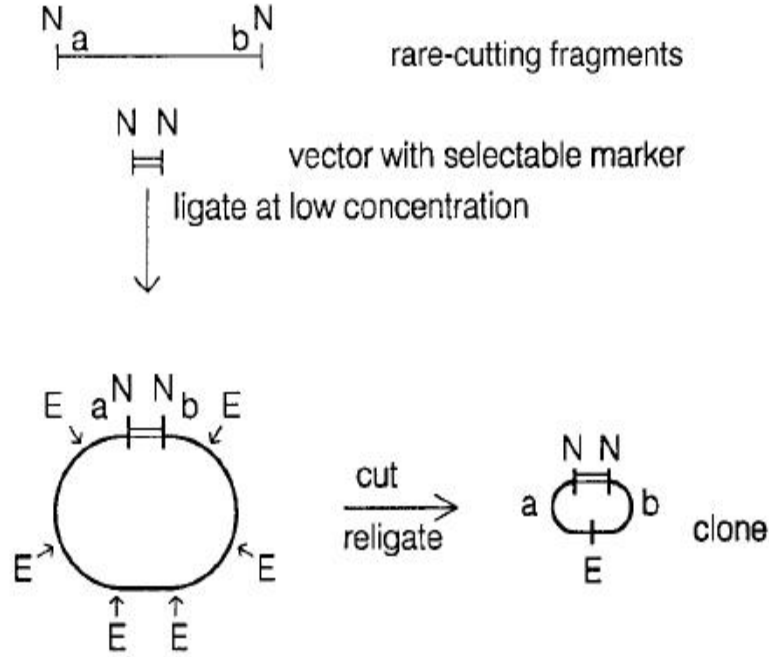


SİÇRAYAN KÜTÜPHANELER

Sıçrayan klonlar bir kromozomun iki süreksiz parçası ile baş etmek için bir yol sunar.Sıçrayan bir klonun ana fikri şekil-8.20’de gösterilmiştir.Oldukça küçük bir giriş klonudur.İstisnası ise şudur:klonlama işleminde iki tane farklı ve uzak orijinal hedef DNA parçası yan yana getirilir ve birleştirilir.Sıçrayan bir klon için basit bir durum,büyük bir DNA parçasının iki ucunu içermesidir.Fakat fragmentin bütün internal iç DNA’sı kesilip atılmıştır.Böyle klonların yapışık şekli şekil 8.21’de gösterilmiştir.



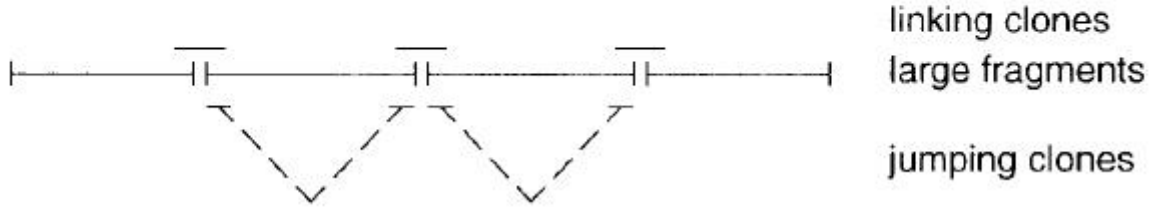
Şekil 8.21 Büyük DNA fragmentlerinin uçlarından türetilmiş sıçrayan klon kütüphanesinin oluşturulması metodu

Çok düşük konsantrasyonlarda sulandırılmış nadir ve kesici enzim ile genom kesilir ve seçici bir marker içeren vektörün varlığında ligasyon yapılır.Amaç vektör dizisinin çevresindeki büyük parçaları çembereştirmektir.Hedefin yeterli derecede düşük konsantrasyonlarında hedef parçanın herhangi bir moleküller arası ligasyonu olmaz.Birisi fazla vektörü kullanabilir.Çünkü vektör defosforile edildiği için vektör-vektör ligasyonu mümkün değildir.Eğer başarılı olunursa;düşük konsantrasyondaki ligasyonlar çok büyük DNA çemberleri oluşturabilirler.Bunlar sonradan hedef DNA’da çok sık kesim bölgesi olup vektörde kesim bölgesi olmayan bir restriksiyon enzimi ile kesilir.Bu;uygun vektörün tasarımı ile düzenlenebilir.Sonuçta oldukça küçük DNA parçalarının bir karışımı oluşur ve orijinal büyük DNA parçalarının iki ucundaki bağlantıya yakın olanlar vektör dizilerini içerir.

İkinci bir ligasyon;yine çok düşük konsantrasyonlarda yapılır.Bu örnekteki tüm DNA’lar çemberleştirilir.Bunlar vektörlerdeki seçici markırların büyüme için gerektiği şartlar altında E.coli’ye tekrar sokulursa bir sıçrayan kütüphane oluşur.

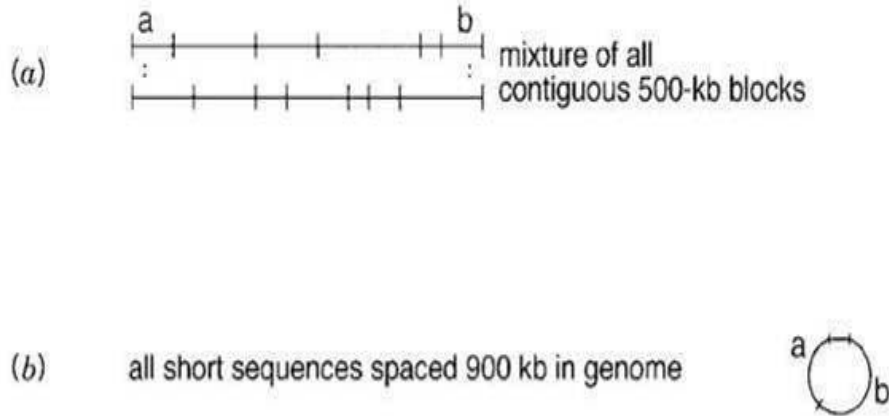
Nadir restriksiyon kesim bölgelerinin yakınına kateden sıçrayan kütüphanelerin kullanımı potansiyel olarak çok güçlüdür.Bunlar şekil şekil-8.22’de gösterilmiştir.

