

Klonlama

Doç. Dr. İnci Başak Müştak

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Mikrobiyoloji ABD

Gen klonlaması nedir?

- Yunancada - klon, ikiz anlamına gelmektedir
- Belirli bir DNA parçasının (klon) kompleks bir DNA karışımının içerisinde saptanarak elde edilmesi ve daha sonra bu DNA parçasının (klonun) fazla miktarlarda üretilmesi
- Bir bireyin aseksüel olarak üretilmiş bileşimi; bir makromolekülün (DNA ya da bir antikor) tamamı ya da bir kısmının kopyasını içeren bir grup
- Ebeveyninin tek bir somatik hücresinden oluşturulan ve genetik olarak ebeveynine benzer olan birey (sözlük)

Klonlama kullanılan Enzimler

- DNA sentezleyen enzimler
 - DNA polimeraz I
 - T4 DNA polimeraz
 - Terminal transferase
 - Reverse transkriptase
- DNA sekanslarını birleştiren enzimler
 - *E. coli* DNA ligase
 - T4 DNA ligase

- DNA'nın 5'-ucunu modifiye eden enzimler
 - Alkalın fosfataz
 - T4 polinukleotid kinase
- DNA'yı ayrıştıran enzimler
 - Nuklease S1
 - Ekzonukleaz III
 - Restriksiyon endonukleazlar:
 - a) Yapışkan uç oluşturanlar
 - b) Küt uç oluşturanlar
 - c) İzoşizomerler
 - d) Değişik tanıma yapanlar

Restriksiyon Enzimleri

- DNA moleküllerini spesifik bölgelerden kesen bakteriyel proteinler (endonükleazlar).
- Restriksiyon bölgesi: Bir restriksiyon enzimi tarafından tanınan 4-8 bazlık spesifik DNA sekansı
- Restriksiyon fragmenti: Bir ya da daha fazla RE ile kesim sonucu daha büyük bir DNA parçasından (örn. genomik DNA) ayrılan daha küçük DNA porsiyonu
- birbirinden farklı yüzlerce RE bulunmaktadır, bunların her biri kendine özel restriksiyon bölgesine sahiptir

Bazı restriksiyon enzimlerinin spesifik kesim bölgeleri

Enzyme	Source Organism	Recognition Sequence
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C/CGG GGC/C
<i>MboI</i>	<i>Moraxella bovis</i>	/GATC GATC/
<i>NdeI</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>	/GATC GATC/
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G/AATTC CTTAA/G
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	/CCWGG GGWCC/
<i>EcoRV</i>	<i>Escherichia coli</i> J62/pGL74	GAT/ATC CTA/TAG
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	G/GATCC CCTAG/G
<i>SauI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	CC/TNAGG GGANT/CC
<i>BglI</i>	<i>Bacillus globigii</i>	GCCNNNN/NGGC CGGN/NNNNCCG
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG
<i>DraI</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	RG/GNCCY YCCNG/GR

/, position where enzyme cuts.

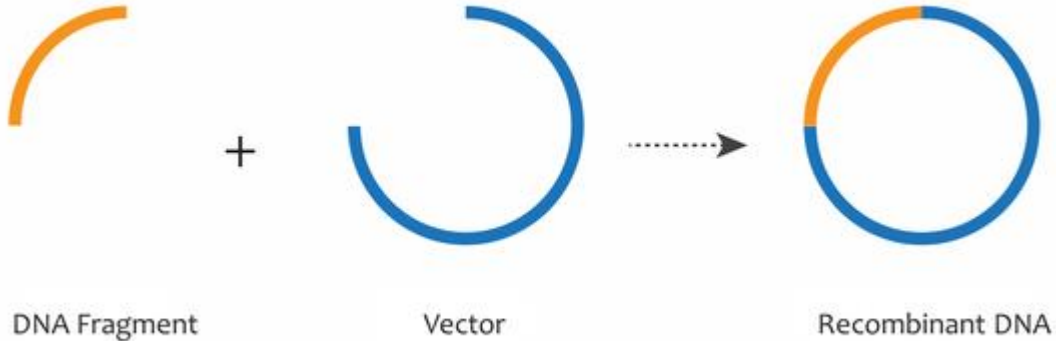
N, any base; R, any purine; Y, any pyrimidine; W, A or T.

Gen Klonlaması'nın Aşamaları

- Gen taşıyan DNA'nın (veya RNA) saf olarak elde edilmesi,
- Genin yerinin belirlenmesi
- Genin çıkarılması
- Taşıyıcı vektör DNA'nın elde edilmesi
- Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi
- Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması
- Seleksiyon
- Gen ürününün kontrol edilmesi

DNA klonlaması

- DNA bir organizmadan ekstrakte edildiğinde bütün genleri elde edilir
- Gen (DNA) klonlamasında belirli bir gen kopyalanır



Neden DNA klonlarız?

- Spesifik bir genin izole edilerek nukleotid dizisinin belirlenmesi
- Kontrol DNA sekanslarının belirlenmesi
- Protein/enzim/RNA fonksiyonlarının araştırılması
- Mutasyonların belirlenmesi Örn. Spesifik hastalıklara yönelik gen kusurlarının ortaya konması
- Organizmaların spesifik amaçlarla tekrar üretilmesi Örn. İnsulin üretimi, dirençli ırkların oluşturulması

Klonlama nasıl gerçekleşir?

