

# HAFTA IV-V

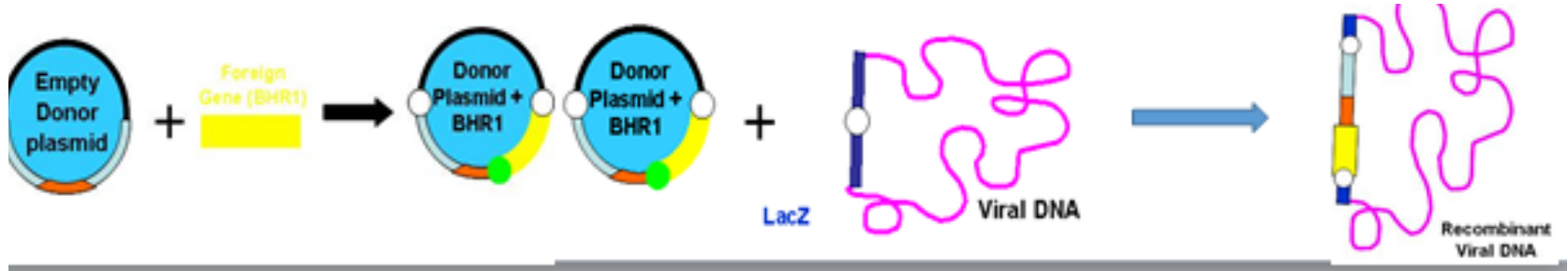
KLONLAMA

# Klonlama

- Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin kombinasyonunu ifade eder.
- Rekombinant DNA teknolojisi, bir genomdaki binlerce gen arasından tek bir genin *ayrıştırılmasını*, *tanımlanmasını* ve bu genin klonlanmış DNA molekülü olarak büyük miktarlarda *üretilmesini* mümkün kılmaktadır.
- Bu teknoloji, bir genin potansiyel olarak sınırsız miktarda üretilmesi için güçlü bir araçtır.

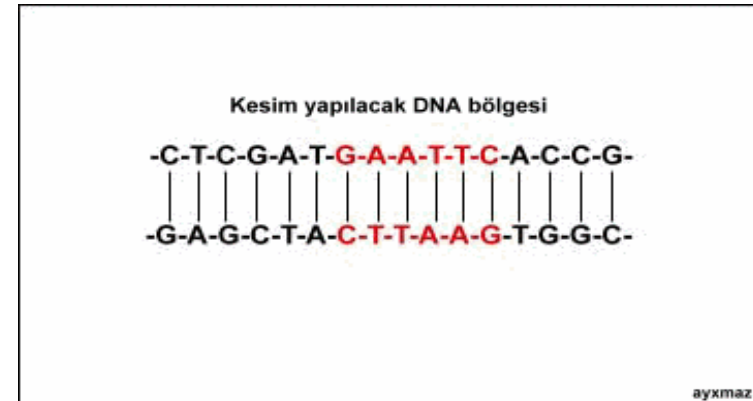
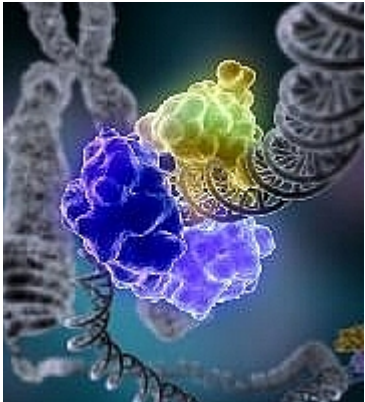
# Klonlama

- Gen klonlama : Bir genin birçok kopyasının oluşturulmasını ve izolasyonunu ifade eder.



# Klonlama

- Genleri doğrudan çalışabilmek için, gen boyutundaki DNA parçalarının çok sayıda kopyasının elde edildiği yöntemlerin geliştirilmesi gerekir.
- Bu işlemi gerçekleştirmek için “Restriksiyon Endonukleaz” veya “Restriksiyon Enzimleri” kullanılır.