PHYSICAL MAPPING



Şekil 8.22 Büyük DNA fragmentlerine yayılan (uzanan) sıçrayan klonların potansiyel yararı

Sıçrayan klonların her biri iki tane bağlantı(overlap) klonunu kateder.Eğer birisi sistematik bir şekilde hangi bağlantı klonunun ,sıçrayan klonlarla DNA dizisi paylaştığını incelerse(veya tam tersi)sonuçta;bütün bağlantı klonların ve bütün sıçrayan klonların dizilmesi gerekecektir.Bu hibridizasyon;PCR veya nadir kesim bölgelerine yakın DNA dizisinin dorudan analizi ile yapılabilir.Son durumda DNA dizi karşılaştırmaları;klon binmelerini açığa çıkaracaktır.Böyle bir yaklaşım;STARs;yani “dizi etiketli nadir restriksiyon bölgeleri” olarak adlandırılır.Ve otomatik DNA sekansının bütünlüğünü ve kolaylığını göz önüne alınırsa,oldukça çekicidir.Sıçrayan kütüphanenin daha genel bir formu şematik olarak şekil 8.23’de gösterilmiştir.



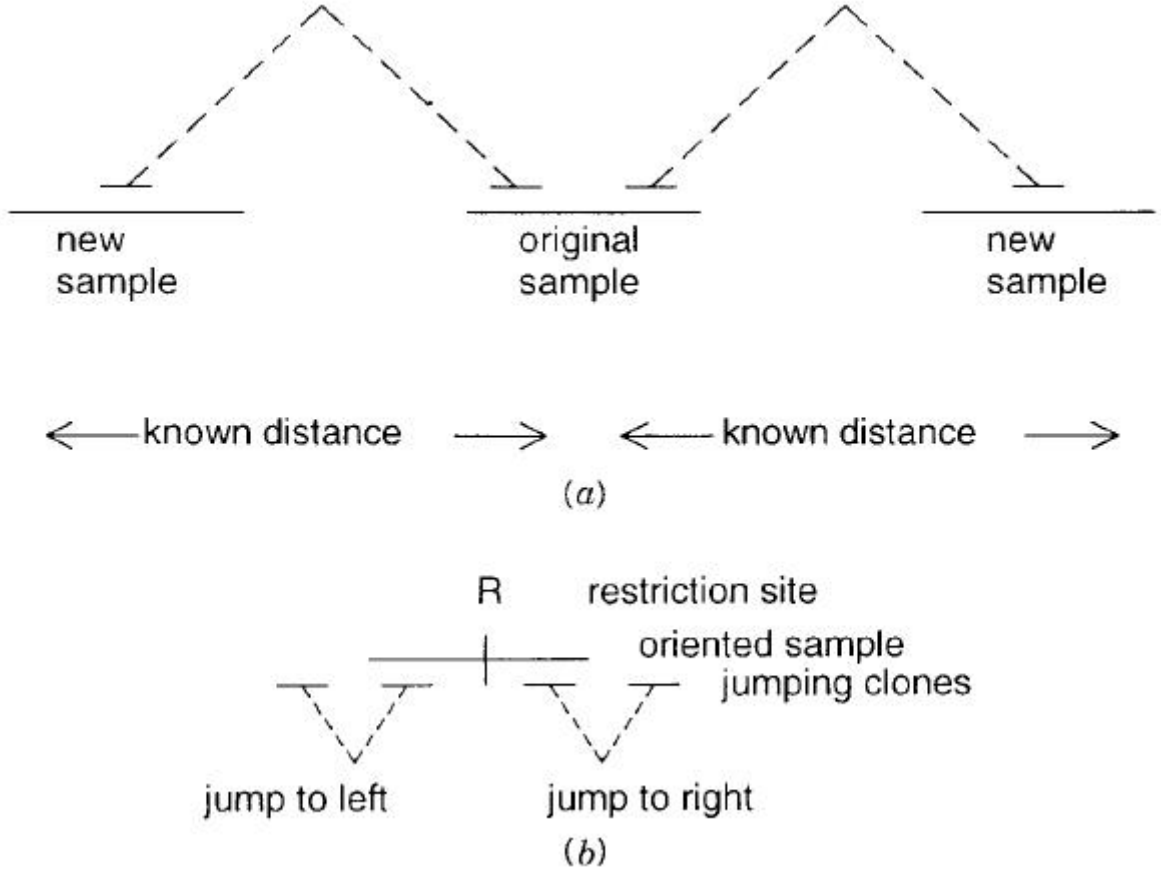
Şekil 8.23 DNA hazırlanması

- Daha genel sıçrayan kütüphane oluşturulması
- Sabit uzunluktaki genomik fragmentlerin çok yoğun örneğini içerir

Burada bir genom oldukça sık bir restriksiyon endonükleaz ile kesilir.sonuçta çok kompleks PFG tarafından ayrılan bir karışım oluşur ve çok dar büyüklük aralığında bir materyal seçilir.Eğer bu 500kb büyüklüğünde olursa bu demektirki;örnek genomdaki bütün sürekli 500kb’lik DNA bloklarını içerir.Bu materyal şu şekilde sıçrayan kütüphane yapmakta kullanılır:

- Önce düşük konsantrasyonda bir vektöre yerleştirilir.
- Sonra iç kısımlar kesilir ve yeniden çemberleştirilir.

