

HAFTA IV-V

KLONLAMA

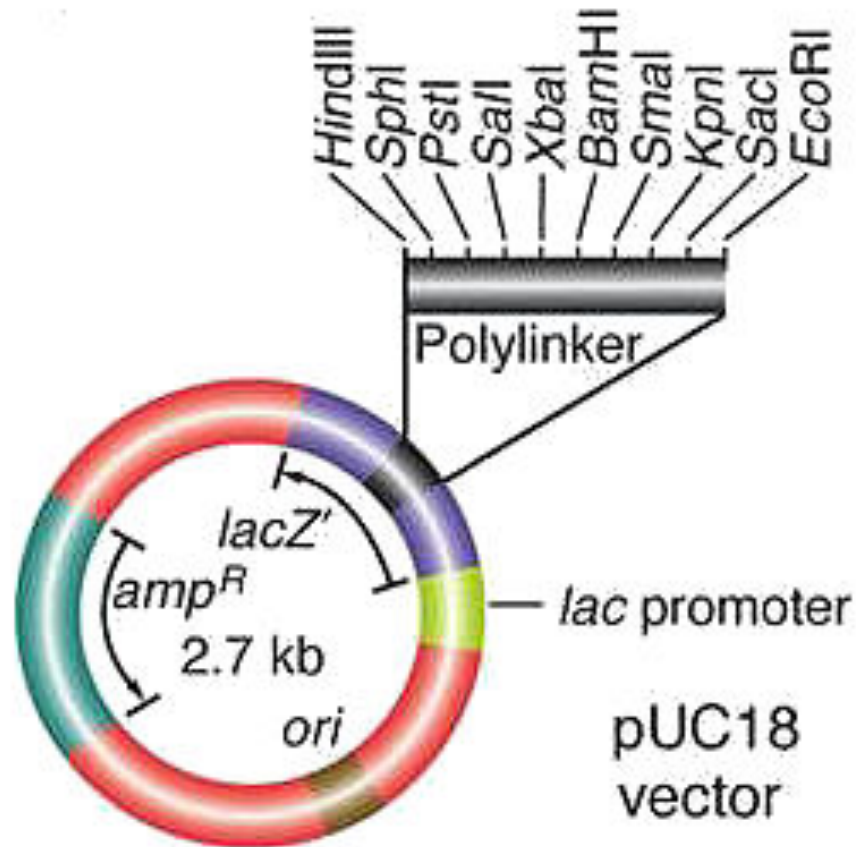
Klonlama

- 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.

Plasmid Vektörlerde Bazı Önemli Teknik Kavramlar

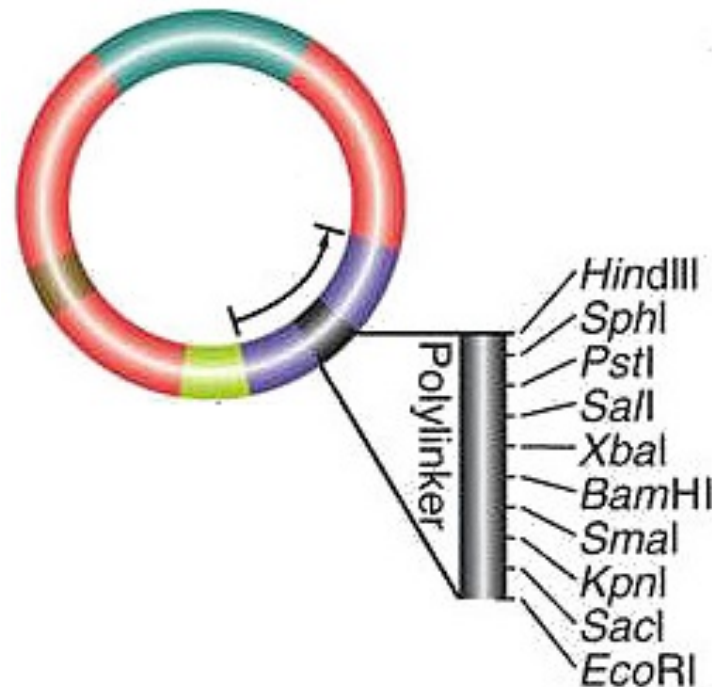
- Replikasyon Orjini (ori) ; Halkasal DNA'ya sahip organizmada replikasyonun başladığı nokta.
- Antibiyotik direnç genleri (marker gen)
- Restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içeren bir "polylinker bölge"

Plasmid Vektör Haritası



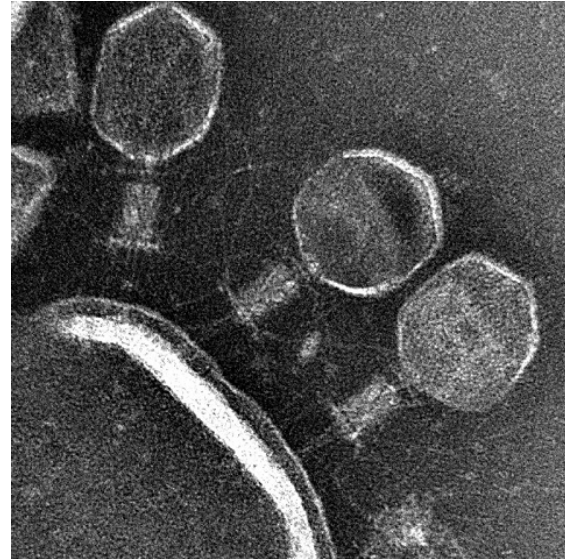
Plasmid Vektörlerde Poly-Linker Bölge

- Yan yana, farklı restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerinin bir arada bulunduğu bölgedir.



Bakteriyofaj Vektörler

- Bu yöntem virüslerin enfekte etme yeteneklerine dayanılarak uygulanır.

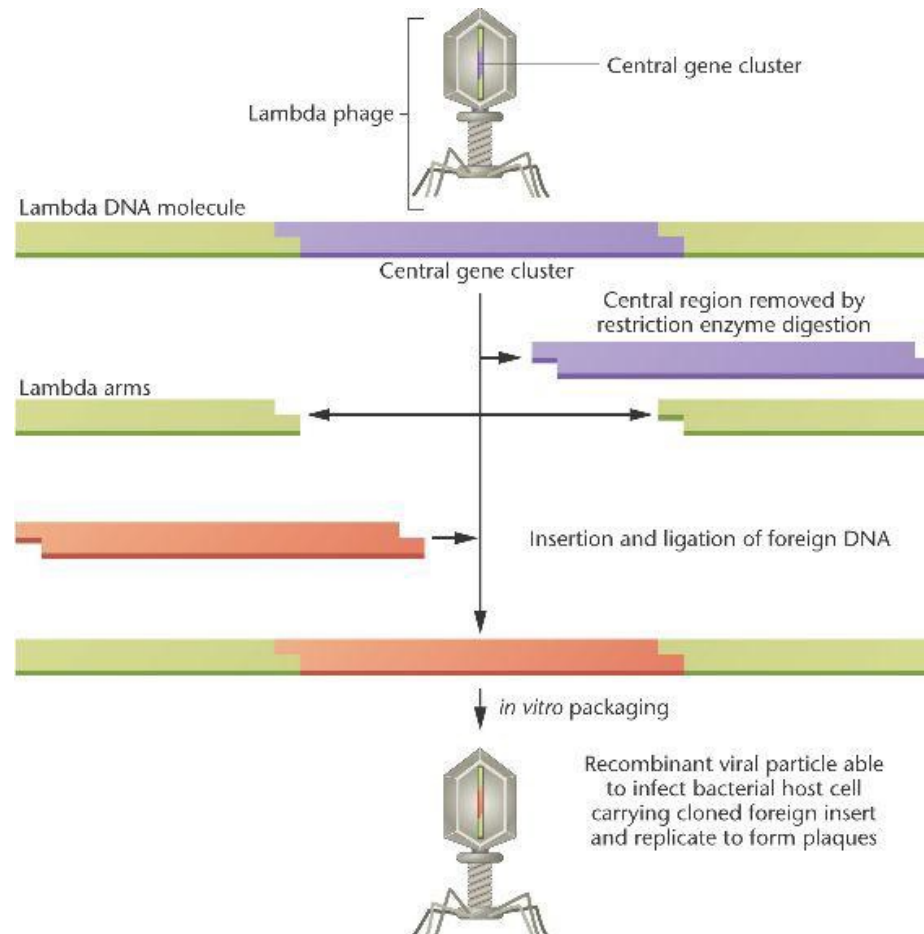


Bakteriyofaj Vektörler

ör: λ Faj Vektörü

- Lambdafajının genlerinin hepsi tanımlanmış, tüm genomunun haritası çıkarılmış ve nükleotit dizisi belirlenmiştir.
- λ fajının genetik olarak değiştirilmiş suşları vektör olarak kullanılır.
- Vektör olarak kullanılması için, lambda kromozomunun ortasında yer alan genomun üçte birlik kısmı, yabancı bir DNA ile değiştirilir.
- Faj vektörler yaklaşık 20kb büyüklüğündeki DNA parçalarını taşıyabilirler.
- Bu vektörü kullanarak DNA klonlaması yapmak için önce fajDNA'sı ayrıştırılır.
- EcoR1 ile kesilerek, sol kol, sağ kol ve vazgeçilebilir orta bölüm olmak üzere 3 kromozomal parça oluşturulur.
- Sol ve sağ kollar izole edilir ve EcoR1 ile kesilmiş DNA ile karıştırılır.
- Parçaların DNA ligaz ile birleştirilmesiyle rekombinant vektörler oluşur.

