

GEN TRANSFERİ

Belirli bir özelliği tanımlayan doğal ya da sentetik yapıdaki nükleik asit dizilerinin (genlerin) bir bitkinin genomuna genetik mühendisliği teknikleri ile aktarılmasıdır.

Gen transferi için ilk aşama genlerin izolasyonu ve manipulasyonudur.

Gen transferinde genel olarak cDNA (komplementar DNA) aktarılabilecek gen olarak kullanılmaktadır. cDNA, mRNA'dan elde edilmektedir. Bunların intronları bulunmadığı için yapıları genin tamamına göre daha küçüktür. Böylece daha kolay manipüle edilebilmektedirler.

Hedef geni taşıyan DNA parçasının bir vektör DNA'ya eklenerek rekombinant DNA'ların oluşturulması, klonlama ile bunların çoğaltılması ve saflaştırılması gerekmektedir. Genin klonlamasında kullanılan aracı moleküllere vektör adı verilmektedir.

Vektörler konukçu organizmanın içerisinde ondan bağımsız olarak çoğalabilmektedir. Plazmitler (bakteri hücresinde bakteri DNA'sından bağımsız olarak bulunan dairesel DNA molekülleri) ve bakteriyofajlar (bakteriyi enfekte eden virüsler) en bilinen vektörlerdir.

Arzu Edilen Geni Taşıyan Rekombinant DNA'nın Bitkilere Aktarılması

Bitkilere gen aktarım yöntemleri:

- 1- *Agrobacterium* bakterisinin aracılığı ile
- 2- Virüslerin aracılığı ile
- 3- Direkt olarak elektroporasyon, mikro enjeksiyon, biolistik (partikül bombardımanı) ve kimyasal uygulamalar (PEG) ile gen aktarımı.

Agrobacterium Bakterisinin Aracılığı ile Gen Transferi

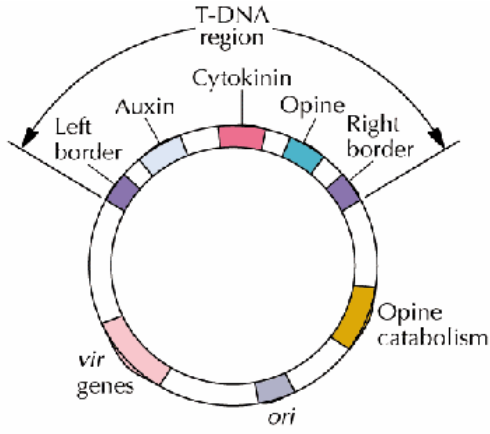
Agrobacterium tumefaciens, toprakta doğal olarak yaşayan, gram negatif, spor oluşturmeyen, hareketli, çubuk şekilli (basil) bir bakteri olup yaralanmış dokulardan organizmaya girerek tümör benzeri dokular oluşturmaktadır.

Bu bakteri meyve ağaçları, asma, otsu ve odunsu süs bitkileri ve sebzelerin dahil olduğu bir çok dikotiledon bitkide taç tümörlerine neden olmaktadır.

Agrobacterium.tumefaciens'in taç tümör oluşturmalarının nedeni sahip olduğu tümör indüksiyon plasmidinin (**Ti plasmidi**) T-DNA bölgesini bitki genomuna entegre etmesidir. Ti plasmidi dairesel bir DNA molekülüdür.

