

rDNA teknolojisi ve yeni fırsatlar

- **Çiftlik hayvanlarına gen transferi sayesinde elde edilen yavru sayısını, süt miktarını, yapağı miktar ve kalitesini, yemden yararlanmayı, hastalıklara direnci artırmak hedeflenmiştir.**
- **Önce genlerin organizasyonu, düzenlenmesi ve mutasyonlar üzerine temel çalışmalar yapılmakta iken, bu teknoloji ile pek çok alanda kullanılabilen büyük bir endüstri ortaya çıkmıştır.**

Genlerin , rekombinant DNA vektörleri içerisinde klonlanması

- Bakteriyel plazmitler klonlama vektörü olarak kullanılır. Bakteriler taşıdıkları DNA'nın kolaylıkla izole edilebilmesi ve benzeri hücelere tekrar aktarılabilmesi ile ilgili kolaylığı nedeniyle yaygın şekilde gen klonlanması amacıyla kullanılırlar.
- Bakteri kültürleri aynı zamanda hızlı bir şekilde çoğalarak taşıdıkları genleri replike ederler.

1)Vektör ve gen kaynağı DNA'nın izolasyonu

Gen kaynağı olarak insan doku hücrelerinden elde edilir.Plazmit ise E.coli bakterisinden elde edilir ve daha sonra doğrulamada kullanılacak iki gen bulundurur: amp , konukçusu olan E.coli hücrelerine ampisilin antibiyotiğine karşı direnç kazandırır ve lac Z , laktoz şekerinin hidrolizini katalize eden B-galaktozidaz enzimini kodlar.Plazmit kullanılan restriksiyon enzimi için tek bir tanıma dizisi bulundurur ve bu dizi lacZ geni içerisinde yer alır.

2)DNA'nın vektöre takılması

Enzim, plazmid DNA'yı tek bir restriksiyon bölgesinden lacZ genini bozarak keser. İnsan DNA'sını binlerce DNA parçası oluşturacak şekilde keser , bu parçalardan biri istediğimiz geni taşır. Daha sonra DNA parçaları karıştırılır. Bazı plazmitler istenen genle birleşir.DNA'ları kovalent olarak bağlamak için DNA ligaz eklenir.

3)Klonlama vektörünün hücrelere aktarılması

Bu aşamada bakteri hücreleri rekombinant plazmitleri transformasyonla içeri alır.Bakteriler LacZ- olup , lacZ genindeki bir mutasyon nedeniyle laktozu parçalama yeteneğine sahip değildir.

4)Hücrelerin klonlanması

Transforme edilen bakteriler, ampisilin ve Xgal olarak adlandırılan bir şeker içeren katı besiyeri yüzeyine ekilir.Çoğalan her bir bakteri , besiyerinde koloni olarak görülen bir hücre klonu oluşturur.Bu esnada plazmitler tarafından taşınan insan geni de klonlanmış olur.