Bakteriyofaj Vektörler

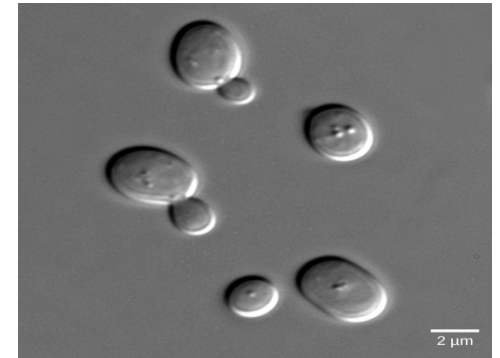
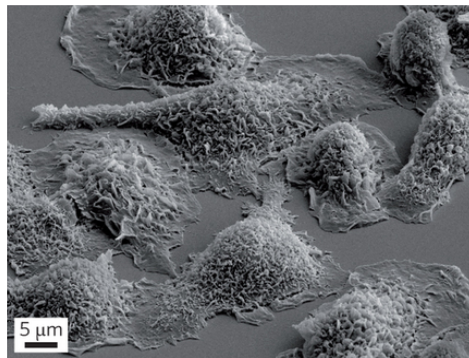
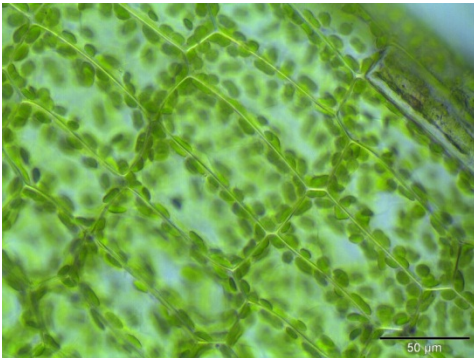


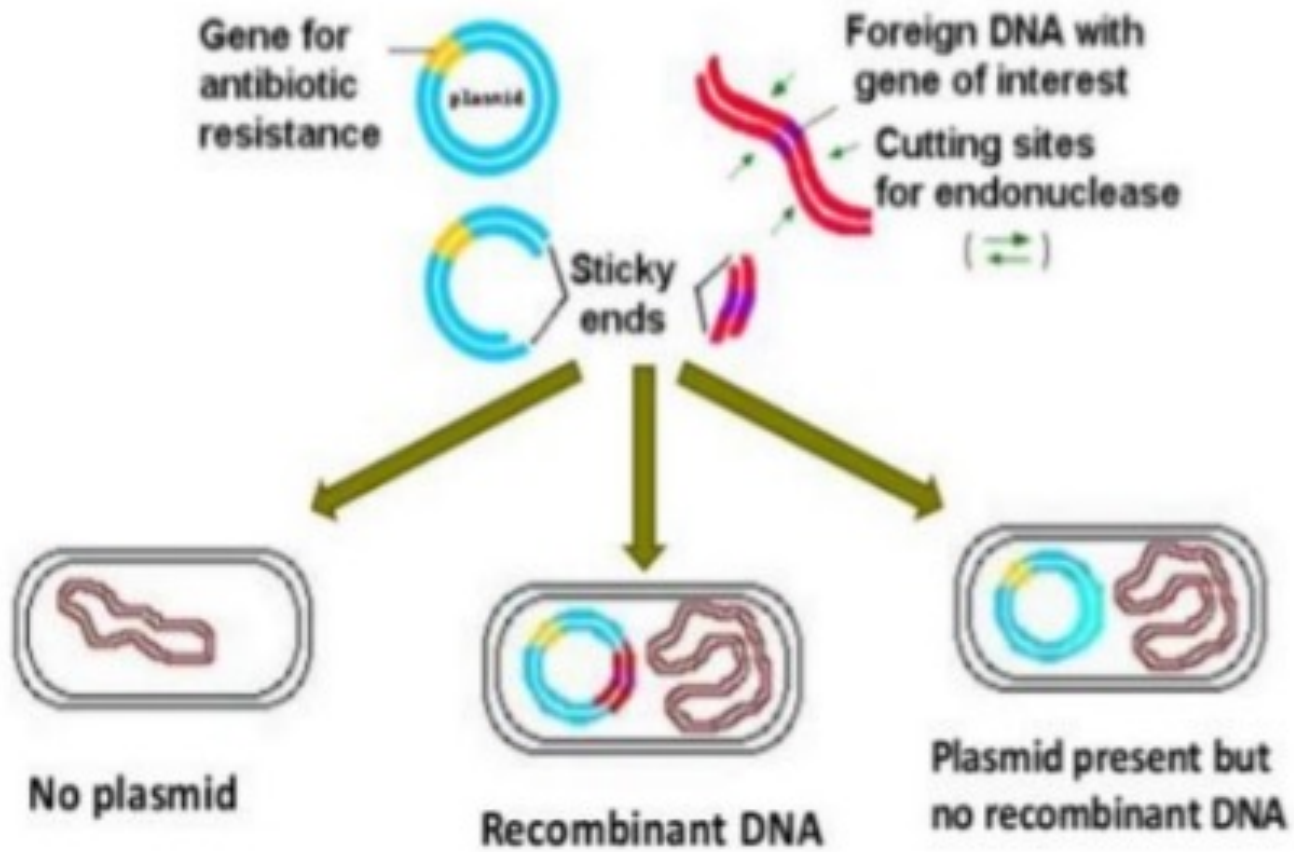
ÖKARYOTİK GENİN BAKTERİYEL PLASMİD İÇİNDE KLONLANMASI

- Vektör ve gen-kaynağı DNA'nın izolasyonu
- DNA'nın vektöre takılması
- Klonlama vektörünün hücrelere aktarılması
- Hücrelerin klonlanması
- İstenen geni taşıyan hücre klonlarının ayrımı

KULLANILAN KONAK HÜCRELER

- Bitki Hücreleri
 - Hayvan Hücreleri
 - Maya Hücreleri
- çevrelerinden DNA moleküllerini içlerine alabilirler.
- Eğer vektör bir plasmid ise; DNA aktarımı transformasyon
 - Eğer vektör bir virüs ise transfeksiyon terimleri bir konağa DNA aktarımını tanımlar.



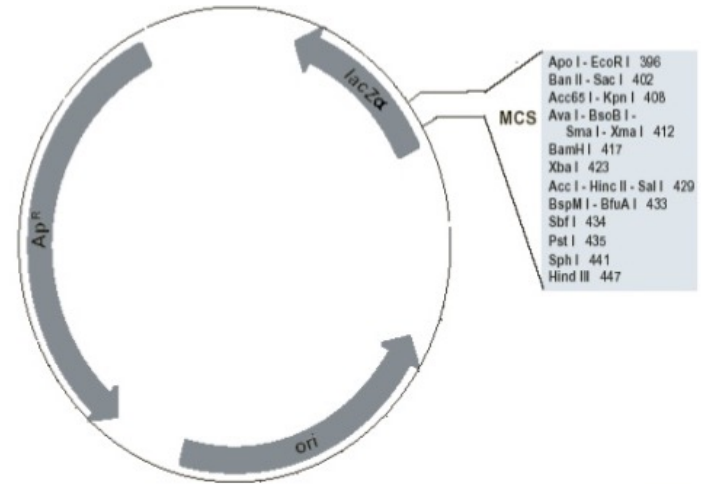


Mavi-Beyaz Tarama

- Transformasyon sonrası PCR tekniğiyle uygun kombinasyonda insert içeren hücrelerin seleksiyonu yapılır ve görüntülenir.
- Seleksiyon markırları
 - Antibiyotik direnci
 - Lethal gen
 - Genetik tarama
 - Mavi beyaz görüntüleme
 - Yeşil Florosan Proteini (GFP)

Mavi-Beyaz Tarama

- Mavi beyaz tarama tekniğiyle ilgili genin vektör içine dođru oryantasyonda ligasyonunu görüntülemeye izin veren en yaygın metoddur.
- Bu teknik LacZ, β -galaktosidaz mekanizmasını kullanır. Multiple klonlama bölgesine inserte edilmiş DNA LacZ'i inaktive eder.



Mavi Beyaz Tarama



Mavi-Beyaz Tarama

- İyi karakterize edilmiş bakteriyel lac operonu lacZ genini içerir. lacZ geni β -galaktosidaz enzimini kodlar. Lac operon ekspresyonu laktoz tarafından indüklenir. Laktoz analogu olan IPTG tarafından da indüklenir. IPTG lac operon represörüne bağlanarak represörü inaktive eder ve lac geni eksprese olur.
- Lac eksprese olduğunda β -galaktosidaz enzimi x-gal'ı galaktoza parçalar ve çözünmeyen bir mavi renk ortaya çıkar.