

HAFTA VIII

Gen transfer teknikleri
Bakteriyel transformasyon

Bakteriyel Transformasyon

- Bakteriyel transformasyon bir dizi DNA teknolojisinin temelini oluşturur. Transformasyonda bakteri eksojen DNA'yı içerisine alır ve bu yabancı DNA'da kodlanan genetik ürünleri, proteinleri üretir. Transformasyon, insülin, insan büyüme hormonu ve diğer hormon replasman tedavileri ve gen terapileri gibi önemli medikal ürünlerin ucuz ve güvenilir yollarla üretilmesine imkan tanır.
- Genetik materyalin diploid ve lineer kromozomlar halinde düzenlendiği ökaryotik genomlardan farklı olarak, bakterilerde genetik materyal haploiddir ve tekli halkasal kromozomdan oluşur. Bakteriler ayrıca plazmid denilen ekstra ve gereksiz olarak nitelendirilebilen halkasal DNA parçaları taşıyabilirler. Plazmidler bakteri genomundan daha az sayıda gen içerirler de bakteriye ayrıcalıklı özellikler kazandırabilirler. Örneğin bir antibiyotik karşı direnç geni içeren bir plazmid, o bakterinin söz konusu antibiyotiğin bulunduğu ortamda hayatta kalmasına olanak sağlar.

Bakteriyel Transformasyon

- Genetik araştırmalarında kullanılacak plazmidlerin, manipölasyona açık olabilecek kadar büyük ve bir hücre tarafından barındırılabilir kadar küçük olması ve hedeflenen geni etiketleyebileceği bir markır gen içermesi gerekmektedir.
- Markır genler, araştırmacıların yeni genetik materyali başarılı bir şekilde içinde bulunduran hücreleri kolayca tespit etmesini sağlar. Örneğin insülin üreten bir gene fosfor eklendiğinde, plazmidi taşıyan hücreler parlayacağından kolayca tespit edilebilir.

Bakteriyel Transformasyon

- ***Escherichia coli (E.Coli)*** bakterisi rekombinant DNA araştırmaları yapan laboratuvarlarda yoğun olarak kullanılmaktadır. İnsan bağırsağının doğal konakçısı olan ***E.Coli***, çevremizde bir çok bölgede kolayca bulunabilir. Yaklaşık beş milyon DNA baz çifti içeren tekil halkasal kromozoma sahiptir. ***E.Coli'ler*** ayrıca 1000-200,000 DNA baz çifti aralığında plazmidler yaşayabilirler. Plazmidler birçok bakteri ve maya türünde bulunabilir ve bir organizmanın yaşamı için gerekli genetik bilgiler taşımazlar. Plazmidlerin taşıdığı genetik bilgi içinde bulunduğu hücreye taşıdığı eklentiye bağılı olarak yaşama şansı sağlar: antibiyotikli ortamda yaşamak gibi.

Bakteriyel Transformasyon

- Bazı ***E.Coli*** bakteri suşları sağlıklı yaşam için gerekli ve yardımcıdır, bu yüzden non-patojeniktir. Diğerleri ise hastalığa hatta ölüme sebep olabilir ve patojen ya da patojenik olarak adlandırılır. Sayısız faydalı karakterlerinden dolayı moleküler biyolojide non patojenik ***E.Coli*** suşları kullanılır. Bu bakterilerin büyüme koşulları basittir ve kolayca ayarlanabilir: 37° optimal ortam sıcaklığı, özel oksijen ya da azot seviyesi ve ışık gerektirmeyen ortam koşulları. Bu bakterilerin en önemli özelliklerinden biri de büyümelerine engel olmadan farklı genlerin farklı boylarda kodlanan proteinlerini kolayca sentezleyebilmeleridir.
- ***E.Coli*** de dahil olmak üzere tüm bakterilerin bir diğer faydalı karakterleri direk hücre bölünmesi ile çoğalmalarıdır. Bir bakteri bölündüğünde birebir aynı iki hücre ortaya çıkmaktadır. Bakterilerin bölünmeleri eksponansiyel olarak devam eder ve yaşam döngüleri log-fazı içerirler. Ortamda yeterli besin ve boşluk olduğu sürece bölünme süreci aynı şekilde devam eder. Bu özellikleri ilgili geni içeren bakteri seçimi sürecinde araştırmacılara avanaj sağlar.

