

KİM 458

Biyoteknolojinin Temelleri

Rekombinant DNA Teknolojisi

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Rekombinant DNA teknolojisi (genetik mühendisliği), bir organizmadan herhangi bir yolla izole edilen bir genin (DNA parçasının) uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğalmasını ve bazen de anlatım yapmasını amaçlayan çalışmalara ait tekniklerin toplamıdır.

Bu teknoloji, en geniş anlamda, belli bir amaca yönelik olarak doğrudan **genetik materyal üzerinde** yapılan çalışmaları kapsar.

Rekombinant DNA teknolojisi' nin genetik temeli '**rekombinasyon**' dur.

Rekombinasyon, farklı genotipteki bireyler arasında eşleşmeler meydana geldiğinde, ana-babaya ait kalıtsal özelliklerin dölde değişik gruplanmalar halinde bir araya gelmesine yol açan olaylar dizisidir.

Moleküler düzeyde rekombinasyon, farklı nükleotid dizilerine sahip iki DNA molekülünün homoloji (benzerlik) gösteren bölgeleri arasındaki parça alışverişi sonucunda meydana gelen yeni gruplanmalardır.

Gen Klonlanması

Gen Klonlaması,

- Bir organizmadan elde edilen ve içinde istenilen geni taşıyan DNA parçalarının, taşıyıcı özellikte bir DNA molekülüne (*vektör*) bağlanarak rekombinant DNA oluşturulması;
- Rekombinant DNA moleküllerinin uygun bir konak hücreye sokularak orada çoğaltılması ve hepsi birbirinin aynı olan bir DNA popülasyonunun elde edilmesidir.
- Konak hücreler çoğaldıkça rekombinant DNA molekülleri nesillere geçerler ve oğul hücrelerde de kopya sayılarını artırırılar.
- Çok sayıda hücre bölünmesiyle oluşan bir klon (*rekombinant DNA teknolojisi ile sentezlenen belirli DNA/gen kopyaları*) da hücrelerin her birinde istenilen geni taşıyan rekombinant DNA moleküllerinin bir ya da daha fazla sayıda kopyası bulunur.

Genetik Klonlamada (Tarihçe-I)

- Deniz hayvanlarında dölllenme (1875, O. Hertwig).
- İlk kez anne rahmi dışında dölllenme (1878, L.Schenk).
- Tüp ortamında insan yumurta hücresi döllendi (1944, M.F.Menkin)
- Dondurulmuş sperm ile inek yumurtası döllendi (1952).
- Deney tüpünde döllenen bir memeli yavru doğdu (1959).
- Dondurulmuş embriyodan yavru fareler elde edildi (1972).
- Louise Brown isimli bebek deney tüpünde döllendi anne rahmine yerleştirilerek sağlıklı doğum yaptırıldı (1978).
- Avusturalya’ da donmuş embriyodan sağlıklı bir kız çocuğu doğdu (1984).

Genetik Klonlamada Tarihçe-II

- Embriyo hücrelerinin çoğaltılmasıyla çok sayıda kuzu elde edildi (1987).
- İnsan embriyosu klonlandı (1993, J.Hall).
- Dolly klonlandı (1997, I.Wilmut).
- Fransa' da bir dananın 63 klonu elde edildi (1999).
- Totipotent stem hücrelerinden deneysel organogenezis (2000).
- Farede gen klonlama yöntemiyle insan kulağı gelişimi sağlandı (2001).
- Amerika' da *ex vivo* yapay rahim geliştirildi (2002).

Klonlama Tipleri

- ✓ DNA / Gen düzeyinde klonlama
- ✓ Hücre düzeyinde klonlama
- ✓ Organizma /çekirdek düzeyinde klonlama

Başarılı Klonlama Yapabilmek İçin Gen;

- Bağımsız olarak replike olabilmeli
- Konak hücreye kolaylıkla transfer edilebilmeli
- Seleksiyona olanak tanınmalı

