

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Doç. Dr. Öğünç MERAL

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

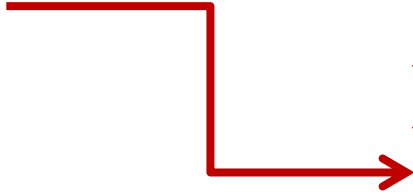
- 1960'lardan bu yana genetik ve moleküler biyolojideki kavrayışımızın hızla artması, biyoteknolojide heyecan verici buluşlar ve uygulamalara yol açtı.
- DNA yapısı ve fonksiyonlarının bilinmeye başlamasıyla, yeni teknolojiler gelişti.



Gen klonlama	→	ilgili geni bulma ve çoğaltma
Genetik mühendisliği	→	bir organizmanın genetiğini değiştirme

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

- Genetik mühendisliği yöntemleriyle, bilim insanları farklı kaynaklardan DNA'ları bir araya getirebilirler.
- **Rekombinant DNA teknolojisi**



➤ İnsülin, insan büyüme hormonu

➤ Tıbbi öneme sahip birçok protein üretiminde kullanılmaktadır.

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Restriksiyon Enzimleri ve Plazmid DNA Vektörleri

- Gen klonlama → 1970
- Rekombinant DNA tekniklerinin iki temel bileşeni

⚡ Restriksiyon enzimleri

⚡ Plazmidler (plazmid DNA)



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

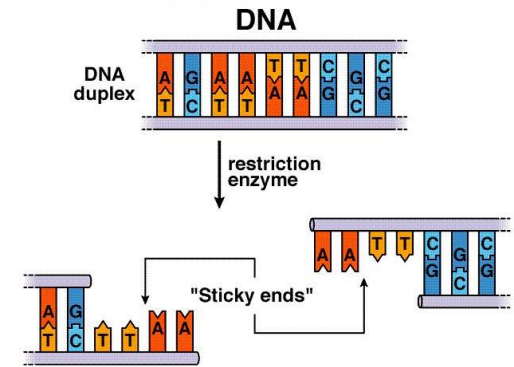
➤ Restriksiyon Enzimleri ve Plazmid DNA Vektörleri

- Restriksiyon enzimleri

→ DNA kesen enzimler

- Plazmid DNA

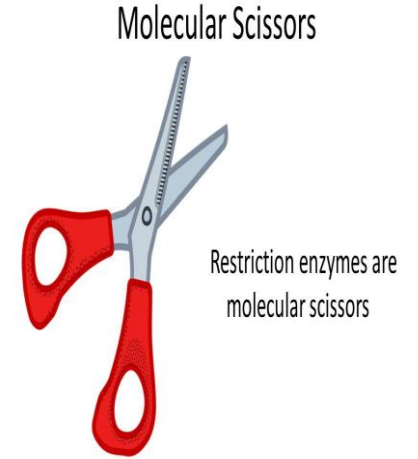
→ DNA parçacıklarını taşıma ve klonlamada kullandıkları kendi kendine replike olan dairesel DNA formu



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Restriksiyon Enzimleri ve Plazmid DNA Vektörleri

