

# HAFTA III

Ektopik Gen İfadesinin Regülasyonu

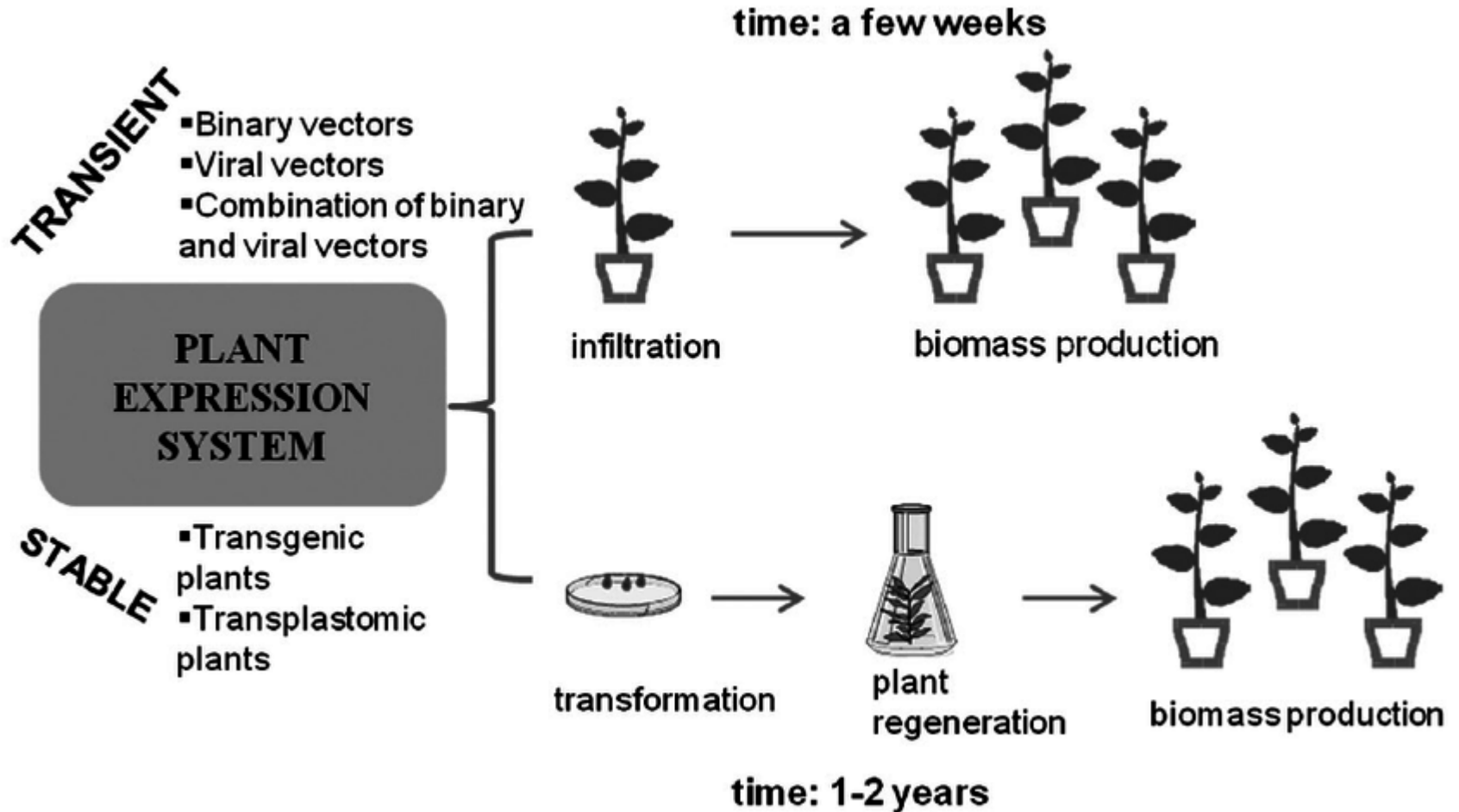
Bitki İfade Sistemleri

Bitkilere Gen Transferi Teknikleri

Vektör-plasmid Kombinasyonları

Transformasyon Aşamaları

# Bitkilerde Ekspresyon Sistemleri



# Bitkilerde Transformasyon Yöntemleri

- Transgenik bitki üretimindeki en zorlu noktalardan biri transformasyon tekniklerinin etkili olarak uygulanmasıdır. Teknolojik ilerlemenin önünde uygun transformasyon tekniğinin seçilmesi ve geliştirilmesi ve transgenik tarla bitkilerinin rejenerasyonu gibi önemli kısıtlayıcı basamaklar bulunmaktadır.
- Genetik transformasyonun tekrarlanabilir olması başarı basamakları arasında sayılır. Bu anlamda önemli gereklilikler şöyledir:
  - Kullanılan tekniklerin düşük maliyetli olması
  - Optimizasyon basamaklarının sınırlı olması
  - İlgili DNA dizisinin vektöre stabil olarak entegre edilmesi
  - Hücre başına düşen genetik kopya sayısının mümkün olduğunca az olması
  - Tüm bir transgenik bitkinin gen aktarılan bir hücreden rejenera edilebilmesi

# Bitkilerde Transformasyon Yöntemleri

- Geçici Transformasyon
  - İlgili genin bitki hücrelerine sokulması basamağını kapsar. İncert edilcn genler henüz genoma entegre olmamıştır.
- Stabil transformasyon
  - İlgili genin bitki hücrelerine sokulması basamağını kapsar ancak bu yöntem ile bitki hücrelerine aktarılan DNA genoma entegre olur.
- Yabancı DNA fragmanı bitki hücrelerine dolaylı ya da doğrudan aktarılabilir. Dolaylı yöntemlerde yabancı genin konak hücreye aktarılması bakteri hücreleri üzerinden gerçekleştirilirken, doğrudan transformasyonda herhangi bir aracı hücre kullanılmaz.