Gen Klonlanma Aşamaları ve Kullanılan Temel Yöntemler

1. Saf DNA örneklerinin hazırlanması
2. DNA örneklerinin kesilmesi (Restriksiyon endonükleazlar)
3. DNA parça boylarının incelenmesi
4. DNA moleküllerinin bir araya getirilmesi
5. DNA' nın konak hücreye girişi (Transfeksiyon, Transformasyon, Transdüksiyon)
6. Rekombinant DNA moleküllerinin belirlenmesi (Genetik, İmmünokimyasal)

SAFLAŐTIRILMIŐ DNA' NIN MANİPÜLASYONU

- DNA' nın eldesinden sonraki basamak, rekombinant DNA molekülünü oluŐturmaktır.
- Bunun için kullanılacak vektör, özel bir noktadan kesimlenmelidir, daha sonra birleŐtirilmelidir.
- DNA molekülü ise ,kesilip birleŐtirilebileceđi gibi çeŐitli kimyasal grupların eklenmesi ya da çıkarılmasıyla da modifiye edilebilir.
- DNA manipülasyon tekniklerinde, çeŐitli organizmalardan saflaŐtırılmıŐ enzimler kullanılır.

DNA MANİPÜLASYON ENZİMLERİ

- Katalizledikleri reaksiyon tipine göre 5' e ayrılırlar;
 - Nükleazlar
 - Ligazlar
 - Polimerazlar
 - Modifiye eden enzimler
 - Topoizomerazlar
- Her enzimin özel bir görevi vardır. Bazı enzimler, birden fazla aktiviteyi bir arada üstlenebilirler.
 - Polimerazlar, yeni DNA molekülleri sentezlerken, nükleaz(DNA'yı parçalar) aktivitesi de içerirler.

NÜKLEAZLAR

- DNA' nın bir nükleotidini diğerine bağlayan fosfodiester bağı kırarak, DNA' yı parçalarlar. 2 tip nükleaz var;
 - **Ekzonükleazlar**; DNA molekülünün sonundaki nükleotidi uzaklaştırırlar.
 - **Endonükleazlar**; DNA molekülü içerisindeki fosfodiester bağlarını keserler.
- Bazı ekzonükleazlar (ör. Bal31) dsDNA' nın 2 ipliğini birden kesebilir.
- Bazıları ise (ör. Ekzonükleaz III) dsDNA' nın sadece 3' ucundan nükleotid çıkarabilirler.
- Aynıısı endonükleazlar için de geçerlidir. S1 nükleaz, dsDNA' nın yalnızca bir ipliğini parçalarken, DNAaseI, dsDNA' nın 2 ipliğini birden keser.
- DNAaseI' in spesifik bir kesim bölgesi yoktur. Herhangi bir fosfodiester bağı kırabilir.

LİGAZLAR

- DNA ligazın hücredeki rolü, dsDNA' daki kırıkları(tek iplikteki) tamir etmektir. Örn: DNA replikasyonu
- Pek çok organizmada, DNA ligazlar dsDNA' daki 2 ipliği de birleştirebilir.
- Genetik mühendisliğinde kullanılan ligazlar,T4 fajı ile enfekte E.coli' den elde edilir.

POLİMERAZLAR

- DNA polimerazlar, DNA ya da RNA'ya komplementer yeni iplik sentezlerler.
- Birçok polimeraz, fonksiyon göstermek için primere ihtiyaç duyar.
 - DNA polimerazı; genellikle E.coli'den elde edilir.
 - dsDNA'daki kısa, tek iplik içeren (nick) bölgeye tutunur ve yeni iplik sentezler.
 - Sentez ilerledikçe, önünde bulunan ipliği de parçalayıp yeniden nükleotid takar.
- DNA polimeraz-I' in; polimeraz ve nükleaz aktiviteleri enzimin farklı bölgelerinden kontrol edilir.
 - Enzim belli bir bölgeden parçalanırsa; polimeraz aktivitesini içeren bölgeye Klenow fragment denir.
 - Klenow fragment, nükleaz aktivitesi içermez.
- Ters (revers) transkriptaz enzimi ise kalıp olarak; RNA kullanıp DNA sentezler, bu cDNA'dır.
- Bu enzimi, bazı virüs tipleri replikasyonlarında kullanılır.