1. DNA organik materyalden ekstrakte edilir
2. RE'ler (örn. EcoRI, HindIII, vb.) DNA'yı küçük parçalara ayırır
3. Aynı enzimle kesilmiş farklı DNA parçaları birleştirilebilir ya da rekombine edilebilir

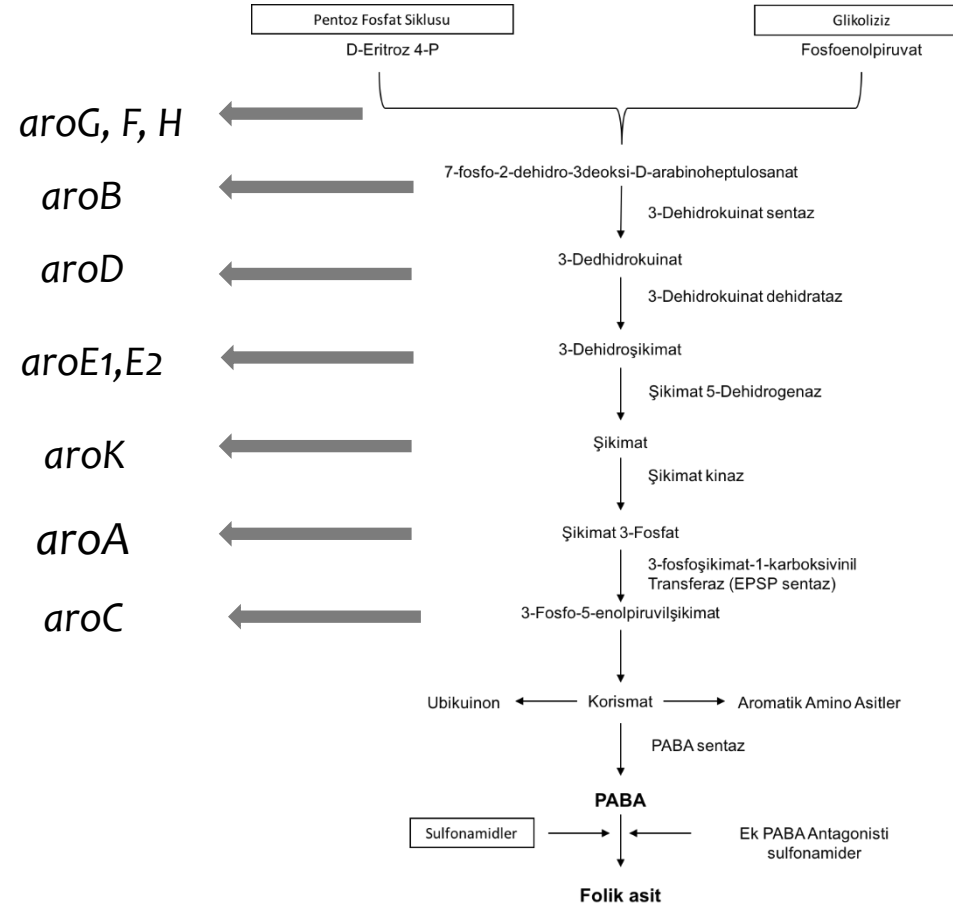
Dna Klonlamasında Kullanılan Bileşenler

- Restriksiyon Enzimleri
- Vektörler
- Dna Ligaz Enzimi
- Kompetent Bakteriyel Hücreler
- Antibiyotikler

aroA Defektif Mutant *Salmonella* Infantis Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

İnci Başak Kaya
(Tez Çalışması)

Aromatik Aminoasitler

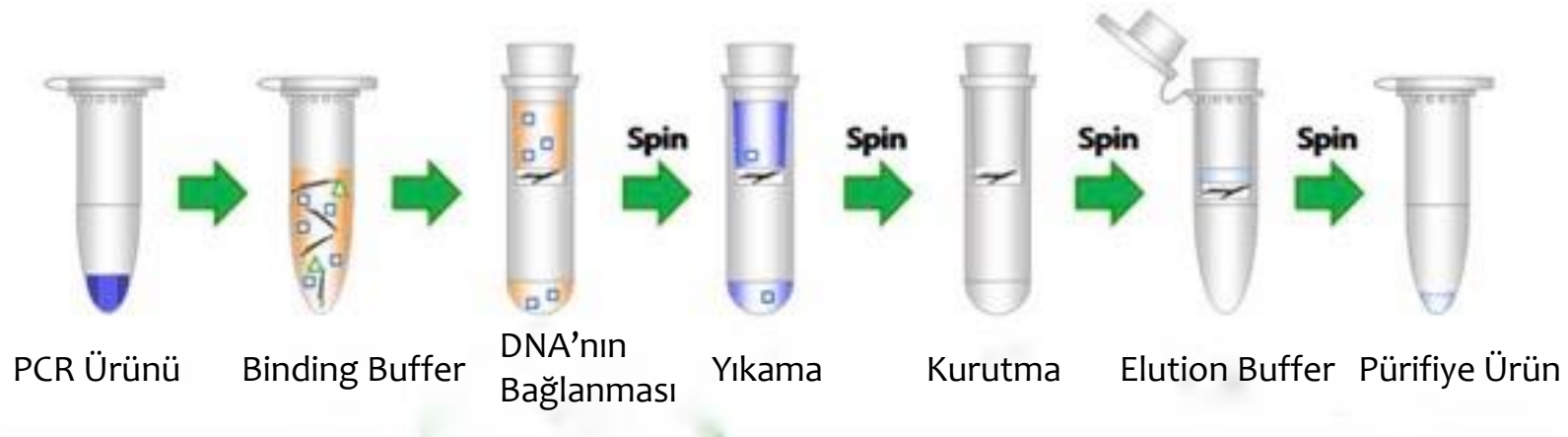


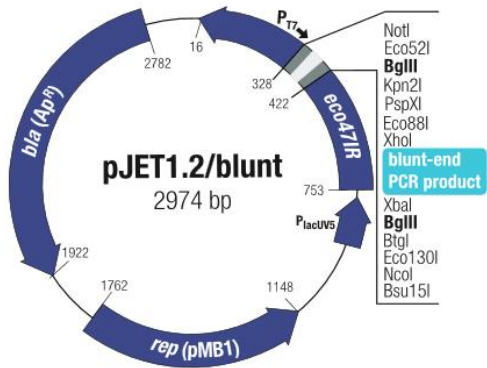
Amaç;