# Bitkilerde Transformasyon Yöntemleri

Yöntem	Prosedür	Avantajlar	Dezavantajlar
<b>Agrobacterium</b>	Transgen taşıyan bir plazmidi aktaracak olan bitki patojeni bir bakteri kullanılır.	Genom entegrasyonu kesindir, düşük kopya sayısıyla transgenlerin yerleştirilmesi kolaydır, genin entegrasyonu, ifadesi ve kalıtımı nesiller boyunca kararlıdır. Birçok dikotil bitki ve bazı monokotil tarla bitkileri için etkili ve tekrarlanabilir protokolleri vardır. Yüksek verimliliğe sahiptir.	Süreç yavaştır. Bitkide bilinmeyen genetik ifadelere sebep olabilecek gereksiz vektörler aktarılabilir. Steril protokoller gerektirir.
<b>Elektroporasyon</b>	DNA kuvvetli elektrik atımları ile geçirgenliği arttırılan hücre zarındaki porlardan hücre içine sokulur.	Tüm bitki protoplast çeşitlerine uygulanabilir. Farklı hücre tipleri kullanılabilir. Kolay, hızlı ve ucuzdur.	Zahmetli protokolleri vardır. Çoğunlukla protoplastlara uygulanır. Transformasyon verimi düşüktür.
<b>Biyolistik</b>	Genlerle kaplanmış yüksek yoğunluktaki taşıyıcı partiküller hücrelere doğru hızla atılır ve bir adsorbsiyon mekanizmasıyla DNA'yı hücre içine bırakırlar.	Kolaydır. Hücre duvarına herhangi bir ön işlem gerekmez. Farklı hücre tipleri için uygundur ve hücrenin fizyolojik özelliklerinden bağımsızdır. Çoklu transgen aktarımı mümkündür.	Pahalıdır. Transgenlerin çoklu kopyalarının aktarılması riski vardır. Transformasyon verimi düşüktür. Sürekli optimizasyon gerektirir. DNA ve hücreler hasar görebilir.
<b>Vakum infiltrasyon</b>	Vakum uygulaması, negatif bir atmosferik basınç yaratarak <i>Agrobacterium</i> gibi bakterilerin sızmasına izin veren hücreler arası hava boşluklarını arttırır.	Kolay ve hızlıdır. Orta derecede verimlidir. Çok sayıda bağımsız hücre transformasyonu gerçekleşir.	Bazı <i>Agrobacterium</i> suşları belirli hücre tiplerini enfekte edemez. Genin birden fazla kopyasının sokulması riski vardır.

# Bitkilerde Transformasyon Yöntemleri

<b>Ultrason</b>	Akustik kavitasyon zar geçirgenliğini değiştirerek DNA'nın absorpsiyonunu kolaylaştırır.	Yüksek verime sahiptir. Orta derecede maliyetlidir. Farklı hücre tiplerine uygulanabilir.	Hücre zarını parçalayarak hücrelere zarar verebilir.
<b>Mikroenjeksiyon</b>	Bir enjeksiyon pipeti aracılığıyla DNA'nın doğrudan bitki hücrelerinin içine sokulmasıdır.	Transformasyon verimi olağanüstü yüksektir. Plazmidlerin ve bütün kromozomların aktarılmasına olanak sağlar.	Pahalı, zahmetli ve yavaştır.
<b>Silikon karbid fiberler</b>	Silikon karbid fiberler doku süspansiyonu ile karıştırılır ve aşınmaya yol açarak DNA'nın içeri girmesini sağlar.	Kolay, hızlı ve düşük maliyetlidir. Farklı hücre tiplerine uygulanabilir.	Verim çok düşüktür. Hücreler zarar görebilir ve rejenerasyon yetenekleri düşebilir. Fiberlerin solunması araştırmacıya zararlıdır.
<b>Cam boncuklarla çalkalama</b>	Cam boncuklarla hızlı bir şekilde çalkalama plazmid DNA'sının içeri girmesine olanak verir.	Kolay, hızlı ve düşük maliyetlidir. Gelişmiş cihazlara, kimyasal uygulamalara ve enzim karışımlarına gereksinim yoktur.	DNA hasarından dolayı verim düşüktür.
<b>PEG</b>	Plazmid izole edilmiş protoplastlarla hafifçe karıştırılır. Ortama $CaCl_2$ , mannitol gibi maddeler içeren PEG çözeltisi eklenir.	Kolaydır ve pahalı ekipmana ihtiyaç duymaz.	Transformasyon verimi düşüktür. Transformasyonda protoplastlar kullanılmasından dolayı, gen aktarılmış olan protoplastların tam bir bitki oluşturmak üzere rejenerasyonu zordur.

# Dolaylı Gen Aktarımı

