

Rekombinant DNA

Prof. Dr. Sümer ARAS

Rekombinant DNA

Moleküler biyolojideki klasik deneyler, genlerin doğası ve ekspresyonu konularında temel kavramlar geliştirmemizde büyük katkı sağlamıştır. Bu çalışmalar temel olarak genetik analizlere dayandığı için, başarıları büyük oranda, hızlı çoğalan, basit yapıdaki organizmaları (bakteri ve viruslar gibi) model olarak kullanmalarına bağlı idi. Buna rağmen pek çok ökaryot genomu (örn., insan genomu) *E.coli* gibi bir organizmadan binlerce kez daha karmaşık yapıda olduğu için, belirlenen temel prensiplerin ökaryot hücrenin karmaşık yapısını anlamada ne kadar başarılı olacağı şüpheli idi. Bu tip karmaşık genomlarla moleküler düzeyde çalışma fikri 1970'lerin başlarında cesaret kırıcıydı. Özellikle genlerin izole edilmesi ve çalışılması imkansız gibi görünmekteydi.

yaşamımda en büyük sorunu gördüm.

Moleküler biyolojinin ilerlemesi önündeki bu sorun, herhangi bir hücre tipine ait genin izole edilmesine, dizisinin belirlenmesine ve genlerle çalışılabilmesine olanak veren, rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi ile aşıldı. Rekombinant DNA uygulamaları, ökaryotik genler ve genomların yapı ve fonksiyonları üzerinde ayrıntılı moleküler çalışmalar yapılmasını ve böylelikle hücre biyolojisini anlamamızda devrim niteliğinde gelişmeler yaşanmasını olanaklı kıldı.

Restriksiyon Endonükleazlar

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinde ilk aşama, DNA'yı belli dizinlerden kesen enzimlerin **-restriksiyon endonukleazların-** tanımlanması oldu. Bunların, bakterilerde, yabancı bir DNA molekülünün (örn., viral DNA) hücreye girişine karşı bir savunma mekanizması sağlayan enzimler olduğu saptandı. Bakterilerin, DNA molekülünü yüzden fazla farklı tanıma bölgesinden kesen, çok sayıda restriksiyon endonükleazı vardır ve her biri, DNA üzerinde dört ila sekiz bazlık (örnekler Tablo 3.2'de) özgün dizileri tanır.

Restriksiyon endonükleazlar DNA'yı özgün dizinlerden kestiği için, DNA molekülünü belli bölgelerden kesmek için kullanılabilir. Örneğin, *EcoRI* endonükleazı altı baz çiftinden oluşan GAATTC dizisini tanımaktadır. Bu dizi bakteriyofaj λ DNA'sında beş farklı

TABLO 3.2 Kesim enzimlerinin bazilarina ait tanima bölgeleri

Enzim^a	Kaynak	Tanima Bölgesi^b
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	GGATCC
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	GAATTC
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	AAGCTT
<i>Hpa</i> I	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	GTTAAC
<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	CCGG
<i>Mbo</i> I	<i>Moraxella bovis</i>	GATC
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC
<i>Sfi</i> I	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	GGCCNNNNNGGCC
<i>Taq</i> I	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA

^a Enzimler izole edildikleri türlere göre isimlendirilir aynı türden izole edilen birden fazla enzim numara ile belirtilir (örn., *Hpa*I ve *Hpa*II gibi).

^b Tanima bölgesi sadece çift iplikli DNA'nın tek ipliğindeki diziyi gösterir. 'N' aynı bölgede yer alacak herhangi bir bazı temsil etmektedir.

Rekombinant DNA Moleküllerinin Eldesi:

- Moleküler klonlamada temel strateji bir DNA fragmanını (örn: insan DNA'sının bir segmenti), konakçı hücreden bağımsız olarak replike olma yeteneğine sahip bir DNA'ya (vektör) yerleştirmektir.
- Sonuçta oluşan rekombinant molekül veya moleküler klondur. Uygun bir konakçıda replikasyona izin verilirse yerleştirilen DNA'dan büyük miktarlarda elde edilebilir.

- Rekombinant moleküller oluşturacak DNA fragmanları genelde RE ile kesimleme sonucu elde edilir. Bunlar yapışkan (kademeli) kesimler oluştururlar, sarkan veya yapışkan tek zincirli kuyruklar oluştururlar.
- Vektör de aynı enzimle kesilince yapışkan uçlar birbirini komplementer baz eşleşmesine bağlı olarak bulurlar ve son olarak DNA ligaz ile muamele edilirler.