- Türkiye’de kanatlı yetiştiriciliklerinde sıklıkla izole edilen *S. Infantis* suşlarına karşı aşı prototipi geliştirilebilmesine yönelik olarak, *aroA* gen bölgesi silinmiş rekombinant *S. Infantis* suşu oluşturulması

Yöntem

1. *Salmonella* Infantis suşunun Üretilmesi ve DNA Ekstraksiyonu
2. Hedef Genom Bölgesinin Belirlenmesi ve PCR ile Çoğaltılması
3. PCR Ürününün Taşıyıcı Plazmide Klonlanması





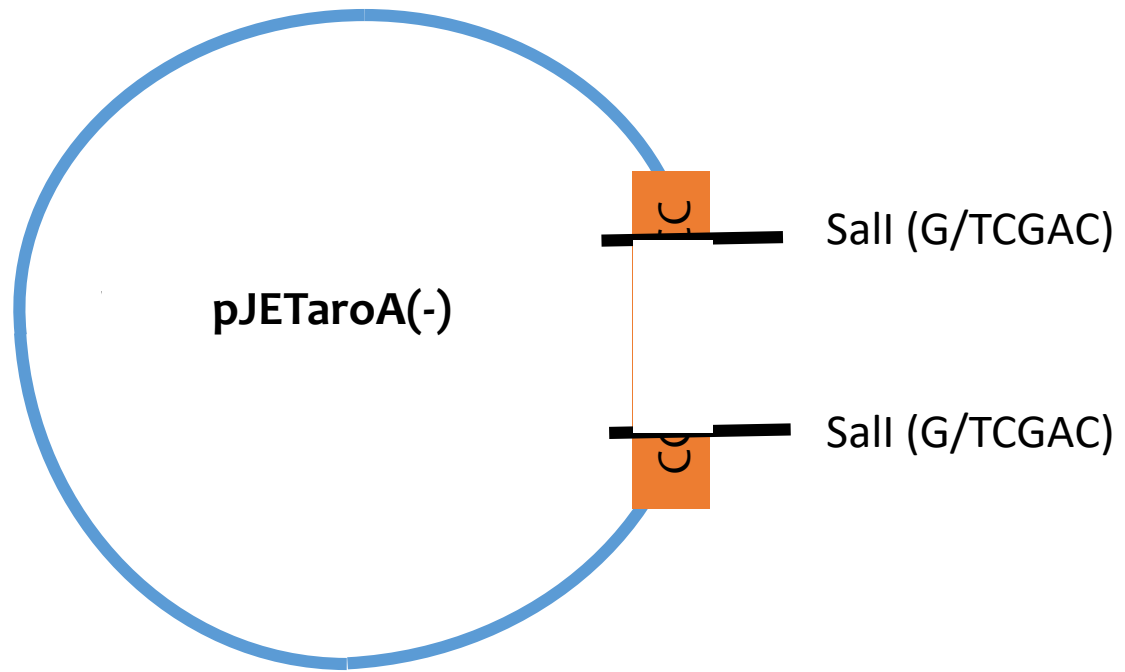
...ACT TCG GCT CGA CGT

aroA

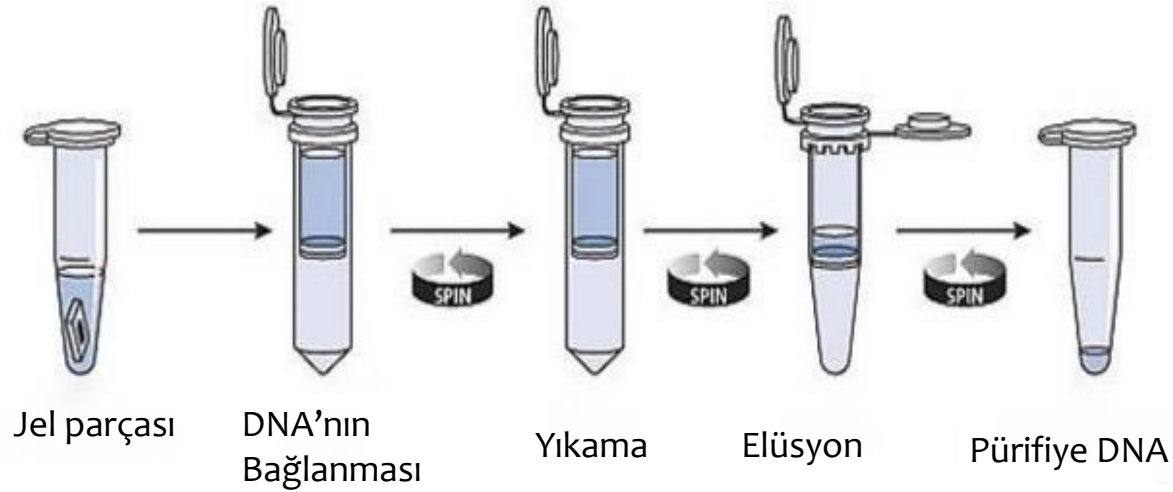
TCC TGG ACC CGT TCC...



