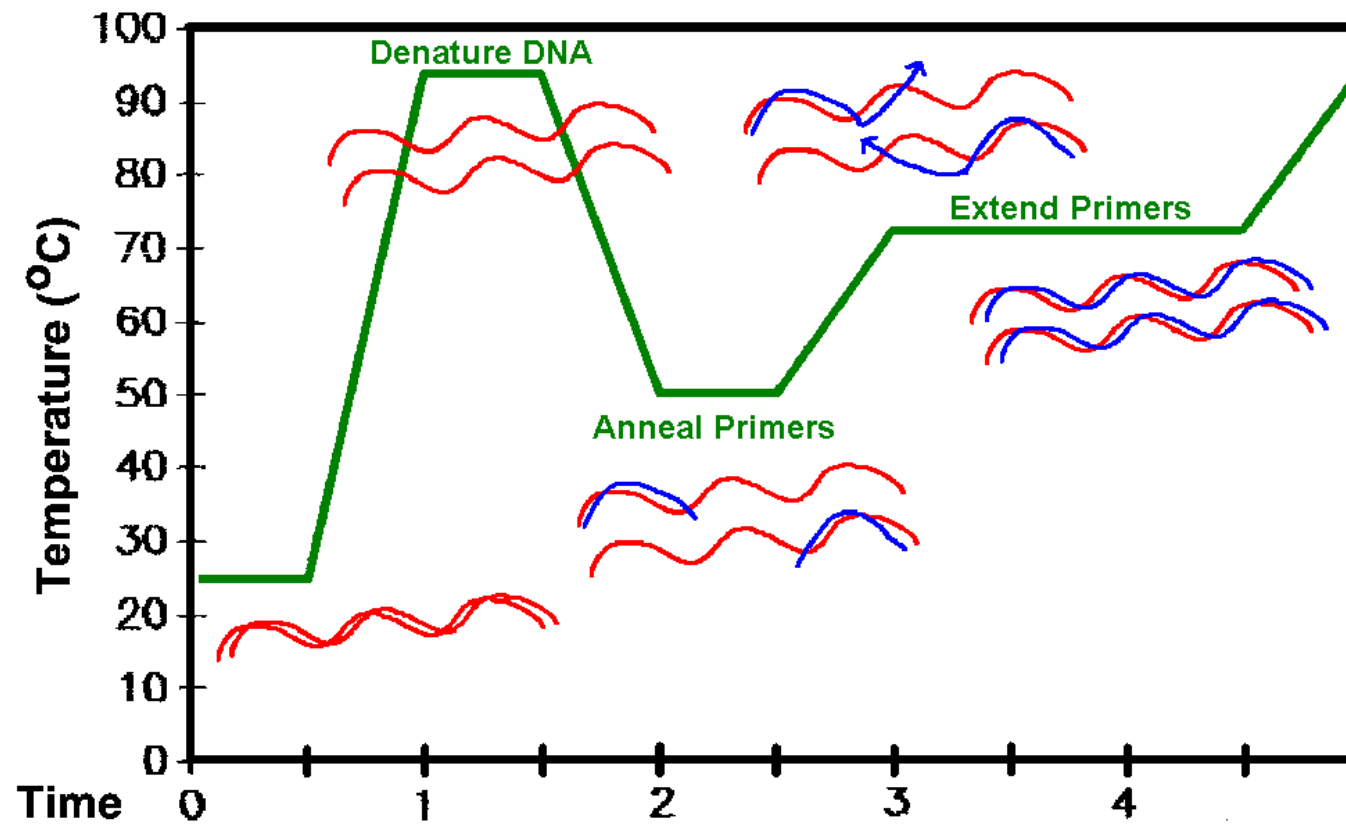
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- PCR, bilim insanlarına hibridizasyonu kullanmadan spesifik DNA parçalarını seçici olarak çoğaltma imkânı verir.
- Herhangi bir DNA dizisi, bir organizmadaki total DNA'dan izole edilebilir.
- Ancak, genel olarak amplifiye edilecek DNA'nın yan bölgelerinin (primerlerinin) dizisi bilinmelidir.
- Böylece amfikasyonda kullanılan primerler sentezlenebilir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- Primerler, DNA polimeraz ve test tüpü içinde verilen dört deoksiribonükleotidin tümü kullanılarak (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) primerler arasındaki DNA çoğaltılır.
- Her bir amplikasyon döngüsünde (bu replikasyondur), kalıp DNA yüksek sıcaklıklarda denatüre edilir.
- Sıcaklığın düşürülmesiyle primerlerin bağlanması sağlanır ve DNA polimeraz primerlerden DNA'yı uzatır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)



Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- Tekrarlanan denatürasyon döngüleri, primer bağlanması ve DNA amplifikasyonu üssel DNA sentezi ile sonuçlanır.
- Bu işlem, sıcaklığı ve zamanı otomatik olarak ayarlayan bir cihaz olan termal döngü cihazı kullanılarak yapılır.



Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

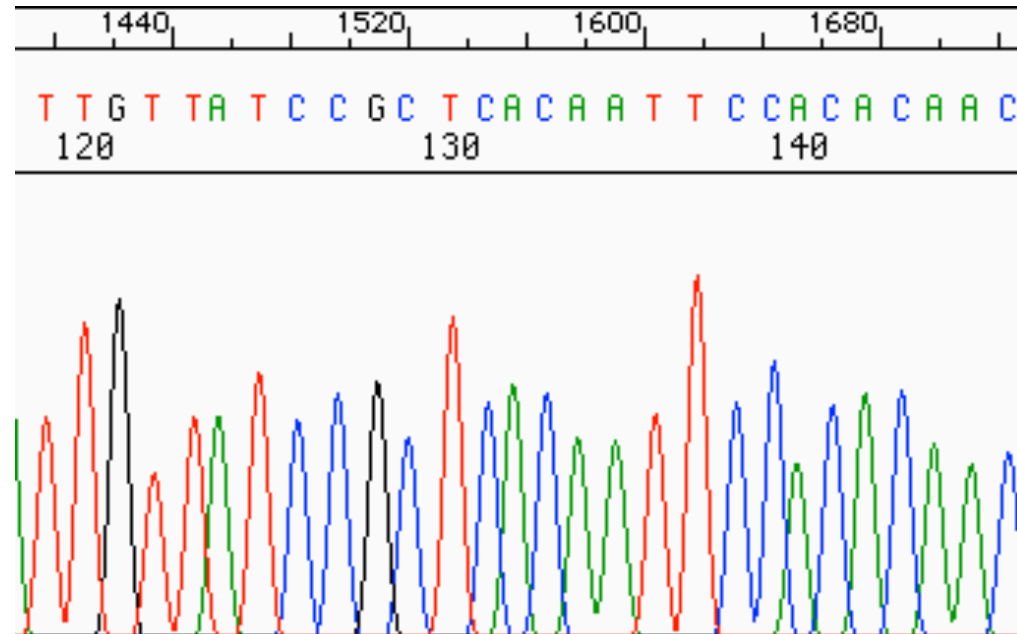
- Bu işlem için kullanılan DNA polimeraz (Taq polimeraz), sıcak su kaynaklarda yaşayan termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'dan izole edilir.
- Polimeraz zincir reaksiyonundan üretileen ürünler, agaroz jel elektroforeziyle analiz edilir.
- PCR, toplam DNA'dan bir kütüphanenin taranması gerekmez, belirli bir gen bölgesinin hızla izole edilmesini sağlar.

PCR'nin kullanım amaçları

- Spesifik dizileri hızla izole etmek için
- Tıbbi teşhiste spesifik genetik lokusları belirlemek için
- Genetik ilişkileri belirlemek veya adli konularda kimlik tespiti için
- DNA'yı hızlı bir şekilde dizilemek için

DNA dizileme

- Bugün, laboratuvarlar rutin olarak DNA'daki deoksiribonükleotid dizilerinin sırası belirlenebilmektedir.



DNA dizileme ve genom projeleri

- İnsan Genom Projesi, fare genom projesi ve pirinç genom projesi gibi büyük genom projeleri sayesinde;
 - Genomların evrimi,
 - Genlerin yerleşimi,
 - Düzenleyici elemanlar ve başka diziler,
 - Mutasyonların varlığı sonucu ortaya çıkan genetik hastalıklar hakkında bilgi edinilebilmektedir.

Gen dizileme ve bilgisayar teknolojisi

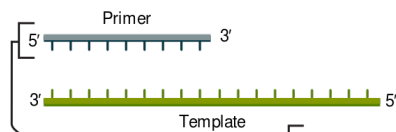
- İşlevi bilinmeyen DNA dizileri ve homolog proteinler için hızlıca veri tabanlarını araştırmak (örn; EMBI ve GenBank),
- Protein dizilerini tahmin etmek ve
- Kodlayıcı dizileri bulmak için

rutin bir şekilde bilgisayarlar kullanılmaktadır.

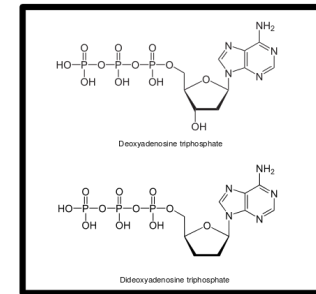
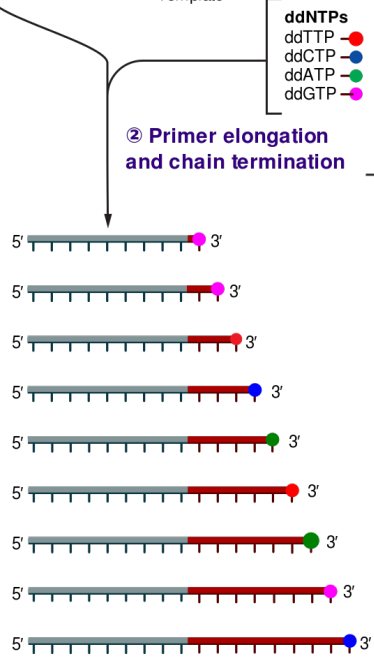
Sanger dizileme metodu

① Reaction mixture

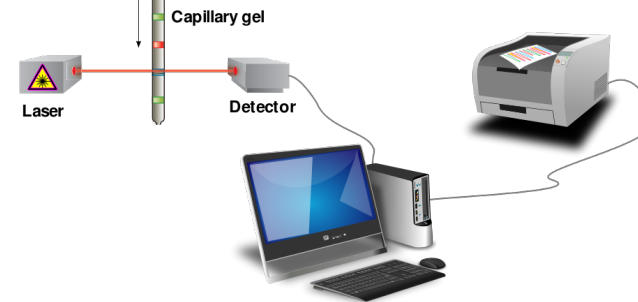
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



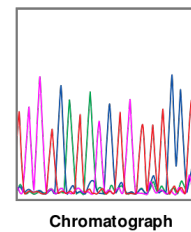
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