- Klonlanacak DNA'nın illa da RE kesimleme bölgesi ile bitmesi şart değildir.Çeşitli RE bölgesi bulunduran sentetik DNA "linker"lar (bağlayıcılar),DNA'nın kör uçlarına bağlanabilir.
- **Linkerlar**, kimyasal olarak sentezlenebilen kısa oligonükleotid dizileridir ve herhangi bir DNA'nın vektör ile bağlanmasını sağlayabilir.
- Sadece DNA değil,RNA dizileri de klonlanabilir.Önce RT ile cDNA elde edilir ve yine vektöre ligasyonu sağlanır.

Rekombinant DNA Vektörleri:

- Insert DNA'nın büyüklüğüne ve deneyin amacına göre değişik tipte klonlama vektörleri kullanılabilir. Klonlanan DNA'nın izolasyon ve çoğaltılması için kullanılan temel vektörler anlatılacaktır.
- Bakteriofaj λ vektörleri ökaryotik hücrelerden genomik veya cDNA klonlarının ilk izolasyonu için kullanılırlar.
- **Cos bölgeleri (kohesiv bölgeler):**DNA'nın faj partikülleri içerisinde paketlenmesi için gereklidir.

- λ klonlama vektörlerinde, bakteriyofaj genomuna ait virüs replikasyonu için gerekli olmayan diziler çıkartılır ve klonlanan DNA'nın bağlanması için gerekli özgün enzim kesim bölgeleri eklenir.
- Yerleştirilecek DNA 15 kb büyüklüğünde olabilir.
- İnsan DNA'sından genomik klonları izole etmek için ~15kb'lık rasgele fragmanlar X vektörüne ligasyon ile bağlanırlar.
- Bu rekombinant DNA moleküllerinin faj partikülleri içerisinde paketlenebilmesi için, DNA λ proteinleri ile in vitro karıştırılır(paketleme ekstraktı).

- Bundan sonra faj partikülleri kültürde *E. coli*'yi enfekte etmek için kullanılırlar.
- Herbir rekombinant faj tek bir plak oluşturacağı için unique insert taşıyan DNA'lar izole edilebilir. Ayrıca belli bir gen ile ilgileniliyorsa, nükleik asit hibridizasyonu veya diğer başka tarama metotları ile tespit edilir.
- Plazmid vektörlerde manipülasyonlar daha kolaydır. Plazmidler küçük halkasal DNA'lardır ve bağımsız replike olabilirler.
- Plazmid DNA'sının ihtiyacı olan konakçı DNA polimerazı için gerekli olan replikasyon orijini.

- Buna ilaveten plazmid vektörler antibiyotiklere direnç sağlayan (örn:ampisilin direnci) genler taşırlar. Böylece plazmid taşıyan bakteriyi seçmek mümkün olur.
- Plazmid vektörleri genelde 2-4 kb'lık DNA içerirler; buna karşın λ vektörlerindeki faj DNA'ları 30-45 kb arasında olabilir.
- Plazmid de klonlanabilmesi için insert DNA'nın bir fragmanı uygun restriksiyon bölgesine ligasyon ile bağlanır ve rekombinant molekül ile *E.coli*'nin transformasyonu sağlanır.
- Plazmid DNA'sını içeren antibiyotiğe dirençli koloniler seçilir. Plazmid içeren bakteriler büyük miktarlarda üretilir ve DNA izole edilir.

- Hücre başına yüzlerce olabilen küçük halkasal plazmid DNA'sı, bakteriyel kromozomal DNA'dan ayrılır.
- Genomik DNA analizi ile ilgili birçok çalışma için λ vektörlerinin de alabildiğinden daha büyük DNA fragmanlarının klonlanması gerekebilir. Bu amaçla kullanılan 5 değişik ana tipte vektör bulunmaktadır.
- Cosmid vektörlere ~ 45 kb'lık insertler yerleştirilebilir.
- Bu vektörler bakteriofaj λ 'ya ait diziler bulundurur, antibiyotik resistans dizileri vardır ve replikasyon orijinine sahiptirler. (45 kb'a kadar büyüklükte DNA dizileri bu vektörlere yerleştirilebilir.)

- λ 'ya ait diziler klonlanan DNA'nın faj partiküllerine paketlenmesini kolaylaştırır. Replikasyon orijini ve antibiyotik direnç genleri sayesinde, plazmidler gibi bakteriyel hücrelerde çoğalabilirler.
- Bakteriofaj P1'den iki tip vektör elde edilmiştir. Bakteriofaj P1 vektörlere 70-100 kb'lık fragmanlar yerleştirilebilir, in vitro P1 faj partiküllerine paketlenir ve *E.coli*'de replikasyonu sağlanır.
- P1 Antifical kromozom (PAC) vektörleri ise bakteriofaj P1'e ait diziler bulundurlar; ama plazmidler gibi *E.coli*'ye direk olarak verilirler ve 130-150 kb'lık daha büyük insertleri taşıyabilirler.