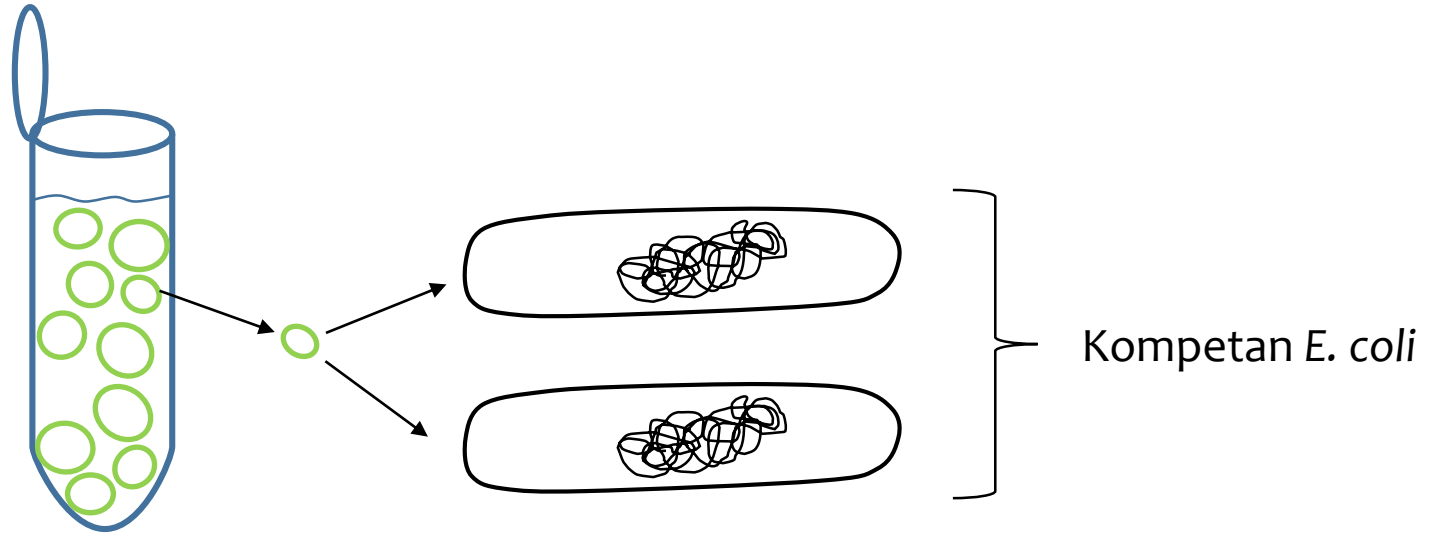
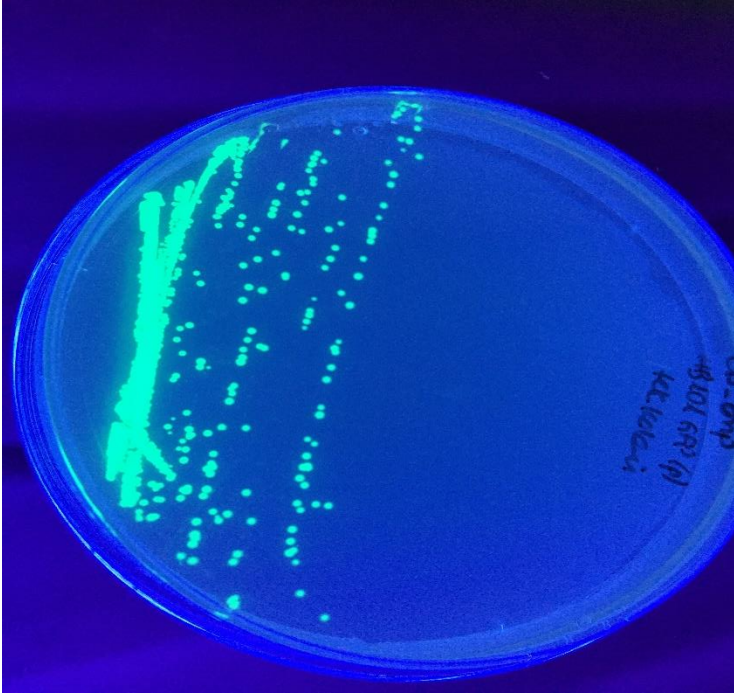
4. pJETaroA Vektörünün Doğrulanması (PCR Analizi)
5. pJETaroA Vektöründen aroA Gen Bölgesinin Kesilmesi



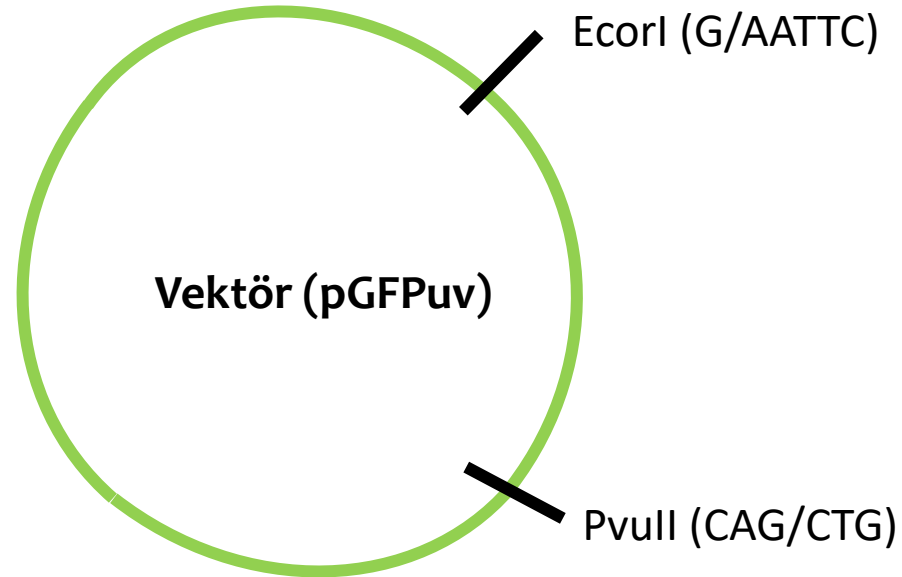
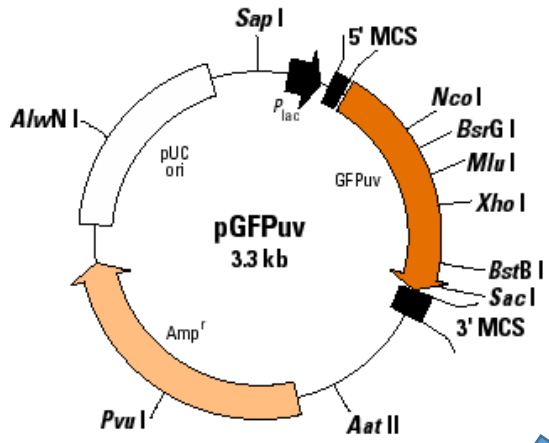
6. pJETaroA(-) Vektörünün Doğrulanması ve Elde Edilmesi (Jel Elektroforezi, Jelden ekstraksiyon)