Protein alışmaları

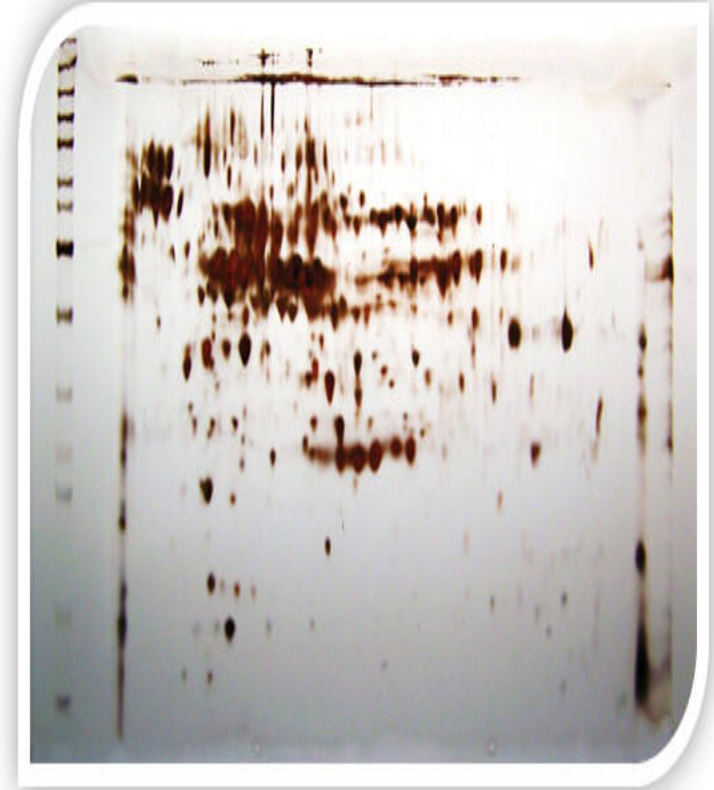
- Protein alışmaları, rekombinant DNA teknolojisinin önemli bir bileşenidir.
- Proteinler, miktarı ve dizisi araştırılan bilimsel moleküllerdir.
- Proteinin yapısı değiştirilmeden önce bu proteinin yapısı ve fonksiyonu açığa kavuşturulmalıdır.
- Önemli aminoasitlerin ve bunların modifikasyonu sonucu oluşacak etkinin (örneğin protein stabilitesi ve aktivitesi) belirlenmesi gerekir.

Protein elektroforezi

- Elektroforez, proteinleri boyut ve net yüklerine göre ayırmak için kullanılır.
- Proteinler, tek ya da iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılır.
- Poliakrilamid, agarozdan daha yüksek çözünürlüğe sahiptir.

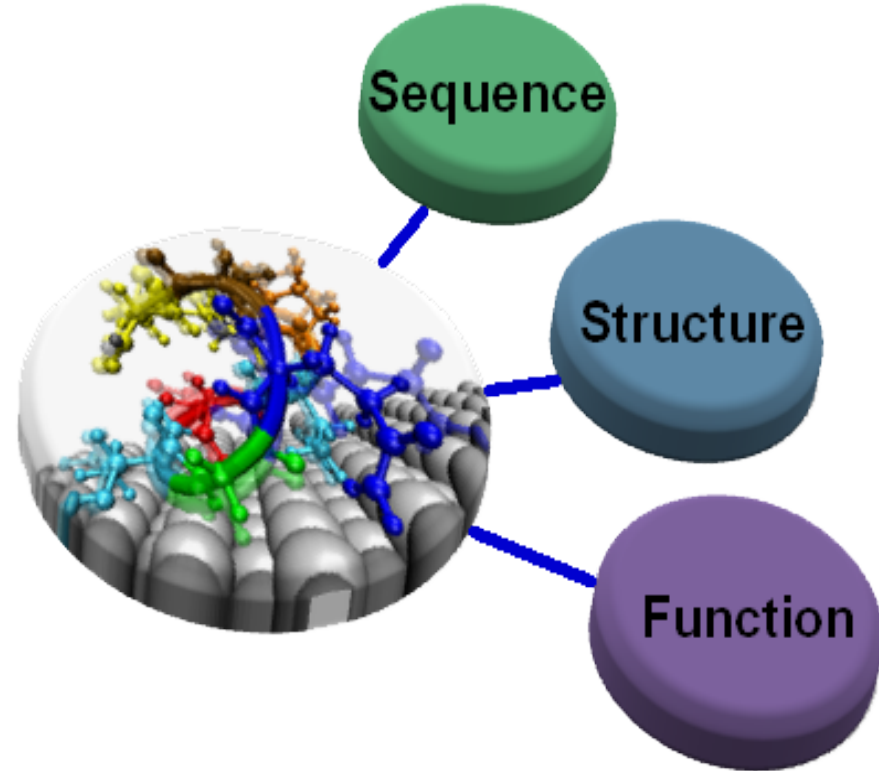
Protein elektroforezi

- Boya ile etiketlenmiş proteinler, tek boyutlu jelde radyoaktif etiketleme ya da otoradyografi ile görüntülendiğinde bantlar verir.



Protein mühendisliği

- Protein mühendisliği spesifik proteinlerin geliştirilmesi için araştırmacılara heyecan verici bir alan sunar.



Protein mühendisliği

- Proteinin aminoasit dizisi değiştirilerek, proteinin yapısı, spesifik yollarda işlevi artırılacak şekilde değiştirilebilir.

Protein yapı değişiklikleri

- Artırılmış stabilite (degradasyon, pH değişimi, sıcaklık, oksidasyon ve kontaminasyona karşı dirençlilik gibi)
- Artırılmış enzim aktivitesi (değiştirilmiş substrat spesifitesi ya da daha ekstrem koşullarda enzim aktivitesi)

Protein yapı değişiklikleri

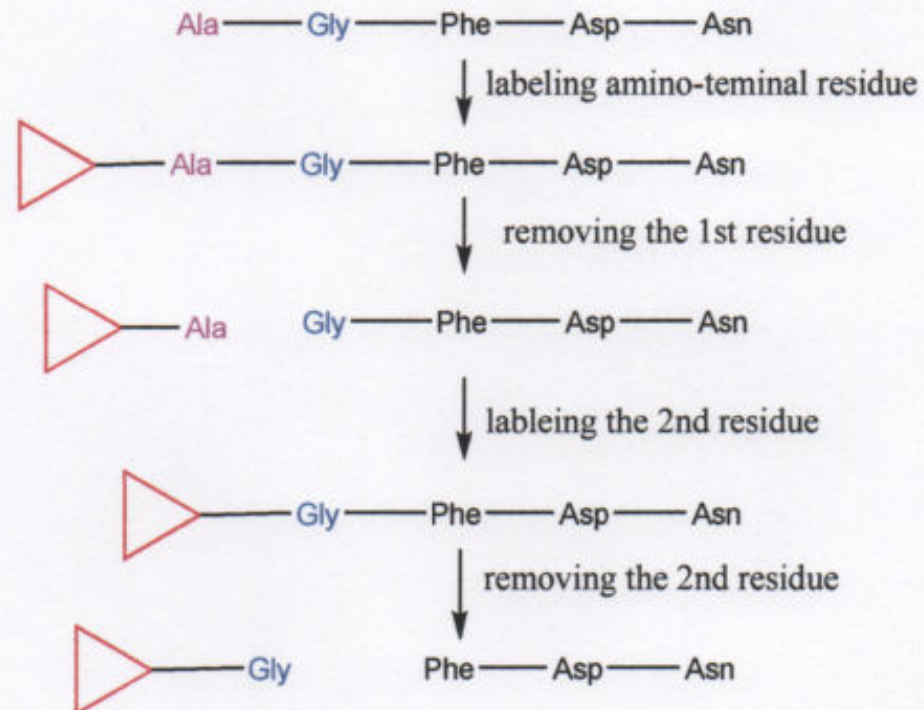
- Proteinlerin özellikleri, belli aminoasitlerin deęiştirilmesi ile modifiye edilir.
- Çeşitli yöntemler, DNA'daki bazı nükleotidleri değiştirerek proteinin aminoasit dizisini değiştirir.

Protein dizileme: Edman degradasyon yöntemi

- Bir proteinin doğrusal amino asit dizisi, Edman degradasyon adı verilen bir yöntemle belirlenebilir.
- Bu yöntemde, polipeptid zincirinin amino terminal ucunda bulunan amino asitlerin her seferinde bir tanesi kimyasal olarak uzaklaştırılarak karakterize edilir.

Protein dizileme: Edman degradasyon yöntemi

EDMAN DEGRADATION



Protein dizileme: Kütle spektrometresi yöntemi

- Yakın zamanlarda son teknoloji ürünü olan kütle spektrometresi yöntemi, daha duyarlı bir yöntem olarak kullanılmaktadır.
- Edman degradasyon yönteminde proteinden 10 pikomol gerekirken, kütle spektrofotometresinde pikomolden daha az materyal yeterlidir.

DNA mikroarray teknolojisi

- Bakteri, mantar, meyve sineği, fareler, bitkiler ve insanlar gibi çeşitli organizmalardan elde edilen dizilerin sayısı, hızlı dizileme yöntemleri ile artmaktadır.
- Dizilemede fonksiyonel analizler için yeni ve güçlü yöntemler artık bir ihtiyaç haline gelmiştir.
- RT-PCR (revers transkriptaz-PCR) ve Northern blot gibi eski tek gen yöntemleri bir çeşit PCR versiyonlarıdır.
- Bunlar ifade edilmiş RNA'ların saptanmasına olanak sağlar.
- Ama hassas ve verimli değildir.

DNA mikroarray teknolojisi

- DNA mikroarray gelişmekte olan bir teknolojidir.
- Tek deneyde tüm genomun analizini sağlar.
- Örneğin, tek hücreli maya DNA mikroarray'i (genomda yaklaşık olarak 6200 gen bulunur) yaklaşık olarak 6200 Southern blota eşittir.

DNA mikroarray ile gen aktivitesi (ekspresyon) analiz edilebilir

- Araştırmacıların, özellikle hücre, doku ya da organlardaki aktif olan genleri belirlemesi mümkün hale gelmiştir.
- Araştırmacıların, fizyolojik veya biyokimyasal süreç değişiklikleri (örn; yüksek ve düşük ışık koşullarında fotosentez) ile gen ekspresyon değişikliklerini ilişkilendirmesi mümkün hale gelmiştir.

DNA mikroarray ile gen aktivitesi (ekspresyon) analiz edilebilir

- Organizmalarda, erken gelişim evreleri boyunca ifade edilen genlerin araştırılmasını sağlar.
- Normal ve hastalıklı hücrelerin gen ekspresyonu karşılaştırmak için kullanılabilir (örneğin kanser).
- Gen ekspresyon modelleri üzerine çeşitli terapötik ilaçların etkisi değerlendirilebilir.

DNA mikroarray ile DNA'daki değişiklikler izlenebilir

- Kanser hücrelerinin DNA'sında meydana gelen değişimler izlenebilir.
- Tek nükleotid polimorfizmleri, mikroarrayler kullanılarak tespit edilebilir.
- Spesifik bir gende dizi varyasyonlarının tespit edilmesine izin verir.

Mikroarray ile transkripsiyon incelenebilir

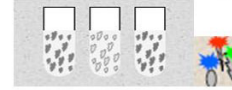
- Mikroarray in vivo gen ifadesini (transkripsiyon) incelemek için kullanılabilir.
- Zaman içinde herhangi bir noktada transkribe edilmiş genlere transkriptom denir.
- Bilinen DNA dizileri sıralı bir şekilde mikroarray plağının kuyucuklarına yerleştirilir ve prob olarak kullanılır.
- Daha sonra farklı renklerde floresan boyalarla etiketlenmiş bilinmeyen DNA ya da cDNA (transkripsiyon ürünü mRNA'dan) ile hibridize edilir.

- Hibridizasyonun meydana geldiği kuyucuklarda renk oluşumu gözlenecektir.