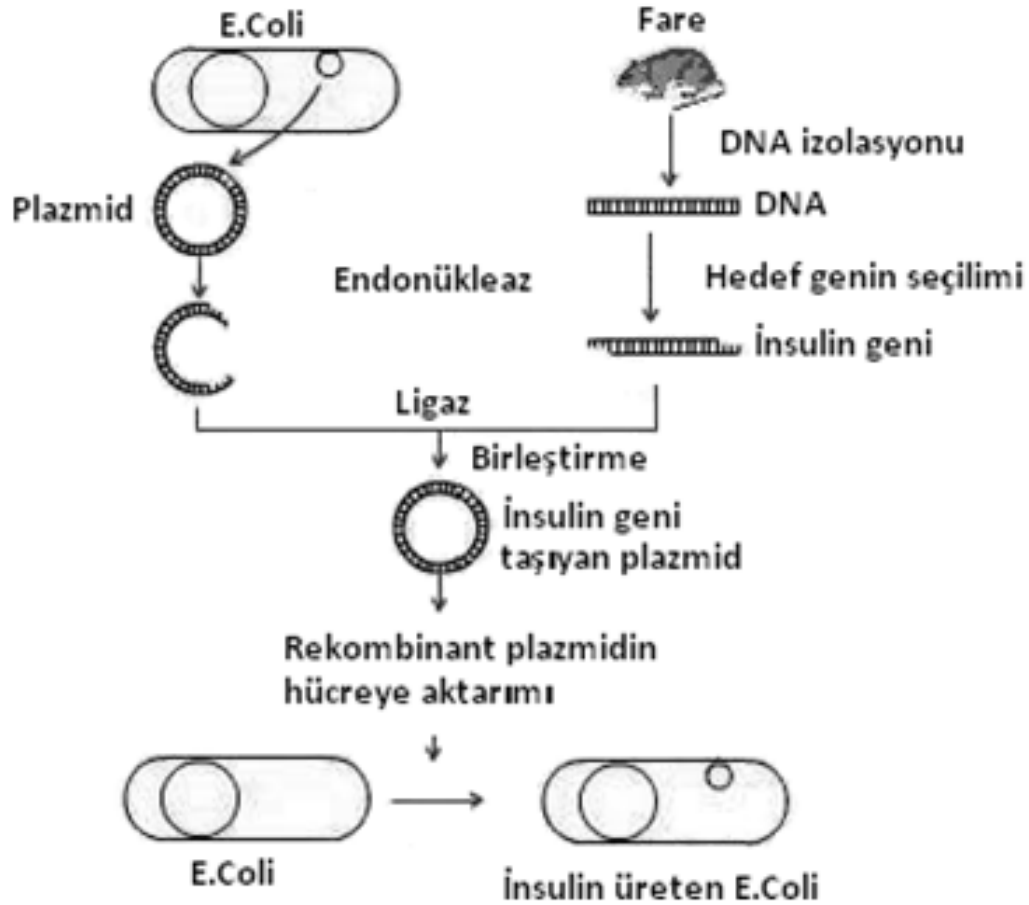
# Klonlama

- İlk geliştirilen klonlama yöntemi hücre-tabanlı klonlama olarak bilinir ve klonlanmış DNA yaratmak için çok yaygın olarak kullanılır.
- En yaygın kullanılan prokaryotik konak, K12 olarak bilinen E.coli'nin bir laboratuvar suşudur.