7. GFP Vektörünün Çoğaltılması ve Elde Edilmesi

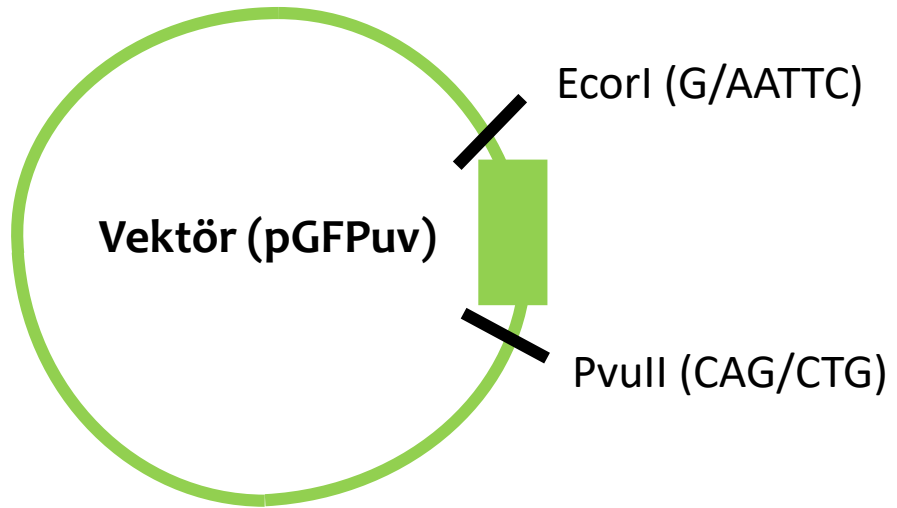


GFP Geni Elde Edilmesi

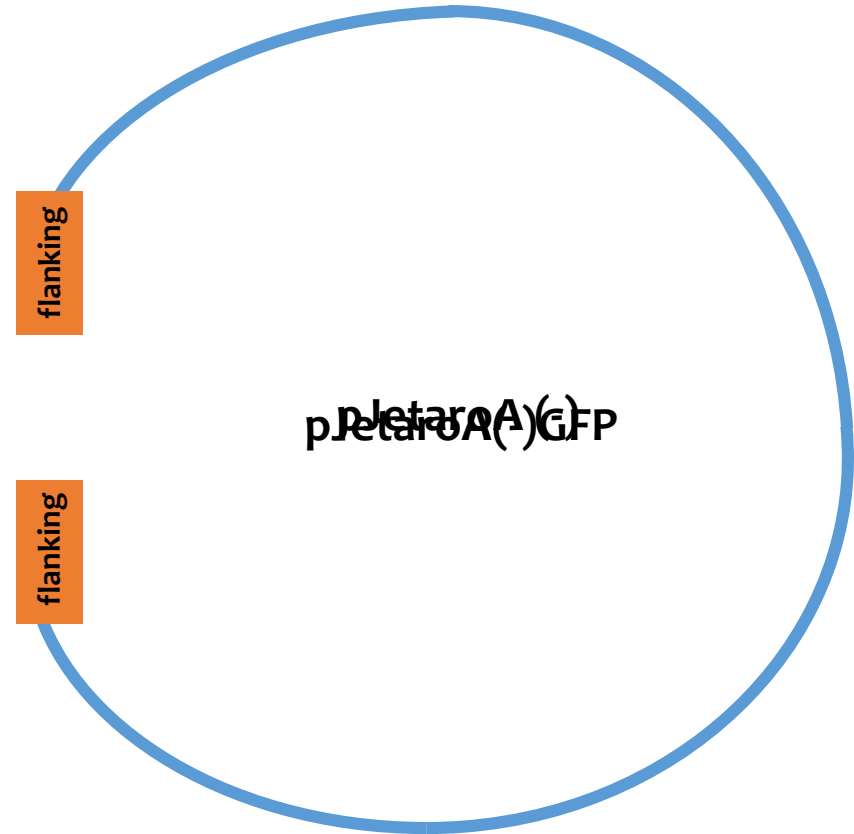


GFP
(950 bp)