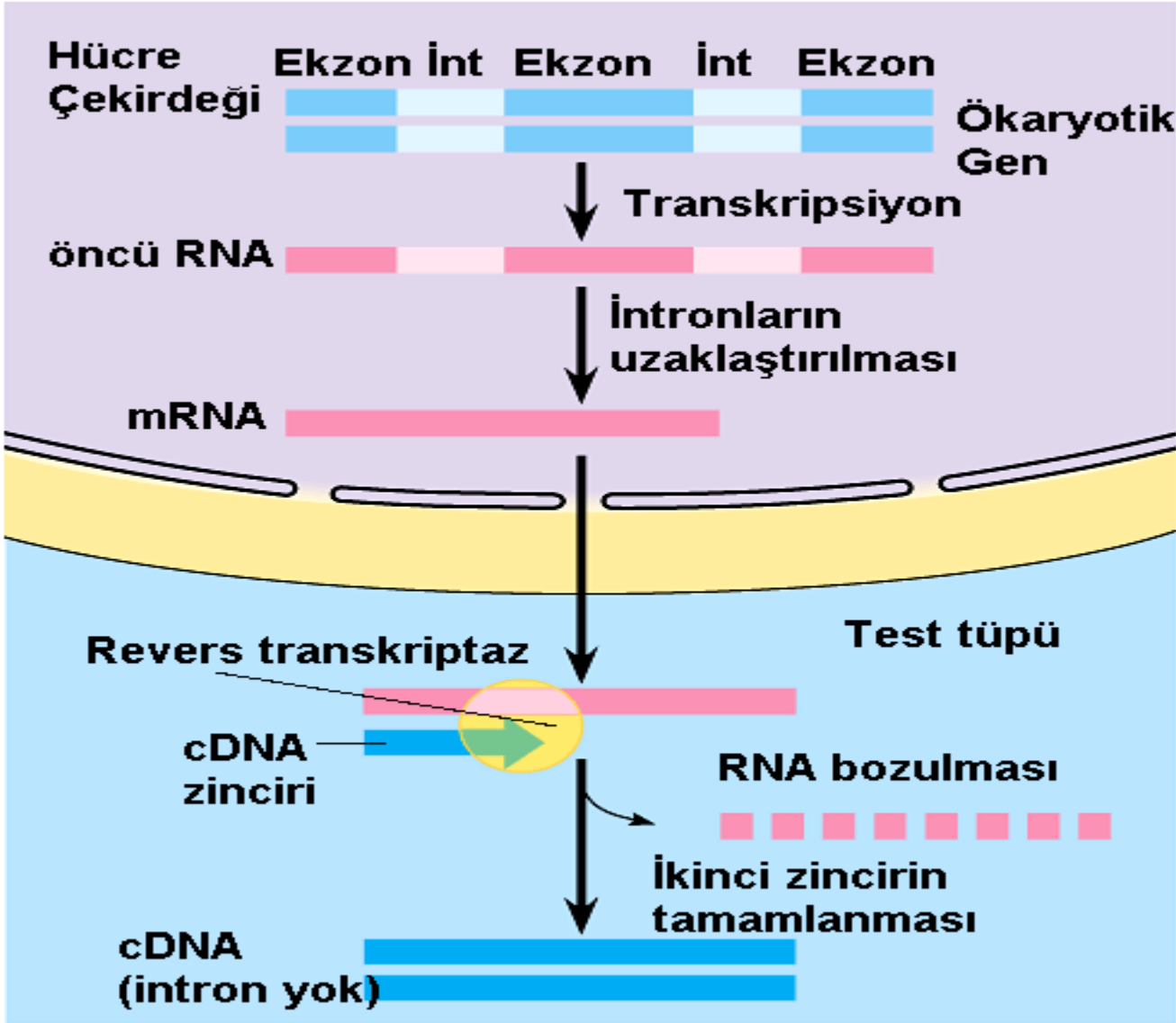
Besiyerinde ampisilin bulunuşu sadece plazmit bulunduran hücrelerin gelişmesine izin verir. Besiyerinde bulunan X-gal da yabancı DNA taşıyan plazmitleri bulunduran bakteri plazmitlerinin tanınmasında kolaylık sağlar. B-galaktozidaz ile hidroliz edilen X-gal nedeniyle mavi bir renk oluşacaktır.Oysa gen'le birleşen plazmitlerde B-galaktozidaz geni bozulacağından X-gal parçalanamaz ve bu hücreler beyaz renkte görünür.

5) İstenen geni taşıyan hücre klonlarının ayrımı

Hedeflenen insan geninden başka birçok gende klonlanmış olabilir. En zor yöntem istenen geni taşıyan koloninin diğerlerinden ayrılmasıdır. Genin kendisi veya gen ürünü olan protein aranmak suretiyle olabilir.