- Sonuçlanan kütüphane bir büyüğe göre seçilmiş bir sıçrayan kütüphanedir ve genomda 50kb kadar byüklükte ayrılmış kısa DNA dizilerinin süreksiz setlerini içerir.Bu kütüphanenin en büyük dez avantajı çok kompleks olmasıdır.Bununla birlikte şekil-8.24a'da gösterildiği gibi çok kullanışlıdır.Birisinin ilgilenilen bir bölgede bir markıra sahip olduğunu düşünelim ve o kişinin bir diğer markırı yaklaşık 500kb uzakta olamasın istiyebilir.Orjinal markır 500kb'lık bir sıçrayan kütüphaneyi taramakta kullanılabilir.Bu her iki tarafında orijinal markerın 500kb tarafından çevreleyen iki tane yarım sıçrayan prob şeklinde kesilen klonların belirlenmesi ile sonuçlanır.



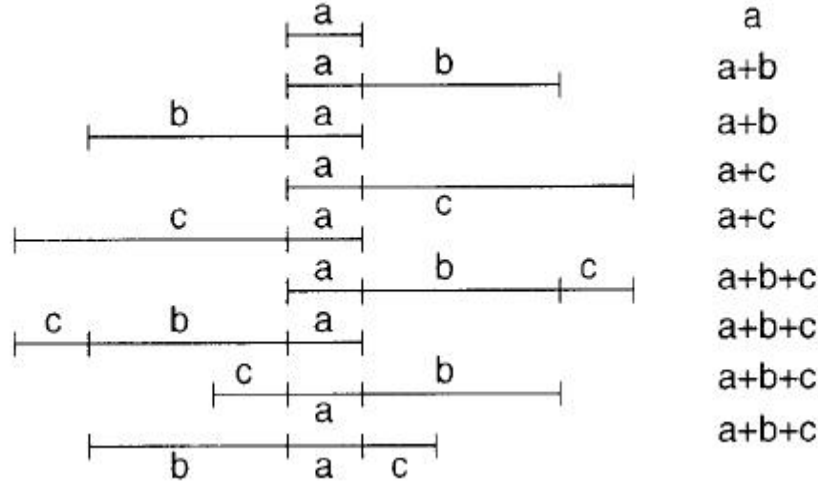
Şekil 8.24 Bir bölgeden uzak ayrılmış bölgelere hareket eden sıçrayan kütüphane kullanımı

- Yarı sıçrayan klonlar başlangıç probundan bilinen uzaklıktaki yeni problemlerin uzaklaşmasını sağlar
- Sıçrayışın yönü hakkındaki bilgi orijinal probun harita oryantasyonu bilindiği takdirde korunmuş olabilir

Eğer orijinal marker genomdaki bazı diğer markırlara göre dizilirse;hangi sıçrayanın hangi yönde olduğunu anlatmak mümkündür.(tabi internal bir kesim bölgesi içerdiği takdirde.)(şekil-8.24b)Orijinal markır kısımları kullanılarak sıçrayan klonların seçimi sıçramadan sonra onun oryantasyonu hakkındaki bilginin korunmasına izin verir.Diğer taraftan çok güçlü bir yaklaşımın kullanımındaki ana sınırlama;uzun sıçramaların yapılmasının oldukça zor oluşudur.Çünkü böyle büyük DNA çemberlerinin etkili bir biçimde ligasyonu oldukça zordur.

KISMİ KESİM (PARTIAL DIGESTION)

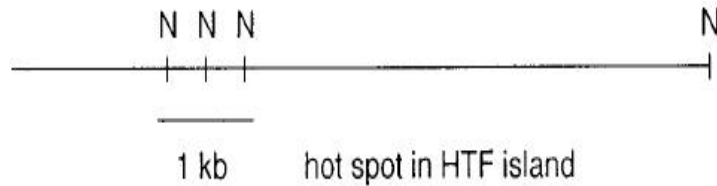
İnsan genomunun bir çok bölgesinde;200kb'dan daha büyük DNA fragmentlerini sürekli olarak veren restriksiyon enzimlerini bulmak oldukça zordur. Pek çok bölgede; genomik restriksiyon fragmentleri nadiren birkaç Mb'dan daha büyüktür.PFG'nin 5-7 Mb büyüklüğüne kadar olan DNA fragmentlerinin çözülmesine olanak sağlayana kadar düşük çözömlü haritalama için bu olay olanal dışı idi.PFG'nin çok büyük dizilerinin avantajı;genomu belli bölgelerinden kesen enzimlerle kısmi kesim(sindirim)sağlamasıdır.Bununla beraber; bölgenin eşsiz haritasını oluşturmak için yapılan kesimin sonuçlarının değerlendirilmesinde temel bir problem vardır. Bu problem şekil 8.25'de gösterilmiştir.



Şekil 8.25 Tek bir proba hibridizasyon sağlandığında fragment paternlerinin yorumlanmasındaki belirsizlik kısmi restriksiyon nükleaz kesiminde görölmekte

Eğer tek bir prob; PFG fraksiyonlanmasından sonraki hibridizasyonla kesimin incelenmesi için kullanılırsa bu prob DNA fragmentlerinin karışımını araştıracaktır ki bu fragmentler her iki yöndeki kendi orijinal lakosyonlarından itibaren uzayıp gitmektedir (genişlemektedir). Bu ürünlerin karışımlarını analiz etmek, haritayı anlamak ve oluşturmak için açık değildir.

Eğer enzim, bütün bölgeleri eşit kinetiklerle keserse, biri likely hood veya maksimum entropi argümanlarını kullanarak verilmiş bir kesim kalıbıyla uyumlu en uygun fragment dizilimlerini seçmekte kullanılabilir. Zorluk şudur ki: çoğu restriksiyon enzimleri tercihsel kesim bölgelerine sahiptir. Sfi-1 durumunda; kesilen tanıma dizilerinin ilginçliğiyle bunlar oluşturulabilir. Not-1 ve diğer birçok enzim durumunda kesim için sıcak noktalar genomda birbirine çok yakın şekilde konumlanmış bazı kesim bölgelerinde olur (şekil 8.26).