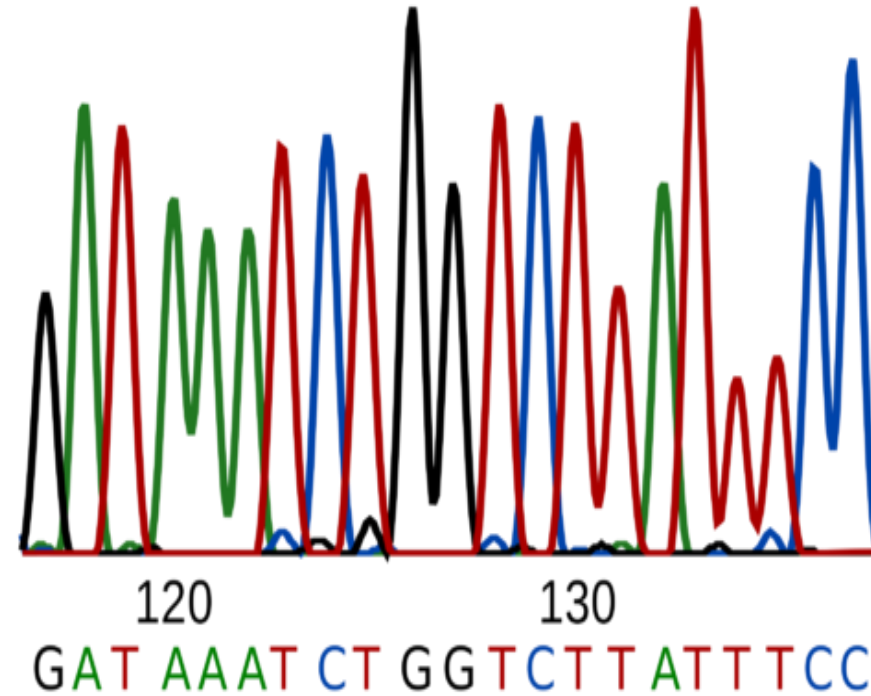
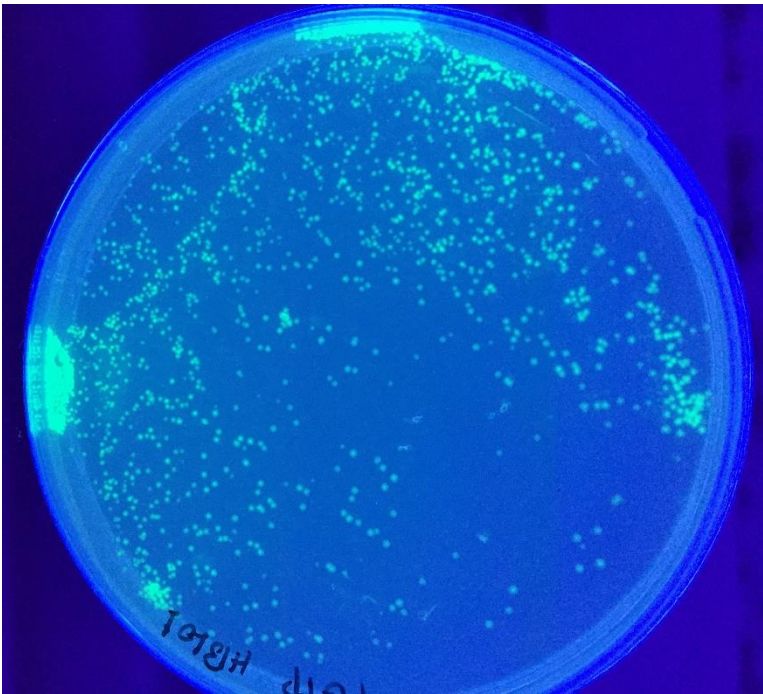
8. GFP Genine Ait Parçanın Doğrulanması ve Elde Edilmesi
9. pJETaroA(-) Vektörü İçine GFP Gen Bölgesinin Yerleştirilmesi