- Bakteriyal artificial kromozom(lar) (BAC) vektörleri *E.coli*'nin doğal plazmidlerinden (F faktör) elde edilir.
- Replikasyon orijini ve diğer F faktör dizileri bunların 120-130 kb taşıyabilen stabil plazmidler olarak replike olmasına izin verirler.
- Daha da büyük DNA fragmanları (250-400 kb) yeast artificial kromozom (YAC) vektörlerine klonlanabilir.
- Bu vektörler, mayaya ait replikasyon orijini bulundurduğu gibi, sentromer, telomer gibi diğer dizileri de bulundurur ve bu sayede maya hücrelerindeki lineer kromozomlar gibi replikasyonları yapılır.

TABLO 3.3 Büyük DNA Parçalarının Klonlandığı Vektörler

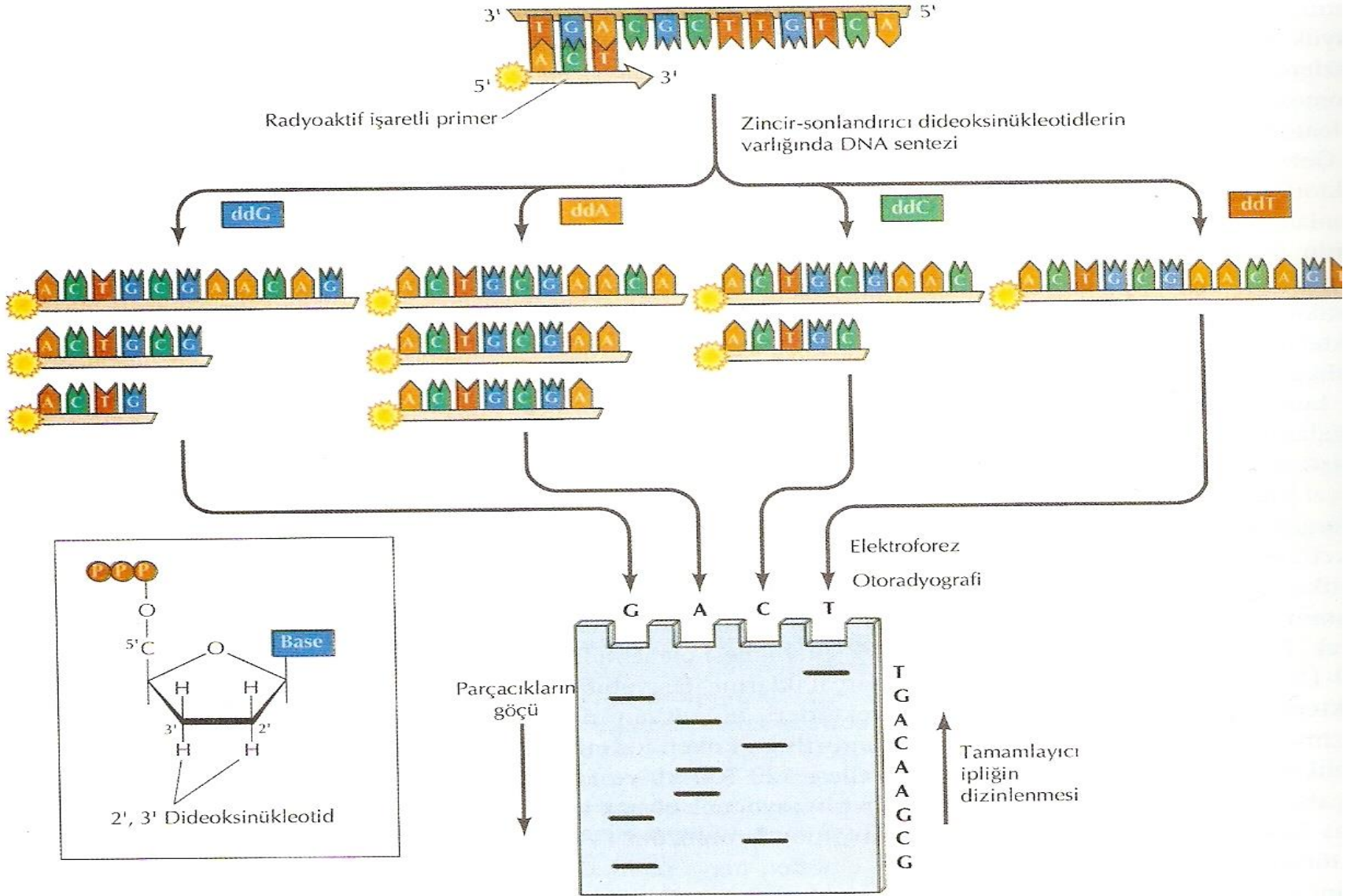
Vektör	DNA eklentisi (kb)	Konakçı hücre
Kozmidler	30-45	<i>E.coli</i>
P1 Bakteriyofajı	70-100	<i>E.coli</i>
P1 Yapay Kromozomları (PAC)	130-150	<i>E.coli</i>
Bakteri Yapay Kromozomları (BAC)	120-300	<i>E.coli</i>
Maya Yapay Kromozomları (YAC)	250-400	Maya

