

## BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİ

### Klasik Mutasyon Yöntemleri

\*Aşılama, Çiftleştirme (Çok sayıda jenerasyon gerekli, Süre uzun)

\*Gelişigüzel mutasyonlar (UV ışınları, mutajenik kimyasallar): Süre uzun, istenmeyen başka mutasyonlar da gelişebilir

MUTASYONLAR BİLİNÇSİZ !

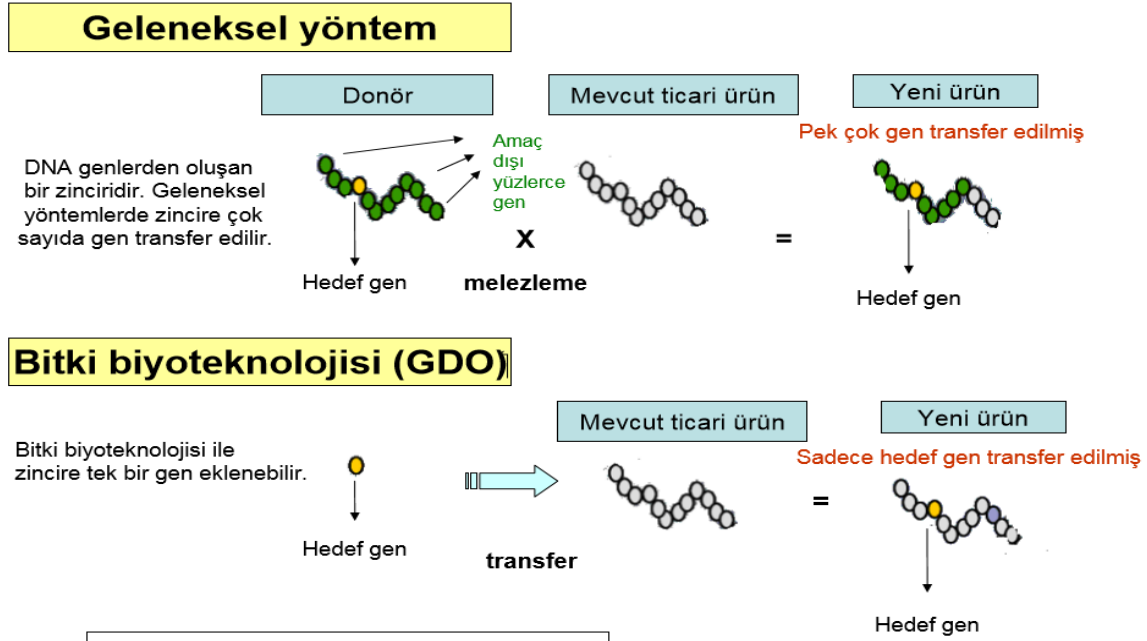
İki farklı DNA molekülü kesilip, yapıştırılabiliyor.

Örneğin;

“A” geni + DNA bazlı vektör (araç)

“A” geni içermeyen hücreye DNA aktarımı

“A” geni içeren hücre



### Geleneksel Yöntem

Güvenlik testlerinden geçirilmez. Güvenli kabul edilip, kullanılır.

### Bitki Biyoteknolojisi

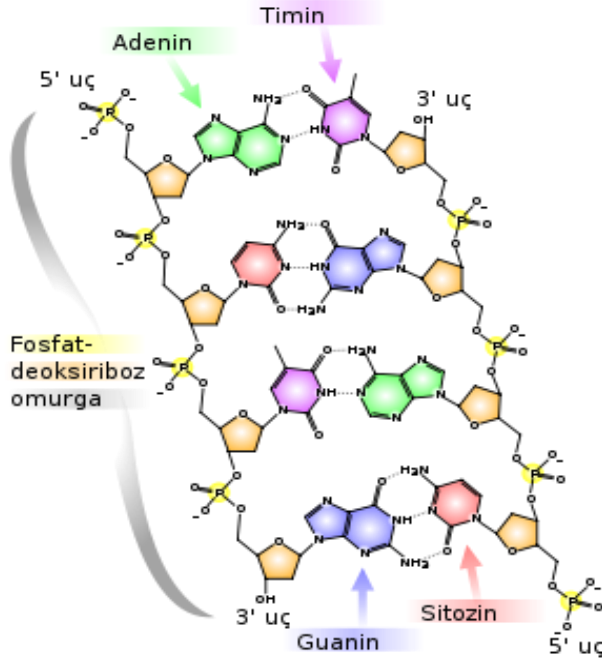
Geleneksel ürünle farklılıklarına bağlı olarak güvenlik testlerinden ve risk analizleri sürecinden geçirilmelidir.

## GENETİK KAVRAMLAR

### DNA

- DNA heliks yapıda ve çift sarmallı (iki nükleotit zincirinden oluşmuş) bir nükleik asittir.
- Nükleik asitler (DNA ve RNA) şeker, fosfat ve bazlardan oluşmuş nükleotit polimerleridir.
- Şekerdeki pentoz halkasının ikinci pozisyonundaki –OH grubunun varlığında riboz, yokluğunda ise deoksiriboz adını alır. DNA ismini deoksiriboz'dan alır.
- DNA'nın iskeletini fosfatlar ve birbirine bağlı 2-deoksiribozlar oluşturur.
- Azot içeren pürin ve pirimidin bazları şekerle bağlıdır. Baz ile şeker arasında glikozit bağı, şekerle fosfat arasında ester bağı bulunur.
- Her bir nükleik asitte 4 çeşit baz bulunabilir.
- Bunlardan pürin bazları Adenin (A) ve Guanin (G) DNA'da ve RNA'da bulunur.
- Pirimidin bazları olan Sitozin (C) ve Timin (T) DNA'da, Sitozin (C) ve Urasil (U) RNA'da bulunur.
- Urasil ve Timin arasındaki fark, C5' de metil grubunun bulunmamasıdır.
- DNA molekülleri çok sayıda nükleotitin birine bağlanarak uzun bir zincir oluşturmasıyla meydana gelir.
- Nükleotitler birbirine şeker ve fosfat birimleri arasındaki fosfodiester bağlarıyla bağlanırken, zincirin üst ve alt tarafında pentoz halkasının 5. ve 3. uçları serbest uçlar olarak kalır.

DNA, sarmal oluşturan iki nükleotit zincirinden meydana gelmiştir. Molekülün iki kenarında (dışında) negatif yüklü şeker – fosfat iskeleti, iç kısımlarında ise azotlu bazlar bulunur.



DNA'yı oluşturan iki zincirde pürinler pirimidin ile, aynı şekilde pirimidinler pürinlerle eşleşir. Yani,

A-T, C-G, T-A, G-C

Böylece iki zincir arasında sabit bir genişlik korunmuş olur.

Eşleşen bazlardan G-C arasında 3 hidrojen bağı, A-T arasında 2 hidrojen bağı bulunur.

Tüm DNA moleküllerinde adenin sayısı timine, guanin sayısı sitozone eşittir. Buradan pürin miktarının pirimidin miktarına eşit olduğu anlaşılır ( $A - G = C - T$ ).

## DNA'NIN DENATÜRASYONU VE RENATÜRASYONU

\*DNA'nın çift sarmalını oluşturan moleküller kolayca birbirinden ayrılabilir ve yeniden birleşebilir.

\*İki zincir arasındaki hidrojen bağlarının çözülmesi **denatürasyon**, çözülmüş tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağlarının oluşumu ile birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturması ise **renatürasyon**dur.

\*Denatürasyon için **sıcaklık**, **asit** ve **baz** uygulamaları yapılabilir. Sıcaklık etkisiyle ayrılmış iplikçikler, sıcaklık yavaş yavaş indirilerek renatürasyon sağlanır.

## **DNA'NIN YETENEK VE İŞLEVLERİ**

- Kendi benzerini meydana getirmesi (Replikasyon- kendini eşlemesi)
- Molekül yapısında meydana gelen değişiklik ve zararları düzeltebilmesi ( Onarım)
- Fenotipin, karmaşık olaylar dizisi sonunda genetik materyal tarafından yönetilmesi (Gen anlatımı ya da ekspresyonu)
- Çeşitlilik gösterebilmesi (DNA' da çeşitlilik rekombinasyon ya da mutasyon mekanizmaları ile sağlabilmektedir).

## **DNA ENZİMLERİ**

- **DNA polimeraz**; DNA 'yı sentezler,
- **Deoksiribonükleaz (DNAaz)**; fosfodiester bağınyı yok ederek, DNA'yı parçalar,
- **DNA ligaz**; replikasyon, onarım ve rekombinasyon sırasında DNA zincirlerini birbirine bağlayan enzim.

## **KLONLAMA**

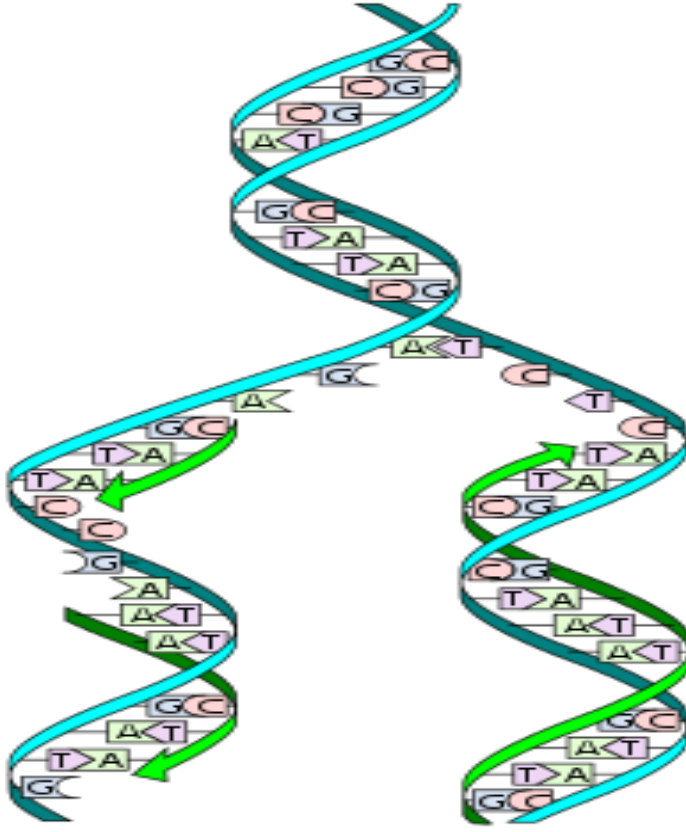
- **Klon** (ya da kopya): Tek orijinden gelen birbirinin aynısı organizma, hücre veya moleküller.
- **Gen klonlama**: Bir organizmanın herhangi bir genini kapsayan DNA bölgesinin, organizmanın genomundan izole edilerek, başka bir yere ekleyip çoğalmasını sağlamak.

## **DNA REPLİKASYONU**

**DNA Replikasyonu** ya da **DNA eşlenmesi** genetik materyalin doğru şekilde yeniden yapılması, yani çift sarmallı DNA'nın kendini kopyalaması işlemidir. Bu sayede genetik bilgi dölden dölle doğru şekilde aktarılır.

Eşlenme sırasında DNA'nın iki zincirini bir arada tutan zayıf hidrojen bağları koparılır ve iki zincir eşlemenin olacağı bölgelerde bir fermuar gibi açılmaya başlar. Bunun sonucu uçları açıkta kalan adeninin karşısına timin, guaninin karşısına sitozin nükleotitleri yerleşir.

DNA polimeraz enzimi bu nükleotitleri birbirine bağlar ve bütün nükleotitler eşlendiğinde, hücre içindeki bir DNA'dan iki DNA oluşur. Oluşan iki DNA molekülünün her birinde bir eski iplik ve bir de yeni sentezlenmiş iplik yer alır. DNA'nın bu şekilde eşlenmesine "**yarı konumlu eşlenme**" denir



Karmaşık olaylar dizisi olan replikasyon; **başlama**, **uzama** ve **tamamlanma** olarak üç temel aşamada gerçekleşmektedir.

\*Replikasyon bölgesinde bir açılma başlayarak ikili sarmal çözülür ve bu bölgeye replikasyon çatalı denir.

\*Her DNA dizisi bir sonraki dizi için kalıp görevi görür, nükleotitler yeni eş dizilerin sentezi için eşleşirler.

\*Ayrılma ve yavru sarmallar halinde yeniden birleşme sürekli birbirini izler.

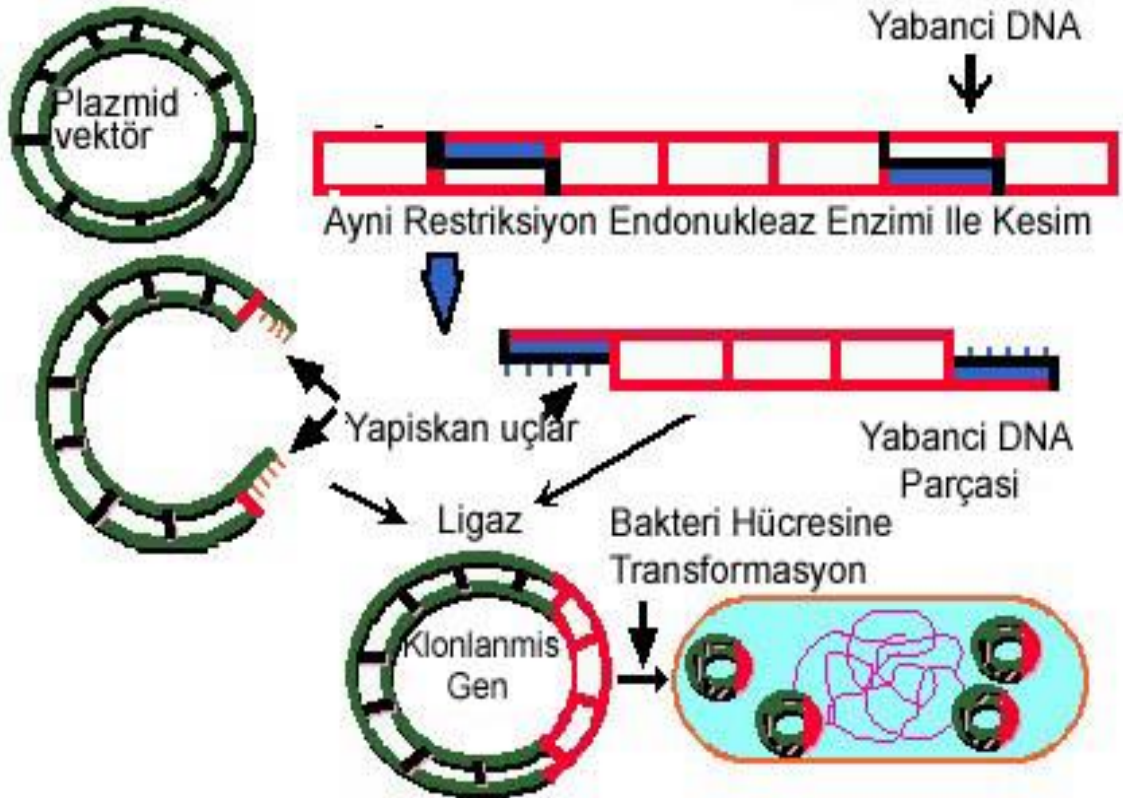
## **REKOMBİNANT DNA**

**Rekombinant DNA:** Değişik biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA parçalarının birleştirilmesi ile oluşan DNA molekülleri (kısaca rDNA olarak belirtilir).

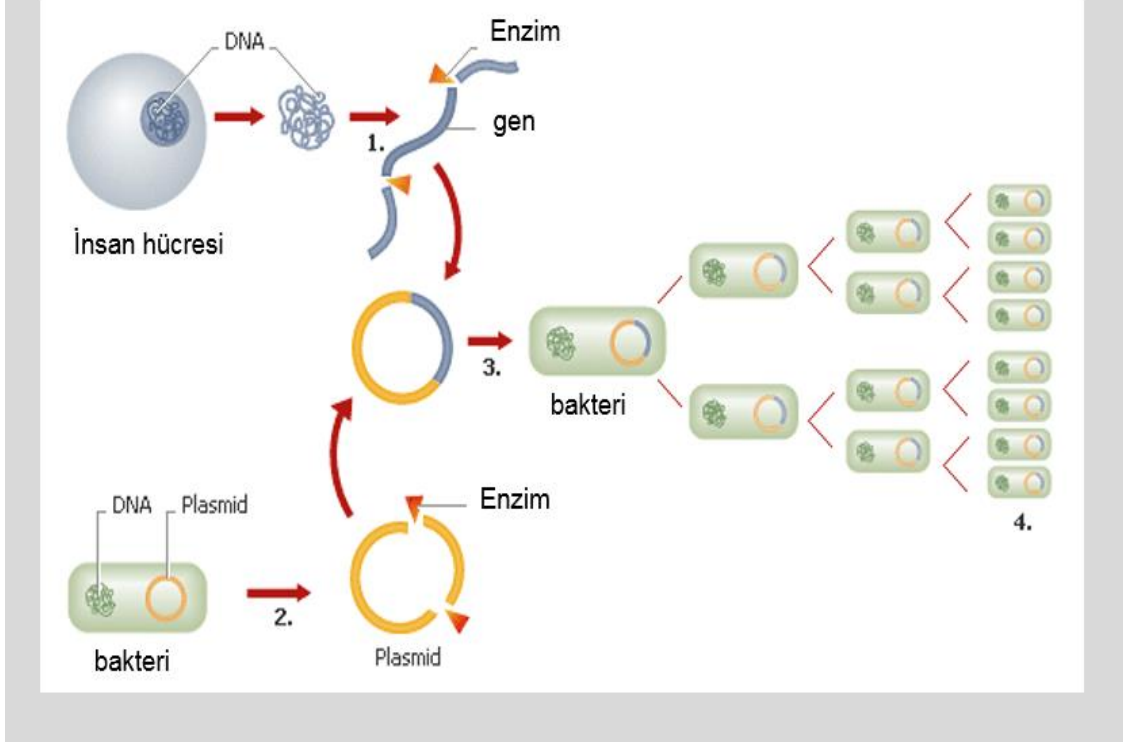
**Rekombinant DNA Teknolojisi:** Doğada kendiliğinden oluşması mümkün olmayan, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA moleküllerinin, modern genetik mühendisliği teknikleriyle kesilmesi ve elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan bir teknolojidir.

**Rekombinant DNA Teknolojisi'nde izlenen olayların sırası şu şekilde özetlenebilir;**

- DNA ya da kodladığı RNA'nın hücre ve dokulardan ayrılarak, saflaştırılması.
- Restriksiyon (Kesim) enzimleri kullanılarak DNA moleküllerinin istenen nukleotit dizinlerinde kesilmesi.
- Elde edilen DNA fragmentlerin yine aynı enzimle kesilmiş uygun bir taşıyıcıya (Vektör) aktarımı ve DNA ligaz kullanılarak birleştirilmesi
- Fragment-Vektör kompleksinin konakçı organizmaya aktarılarak çoğaltılması (Klonlama)
- Spesifik DNA fragmenti içeren kolonilerin seçimi
- Klonlanan spesifik DNA fragmentinin tanımlanması
- Genin kodladığı proteinin (Ürünün) üretimi



# GENETİK MÜHENDİSLİĞİ



## Vektör Sistemleri

1. Plazmidler (0.1-10 kb ilave DNA)
2. Faj ya da virüsler (8-25 kb ilave DNA)
3. Bakteriyel Yapay Kromozomlar (75-300 kb ilave DNA)
4. Maya Yapay Kromozomlar (100-1000 kb ilave DNA)

## POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİ: (*Polymerase Chain Reaction - PCR*)

DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir.

DNA'nın bir bölümünün tüp içerisinde sentetik olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Çok az miktardaki genetik materyalin, kısa sürede çoğaltılması için geliştirilmiş, önemli bir araştırma tekniğidir.

- Yüksek sıcaklık uygulaması ile çift zincirli sarmal formda bulunan DNA zincirleri ayrılarak tek iplik formuna geçer.
- Farklı ısı değişimleri ile reaksiyon tüpü içerisindeki bileşenler kendilerini organize ederek kalıp DNA'nın benzeri yeni DNA moleküllerini oluştururlar.
- Her PCR döngüsü sonunda DNA'nın sayısı ikiye katlanır.

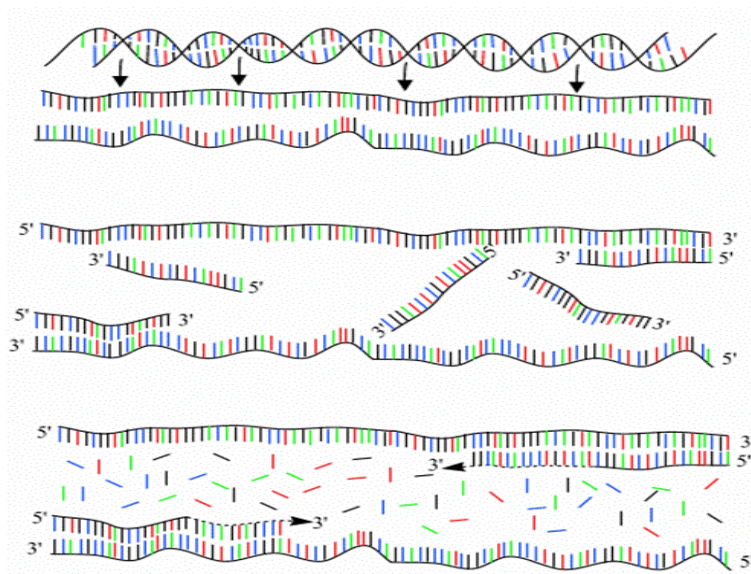
### Polimeraz Zincir Tepkimesi'nin Aşamaları

Polimeraz zincir tepkimesinin oluşması için üç farklı sıcaklık ve bunların döngüsel tekrarı gerekmektedir.

**Denatürasyon:** Öncelikle, çift iplikli sarmal DNA molekülü birkaç dakika yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak denatüre edilir. Yüksek sıcaklık DNA iplikleri arasındaki zayıf hidrojen bağlarını kırarak, DNA molekülünü tek iplikli forma dönüştürür.

**Primer eşleşmesi:** Bu aşamada özgün primerler uygun sıcaklıkta, orijinal kalıp DNA'nın tek iplik formundaki eşlenikleri olan bölgelere bağlanırlar.

**Sentez:** Taq DNA polimeraz enzimi ortamda bulunan serbest dNTP (Deoksinukleotit trifosfat)'leri kullanarak, kalıp DNA'ya primerin uygun dNTP'lerini bağlar. Böylece, orijinal kalıp DNA'nın aynısı sentezlenmeye başlar.



### Kalıp DNA

**1. Aşama**  
**Denatürasyon**  
**(94°C'de 1 dakika)**

**2. Aşama**  
**Primer Bağlanması**  
**(50-54°C'de 1 dak)**

**3. Aşama**  
**Yeni Zincir Sentezi**  
**(72°C'de 2 dakika)**



## **PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi**

PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenebilir. Reaksiyon ürünlerinden alınan örnekler brom fenol mavisi ile karıştırılarak, etidyum bromür içeren agaroz jelde oluşturulan kuyucuklara yüklenir.

Ürünler agaroz jel elektroforezinde, elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre ayrılır ve ultraviyole ışık altında gözlenir.

## **PCR Kullanım Alanları**

- Genetik haritalama alanları
- Türler arasındaki polimorfizmin hesaplanması
- Evrim çalışmaları (fosil örneklerinde)
- Tohum saflığının belirlenmesi
- Analık- babalık tayini
- Adli tıpta kimlik belirleme
- Kalıtsal hastalıkların doğum öncesinde belirlenmesi
- Mutant genlerin devamlılığının izlenmesi
- GDO belirleme
- Mikroorganizmaların belirlenmesi (identifikasyon)