DNA' YI MODİFİYE EDEN ENZİMLER

En çok kullanılanlar:

- **Alkalin fosfataz**; DNA' nın 5' ucundaki fosfat grubunu ayırır.
- **Polinükleotid kinaz**; DNA' nın serbest 5' ucuna fosfat grubu ekler.
- **Terminal deoksinükleotidil transferaz**; DNA' nın 3' ucuna bir veya birden fazla nükleotid ekler.

TOPOİZOMERAZLAR

- Süper sarmal ekleyerek ya da kaldırarak ccc DNA konformasyonunu değiştirirler
(cccDNA:covalently closed circular DNA)
- DNA replikasyonunda önemlidirler.

RESTRIKSİYON ENDONÜKLEAZLAR

- Restriksiyon endonükleazlar rekombinant DNA teknolojisinin köşe taşlarından biridir.
- Bakterilerden yaygın olarak izole edilen enzimlerdir.
- Bakteriyi izole eden viral DNA' yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği veya kısıtladığı için bu ismi almışlardır.
- Bakteri DNA' sı ise bu enzimlerden, içerdiği metil gruplarıyla korunur.
- RE' lar özgül DNA dizilerini tanırlar ve bu dizilerden her iki DNA zincirini keserler.
- Klonlama için çok önemli araçlar olmalarının nedeni, DNA' yı her zaman özgün bölgelerden parçalayabilmelerinden ileri gelmektedir.

RE'lerin yapısal özelliklerine ve işlevlerini yapma biçimlerine göre 3 grup altında toplanmaktadır.

I. Tip RE'ler: Çift zincirli DNA' da bir tanıma dizisi ile etkileşime girdikten sonra DNA boyunca 1000-1500 nükleotitlik bir uzaklıkta ilerleyip DNA' nın zincirinde rastgele bir noktada kesim yaparlar.

Restriksiyon ve modifikasyon aynı enzim tarafından gerçekleştirilir.

II. Tip RE'ler: Çift zincirli DNA' da 4-6 nükleotidlik özel bir diziyi tanır ve aynı dizide kesme yapar.

III. Tip RE'ler: I. tip RE' lere benzerler restriksiyon ve modifikasyon birer alt birimleri ortak olan enzimler tarafından gerçekleştirilir.

YAPIŞKAN VE KÜT UÇLAR

- Bazı R.E.' lar , DNA' nın 2 ipliğini birden tanıma bölgesinin ortasından keserler ve küt uçlar oluşur.
- Bazıları ise dsDNA' yı aynı pozisyondan kesmezler, uç bölgedeki bir zincir, diğerine göre uzun olabilir; bunlar da yapışkan uçlardır ve birbirlerine bağlanma eğilimindedirler.
- Farklı tanıma bölgelerine sahip 2 enzim, 2 aynı yapışkan uç oluşturabilir.

LABORATUVARDA R.E. KESİMİ YAPMAK

Lambda faj DNA' sının BglIII ile kesimi;

- Gerekli miktar DNA, tüpe konur (ör. 16 mikrolitre örnekte bulunan 2 mikrogram lambda DNA)
- Enzimin çalışması için uygun koşullar sağlanır:
 - Mg^{+2} , NaCl (iyonik koşulu sağlarlar).
 - Dihidrofenol gibi indirgeyici ajanlar(enzim inaktivasyonunu önler).
 - Toplam hacmin %10' u kadar uygun tampon çözeltisi
- Uygun miktarda enzim ve su ortama ilave edilir.
- İnkübasyon sıcaklığı da enzim kesiminde önemlidir. Pek çok enzim $37^{\circ}C$ ' de ,bazıları ise daha yüksek sıcaklıklarda optimum çalışır.
- Bir saat sonra enzim kesimi tamamlanmalıdır.
- Fenol ya da EDTA ilavesi veya sıcaklığın $70^{\circ}C$ ' ye çıkarılması ile enzim aktivitesi inhibe edilir. Böylece daha sonra eklenebilecek DNAların kesilmesi engellenmiş olur.

R.E. KESİMLERİNİN ANALİZİ

- R.E. kesimi sonucu birçok fragman oluşur.
- DNA' nın kesilip kesilmediği, viskozitesi ölçülerek anlaşılabilir:
 - Fragmanlar büyükse solüsyon daha viskozdur.
 - Kesimlenme durumunda ise viskozite düşer.
- Fakat bu yöntemle kaç fragman oluştuğunu anlayamayız.

MOLEKÜLLERİN JEL ELEKTROFOREZİNDE AYRIMI

- DNA molekülleri; genelde, büyüklüklerine göre ayrılırlar.
- Jel kompozisyonu DNA fragmentinin boyu için önemlidir.
 - 0,5 cm' lik tabakadaki %0,3' lük agaroz jelde, 5kb-60kb' lık DNA' ları yürütebiliriz.
 - Daha küçük bir tabakada(0,3mm) %40' lık poliacrilamid jelde çok daha küçük DNA fragmentleri yürütülür(1bp-300bp).
- EtBr eklenerek, DNA fragmentleri UV altında görünür hale getirilir.

DNA MOLEKÜLÜNÜN JELDE GÖRÜNTÜLENMESİ

- 25 ng' dan daha az DNA, EtBr ile boyamayla görülmez. Daha hassas metodlar vardır;
- Otoradyografi:
 - Elektroforezden önce DNA, radyoaktif marker ile işaretlenir, agaroz jele yüklenir.
 - Jel üzerine X ışınına hassas film konulur.
 - Radyoaktif DNA filmi yakıp, bantlar oluşturur.
- En çok kullanılan, radyoaktif marker ile işaretleme yöntemleri;
- Nick translasyonu;
 - DNA' da nick bölgeleri bulunur.
 - DNA polimeraz bu bölgeleri radyoaktif işaretli nükleotidlerle tamir eder.
- End filling;
 - Bu işaretleme için, DNA üzerinde yapışkan uçlar gerekir.
 - Klenow fragment enzimi ile yapışkan uçlara, işaretli nükleotidler sokularak komplementer iplik sentezlenir.
- Bu yöntemlerle 2 ng' a kadar DNA otoradyografi ile görüntülenebilir.

DNA FRAGMENT BÜYÜKLÜKLERİNİN SAPTANMASI

- İyi bir R.E. enzim kesiminden sonra jelde birçok bant görülecektir.
- Büyüklüklerini saptamak için 2 yöntem kullanılır;
 1. $D = a - b(\log M)$
D:molekülün aldığı yol, M:moleküler ağırlık,
a ve b: elektroforez koşullarına bağlı sabitler.
 2. Tahmini fragment büyüklüklerini verir. Molekül ağırlığı bilinen fragmentler de jelde yürütülür ve buldukları yerlerle elimizdeki fragmentlerin yerleri karşılaştırılarak büyüklükleri tahmin edilebilir.

RESTRIKSİYON HARİTASI

- Gen haritası üzerinde, hangi enzimlerin hangi bölgeleri kestiğini gösterir.
 - Restriksiyon haritası oluşturmak için; birçok restriksiyon kesimi olmalı,
 - Kesim sonrası oluşan fragmentlerin büyüklük ve sayısı elektroforezle tespit edilmeli,
 - Ardından 2 R.E. enzimi ile birden kesim yapılmalıdır (double digestion).
- Tek ve çift kesim sonuçları karşılaştırıldığında çelişki varsa; düşük sıcaklıkta ya da kısa bir inkübasyon periyodunda tekrar enzim kesimi yapılır (partial digestion).
- Enzimin ya aktivitesi kısıtlanacağından ya da, her spesifik kesim bölgesini kesmek için vakit bulamayacağından, total digestion' da görülen fragmentlerin yanı sıra farklı büyüklükte fragmentler de jelde görülür.

DNA MOLEKÜLLERİNİN BİRLEŞTİRİLMESİ

- Son aşamada; DNA ligaz enzimi, klonlanacak DNA ile vektör molekülünü birleştirir.
- Yapışkan uçların ligasyonu oldukça verimlidir. Sebebi ise; birbirleri ile H bağı yaparak enzimin çalışabileceği stabil yapıyı oluşturmalarıdır.
- Küt uçların ise ligasyonu zordur.Çünkü DNA ligazın doğru molekülü yakalaması güçtür.
- Küt uçla ligasyon, yüksek DNA konsantrasyonunda yapılırsa, doğru birleşme şansı arttırılır.

LINKERS

- Bunlar kısa dsDNA molekülleridir, nükleotid sekansları bilinir, test tüpünde sentezlenirler.
- Küt uçludurlar, fakat R.E. kesim bölgesi içerirler.
- DNA ligaz, linker molekülünü küt uçlu, büyük DNA fragmentine bağlar. Bu olay küt uçlu ligasyon olmasına rağmen verimlidir, sebebi ortamda fazla miktarda linker bulunmasıdır.
- Birden fazla linker, DNA'ya bağlanır, molekül R.E. ile kesilip yapışkan uçlu hale getirilir.
- DNA molekülü, aynı R.E. ile kesilmiş vektörle ligasyona hazırdır.

ADAPTÖRLER

- Yapışkan uç eklemenin diğer yoludur.
- Adaptörler de kısa, sentetik oligonükleotidlerdir.
- Bir yapışkan, bir de küt uç içerirler.
- $\left. \begin{array}{l} \text{GATCCCGG} \\ \text{GGCC} \end{array} \right\} \text{ (Küt uç)}$
- Küt uç ile DNA fragmentinin küt ucuna bağlanır, böylece yapışkan uçlu bir yapı oluşur.
- Adaptörler birbirleri ile ligasyona uğrayabilir ve DNA fragmenti küt uçlu kalabilir.

- Bu sorun, şöyle çözümlenir;

Adaptörün; Küt ucu normal DNA gibidir (5' fosfat ve 3' OH ucu içerir), yapışkan ucu ise 5' fosfat grubundan yoksundur, 3' OH uçları içerir. Böylece adaptörler birbirlerine bağlanamazlar.

Adaptörler, DNA molekülüne bağlandıktan sonra, polinükleotid kinaz enzimi ile 5' ucuna fosfat grubu takılır, böylece yapışkan uçlu fragment elde edilir.

Vektör(taşıyıcı) DNA molekülünün özellikleri;

- Hücre içine kolaylıkla girebilmeleri
- Bağımsız replikasyon yapabilmeleri
- Yüksek titraj,
- Kolay tasarım
- Etkin entegrasyon yeteneği
- Kontrol edilebilir gen transkripsiyonu
- İmmünolojik etkilerin minimum düzeyde olması

Plasmidler: Bakterileri hücrelerinin içinde doğal olarak bulunan, otonom olarak replike olabilen, bakteri kromozomunun dışında, çift zincirli DNA molekülleridir.

- Fertility, F plasmidleri: tra genlerini bulundurlar, plasmidlerin konjugasyonunda rol alırlar.
- Direnç, R plasmidleri: Antibakteriyal ajanlara karşı direnç sağlayan genler bulundurlar.
- Col, colicin plasmidleri: Diğer bakterileri öldüren proteinler.
- Degradative plasmidler: Konak bakterinin toluen ve salisilik asit gibi maddeleri metabolize etmesini sağlar.
- Virulans plasmidleri: Konak bakteriye patojen özellik verir.

Başarılı plazmit geliştirilmesindeki ölçütler:

- ✓ Küçük olmalı, ilgili bölgelerin dışında genetik bilgi taşımamalı 15 kb' den küçük olması tercih edilir
 - ✓ Küçük olmanın sağladığı avantajlar
 - ✓ Kolay izolasyon
 - ✓ Kopya sayısı yüksek
 - ✓ Klonlanan genin dozaj etkisi
- Vektör olarak kullanılan plazmitler, sınırlı sayıda uygun enzim kesim bölgelerini ve plazmiti taşıyan konakçı hücreleri ayırt etmeye yarayan marker genleri taşıyacak şekilde değişikliğe uğratılırlar.

Plasmid DNA Elde Edilmesi

- Lizozim: Hücre duvarına sağlamlık veren polimerik yapıları sindirir.
- EDTA: Hücre zarfının genel yapısını sağlayan Mg^{++} iyonlarını uzaklaştırır. DNA' yı degrades edebilecek enzimleri engeller.
- SDS: Polipeptid zincirlerini kaplar. 2°, 3°, 4° yapılar zarar görür ve protein düzgün olarak negatif yüklerle kaplanır.
- Na+: Negatif yüklü proteinleri çöktürür.
- Santrifüj: Parçalanmış hücre atıklarını santrifüj ile uzaklaştırır.
- Tris: pH > 7,5 olmasını sağlar. pH < 7 olursa DNA asidik ortamda degrades olabilir.
- Fenol-kloroform: Nükleik asitler (DNA + RNA) sıvı fazda kalırlar, fenol aşağıda, proteinler ara fazda toplanır.
- Proteaz: (pronaz, proteinaz K) polipeptidleri daha küçük parçalara ayırırlar böylece bunlar fenol ile daha kolay uzaklaşır.
- Ribonükleaz: RNA' yı uzaklaştırmanın etkili yolu. RNA' yı ribonükleotid alt ünitelerine ayırır.
- Etanol: (EtOH) DNA' nın PO_4 grupları bulunur. Bu negatif yüklü gruplar, suyla hidrojen bağı yaparlar. EtOH eklendiğinde, su EtOH ile bağ yapar, DNA açıkta kalır ve çöker.

Viral Vektörler

1. Retroviral vektörler
2. Adenoviral vektörler
3. Adeno-asociated virüs
4. Polio virüs
5. Sindbis virüs

Retrovirüsler: Retrovirüsler RNA molekülü içeren envelop virüs sınıfında yer alırlar. Viral genom yaklaşık olarak 10 kb' dır.

Hücreye infekte olduktan sonra revörz trankriptaz enzimlerini kullanarak ds DNA' larını sentezler ve bu şekilde konakçı genomuna entegre olurlar. Transkripsiyon ve translasyon aşamaların gerçekleşmesiyle hücre içerisinde özelliklerini ifade etmeye başlarlar.

Adenovirüsler: Adenovirüsler akut üst solunum yolu infeksiyonlarına yol açan non-envelop ds DNA içeren ikozahedral bir virüs tipidir. 252 tane kapsomerden oluşan bir kapsid içermektedir.

Herpesvirüsler: Herpesvirüsler, ikozahedral kapsid ile çevrilmiş bir envelopea sahip, yaklaşık 100 nm çapında büyük bir ds DNA (245 kbp) içeren bir virüslerdir.

Viral vektörler hücre içerisine kolaylıkla girip kendi genetik materyalini hedef hücreye entegre edebilen vektörlerdir. Bu açıdan değerlendirildiklerinde non-viral sistemlerden daha etkin oldukları söylenebilir.

Ancak her viral vektörün kendine özgü dezavantajları vardır:

- ✓ Bölünmeyen hücreleri enfekte edememek (retrovirüs),
- ✓ Olumsuz immünolojik etkiler (adenovirüs),
- ✓ Sitotoksik etkiler (herpesvirüs)
- ✓ Kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesi (adeno-ilişkili virüs)

Rekombinant DNA Moleküllerinin Konak Hücrelere Sokulması

- ✓ Taşıyıcı DNA plazmit ise 'Transformasyon'
- ✓ Virüs ise 'Transfeksiyon'
- ✓ Mikroenjeksiyon
- ✓ Biyolistik
- ✓ Elektroporasyon

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR, hücreden arındırılmış bir yöntem olarak, DNA klonlamasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur.

PCR, DNA moleküllerinde özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına esasına dayanır ve yöntem için yok denecek az miktardaki DNA bile yeterlidir.

PCR reaksiyonunda 3 temel basamak vardır ve çoğaltılmış ürünün miktarı, teorik olarak, bu 3 adımın tekrarlanma sayısına bağlıdır.

1. İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. Bunun için çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar ısıtılır (90-95 C, ~5 dk).

2. Sıcaklık 50-70 °C arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale gelmiş DNA'ya bağlanması sağlanır.

Bu primerler yapay oligonükleotitlerdir ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanır. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3. DNA polimeraz (Taq polimeraz) reaksiyon ortamına ilave edilir ve DNA sentezi 70-75 °C gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' den 3' ne doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.