Şekil 8.26 Kısmi kesim haritalama metodlarını kullanmak için denemeleri şaşırtan restriksiyon enzim sıcak nokta örneği

özgül bir bölgedeki bir sıcak noktanın varlığını kural dışı etmek zordur. Kısmi kesim verilerine uyan bir kesim haritasına uygun bir aday Null haritasıdır. Bu haritada bütün kısmi kesim bölgeleri probun bir tarafında bulunur ve tüm kesim sıcak noktalarının diğer tarafında bulunur (şekil 8.27).

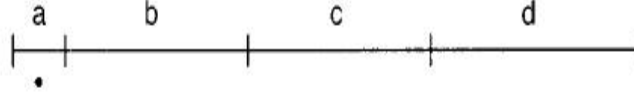
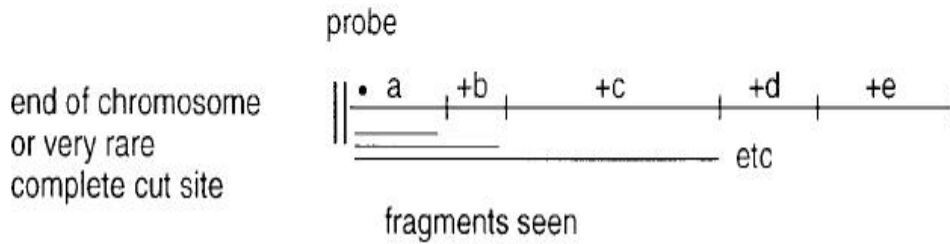


Figure 8.27 Null ordering of fragments seen in a partial digest.



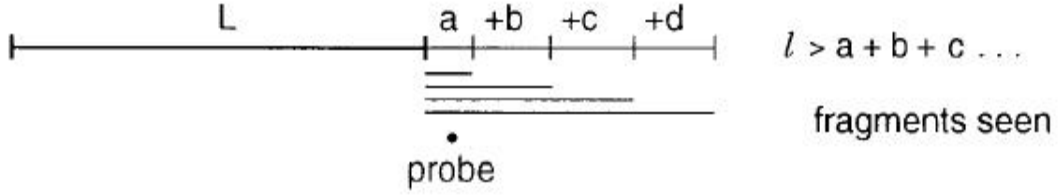
Şekil 8.27 Fragmentlerin anlamsız sırası kısmi kesimde görülmektedir

Şekil 8.28 Total kesim yeri (ya da kromozom ucu) belli bir bölgede olduğu bilindiği takdirde kısmi kesim datasından bir restriksiyon haritasının bir araya getirilmesi

Böyle bir harita istatistiksel olarak tesadüfi bir genomda imkansız olmasına rağmen sıcak noktaların varlığına izin verildiği için oldukça mantıklıdır. Burada ortaya çıkan komplikasyonlar olmaksızın analiz edilen üç tane kısmi kesim kalıbı vardır. Bunlardan birincisi, bölge inceleme altındaki her molekülde kesilen bir bölge tarafından sarılı kısım olduğu zaman olur. Bu sıcak nokta bölgesini yaratmak için iki yol vardır. Şu unutulmamalıdır ki kesimi analiz etmek için kullanılan prob, bir kromozomun ucuna çok yakındır (şekil 8.28). dolayısıyla bu durumda Null haritası doğru bir haritadır. Daha önce tartıştığımız telomerik bir probun kullanımı Smith-Brinstiel haritalama yaklaşımına denktir.

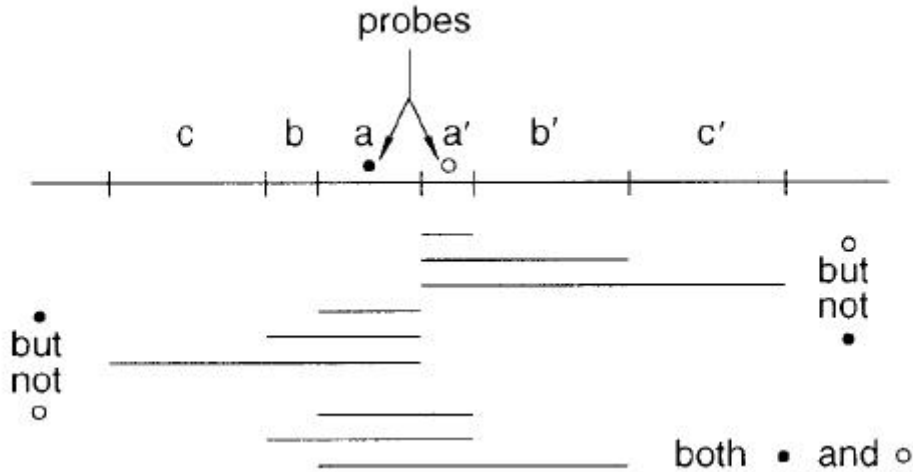
1. Eğer prob haritalanmış bölgenin en ucunda değilse bile uca yakın herhangi bir bilgi, kısmi kesim verisinin analizini oldukça basitleştirir. Böyle bir bölgenin ikinci bir durumu ise çok nadir bir kesim enziminin bir kromozomdaki tanıma dizisine entegrasyonu sonucunda olur. Öyle ki bu ilgilenilen bölgedeki tek kesim bölgesi olacaktır. Sonra çok nadir bölge tamamen kesilir ve daha sık kesim bölgesi olan bir enzim ile kısmi bir kesim yapılır. Böyle bir yaklaşımın hızlı bir haritalama metodu olarak önemi büyüktür. Bununla birlikte çok nadir kesimi sonuna kadar götürme kabiliyetine sahiptir. Çok nadir kesim için mevcut şemaların çoğunda total kesim garanti edilemez. Paris'deki Thierrbi ve Dujon nükleaz1-Sce1 için kesim bölgesi maya genomuna uygun yoğunluklarda sokulabilir ve enzim tanımlama stratejisini etkili yapmak için yeterli derecede kesebilir.
2. Eğer ilgilenilen bölge çok büyük bir DNA fragmentine bitişikse onun kısmi kesim verisinin analizine izin vererek olur, sonra şekil 8.29'da gösterildiği gibi çok büyük bir fragmentten daha küçük kısmi kesimde görülen bütün DNA fragmentleri şu şekilde dizilebilir. Kesim; çok büyük bir fragmente bitişik ilk küçük parçada lokalize olmuş