- Gen DNA'sının doğrudan aranmasına yönelik tüm metodlar nükleik asit hibridizasyonu adı verilen gen ve diğer bir nükleik asit molekülündeki komplementer dizi arasındaki baz eşleşmesine dayanır.**
- Komplementer molekül ,DNA ya da RNA olabilen kısa , tek zincirli bir nükleik asit olup nükleik asit probu olarak adlandırılır. Eğer istenen genin en azından bir kısmı biliniyorsa bir prob sentezlenebilir.**

- Ökaryotik DNA'nın bakterilerde klonlanması ve ifadesi ile ilgili problemlerden biri , pek çok ökaryotik gende kodlama yapmayan uzun bölgelerin(intron) olmasıdır.
- İntronlar ökaryotik bir genin oldukça uzun ve kullanışsız olmasına neden olur ve RNA-splicing yeteneğine sahip olmayan bakteriler tarafından bu genin doğru okunmasına engel olurlar.
- Bu olayı engellemek için cDNA yapımı yolu kullanılmaktadır.
- Başlangıç materyali olarak mRNA kullanılır , mRNA da intronlar doğal olarak çıkartılmıştır ve asıl gen parçasını ifade eder. Bu mRNA hücreden izole edebilir ve DNA yapmak için kullanılabilir.



- mRNA dan reverse transkriptaz enzimi kullanılarak tek zincir DNA yapılır.
- İkinci zincir sentezlendikten sonra elde edilen DNA lar intronları taşımayan sadece gerekli şifreleri içeren DNA molekülleridir.
- DNA lar vektör DNA ya bağlanarak bakteri sitoplazması içinde genlerini ifade edebilirler.
- Bu DNA'lar cDNA olarak adlandırılır.

•Moleküler biyologlar , istenen ökaryotik genin klonlanması amacıyla konukçu olarak bakterilerin yerine ökaryotik hücreleri kullanarak ökaryotik-prokaryotik uyumsuzluktan uzak durmaya çalışırlar.Tek hücreli maya kültürleri plazmitlere sahiptirler. Bilim adamları maya ve bakteri DNA'larının bir araya getirildiği rekombinant plazmitler geliştirmişlerdir.

•Ökaryotik bir kromozomun temel bileşenlerini , yabancı DNA ile birleştirerek elde edilen ve maya yapay kromozomları(YACs) olarak adlandırılan vektörler yapılmıştır. Bu kromozomlar normal olarak mitozdaki gibi davranır ve maya hücresi bölündükçe yabancı DNA klonlanmış olur.

Genomik Kütüphaneler

•Her biri başlangıçtaki genomun belirli bir segmentinin kopyalarını taşıyan binlerce rekombinant plazmidin tümü genomik kütüphane olarak adlandırılır.Plazmitlerin dışında , bazı bakteriyofajlar da genomik kütüphanelerin yapımında klonlama vektörü olarak kullanılırlar.

•Plazmitte olduğu gibi , yabancı DNA segmentleri , bir restriksiyon enzimi ve ligaz kullanılarak faj genomu içerisine yerleştirilebilir.Rekombinant faj DNA'sı daha sonra in vitro koşullarda kapsit içerisinde paketlenir ve normal enfeksiyon olayıyla bir bakteri hücresi içine sokulur.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) DNA'yı tamamen hücre dışı koşullarda klonlar

- Belirli bir genin ya da diğer DNA dizisinin büyük miktarlarda hazırlanması için en iyi metot , hücrelerdeki DNA'nın klonlanmasıdır. PCR yani polimeraz zincir reaksiyonu herhangi bir DNA parçasının hücreyi kullanmadan kısa bir süre içerisinde çoğaltılabileceği bir tekniktir.
- Bu teknikte DNA özel bir DNA polimerazın , nükleotitlerin ve DNA sentezinde primer olarak kullanılan sentetik tek zincirli kısa DNA parçalarının bulunduğu bir test tüpü içerisinde inkübe edilir.
- PCR yöntemi plazmid veya faj vektörünün kullanıldığı gen klonlamaya göre çok daha hızlıdır ve tamamen hücre dışı ortamda gerçekleştirilir.
- PCR aleti , üç aşamalı döngüyü hedef dizi çok sayıda duplikasyon oluncaya kadar ard arda tekrar eder.