DNA Dizi Analizi

Moleküler klonlama, her bir DNA parçasının, nükleotid dizilerinin belirlenmesini de içeren, ayrıntılı incelemelerine olanak sağlayacak miktarlarda eldesini olanaklı kılmıştır. Gerçekten de pek çok genin nükleotid dizisinin çıkarılması, sadece bu genlerin kodladıkları proteinlerin yapısının anlaşılmasını değil, aynı zamanda gen ekspresyonlarını düzenleyen dizilerin özelliklerinin de anlaşılmasını sağlamıştır. Bunun da ötesinde, yeni bulunan genlerin kodlayan dizileri genellikle, daha önce çalışılmış olan genlerle ilişkilidir ve böylelikle yeni izole edilen genlerin fonksiyonları, bu tip dizilim benzerlikleri kullanılarak, doğru olarak tahmin edilebilmektedir.

Günümüzde kullanılan DNA dizi analizi yöntemleri hızlı ve doğru bir biçimde, birkaç kilobaz büyüklükte DNA dizilerinin belirlenmesine

- DNA dizi analizinde en fazla kullanılan metot zincir durduran dideoksinükleotidlerin kullanıldığı, DNA sentezini prematüre olarak durduran yöntemdir.
- DNA sentezi bir uçtan işaretli primer ile başlatılır. Her biri normal bazın yanında dideoksi işaretli bir baz bulunduran 4 tüpte reaksiyon gerçekleştirilir.
- Dideoksinükleotidin bağlanması ile reaksiyon durur. Çünkü bu baz 3' hidroksil grubu içermeyen deoksiriboz bulundurur.
- Sonuçta bitiş bazı reaksiyondaki dideoksinükleotidi temsil eden bir dizi işaretli DNA molekülleri elde edilir.



- Daha geniş ölçekli DNA dizi analizleri için otomatik sistemler kullanılmaktadır.
- Bu sistemde, dideoksi nükleotid sekanslama reaksiyonlarında floresan işaretli primerler kullanılır.
- Yeni sentezlenmiş DNA dizileri jelden geçtikçe, floresan işaretli exite eden lazer ışığından geçer.
- Çıkan ışın fotomultiplierda tayin edilir ve bir bilgisayar bunları toplar ve datayı analiz eder.
- Bu şekilde yapılan geniş ölçekli analizler sayesinde insan genomunun tam dizisi yanı sıra bakteri, maya, *Arabidopsis*, *C.elegans*, *Drosophila* ve fare gibi birçok türün de genom dizileri çıkartılmıştır.

Dizi analizi yapılacak tek-iplikli DNA



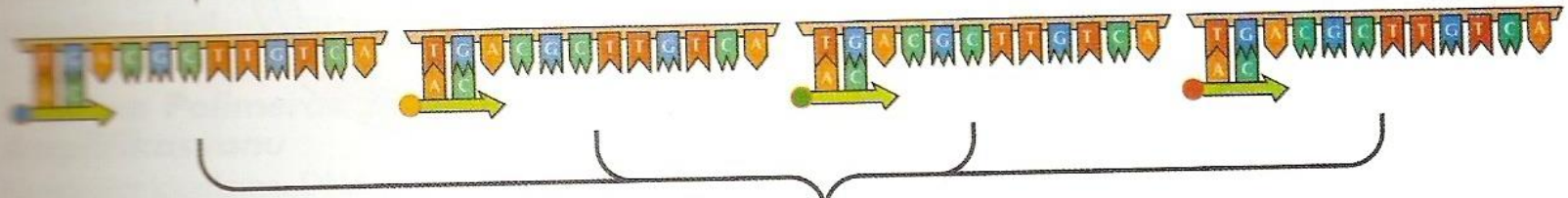
Her bir dideoksınükleotid için farklı floresanlar ile işaretlenmiş dizi analizi reaksiyonlarının kullanımı