bir propile hibridize edilerek belirlenir. Telomerik problarda olduğ gibi kısıtlamadan biraz gevşetmek kesimden önemli harita bilgilerinin çıkarılmasını sağlar.



Şekil 8.29 Kısmi kesim data komşusunda çok büyük restriksiyon fragmentlerine kadar olan bölgenin restriksiyon haritasının bir araya getirilmesi

3. Kısmi kesimin analiz edilebildiği bu durumda bitişik DNA fragmentleri üzerinde uzanan iki prob olduğu zaman olur. Örneğin iki tane yarım bağlantı klonu, klonlarda mevcut aynı nadir bölgeler kullanılarak yapılan kısmi bir kesim problemleri halinde kullanılanlardır. Bu durumda şekil 8.30'da gösterildiği gibi bir proba görülen fragment büyüklükleri o probun yönünde diğer probda uzanmaz. Her iki proba görülen problemler bilgilendirici değildir. Böylece bağlantı klonları kısmi kesimin etkili analizinde anahtar rol oynar. Kısmi kesimleri uygulayan yaklaşımların etkisi şöyledir: bir lokasyondaki bir prob oldukça uzak bölgeler boyunca harita elde etmek için kullanılabilir ki, bu noktalarda diğer problemler mevcut olmayabilir. Bu deneyleri uygulamak için iki şeye ihtiyaç vardır.
 1. Güvenilir uzunluk standartları
 2. İyi, yüksek çözünürlükte PFG fraksiyonları temeldir.



Şekil 8.30 İki hibridizasyon probunun kullanılabilir olduğu ve komşu DNA fragmentlerine bağlı olduğu bilinen durumlarda restriksiyon haritasının oluşturulması. Bu tip problemler kullanılmaktadır. Örneğin bağlantı klonlarının yarısında olduğu gibi.

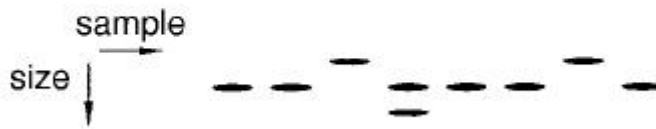
Kısmi bir kesim tarafından elde edilen veri görünen DNA bantlarının uzunluğunu verir. Örneğin; Eğer birisi 400 kb'lik bir bant üzerinde uzandığı bilinen bir prob kullanılırsa ve onu 1000 kb'lik bir kısmi bantta görürse bu şunu işaret eder: 600 kb'lik bant 400 kb'lik bantın komşusudur. Daha sonra araştırmacı bu görevi ispatlamak için 600 kb'lik bölgeden özgül problemleri izole etmeye çalışacaktır. Bununla birlikte eğer 1000 kb'lik bantın büyüklüğü yanlış tahmin edilmişse ve eğer 900 kb ise ve o araştırmacı da 600 kb'lik jel bölgesinde prob bulmaya gittiyse bu yanlış bölge olacaktır. Etkili bir kısmi kesim analizinin ikinci sınırlaması çok duyarlı hibridizasyon protokollerinin olmasıdır. Kısmi kesimlerdeki DNA parçalarının eldesi % 1-10 arası olabilir. Bunların tespit edilmesi hibridizasyonların sıradan tek kopyalı DNA hedefleri için ihtiyaç duyulandan 10-100 kat duyarlı olması lazımdır. Otoradyografi, bu nadir kesim enzimleri ile yapılan kısmi kesim analizinde 1-2 hafta sürebilir.

HARİTALAMAYA YARDIM ETMEK İÇİN DNA POLİMORFİZMLERİNİN ETKİLİ KULLANIMI

Farzedelim ki iki farklı DNA probu 800 kb uzunluğunda bir Not1 fragmentini tespit etsin. Aynı fragment üzerinde uzandıklarını veya bunun sadece bir tesadüf olup, onları çözümlmek için benzer büyüklükte fragmentten türeyip türemediklerini nasıl biliriz?

1. Not1 fragmentlerini ikinci bir nadir kesim yapan enzimle kesmektir. Eğer bir proba gözlenen bant kısalmış ve diğer bant aynı kalırsa, onların iki farklı fragment olduğuna karar veririz. Eğer ikinci kesimden sonra her iki bant da kısalmışsa sonuç açık değildir. Bir istisna vardır ki: eğer iki grup tarafından iki farklı uzunlukta bant görülür ve onların büyüklüklerinin toplamı Not1 kesiminde görülen orijinal bantın büyüklüğünden daha büyükse.
2. Farklı bir hücre hatları serisinden izole edilen DNA üzerinde iki farklı probun kullanılmasıdır. Pratikte çok farklı karakterde 8 hücre hattı genellikle yeterlidir. Eğer bu tek bir DNA probu ile yapılırsa genellikle bir veya daha fazla hat önemli derecedeki büyüklük farkı ve diğerlerine göre kesim farkı gösterir (şekil 8.31).