## Klonlamanın temel basamakları şu şekildedir;

- Klonlanacak DNA, doku ya da hücrelerden izole edilir.
- Restriksiyon enzimleri kullanılarak özgül DNA parçaları elde edilir. Bu enzimler, DNA'yı özgül dizilerinden tanır ve keser.
- Oluşturulan bu DNA parçaları vektör adı verilen DNA molekülleriyle birleştirilir.
- Rekombinant DNA molekülü, bir konak hücreye aktarılır. Konakta molekül kendini eşler ve düzinelerce kopyası oluşur

# Klonlama



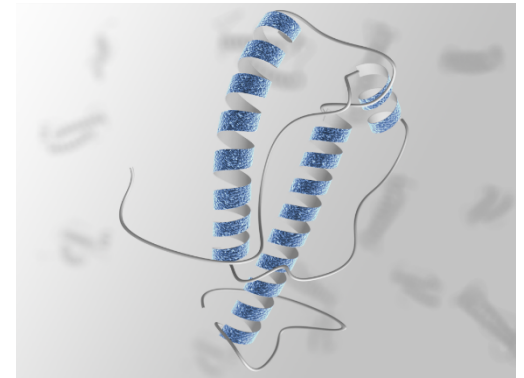
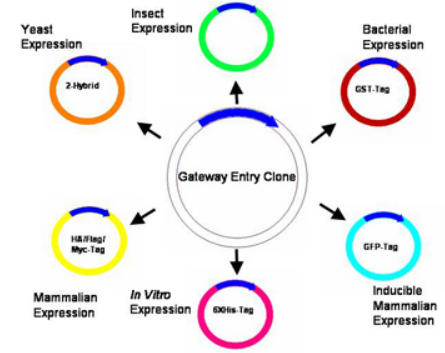
# Klonlama

## Klonlanmış DNA

- Konak hücrelerden izole edilip incelenebilir,
- Transkripsiyona uğratılabilir,
- mRNA'sıtranslasyona sokulabilir ve
- Kodlanan gen ürünü izole edilerek araştırma için ya da ticari amaçlarla satılmak için kullanılabilir.

## Klonlanan genlerin potansiyel kullanımı 2 genel kategoride toplanır

- Protein ürünü elde etmek
- Genin çok sayıda kopyasını hazırlamak



# Klonlama

- Kopyalanacak DNA parçaları konak hücrelerine doğrudan giremezler. Ancak, restriksiyon enzimiyle kesilmiş bir DNA parçası “vektör” adı verilen başka bir DNA molekülü ile birleşirse konak hücreye girebilir.





# Vektörler

- Vektörler, kendilerine takılan DNA parçasını nakleden ve replike eden taşıyıcı DNA molekülleridir.

Bir DNA molekülünün vektör olarak kullanılabilmesi için;

- Kendini ve taşıdığı herhangi bir DNA parçasını bağımsız olarak replike edebilmelidir.
- Klonlanacak DNA parçasının insersiyonuna olanak tanıyan birçok tanıma dizisi içermelidir.
- Vektörde seçicilik sağlayan “marker genler” bulunmalıdır. Bunlar, vektör taşıyan ve taşımayan konak hücreleri ayırmak için gereklidir.
- Vektör ve vektörün taşıdığı DNA parçası konaktan kolaylıkla ayrıştırılabilmelidir.

# Vektörler

- Konak özgüllüğü,
- Taşıdıkları parçanın büyüklüğü,
- Kopya sayıları,
- Tanıma dizilerinin sayıları,
- Marker genlerinin tipi ve sayıları

gibi birtakım özellikleri açısından birçok farklı klonlama vektörü vardır.