ddG

ddA

ddC

ddT



Ürünlerin toplanması
Elektroforez

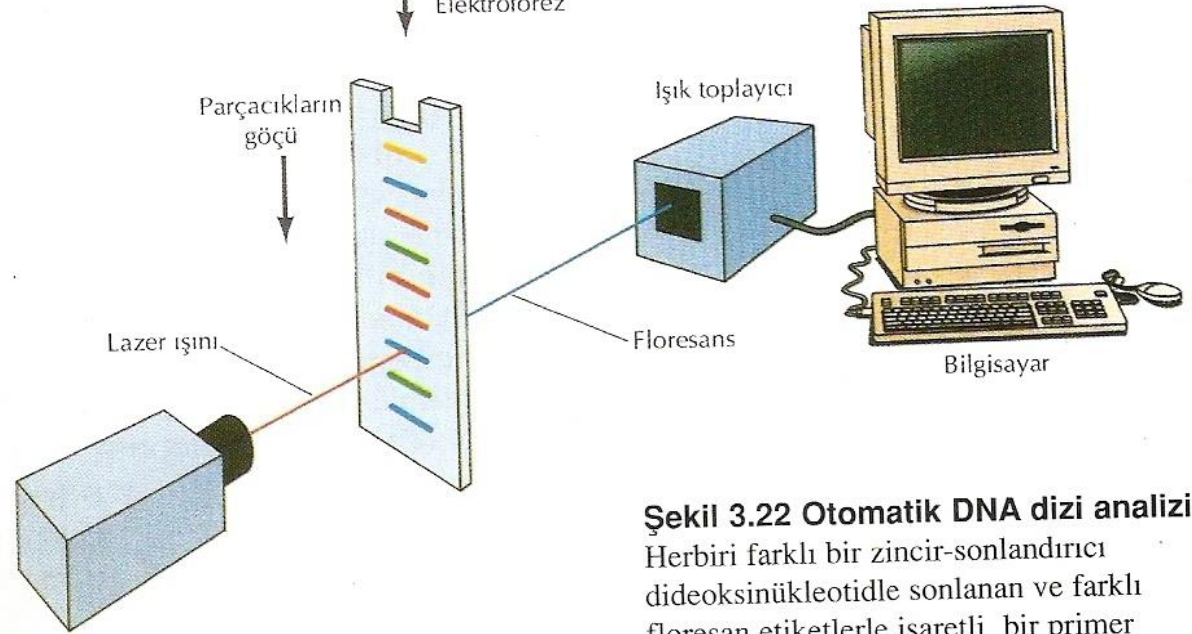
Parçacıkların göçü

Lazer ışını

Işık toplayıcı

Floresans

Bilgisayar



Şekil 3.22 Otomatik DNA dizi analizi
Herbiri farklı bir zincir-sonlandırıcı dideoksınükleotidle sonlanan ve farklı floresan etiketlerle işaretli bir primer içeren dört ayrı dizi analizi reaksiyonu

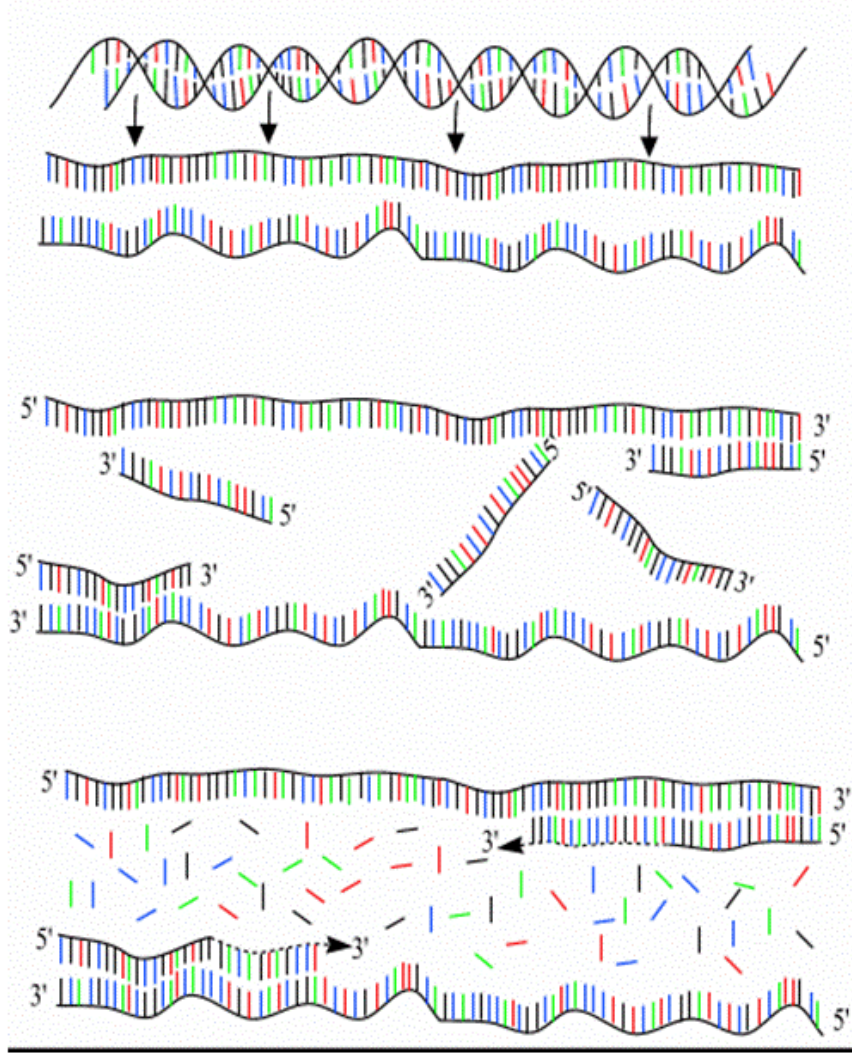
Ekspresyon Vektörleri:

- Proteinleri birçoğu ökaryotik hücrelerde az miktarda bulunur ve bu nedenle klasik biyokimyasal yöntemlerle bunları çok miktarda elde etmek mümkün değildir.
- Ama eğer elimizde klonlanmış bir gen varsa, bakteri veya ökaryotik hücrelerde yüksek seviyede gen ekspresyonu sağlayan vektörlere bu geni bağlayarak, bu problem çözülebilir.
- Ökaryotik bir genin *E.coli*'de ekspresyonunu sağlamak için, ilgilenilen cDNA, plazmid veya faj vektöre (ekspresyon vektörü) bağlanır.

- Bu vektör eklenen genin transkripsiyon ve translasyonunu sağlayabilecek dizilere sahiptir.
- Eklenen gen genelde bakteride ,bakterinin total proteininin %10'u kadar eksprese edilir.
- Bundan sonra yapısal analizi için bunun biyokimyasal izolasyonu bilinen metotlarla gerçekleştirilebilir.
- Çoğu durumda protein ekspresyonunu bakteride yapmaktansa ökaryotik hücrede yapmak daha uygun olmaktadır.
- Ekspresyonun bu şekilde yapılması , örneğin normal olarak yapılan posttranslasyonel modifikasyonlarında aynen gerçekleşeceğini garantiler.

- Yine klonlanan gen bir vektöre bağlanır.
- Ökaryotik hücrelerle ilgili bir sistem baculovirus vektörlerinin böcek hücrelerini enfekte etmesidir.
- Viral yapısal bir genin yerine yerleştirilen gen böylece fazlaca ekspresyon gösterir.
- Alternatif olarak, uygun vektörler ile memeli hücreleri de kullanılabilir.
- Klonlanan genin mayada ekspresyonu özellikle pratiklik bakımından (maya genetiğinin kolay manüpülasyonları) faydalıdır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu



Kalıp DNA

1. Aşama
Denatürasyon
(94°C'de 1 dakika)

2. Aşama
Primer Bağlanması
(50-54°C'de 1 dak)

3. Aşama
Yeni Zincir Sentezi
(72°C'de 2 dakika)

Nükleik Asit Hibridizasyonu

Protein Problemleri Olarak Antikorlar

- Antikorlar bir hayvanı yabancı proteinlerle inoküle etmek suretiyle oluşturulurlar. Örneğin insan antikorları genelde tavşanlarda üretilir.
- İmmünize olmuş hayvanlara ait sera değişik lenfositler tarafından üretilmiş antikor karışımı bulundurulur.
- Bununla beraber ,immünize edilmiş hayvanlardan (genelde fare) B lenfositlere ait klonal serileri kültüre edilmesiyle tek tür antikor da üretilebilir. Bu tek tür antikor **monoklonal antikor** olarak isimlendirilmektedir.

- Her bir lenfosit sadece bir tip antikor ürettiği için lenfositlerin klonal bir serisinden üretilen antikorlar, sadece tek bir antijenik determinant tanıyan monoklonal antikorlar olacaktır.
- Hücrelerden pürifiye edilmiş proteinlere karşı antikor oluşturulabileceği gibi ,diğer başka materyallerde immünizasyon için kullanılabilir.
- Örneğin intact hücrelerle de immünizasyon yapılabilir ve böylece belli bir hücre tipinin (örn: kanser hücresi) ekspresyonunu gerçekleştirdiği proteinlere karşı antikor elde edilmiş olur.
- Daha sonra bu antikorlar, proteinlerin tanımlanmasında kullanılabilir.

- Ayrıca, antikorlar bakteride rekombinant klonlar olarak ekspresyonu yapılan proteinlere karşı oluşturulabilir.
- Böylece ökaryotik hücrelerden izolasyonu zor olan proteinlere karşı antikor oluşturulur.
- Daha da ötesi antikorlar 10-15 aa.lik sentetik polipeptidlere karşı da oluşturulabilir.
- Sonuçta bir genin dizisi biliniyor ise ,protein dizisinin bir kısmından oluşturulmuş peptidlere karşı antikor oluşturulur.