EXPLOITING DNA POLYMORPHISMS TO ASSIST MAPPING

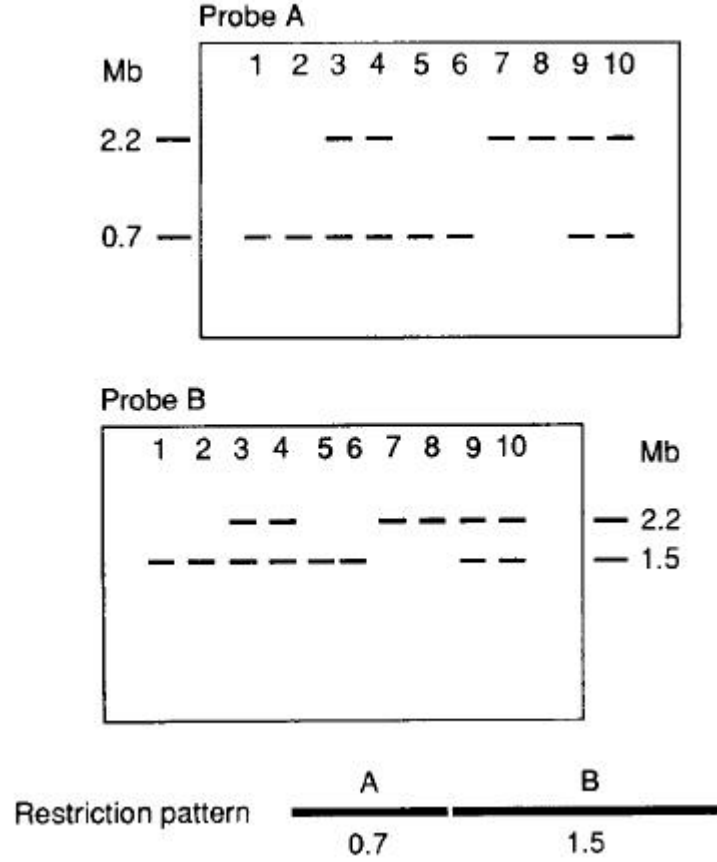


Şekil 8.31 Birkaç farklı hücre hatları karşılaştırıldığında büyük restriksiyon fragmentlerindeki polimorfizm örneği DNA problemlerinin tekli kopyasıyla görülmektedir

Bu polimorfizm için birçok potansiyel orijin vardır. Memeli genomları tandem tekrarlarla doludur ve bunların büyüklüğü bireyden bireye önemli derecede değişir. Çoğu nadir kesim bölgeleri metilasyona duyarlıdır. Özellikle doku kültür hücreleri hatlarında oldukça heterojen bir metilasyon paterni oluşur.

Ayrıca nadir kesim bölgelerinde sık genetik polimorfizmler vardır. Bu RFLP'ler oluşur, çünkü bölgeler CpGs içerir ve bunlar potansiyel mutasyon sıcak bölgeleri içerir. Harita inşa etmenin amacı için polimorfizm kaynağı hemen hemen önemli değildir. Temel fikir şudur: eğer iki farklı prob bir hücre hattı serisi boyunca aynı polimorfizm paternini paylaşırsa sebep ne olursa olsun; onlar hemen hemen daima aynı DNA fragmentinden türemelidirler.

Polimorfizm kalıpları ayrıca bitişik fragmentleri bağlamaya da yardımcı olur (şekil 8.32).



Şekil 8.32 DNA fragmentlerinin paternleri üzerinde polimorfik restriksiyon bölgesinin etkisi. Bu bölge bitişik olan iki prob ile görülmekte

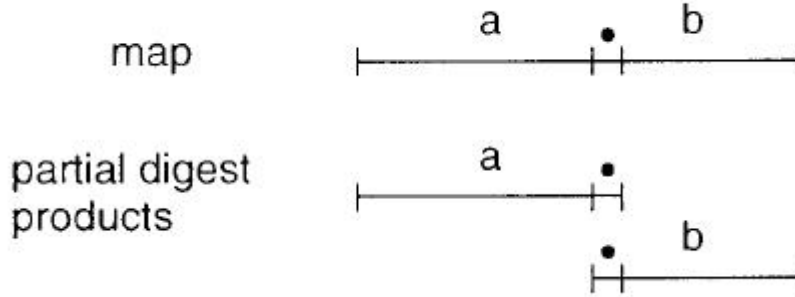
Burada birisi yaygın bir polimorfik bölgeyi paylaşan iki farklı DNA fragmenti için problara sahiptirler. Tipik bir durumda bu bölge bazı hücre hatlarında kesilir, bazılarında kısmen kesilir, bazılarında ise hiç kesilmez. İki prob tarafından görülen bant kalıpları hücre hatları serisi boyunca doğru bir şekilde korele edilir. Ayrıca birisi bazı hücrelerde bir bant görülür ki, bu diğerlerinde görülen iki fragment uzunluğu toplamıdır. Bu iki probun komşu bantları tanıdıklarının bir delilidir. Küçük bir bölgede çoklu polimorfizmlerin olduğu daha kompleks durumlar mevcuttur. Bunu analiz etmek çok zordur. Gerçekte böyle bölgeler hiç de nadir değildir.

KÜÇÜK FRAGMENTLERİ HARİTAYA YERLEŞTİRME

Bugüne kadar oluşturulan çoğu makrorestriksiyon haritalarında bazen çok küçük restriksiyon fragmentleri kaybolu. Bu fragmentler haritaya çok az değer katarlar. Ve eğer bir sonraki işte bir bölge çok ince bir şekilde haritalanır ve düzenli bir klon bankasına dönüştürülürse, eksikliğini gösterir.