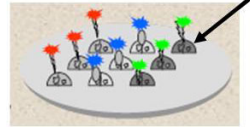
Mikroarray fabrikasyon



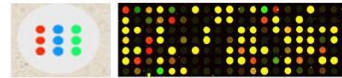
Örnek hazırlama ve işaretleme



Mikroarray reaksiyon

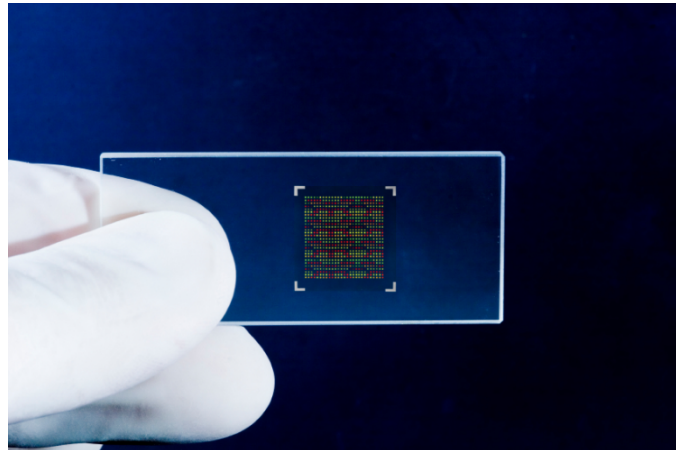


Okuma ve veri analizi



DNA ip teknolojisi

- Bazen DNA, sabit, küçük bir ip üzerindedir.
- Çipler son derece hızlı bir şekilde üretir ve hassas robotlar cam bir slayt üzerine binlerce DNA örneğini yükleyebilir.
- Tek örneğin çapı yaklaşık 100 mikrometredir.



DNA ip teknolojisii

- Her bir spot, tek bir genin ya da oligonükleotidin tek zincirli kopyalarına karşılık gelir.
- Binlerce dizi birbirine çok yakın yerleştirilir.
- Bir organizma, organ veya dokuda ifade edilen tüm genlerin taranmasını sağlar.

Örnek DNA çipleri

- Araştırma ve teşhis amaçlı ticari olarak bulunan çiplere aşağıdaki örnekler verilebilir:
 - HIV gen çipi,
 - Meme kanseri BRCA-1 gen çipi ve
 - p53 gen çipi