- Bu sentetik peptidlere karşı oluşturulan antikolar intact protein ile de reaksiyona girebileceği için sadece gen dizisini bilerek proteine karşı antikor oluşturmak mümkündür.
- Antikolar hücre ekstraktındaki proteinlerin bulunmasında kullanılırlar. Bunun için iki metot vardır: Birincisi Western Blotting (Immüno blotting) , ikincisi Immünopresipitasyon.

Rekombinant DNA Kütüphanelerini Taramak İçin Problar:

- Genomik veya cDNA klonlarını izole etmek için ilk basamak **rekombinant DNA kütüphaneleri** oluşturmaktır.
- Bunlar belli bir hücre tipine ait tüm genomik veya mRNA dizilerine ait klonların bir koleksiyonudur.
- İnsan DNA'sına ait bir genomik kütüphane ~15 kb büyüklüğünde DNA fragmanlarının λ vektöre klonlanmasıyla hazırlanabilir.
- İnsan genomu 3×10^6 kb olduğuna göre ~ 200.000 λ klonu bir genom için gereklidir.

- Örneklemedeki istatistiki saplamalar yüzünden birçok gen bu 200.000 rekombinantın bulunduğu kütüphanede yer almayacak; buna karşın birçok gen de birçok klonda bulunacaktır.
- Bunun için daha geniş kütüphaneler ,örneğin bir milyon rekombinant fajın bulunduğu kütüphaneler hazırlanır.
- Eğer gen için prob var ise, bu rekombinant kütüphanelerden bu gen izole edilebilir.
- Rekombinant fajlar *E.coli*'ye enfekte edilir ve replike olan her faj bir plak oluşturur.
- Plaklar daha sonra filtrelere aktarılır ve ilgilenilen gene ait prob ile hibridize edilir.

- Daha sonra uygun plak,uygun ortamdan izole edilir ve istenilen geni taşıyan fajın üretimi sağlanır.
- Plazmid DNA klonları içeren bakteri kolonilerini taramak için de aynı yöntem kullanılabilir.Sonuçta faj veya plazmid kütüphanelerinden spesifik klonlar izole edilebilir.
- Çok çeşitli problemler rekombinant kütüphanelerin taranmasında kullanılabilir.
- Örneğin bir cDNA klonu,karşılık gelen genomik klonun izolasyonunda prob olarak kullanılabilir veya bir türde klonlanmış bir gen (örn:fare) başka bir türde (örn:insan) ilgili genin klonlanmasında prob olarak kullanılabilir.

Bitki ve Hayvanlarda Gen Transferi:

- Kompleks ökaryotlarda ,mayadaki gibi basit genetik manüpülasyonlar yapmak çok kolay olmamakla beraber yine de klonlanmış DNA'nın bitki ve hayvana yerleştirilmesiyle gen fonksiyonu tespit edilebilir.
- Genel olarak **gen transferi** olarak isimlendirilen bu deneyler birçok soruya cevap oluşmasını sağlamıştır,
- DNA'nın hayvan hücrelerine yerleştirilmesi ilk defa enfeksiyona neden olan viral DNA'larla yapılmıştır ve bu nedenle genelde **transfeksiyon (transformasyon + enfeksiyon)** olarak isimlendirilmiştir.

- DNA kültürdeki hayvan hücrelerine birçok yol ile aktarılabilir:
 - 1.Hücre nükleusuna direk mikroenjeksiyon ile verilebilir.
 - 2.Kalsiyum fosfat ile DNA kopresipite edilir ve hücre oluşan küçük partikülleri alır.
 - 3.DNA lipid vesiküllerine (lipozom)yerleştirilir.Bunlar plazma zarı ile fuse eder.
 4. Elektroporasyonda,kısa bir elektrik pulse ile membranda porların açılması sağlanır.

- Hücrelerin çoğu tarafından alınan DNA nukleusa taşınır ve burada günlerce transkripsiyonu yapılabilir.
- Bu olguya **transient ekspresyon** adı verilir.
- Hücrelerin küçük bir bölümünde (genelde %1'den az) yabancı DNA stabil olarak genoma yerleşir ve bölünme sonucu projeni hücrelere aktarılır.
- Transfekte edilen DNA eğer selektif bir marker bulunduruyorsa (örn:ilaç direnci)stabil olarak transforme olan hücreler izole edilebilir.
- Bu şekilde klonlanıp aktarılan genlerin hücre davranışı üzerindeki etkileri (örn:hücre büyümesi veya farklılaşması)incelenebilir.

- Klonlanmış DNA'nın aktarımında hayvan virüsleri de vektör olarak kullanılabilir.
- Bu açıdan **retrovirüsler** çok kullanışlıdır. Çünkü bunları DNA'ları yaşam yaşam döngülerinde enfekte ettikleri hücrelerin genomuna stabil olarak entegre olabilir.
- Sonuçta,retroviral vektörler klonlanmış genlerin,birçok değişik hücre tipine aktarılmasında kullanılabilir.