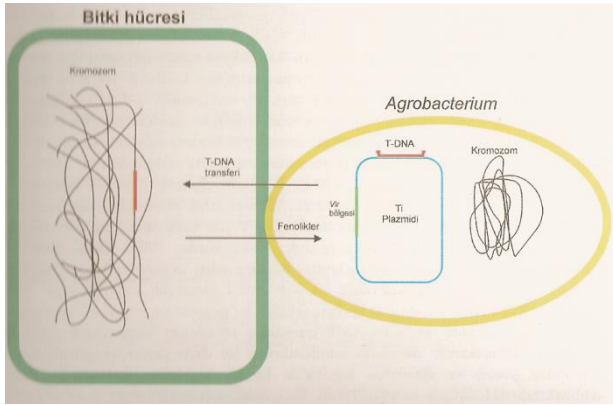
Ti plasmid farklı bölgelerden oluşmaktadır. Bunlar:

- 1- Vir bölgesi: T-DNA aktarımı için gerekli olan bölge.
- 2- Ori bölgesi: Replikasyon orijin noktası.
- 3- Opn bölgesi: Bakteri tarafından karbon ve azot kaynağı olarak kullanılan opinlerin (octopin ve nopalinin) parçalanmasından sorumlu gen bölgesi.
- 4- T-DNA bölgesi: Tümör oluşumu, opin sentezi ve farklılaşmanın engellenmesi olaylarından sorumlu olan 24 bp'lık sağ ve sol sonlanma bölgeleriyle sınırlanmış DNA'nın yer aldığı bölge.



T-DNA'nın bir bitki hücresine aktarımı 4 aşamada gerçekleşir:

- 1- *Agrobacterium*'un bitki hücresine tutunması ve koloni oluşturması,
- 2- Virulens genlerin uyarılması,
- 3- T-DNA transferi,
- 4- T-DNA'nın bitki genomuna entegrasyonu

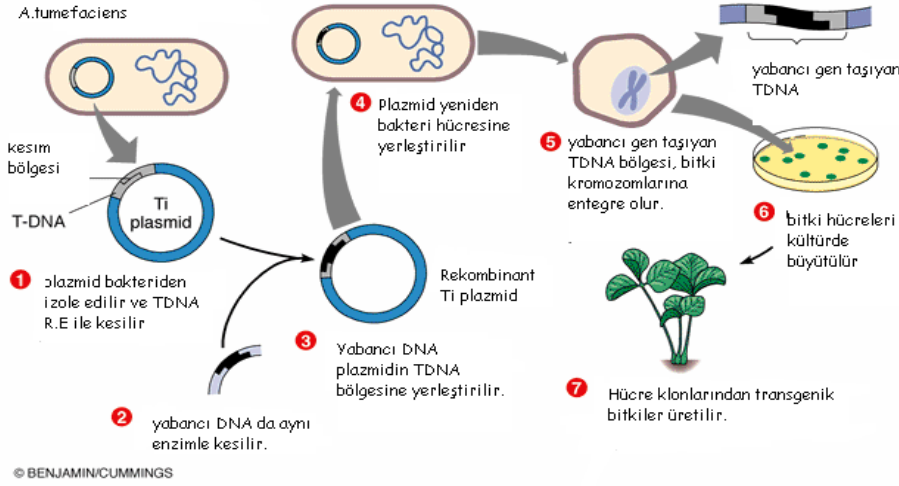


T-DNA aktarımında gerekli olan unsurlar:

- 1) T-DNA bölgesi
- 2) Vir genleri
- 3) Kromozomal genler

Rekombinant Ti plazmidin bitkiye aktarılmasında esas alınan dokular:

- 1- Yaprak diskleri (parçaları)
- 2- Meristemler
- 3- Protoplastlar
- 4- Somatik embriyolar



Partikül Bombardmanı (Biyolistik Mikro Mermi Tabancası ile) Gen Transferi

Biyolistik, biyolojik ve balistik kelimelerinin kısaltılmasından elde edilmiştir. Bu yöntemde, DNA ile kaplı hızlandırılmış mikro taşıyıcılarla (mermilerle) gen aktarımı yapılmaktadır.