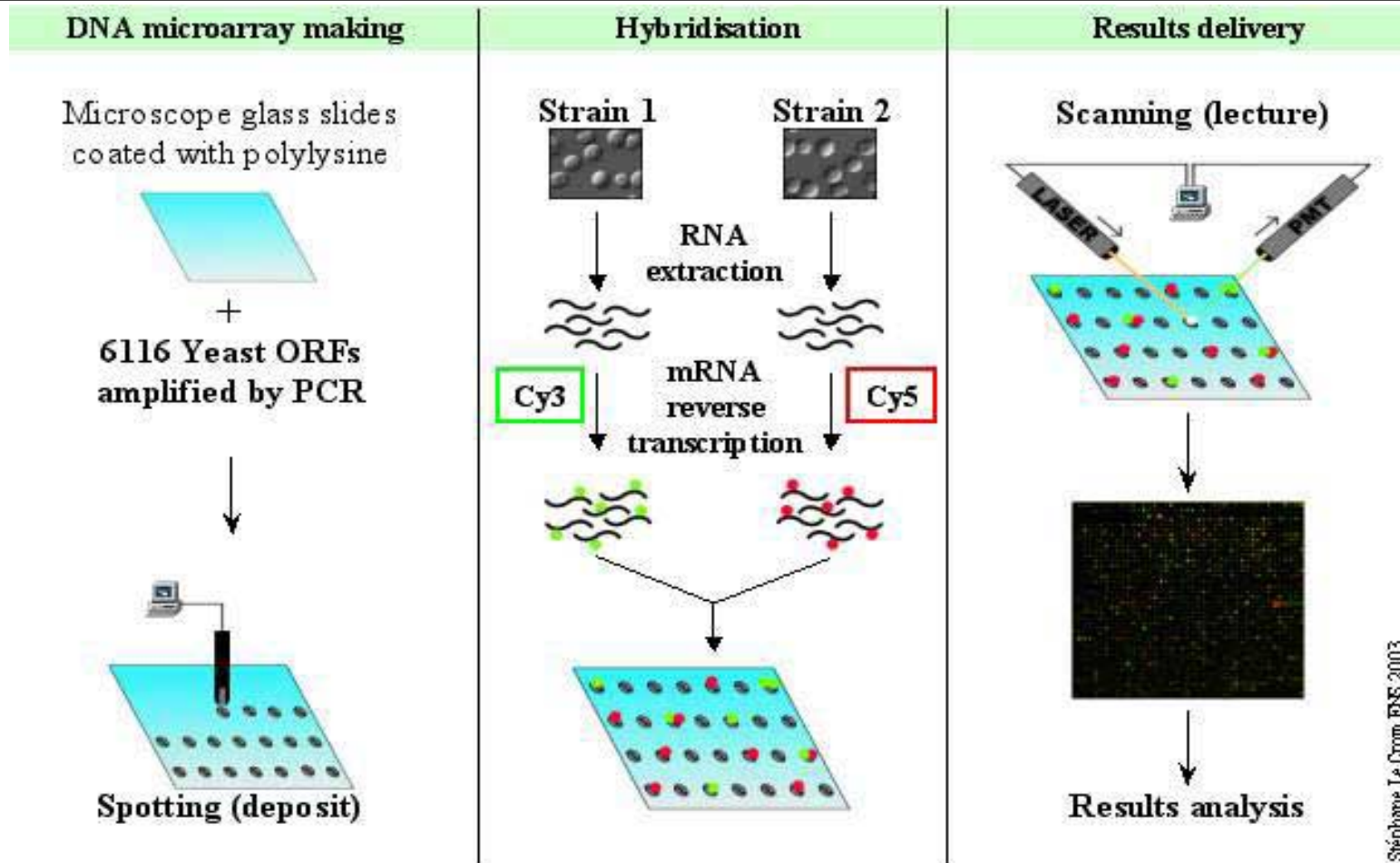
DNA ip teknolojiŒi

- SıralanmıŒ mikroarrayler, daha sonra floresan etiketli bilinmeyen DNA dizi solüsyonu ile hibridize edilir.
- Hibridizasyon ürünleri, mikroarray üzerinde spesifik bir desen verir.
- Bu desenler analiz edilebilir ya da diğeri desenlerle karşılaştırılabilir.

DNA ip teknolojisii

- Yüksek çözünürlüklü lazer tarayıcı, substrat yüzeyindeki bu floresan ışımaları (hibridizasyonun olduğu yerlerde) tespit eder.
- Dijital görüntüleme yazılımı ile her bir hibridizasyon deseni kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilir.

DNA mikroarray analizinin adımları



Protein ipleri

- Aynı mikroarray teknolojisi, protein çiplerinin üretiminde de kullanılır.
- Binlerce protein sıralı bir şekilde ip üzerine bağlanabilir.
- Bu çipler protein-protein etkileşim ağında kullanılır.

Rekombinant DNA uygulamaları

- Rekombinant DNA teknolojisi sadece biyokimya, moleküler ve hücre biyolojisi alanlarında kullanılmayıp, ekoloji ve antropoloji araştırmalarında da devrim yaratmıştır.

Rekombinant DNA uygulamaları

- Rekombinant DNA uygulamaları, tarım ve tıp gibi birçok alanda kullanılır.
- Örneğin;
 - Klonlanmış genlerin kodladığı proteinlerin analizi,
 - Genetik bozuklukların tamiri ve
 - Transgenik bitkilerin üretimirekombinant DNA yöntemleri ile gerçekleştirilebilir.

Heyecan verici yeni uygulamalar

- Çevresel kirliliklerin ve zehirli atıkların uzaklaştırılması
- Tarımsal verimliliği artırılması
- Yeni tıbbi tedaviler vb.