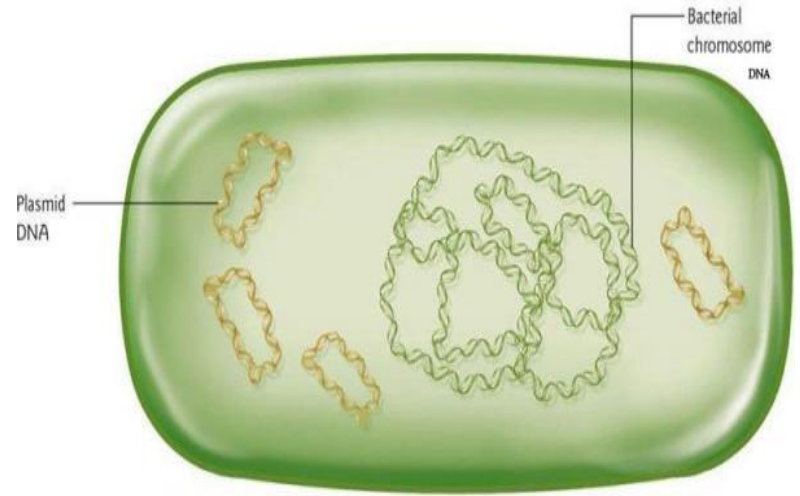
- Restriksiyon enzimleri DNA molekülünü, DNA dizisindeki nükleotidleri birleştiren fosfodiester bağınyı ayırarak keser.
Rastgele bir kesim deęil
- Tüm restriksiyon enzimleri DNA'yı aynı yerden kesmez.
Substrat özellięi
- Restriksiyon enzimlerinin keşfi, bilim insanlarına en basit ifadeyle gen klonlamaya olanak sağlayan makasların keşfi anlamına gelmektedir.



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Restriksiyon Enzimleri ve Plazmid DNA Vektörleri

- Plazmid DNA'ları öncelikle bakterilerde bulunurlar ve bakteriyel kromozomun yanı sıra bakteriyel sitoplazmada bulunmaları onları ekstrakromozomal DNA olarak ele alınmalarına neden olur.



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Plazmidlerin başka DNA parçalarını alan, taşıyabilen ve çoğaltabilen bir DNA parçacığı (vektör) olarak kullanabileceğini ileri sürdü.



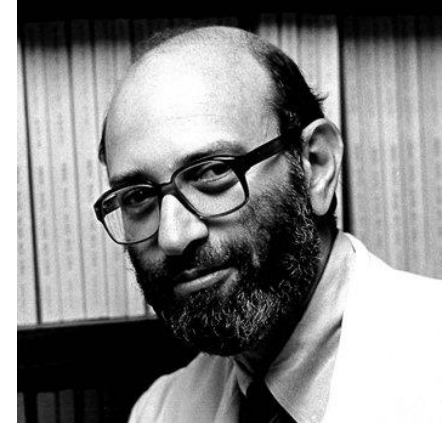
İki bakteriyel plazmidi restriksiyon enzimi ile kesti.



Plazmid parçacıklarını DNA ligaz kullanarak birleştirdi.



Rekombinant plazmid



Stanley N. Cohen

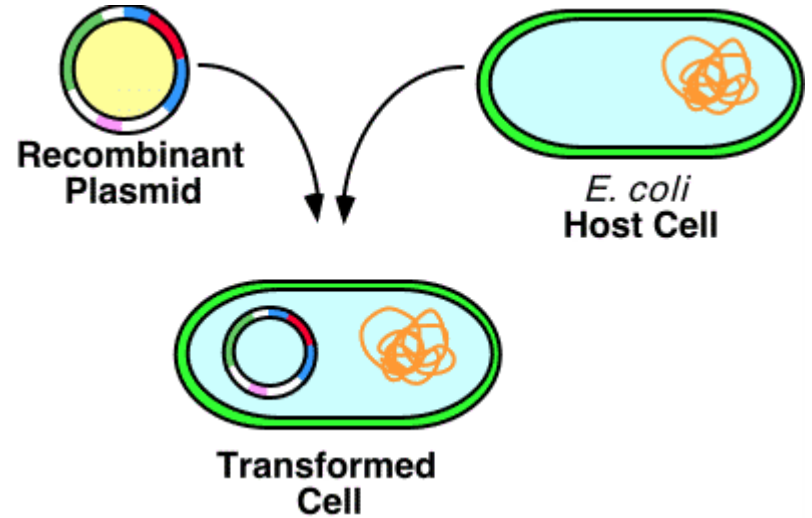
DNA ligaz

nükleotidlerin fosfodiester bağ oluşumunu katalize eden bir enzim.

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Transformasyon

- DNA'nın bakterilere yerleştirilmesi



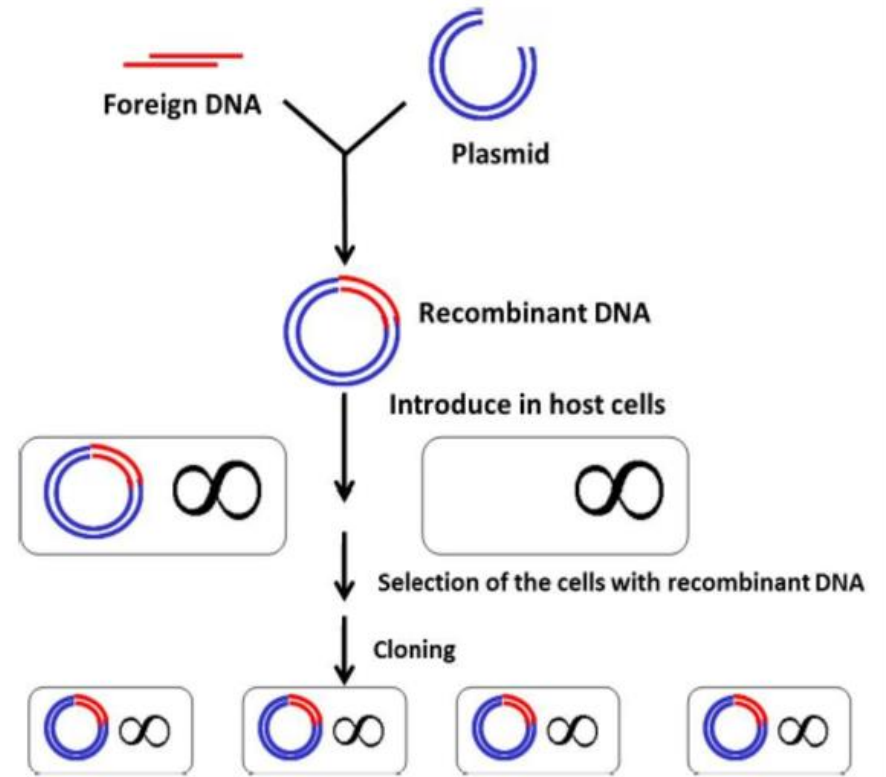
REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Seleksiyon

- Rekombinant bakterinin dönüştürülmemiş bakteriden ayırt edilmesi

Antibiyotik seleksiyonu

- Bu teknikle rekombinant bakteriler farklı antibiyotik içeren agara rekombinant ve dönüştürülmemiş bakterileri tanımlamak üzere ekilir.

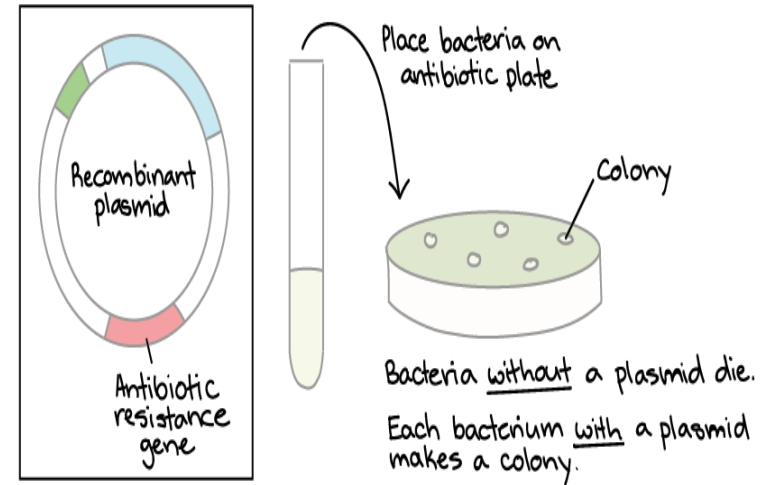


REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Seleksiyon

Ampisilin antibiyotiği içeren agar

- Rekombinant bakteri (+)
- Dönüştürülmemiş bakteri (-)



- Rekombinant bakteri ➡ ampisilin dayanıklılık geni (ampR)

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ Rekombinant DNA teknolojisi laboratuvar teknikleri

- Agaroz jel elektroforezi
- DNA dizilemesi
- Yeni-Nesil Dizileme (NGS)
- Floresan İn Situ Hibridizasyon
- Southern Blot
- Northern Blot Analizi
- PCR

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

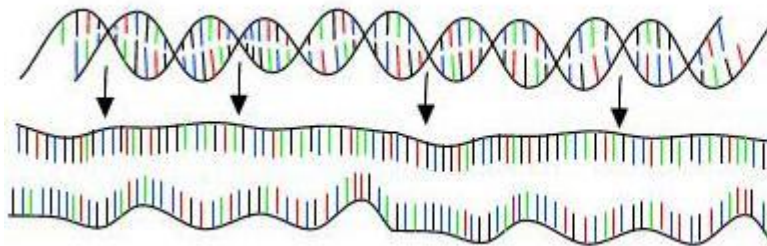
- Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), in vitro koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır.
- PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.
 - DNA Zincirinin Açılması (Denaturation)*
 - Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing)*
 - Primer Uzaması (Primer Extension)*



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

- *DNA Zincirinin Açılması (Denaturation):*
- Kalıp DNA (template DNA), 92-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır.



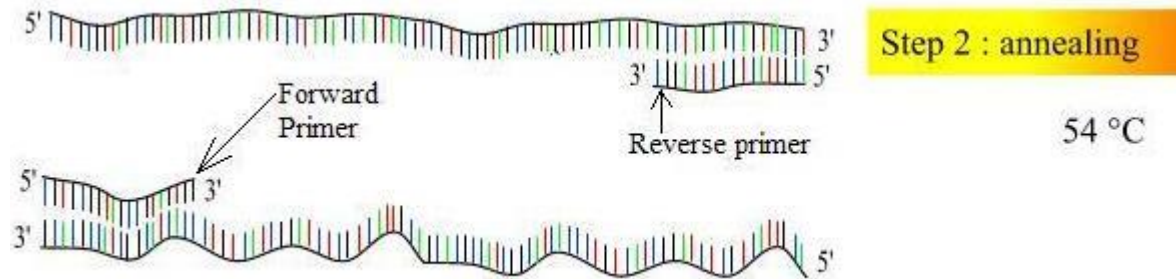
Step 1 : denaturation

94 °C

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

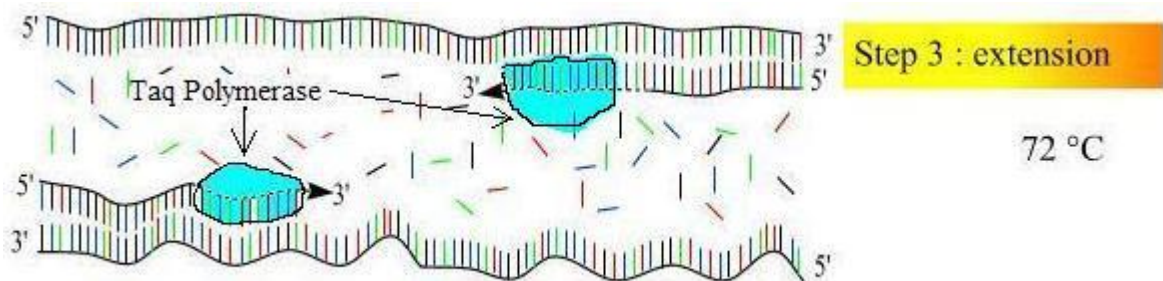
- *Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing):*
- Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

- *Primerlerin Uzaması (Primer Extension):*
- DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır.
- Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder.



REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

➤ PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

- PCR Temel Bileşenleri

Primerler (Oligonükleotidler)

dNTP

Kalıp DNA

Taq DNA Polimeraz

Mg Derişimi

PCR Tamponu

PCR : Polymerase Chain Reaction