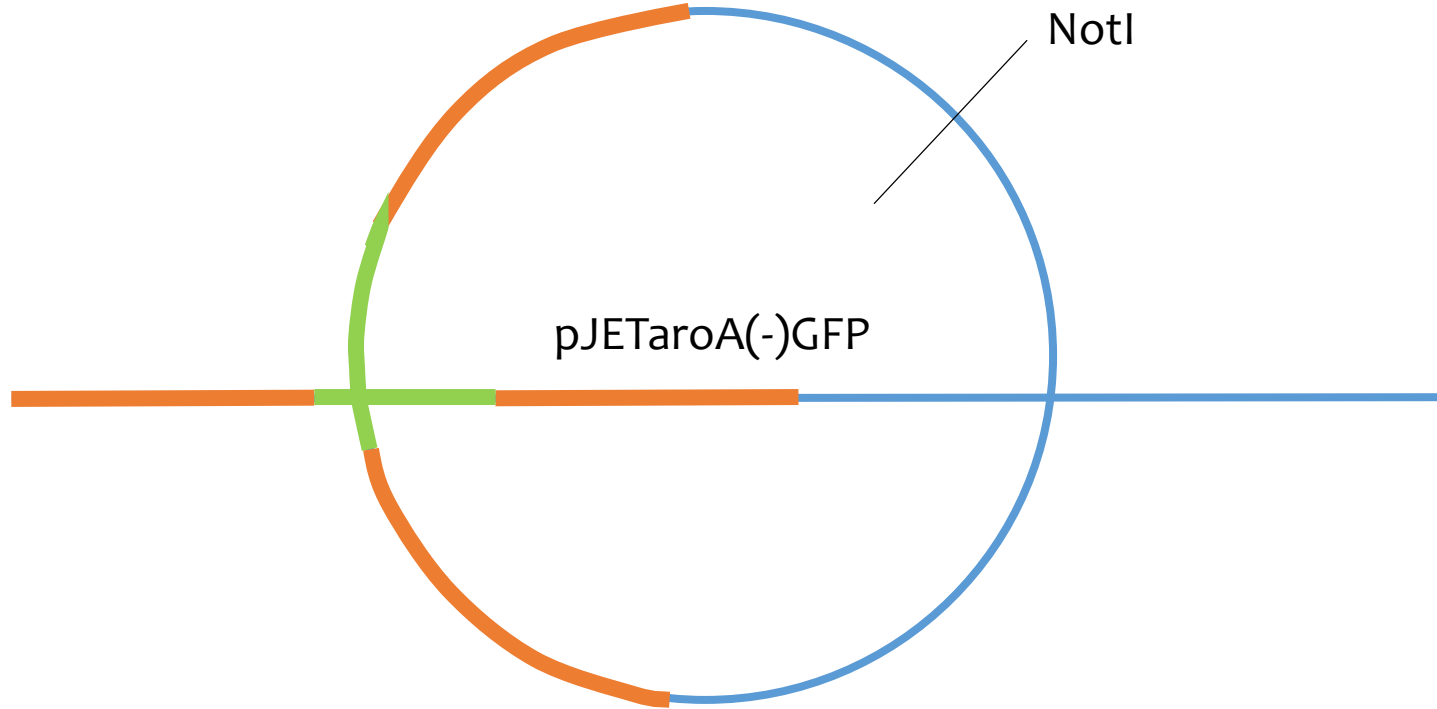
T4 DNA ligaz



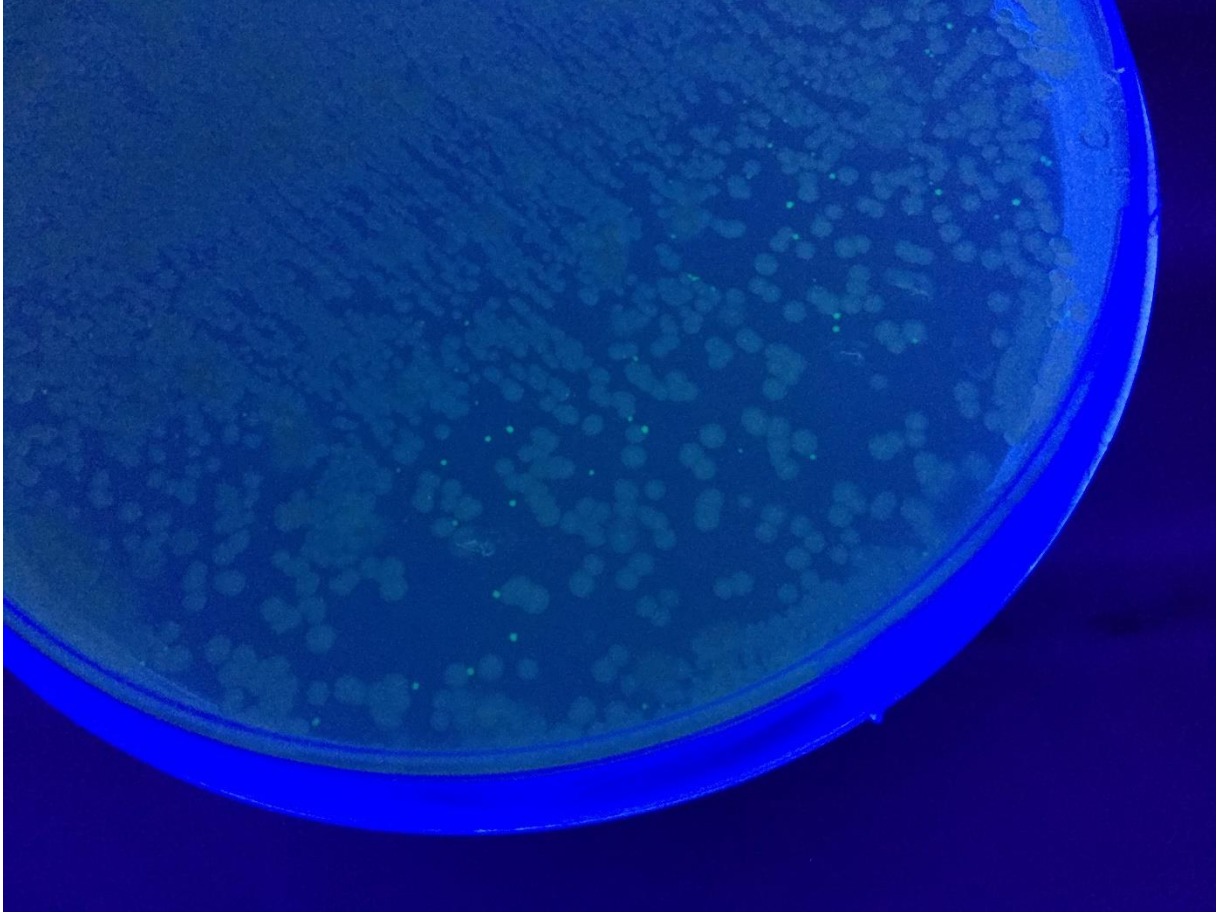
10. pJETaroA(-)GFP Plazmidinin Doğrulanması (Transformasyon, Sekans analizi)



11. Rekombinant Bakterinin Oluşturulması



Rekombinant Bakterinin Oluşturulması



Plazmidler

- Bakteri içerisinde bakteriyel genomdan ayrı olan, ayrı olarak replike olan, sirküler çift-iplikcikli DNA molekülü
- Bir DNA klonlama vektörü olarak işlev görecektir şekilde dizayn edilir ve sadece klonlanacak sekansları içerir:
 - bir bakteriyel replikasyon orijini (ori)
 - bir antibiyotik direnç geni [örn. ampiciline dirençten sorumlu (amp)]
 - bir ya da daha fazla özel restriksiyon enzim kesim bölgesi bu yabancı DNA parçasının eklenmesine olanak sağlar (MCS)
- DNA MCS'ye eklendiğinde aktivite kaybeden bir *B-galactosidase* geni, yabancı bir genin prokaryotik veya ökaryotik hücrelerde ekspresyonunu sağlayan promotorlar içerebilirler.

Dikkat Edilmesi Gerekenler

- Gen klonlamasında kullanılan plazmidler belirli antibiyotiklere karşı direnç geni taşımaktadır - Örn. Ampisilin veya Tetrasisklin.
- İşte bu genler transjenik bir organizmanın oluşturulmasında kullanıldığında direnç genleri aktarılabilir. İşte bu direncin diğer organizmalar tarafından alınabileceği dolayısıyla antibiyotik direncine ilişkin sorunların ortaya çıkmasına yönelik kaygılar bulunmaktadır

Vacanti Faresi



- Vacanti faresi, sırtında insan kulağına benzeyen bir şey olan bir laboratuvar faresiydi. "Kulak" aslında inek kıkırdak hücrelerinin biyolojik olarak parçalanabilen kulak şeklinde bir kalıba ekilmesiyle büyütülen kulak şeklinde bir kıkırdak yapısıydı. Kulak faresi, 1995 yılında Massachusetts Üniversitesi'nde Charles Vacanti tarafından yaratıldı.
- İnsanlara transplantasyon için kıkırdak yapılarını imal etme yöntemini göstermek için oluşturulmuştur. Emilebilir bir polyester kumaşa sığır kıkırdak hücreleri infiltre edildi ve tüysüz bir farenin derisinin altına implante edildi. Daha sonra kıkırdak, sınırlı şekil ve boyutta doğal olarak kendi kendine büyüdü.

Dang Humması



- Bir İngiliz biyoteknoloji şirketi olan Oxitec, ani ölüm için programlanmış genetiği değiştirilmiş sivrisinekler yarattı.
- Oxitec'ten yapılan açıklamaya göre, genetiği değiştirilmiş erkek sivrisineklere yerleştirilen özel bir genin, yeni üreyen dişi sinekleri büyümeden, larval evresinde **öldürmesi** ve bu sineklerin nüfusunu azaltması hedefleniyor.
- Bilim adamları, genetiği değiştirilmiş sivrisineklerinin bu şekilde dang humması yayılmasını kesin olarak kontrol edebildiğine dair kanıtları olduğunu söylediler

Timsah Jack



- Jake the Alligator Man, 1993 yılında Florida bataklığında keşfedildi. Esaretten kaçtığı, öldürüldüğü bildirildi.
- Bilim adamlarından bazıları bunun [bir zamanlar insansılar ile insanlar arasındaki evrimsel boşluğu açıklayacağına inanılan varsayımsal bir primat](#) olduğunu, bazıları ise insanın uzak bir atası olabileceğini söylüyor.
- Teoriler, bunun yanlış ve çılgına dönen erken bir gizli genetik mühendislik projesi olduğunu iddia etti. Jake'in gerçek kökeni ne olursa olsun, kesinlikle bir mutanttır.

Parlayan balıklar



- GloFish, parlak kırmızı, yeşil ve turuncu floresan rengine sahip, genetiği değiştirilmiş floresan zebra balığının patentli bir markasıdır. GloFish'in geliştirildiği orijinal zebra balığı, üç santimetre uzunluğunda, altın rengi ve koyu mavi çizgileri vardır. 1999'da, Singapur Ulusal Üniversitesi'nden Dr. Zhiyuan Gong ve meslektaşları, yeşil flüoresan proteini (GFP) adı verilen ve orijinal olarak bir denizanasından elde edilen ve doğal olarak parlak yeşil biyoluminesans üreten bir gen üzerinde çalışıyorlardı. Geni bir zebra balığı embriyosuna yerleştirdiler ve zebra balığının genomuna entegre olmasını sağladılar, bu da balığın hem doğal beyaz ışık hem de ultraviyole ışık altında parlak bir şekilde flüoresan olmasına neden oldu. Amaçları, çevresel toksinlerin varlığında seçici olarak floresan yayarak kirliliği tespit edebilen bir balık geliştirmektir.
- Evcil hayvan olarak halka açık hale gelen ilk genetiği değiştirilmiş hayvandır.

Ruppy (Ruby Puppy)



- Ultraviyole ışık altında kırmızı parlayan, Güney Kore'den klonlanmış bir beagle'dır. Ruppy, 2009 yılında Güney Kore'de Byeong-Chun Lee liderliğindeki bir grup bilim insanı tarafından oluşturuldu.
- Köpek, kırmızı flüoresan genini ifade eden bir protein ile fibroblast hücrelerinin viral transfeksiyonu kullanılarak klonlandı.

Kara mayınlarını gösteren bitkiler



- Kopenhag firması Aresa Biodetection tarafından geliştirilen bu genetiği değiştirilmiş bitkiler, nitrojen dioksite (gömülü kara mayınlarından toprağa sızan) çarptığında, bitkinin rengi kırmızıya döner.

Yakıt Dışkılayan Genetik Olarak Modifiye Böcekler



- Silikon vadisinde bir araştırmacı, tarımsal atıkları yiyen ve dizel yakıtı salgılayan genetiği değiştirilmiş böcekler buldu.

Çevreci domuzlar



- Hayvan atıklarında yüzde 65 daha az fosfor üreten ve bu nedenle de çevre dostu olan, sınırlı üretim için onaylanmış, genetiği değiştirilmiş domuzlar.