- Klonlanmış genler çok hücreli organizmaların germ hücrelerine de aktarılabilir; böylece kültür hücreleri yerine canlı hayvanlarda çalışılabilir.
- Yabancı genleri taşıyan fare (transgenik fare) üretmenin bir yolu, klonlanmış DNA'nın döllenmiş yumurta pronükleusuna direk mikroenjeksiyonudur.
- Daha sonra enjekte edilmiş yumurtalar taşıyıcı anneye transfer edilir ve gelişimi beklenir.
- Yavru farelerin genelde yaklaşık %10'luk bir bölümü yabancı DNA'yı taşır. Yabancı DNA somatik hücrelerde olacağı gibi germ hücrelerinde de bulunur ve böylece diğer nesillere de aktarılır.

- Embriyonik kök hücrelerin (ES), özellikleri de klonlanmış genlerin fareye aktarımında alternatif bir metot sunmaktadır.
- ES hücreleri, kültürde erken fare embriyolarından oluşturulabilir.
- Bunlar manüpile edildikten sonra tekrar embriyolara aktarılır ve böylece germ hücreleri de dahil hayvanın vücudundaki tüm hücrelerde bulunurlar.
- Klonlanmış DNA'nın kültürdeki ES hücrelerine aktarımı mümkündür.

- DNA ile transforme edilmiş ES hücreleri daha sonra tekrar fare embriyosuna aktarılır.
- Bu embriyolar kimerik yavrular oluşturur. Çünkü bazı hücreler normal embriyo hücrelerinden, bazıları ise ES hücrelerinden gelmektedir.
- Bazılarında ise transfekte edilmiş ES hücreleri, germ hücrelerine yerleşirler. Bunların çiftleştirilmesi ile transfekte olmuş genin direkt kalıtımı sağlanır.

Klonlanmış genler bitki hücrelerine de aktarılabilirler:

- Bunun için bir yaklaşım bitki hücre duvarını uzaklaştırıp plazma zarı ile çevrili **protoplast** oluşturmaktır. Daha sonra DNA **elektroporasyon** ile bu protoplasttan aktarılabilir.
- Başka bir yöntem, **partikül bombardımanı** yapmaktır. DNA intakt bitki hücrelerine DNA kaplı mikroprojektiler ile (örn:küçük tungsten parçaları) aktarılır. DNA ile kaplı partiküller direk hücreye ateş edilerek aktarılır.Bazı hücreler ölür ama diğerleri kurtulur ve stabil transformasyonları sağlanmış olur.

- Bitki virüsleri de vektör olarak kullanılarak daha etkili aktarımlar yapılır.
- Buna ilaveten *Agrobacterium tumefaciens* bakterisindeki bir plazmid (Ti plazmidi) klonlanmış DNA'nın çeşitli bitkilere aktarımında çok etkili bir araçtır. Doğada *Agrobacterium* bitki yapraklarına yapışır ve Ti plazmidi bitki hücrelerine transfer olur ve burada kromozomal DNA'ya entegre olur.
- Transgenik bitkiler, kültürdeki hücrelere rekombinant DNA'nın aktarılmasıyla elde edilebilirler. Bu transgenik hayvan üretiminden daha kolaydır.

Klonlanmış DNA'nın Mutagenezi:

- **Reverse genetics:** İlk önce gende mutasyon oluşturuluyor.İkinci olarak fonksiyonel sonuçlar araştırılıyor(gen→ ürün).
- Klonlanmış DNA'da belli mutasyonların oluşturulması (in vitro mutagenez) ökaryotik genlerin fonksiyon ve ekspresyonlarını çalışmada çok etkili bir tekniktir.
- Klonlanmış genler birçok in vitro mutagenez yöntemi ile değiştirilebilirler.
- Sonuçta gende delesyon ,insersiyon, tek nükleotid değişimleri oluşturulabilir.

- Mutajenezde çok kullanılan bir metot **sentetik oligonükleotidlerin** kullanımudur.
- Bu prosedür de;mutant baz bulunduran primerler DNA sentezinde kullanılırlar.Yeni sentezlenen ve mutasyon taşıyan DNA molekülleri daha sonra izole edilip karakterize edilirler.Örneğin bir proteinin spesifik aminoasitleri değiştirilerek karakterizasyonu yapılabilir.
- Değişik metotlarla mutagenezi oluşturulmuş bir gen uygun hücre tipine aktarılarak , mutasyonun gen ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenebilir.Yani in vitro mutagenez , klonlanmış genlerin regülatör veya protein kodlayan dizilerini incelemek için kullanılabilir.