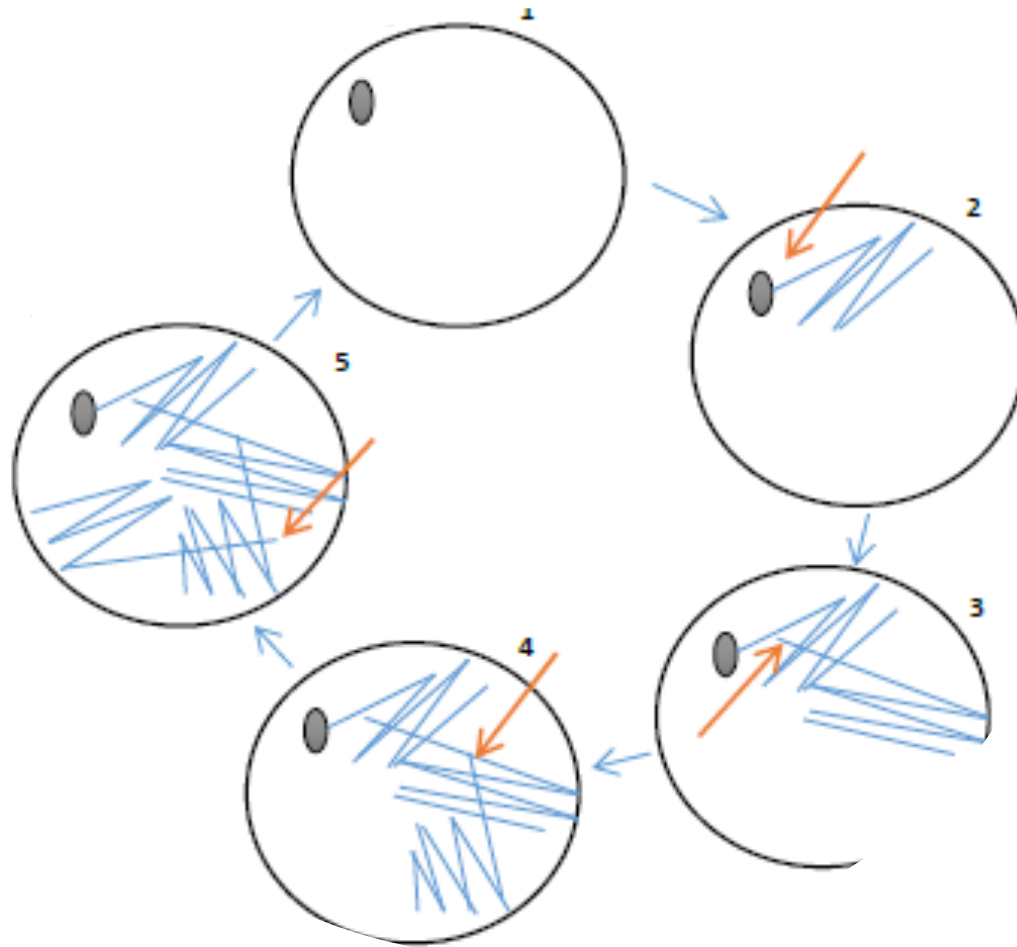
Bakteriyel Transformasyon

- Bakteriler, Luria-Bertani (LB) Broth denilen sıvı medyumda süspansiyon kültürü olarak kolayca büyüyebildikleri gibi, petri dişlere dökülmüş LB broth ile agar karışımından oluşan katı yüzeyde de büyüyebilirler. Bakteriler petri dishe ekildiklerinde, bir bakteri hücresi bölünmeye başlar ve koloni oluşturur. Her koloni bir hücreden başlayarak çoğalan milyonlarca hücre içerir. Kolonideki tüm hücreler tamamen aynı DNA ve gen ekspresyonuna sahiptir.

Bakteriyel Transformasyon



Bakteriyel Transformasyon



Bakteriyel Transformasyon

- Bakteri hücrelerine yabancı bir plazmid girdiğinde o bakteriye yeni bir genetik özellik kazandırır ve bu durum transformasyon olarak adlandırılır. Bakteriyel transformasyon, yabancı/eksojen DNA'nın direkt bakteri tarafından içeri alınmasıyla plazmid üzerindeki genetik verilerin bakteri hücrelerine transfer olması sürecidir. Söz konusu geçiş stabil ve kalıtsaldır. Bakteri hücreleri endonükleaz/restriksiyon enzimleri adı verilen enzimler içerir. Bu enzimler yabancı DNA parçalarını, ki plazmid üzerindeki DNA dizisi de buna dahildir, sondan başa doğru oryantasyonda keserler.
- Plazmidler halkasal yapıya sahip olup endonükleaz tarafından kesilmeye karşı dirençlidirler.

Bakteriyel Transformasyon

- Plazmidi içine alan transforme bakteriler olmayanlardan ayrılmalı ve seçilmelidir. Bakterilerin seçilmesine olanak sağlayan plazmid üzerindeki sıklıkla ve kolaylıkla seçilimi sağlayan antibiyotik direnç genleridir. Bakteriler antibiyotik içeren katı medyum ortamında büyütüldüklerinde sadece transforme olup antibiyotik direncine sahip olan bakteriler hayatta kalır. Direnç genine sahip olmayan bakteriler ölererek elimine olur.
- Transforme edilen plazmidler insört edilmiş çoklu gen bölgeleri taşıyabilirler: antibiyotik direnç geni ve ilgi duyulan protein gibi.

Bakteriyel Transformasyon

- Transformasyon verimliliği kullanılan plazmid DNA mikrogramına karşılık transforme olan hücre sayısı ile tespit edilebilir. Transforme olan hücrelere transformant denilir. Transformasyon verimliliği aşağıdaki formülde belirtildiği gibi hesaplanır:

$$\frac{\text{Number of Transformants}}{\mu\text{g of DNA}} \times \frac{\text{Final volume at recovery (ml)}}{\text{vol of plates (ml)}} = \text{Number of transformants per } \mu\text{g}$$

Bakteriyel Transformasyon

- Araştırma laboratuvarlarında beklenen verimliliği genellikle $1 \cdot 10^4$ ile $1 \cdot 10^7$ transformant/ microgram DNA olarak beklenir. Transformasyon prosedürü hiçbir zaman %100 verimlilikle gerçekleşmez. Verimlilik inkübasyon süresi, sıcaklık, fazla büyümüş bakteri kültürü gibi sebeplerle değişiklik gösterir.