# Vektörler

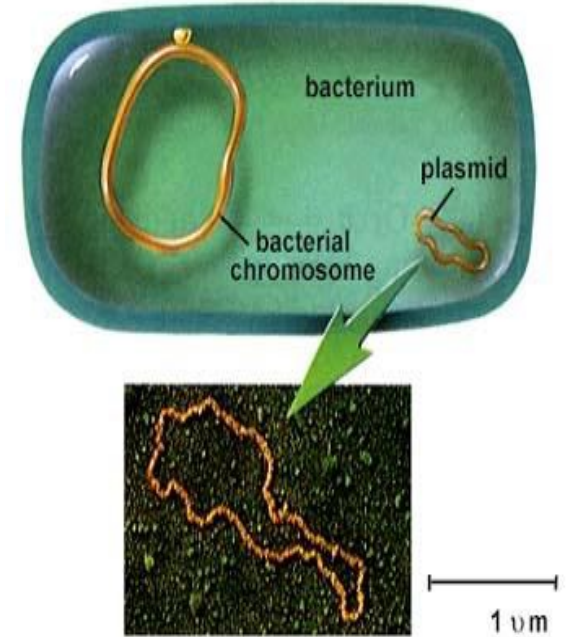
## Başlıca Vektörler

- Plasmidler
- Bakteriyofajlar
- Cosmidler
- Bakteri Yapay Kromozomları (BAC)
- Maya Yapay Kromozomları (YAC)
- Memeli Yapay Kromozomları (MAC)
- İnsan Yapay Kromozomları (HAC)
- İfade Vektörleri

# Vektörler

## Plasmidler

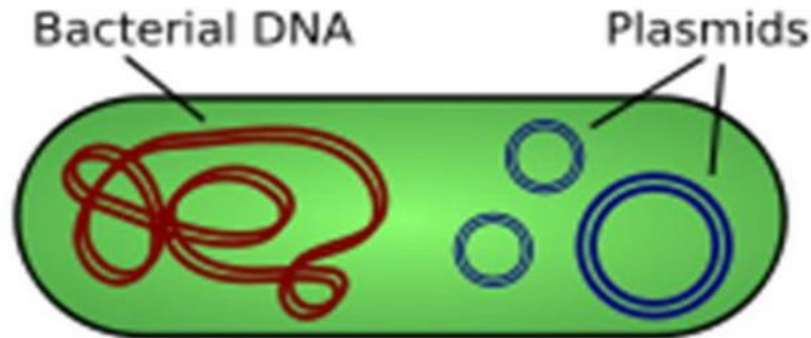
- Plasmid, çoğu bakteri türünde doğal olarak bulunan, bağımsız olarak replike olabilen, bakterinin kendi kromozomu dışındaki çift zincirli halkasal veya süper sarmallı DNA molekülleridir.



# Plazmidler

## ➤ Plasmidler

- küçük moleküllerdir;
- bakteriyel kromozomun %20'si ile %4'ü arasında büyüklüklerde olduğu görülür.
- Plasmidlerin büyüklüğü 1-400kb's kadar değişebilir.



# Plasmid Tipleri

- Fertilitite (F) Plasmidleri
- Direnç (R) Plasmidleri:
  - konakçıyı antibiyotiklere karşı dirençli kılar.
  - Bu tip plasmidler, transfer edilerek başka hücrelerin de direnç kazanmasına yol açabilirler.
  - Ampisilin(amp), Kloramfenikol(Cam), Streptomisin (Str), Kanamisin(Kan) ve Sulfonamid(sul) gibi direnç genleri vardır.

# Plasmid Tipleri

- Kolisinojenik (Col) Plasmidler: Colplasmidleri, "kolisin" denilen bir grup proteinin sentezinden sorumlu genleri içerirler. Kolisinler, aynı tip Colplasmidini taşımayan bakterileri öldürme özelliğindedirler.
- Ent Plasmidler (E. Coli) ; zararsız bakterilere girerek onları patojen hale getirirler ve diareyesebep olan enterotoksinlerin sentezini sağlarlar.

# Plasmid Tipleri

- Hly Plasmidi (hemoliz yapan plasmit) ; domuzdan izole edilen E.coli'lerde bulunmuştur. Patojeniteye sahip değildirler.
- Degredasyon Plasmidleri ; Pseudomonas türü bakterilerdir. Özellikle, toluen, oktan gibi organik, zehirli karbonları kullanabilirler.
- Toksik metal iyonlarına karşı direnç sağlayan plasmidler ;