- **Başlangıç maddesi hedef nükleotit dizisini içeren bir çift zincir DNA solusyonudur.**
- **Bu solusyona , sıcaklığa dirençli bir DNA polimeraz , dört tip nükleotit ve primerler eklenir.**
- **PCR'de DNA sentezini başlatmada kullanılan primerler, hedef DNA sonlarına komplementer olan kısa, tek zincirli sentetik DNA molekülleridir.**
- **Bu şekilde primerler çoğaltılacak olan belirli bir**
- **DNA segmentini belirler.**
- **PCR uygulanmasının her bir döngüsü**
- **yaklaşık 5 dakika sürer.Döngü sonunda**
- **hedef DNA dizisi çift zincire dönüşür.**
- **Solusyon tekrar ısıtılır, zincir ayrılmasıyla bir**
- **sonraki döngü başlar , primer bağlanır ve DNA sentezi yapılır.**

DNA ANALİZİ VE GENOMİKS

- İstenen insan genini taşıyan bir DNA segmenti klonlandıktan sonra , kişiler arası farklılıkları saptamak , kalıtsal bozukluk olup olmadığını anlamak , genin ne zaman ifade olunacağını saptamak için nükleotit dizisinin belirlenmesi gerekir.
- Genomiks , mevcut tüm genom bilgisine sahip olmak olarak tanımlanabilir. DNA molekülünün elektrik yükü ve diğer fiziksel özelliklerine göre ayrılması jel elektroforezi olarak bilinir. Bu yöntem , karışık haldeki DNA moleküllerini , her biri aynı büyüklükteki DNA molekülleri biçimde ayırma prensibine dayanır.
- Restriksiyon fragment analizi , restriksiyon bölgelerini etkileyen DNA farklılıklarını saptar. Elektroforez ile ayrılan DNA molekülü , başlangıç molekülüne ve kullanılan restriksiyon enzimine özgü bir band modeli oluşturacaktır.
- Ökaryotik kromozomlarındaki gibi büyük DNA molekülleri , belirgin ayrı bantlar olarak görülen çok sayıda fragment meydana getirir.

•Jel elektroforez , makromolekülleri , elektrik alanı altında , jeldeki hareket hızlarına göre ayırır. DNA için hareket hızı –akım altında molekülün ne kadar uzağa gittiği- molekülün büyüklüğü ile ters orantılıdır.

•Negatif yüklü olan DNA molekülleri pozitif elektroda yani anoda doğru hareket eder. Elektrik kapatıldığında , her bir örnek içerisinde bulunan DNA molekülleri , büyüklüklerine göre hat boyunca bantlar halinde ayrılırlar.En uzağa giden en kısa moleküller jelin alt kısmındaki bantlarda bulunurlar.

- DNA jelden zarar vermeden geri kazanılabildiği için bu yöntem aynı zamanda her bir fragmentin saf örneklerinin hazırlanması için kullanılır. Örneğin bir genin iki farklı alleli karşılaştırılabilir. Önce her bir DNA örneği aynı restriksiyon enzimiyle kesilerek işe başlanır.
- Bunlar az da olsa DNA dizisinde bir miktar farklılıklar gösterir. Bundan dolayı jel elektroforezde farklı band modeli oluştururlar.

Bir sonraki şekil

- A)Allel 2 deki tek baz çiftlik bir farklılık , belirli bir restriksiyon enzimine karşı tanıma dizisinin bir adet azalmasına neden olur.Bu enzim allel 1'e ait DNA'yı üç parçaya(w,x ve y) ayırırken , Allel 2'ye ait DNA'yı sadece iki parçaya(z ve y) ayırır.
- B)Elektroforez , her bir allelden ortaya çıkan restriksiyon fragmentlerini ayırır. İki allel arasındaki kesin farklılık , jeldeki bant modelleriyle gösterilmiştir.Allel 1 ,w, x ve y olmak üzere üç banda , allel 2 ise z ve y fargmentlerine karşılık olan iki banda sahiptir.