Yöntemin başarısını etkileyen faktörler:

- 1- Partikül hızlandırmada kullanılan helyum gazının basıncı,
- 2- Mikro taşıyıcının (merminin) boyutu, tipi ve sayısı,
- 3- Makro taşıyıcı (kovan) ile hedef doku arasındaki uzaklık,
- 4- DNA'nın mikro taşıyıcı (mermi) partiküllere yapışması için kullanılan spermidin ve $CaCl_2$ 'ün konsantrasyonu

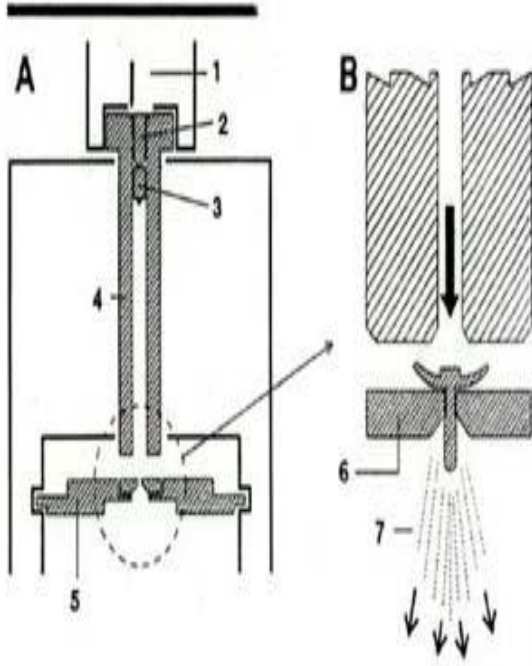
Mikro mermiler, altın ya da tungsten partikülleridir. Tungstenin ortalama çapı 0.5-2.0 μm 'dir.

Ancak düzensiz şekilleri, bazı hücre tipleri için toksik etkileri, DNA çökmesine neden olabilen yüzey oksidasyonu nedeniyle tercih edilmezler. Bunun yerine 1-3 μm çapta, düzenli şekillere sahip altın partikülleri kullanılması tercih edilebilmektedir.

Biolistik Yöntemin özellikleri:

- Kullanım kolaylığı,
- Her ateşlemede mikro taşıyıcıların birden fazla hücreye ulaşabilmesi,
- Dokulara zarar verebilmesi,
- Mikro taşıyıcılara bağlı genlerin biyolojik aktivitelerinin bozulmaması,
- Bir çok doku, hücre ve canlı türüne uygulanabilmesi,
- Kullanılan malzemelerin bazı modellerde pahalı olması
- Başarılı yöntemin belirlenmesi için denemelerin gerekli olması

1. Ateşleme mili
2. Barut ateşleyicisi
3. Mikro taşıyıcıları (tungsten veya altın) taşıyan makro taşıyıcı (plastik kovan)
4. Hızlanma tüpü
5. Durdurucu tabaka rafı ve durdurucu tabaka
6. Makro taşıyıcıyı (kovan) tutmuş haldeki durdurucu tabaka
7. Ateşlenmiş mikro taşıyıcılar



Elektroporasyon Yöntemiyle Gen Aktarımı

Elektroporasyon, hürelere veya dokulara kısa zamanlı çok kuvvetli elektrik akımı uygulayarak, hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar oluşturulması işlemidir.

Böylece hücre zarı DNA, enzim ve diğer makromoleküllerin geçişine izin vermektedir.

Bu yöntemde hedef hücreler ve bu hücelere sokulacak moleküller solusyonda süspansiyon halinde bulunmaktadır.

Yöntemin Özellikleri:

- Hızlı bir yöntemdir,
- Geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Tüm hücelerde etkilidir,
- Hücelerin çoğu hedef DNA molekülünü içine almaktadır,
- Gerekli olan DNA miktarı diğer yöntemlerden daha düşüktür,
- Toksik etkiye sahip değildir.
- Bununla birlikte akımlar yanlış uzunlukta ve siddette uygulanırsa bazı porlar çok büyüyebilmekte ve hücre zarar görebilmektedir,
- İyon dengesizlikleri ortaya çıkabilmekte ve bu durum hücre fonksiyonunda bozukluklara ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir.