

İLERİ ARAŞTIRMA
YÖNTEMLERİ
56901007

2020-21 BAHAR

DR. GÜNSELİ ÇUBUKÇUOĞLU DENİZ

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

DERS 3

[Proc Natl Acad Sci U S A](#). 1973 Nov; 70(11): 3240–3244.

PMCID: PMC427208

doi: [10.1073/pnas.70.11.3240](https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3240)

PMID: [4594039](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4594039/)

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

[Stanley N. Cohen](#),* [Annie C. Y. Chang](#),* [Herbert W. Boyer](#),† and [Robert B. Helling](#)†

▶ [Author information](#) ▶ [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

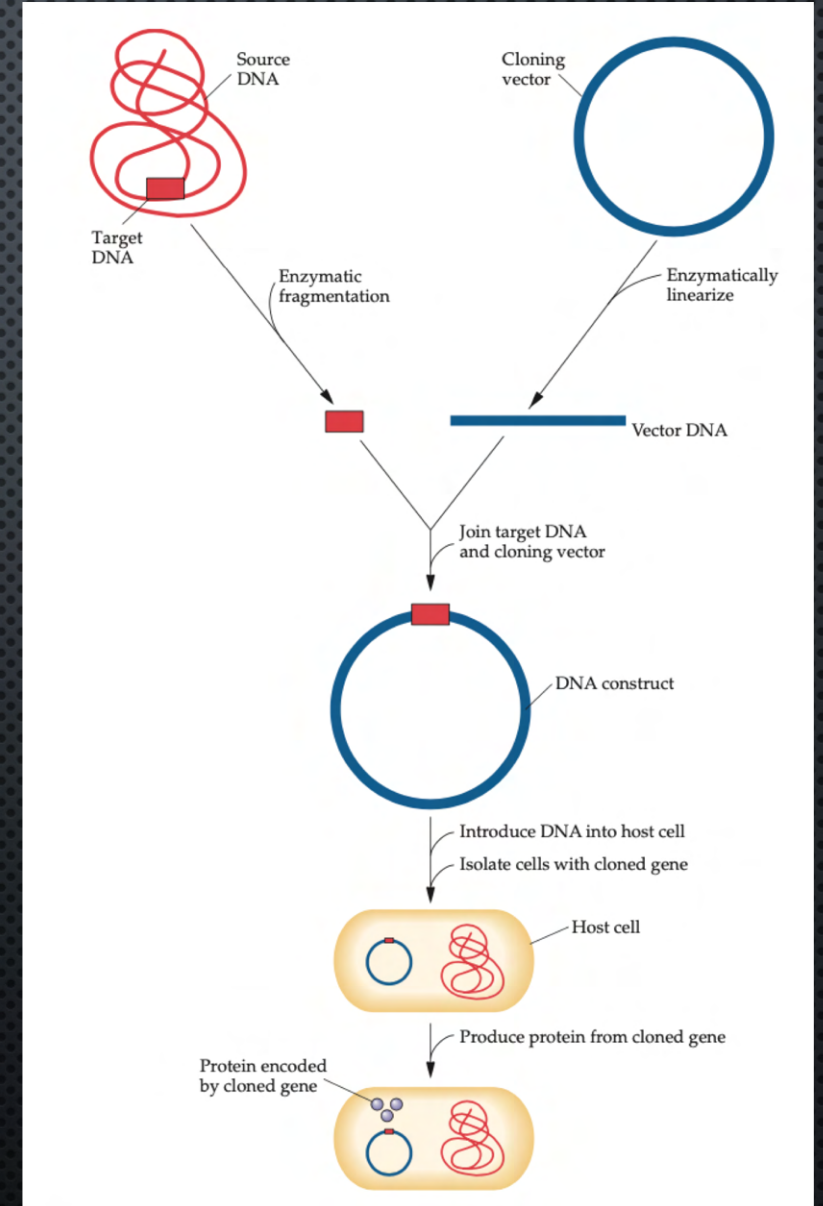
The construction of new plasmid DNA species by *in vitro* joining of restriction endonuclease-generated fragments of separate plasmids is described. Newly constructed plasmids that are inserted into *Escherichia coli* by transformation are shown to be biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences from both of the parent DNA molecules. Functional plasmids can be obtained by reassociation of endonuclease-generated fragments of larger replicons, as well as by joining of plasmid DNA molecules of entirely different origins.



Alexis Rockman

DENEYSEL AKIŞ

- Donör organizmadan ekstrakte edilen klonlanacak DNA'nın (hedef, insert) enzimatik kesilmesi ve diğer DNA'ya (cloning vector-insert DNA construct) ligasyonu ile yeni rekombinant DNA molekülünün oluşturulması
- Rekombinant DNA'nın konak hücreye transferi (transformasyon, transdüksiyon, transfeksiyon)
- Transforme hücrelerin idantifikasyonu ve seçilmesi

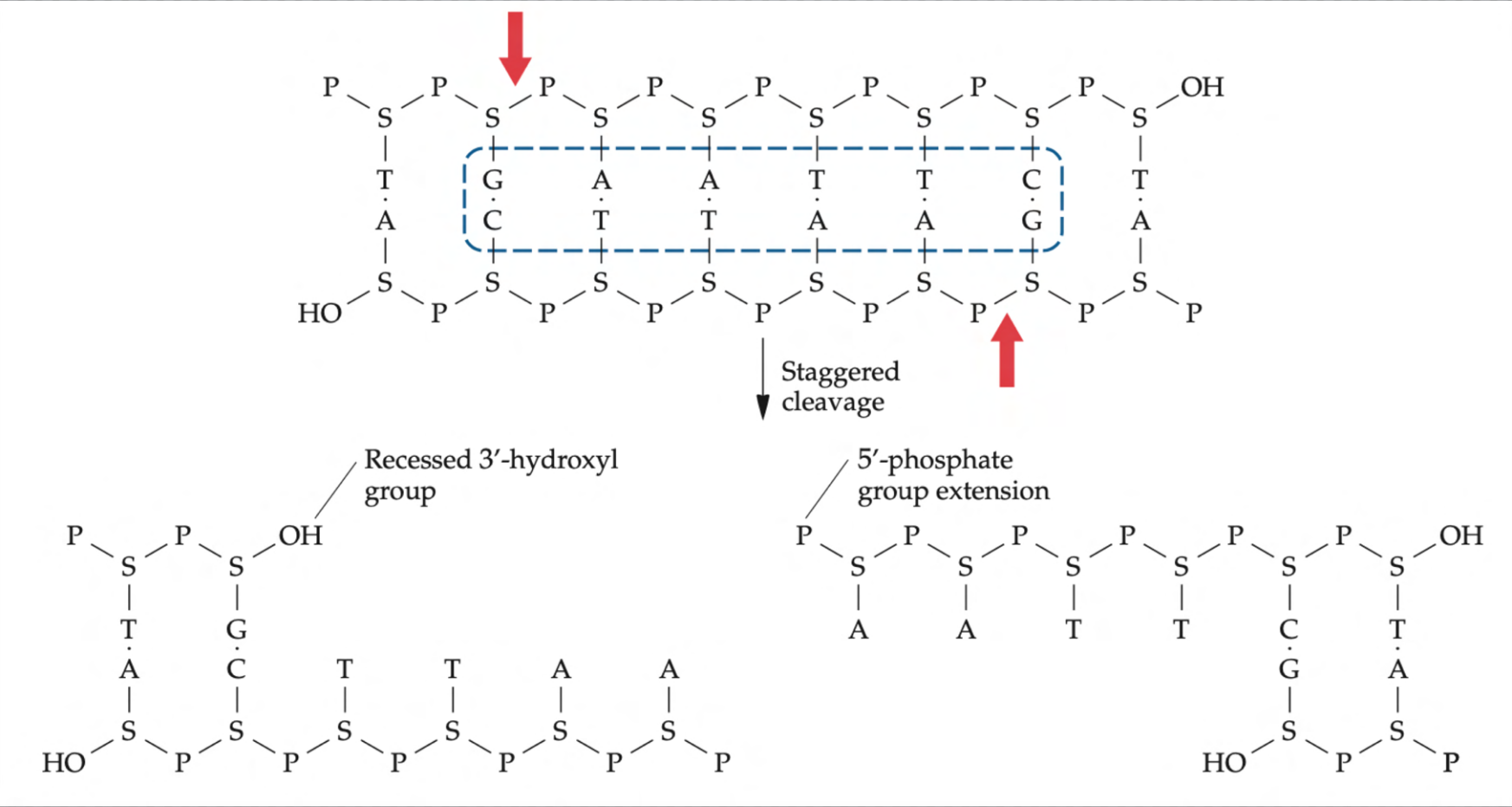


RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZLAR

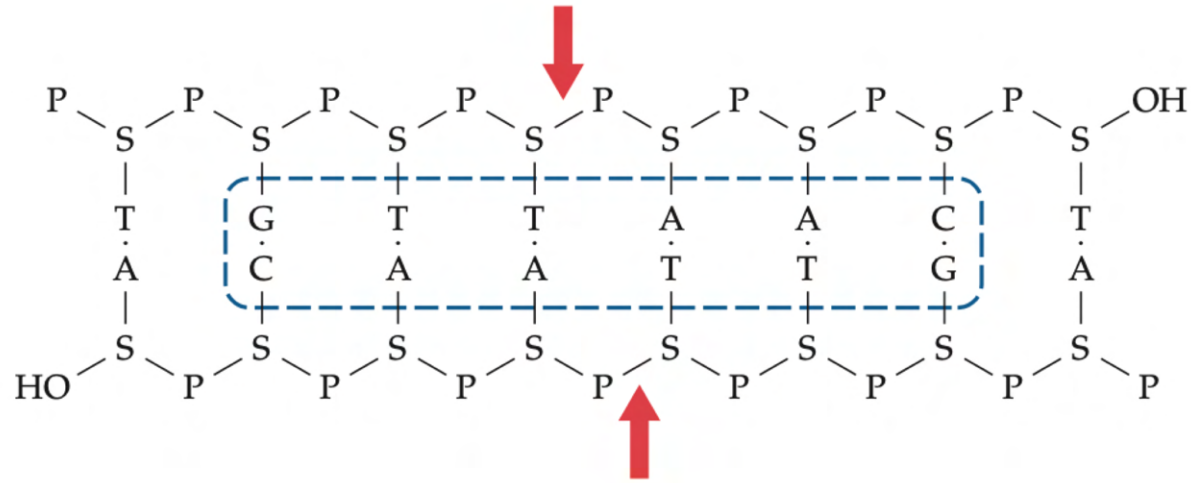
- DNA üzerindeki restriksiyon bölgeleri denilen 4 - 8 bp sekansları tanıyabilen bakteri enzimleridir.
- Tanıma bölgesinden DNAyı keserler.
- Restriksiyon bölgeleri çoğunlukla kısa palindromik dizilerdir.
- Her restriksiyon enzimi için bakteri bir modifikasyon enzimi de üreterek kendi DNAısını kesilmekten korur.

Enzyme	Source Microorganism	Recognition Site*	Ends Produced
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<pre> ↓ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- ↑ </pre>	Sticky
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	<pre> ↓ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- ↑ </pre>	Sticky
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	<pre> ↓ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- ↑ </pre>	Sticky
KpnI	<i>Klebsiella pneumonia</i>	<pre> ↓ -G-G-T-A-C-C- -C-C-A-T-G-G- ↑ </pre>	Sticky
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	<pre> ↓ -C-T-G-C-A-G- -G-A-C-G-T-C- ↑ </pre>	Sticky
SacI	<i>Streptomyces achromogenes</i>	<pre> ↓ -G-A-G-C-T-C- -C-T-C-G-A-G- ↑ </pre>	Sticky
SaII	<i>Streptomyces albue</i>	<pre> ↓ -G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G- ↑ </pre>	Sticky
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	<pre> ↓ -C-C-C-G-G-G- -G-G-G-C-C-C- ↑ </pre>	Blunt
SphI	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	<pre> ↓ -G-C-A-T-G-C- -C-G-T-A-C-G- ↑ </pre>	Sticky
XbaI	<i>Xanthomonas badrii</i>	<pre> ↓ -T-C-T-A-G-A- -A-G-A-T-C-T- ↑ </pre>	Sticky

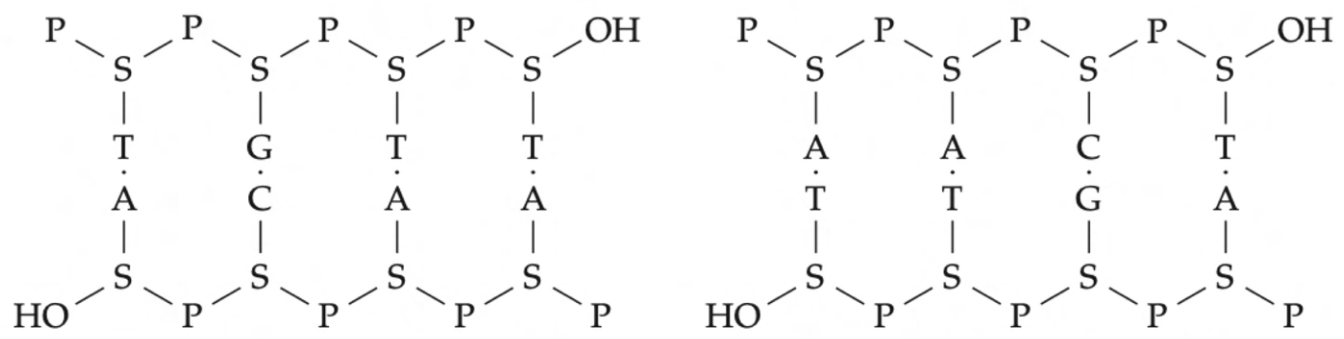
EcoRI ile yapışkan uçlu (sticky-end) kesim



HindII ile küt uçlu (blunt-end) kesim

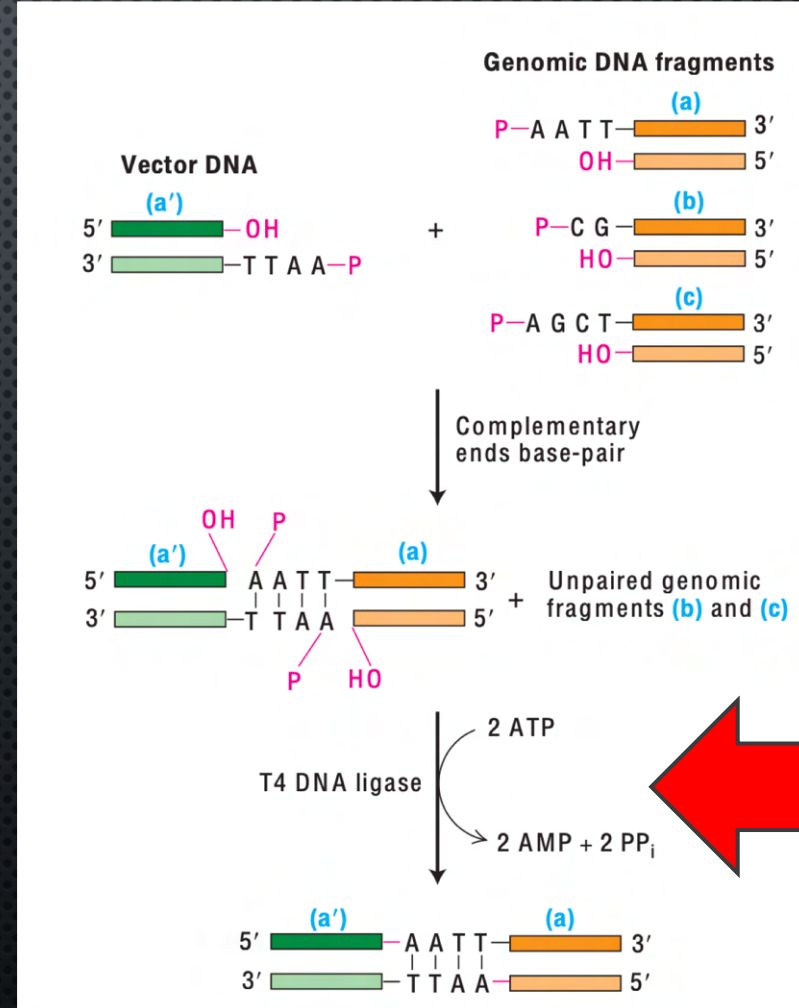


Blunt-end
cleavage ↓

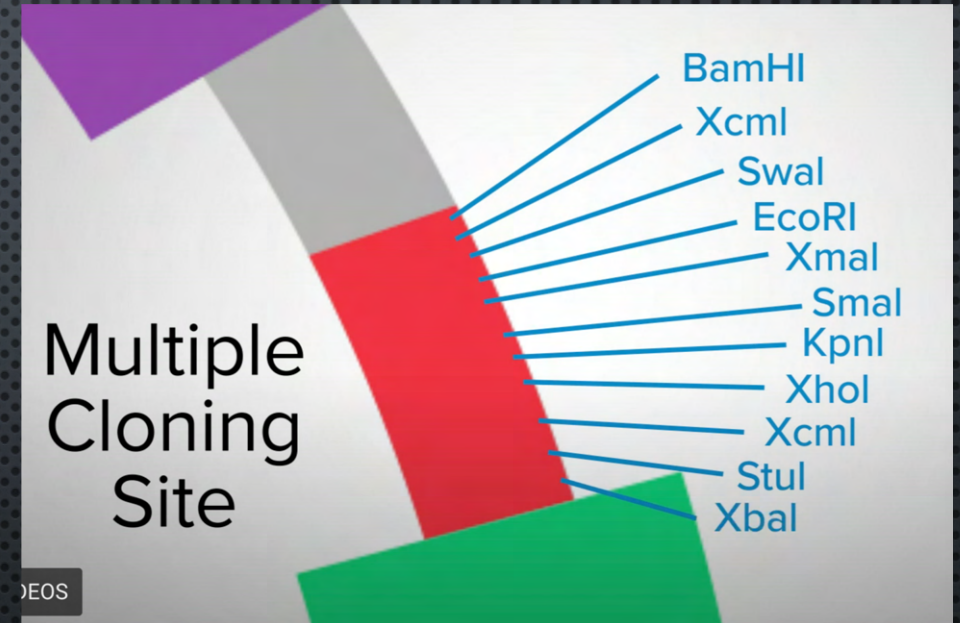
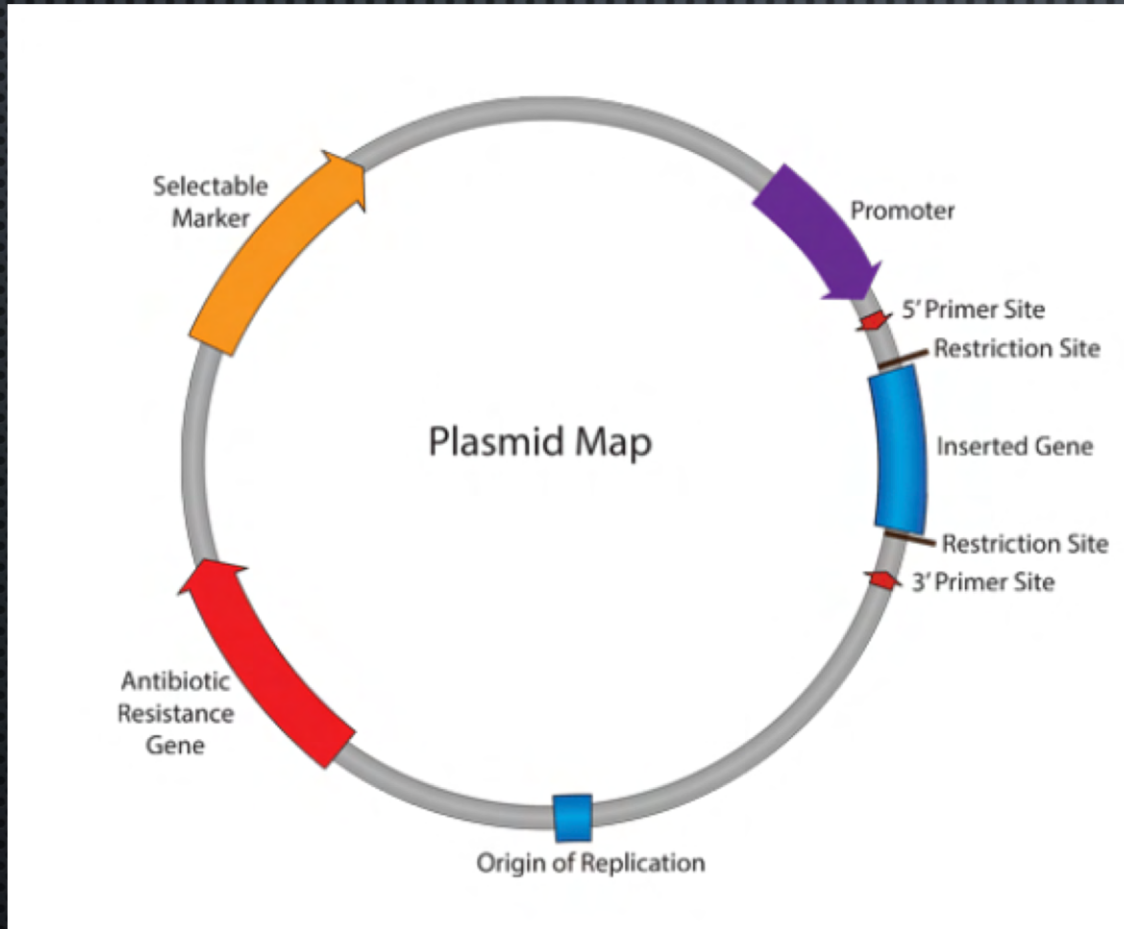


RESTRIKSİYON FRAGMANLARININ VEKTÖRLERE AKTARIMI

- Ligasyon: DNA ligaz uç-uca bağlanma reaksiyonunu katalizler.
- Vektör DNA ve restriksiyon fragmentinin komplementer uçları kovalent olarak DNA'nın 3' → 5' fosfodiester bağlarıyla bağlanır.



PLAZMİDLER



PROMOTOR

- RNA pol ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kontrol eden genin 5' upstream bölgesinde yer alan diziler
- Promotor spesifikliđi
 - Ökaryotik promotorlar (CMV, SV40, PGK1)
 - Prokaryotik promotorlar (T7, T7lac, trp, T3)
- Tasarlanan plazmidde bulunan promotor(lar) RNA pol ile uyumlu olmalıdır.