Küçük fragmentleri belirlemenin alternatif bir yaklaşımı PCR kullanmaktır. Destekleyiciler (alçı gibi) restriksiyon enzimi ile yaratılan yapışkan uçlara yapıştırılır. Destekleyiciler için özgül primerler ardından PCR amplifikasyonu için kullanılırlar. Tipik PCR amplifikasyonlarında ki sınırlı büyüklük aralığı göz önüne alınırsa hiçbir makrorestriksiyon

fragmenti amplife edilemez. PCR ürünleri kesimle oluşturulan küçük restriksiyon fragmentlerinden ibarettir. Bunlar büyüklüklerine göre ayrılabilir ve bireysel olarak yukarıda anlatıldığı gibi kısmi bir kesimi belirlemek için kullanılabilir. Amaç, makrorestriksiyon haritası üzerindeki küçük fragmentlerin pozisyonunu belirlemektir.



Şekil 8.33 Makrorestriksiyon haritası üzerinde küçük DNA fragmentlerinin yerleşimi

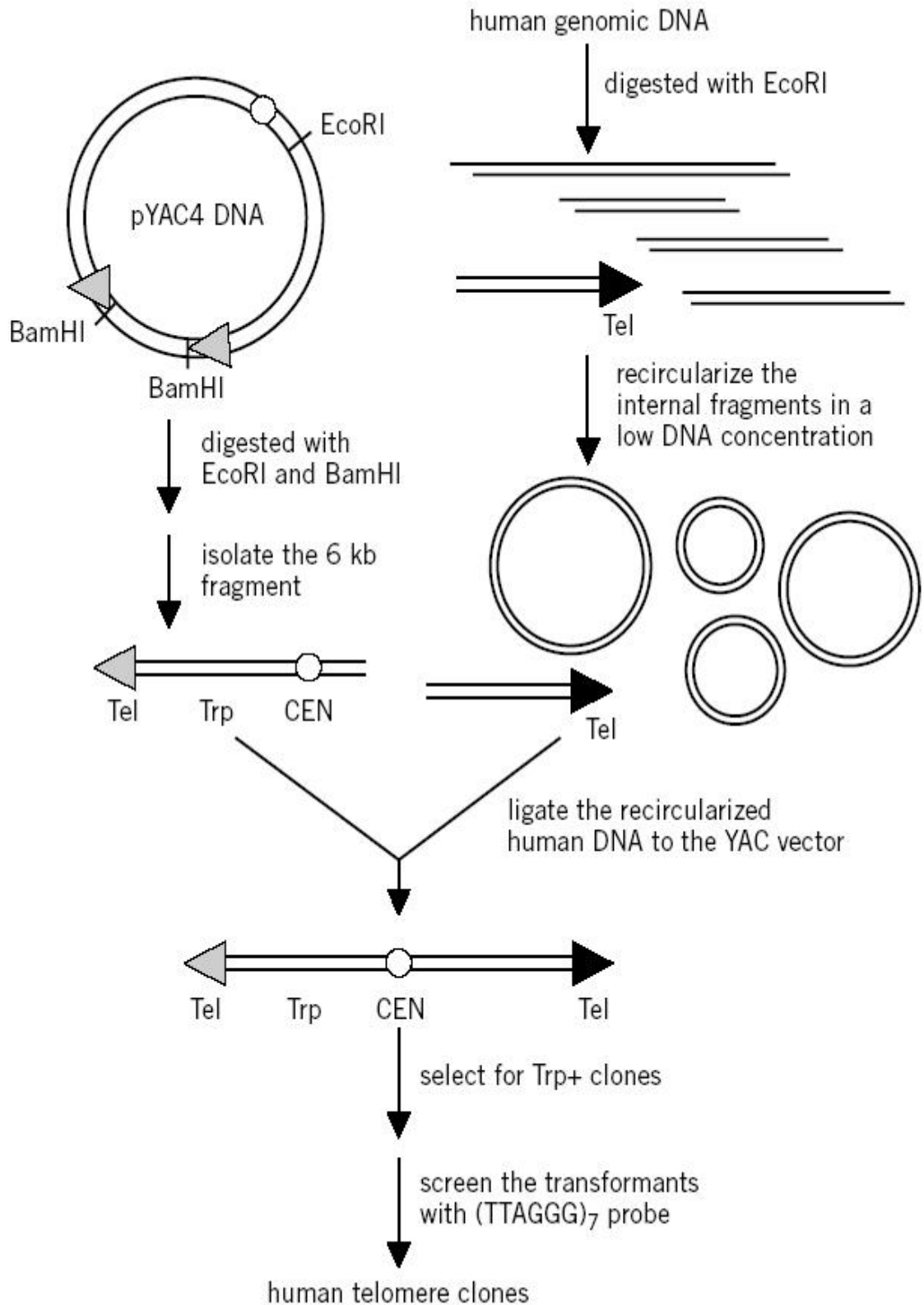
FİZİKSEL HARİTANIN UÇLARINA ULAŞMAK:

TELOMERLERİ KLONLAMAK:

Telomerlere yakın klonlar kısmi kesimler için oldukça faydalı proplardır. Sonuç olarak telomerler tanıma göre bütün lineer kromozom haritalarının uçlarıdır. Ve onlar bir genetik veya fiziksel haritanın geri kalan kısmına bağlanmayınca kadar hiç kimse bir haritanın gerçekten tam olduğunu söyleyemez. Gerçek telomerleri plazmidlerde, bakteriyofajlarda ve kozmit kütüphanelerde bulunması beklenmez. Bunu iki açıklaması vardır:

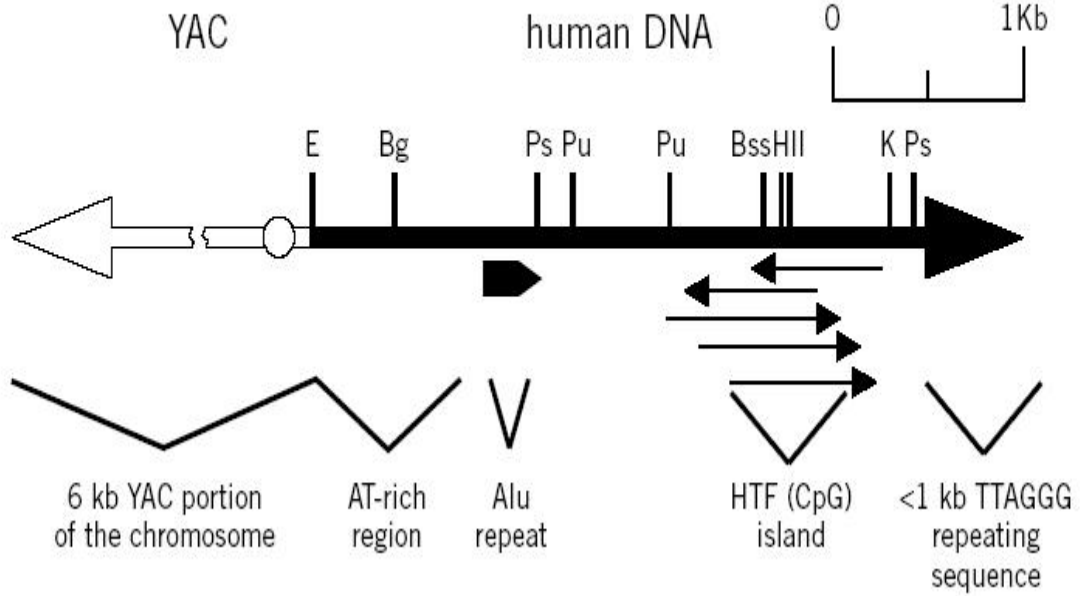
1. Basit bir telomer tekrar dizisinin yapısı normal bir dubleks veya tek zincirli loop'tan ziyade bir saç tokası yapısı içerir. Bu saç tokası sıradan DNA klonlanması için kullanılan şartlar altında oldukça karardır. Bu koşullar altında birleşme olmaz. Ve böylece telomerlerin klonlanamayacağı düşünülür.
2. Basit tandem tekrarları tipik klonlama vektörleri içinde çok kararlı değildir. Onlar rekombinasyonla kolayca kaybolur. 10-30 kb'lik basit insan telomerik tekrarı hemen hemen kesinlikle tipik bakteriyal klonlama suşlarında kararlı değildir. Basit tekrarların distalinde bulunan dizilerin kendisi orta büyüklükte tandem tekrarlarca zengindir. Ve böyle dizilerin tüm blokları tekrarlanır. Böylece bu bölgeler E.Coli de oldukça kararsızdırlar. Bütün bunlardan dolayı telomerlerin geleneksel kütüphanelerde bulma teşebbüsleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

Bu problemi aşmak için ve memeli telomerik DNAsını bulmak için altı araştırma grubu S.Ceravisiae' da bu dizileri seçici olarak klonlama yöntemleri geliştirdiler. Mayada klonlanan standart klonlama vektörü YAC'dir. Telomerlerin kromozom fonksiyonunda anahtar elementler olması ve özelliklerinin çoğu türlerde korunmuş olmasından dolayı şu düşünülür: bir memeli telomeri bir mayanın telomerine ve bağlantılı dizilerine benzer olmamasına rağmen mayada da fonksiyon görebilir. Bu fikri test etmek için yarım YAC'ları klonlama vektörü olarak kullandılar. Yarım YAC'lar mayada kararlı türler olarak yaşamak için diğer telomer içeren DNA fragmentlerine bağlanmak zorunda idiler.



Toplam genomik insan DNA'sı E. coR1 ile kesildi. Reaksiyon karışımı dilüe edildi ve ligaz eklendi. Bütün E. coR1 DNA fragmentleri iki tane yapışkan uca sahiptir. Bunlar ligasyon yapabilirler ve düşük konsantrasyonlarda primer ligasyon ürünleri intramoleküler çember

olabilirler (sıçrayan kütüphanelerde olduğu gibi). Ligasyonla yapışkan uçlarını kaybetmeyen tek fragment telomerlerdir ve bunlar sadece bir yapışkan uca sahip olup çemberleşemezler. Çok küçük E. coli fragmentleri yeterince bükülemediği için bir çember oluşturamazlar. Bu ligasyon yöntemiyle telomerik olmayan restriksiyon fragmentlerinin çoğu seçici olarak elimine edilir ve pratikte 10^4 'lük bir telomerik restriksiyon fragmenti zenginleştirilmesi oluşturur.

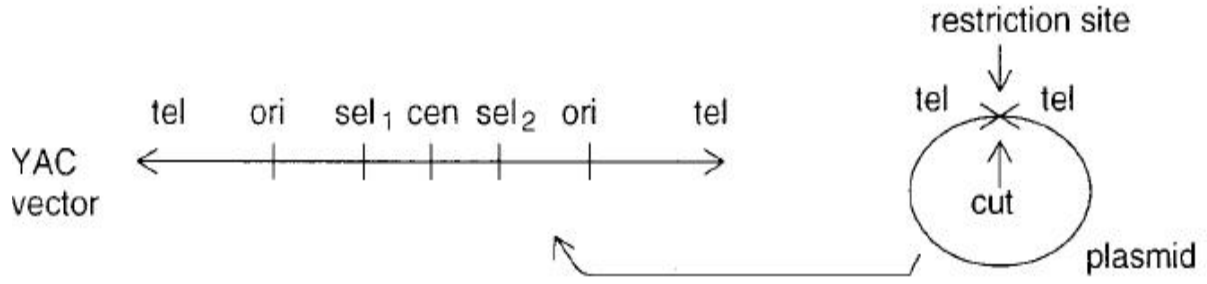


BÜYÜK DNA FRAGMENTLERİNİ YAPAY KROMOZOMLAR OLARAK KLONLAMA

Hem maya hem de bakteriyel büyük fragment klonlama sistemleri geliştirildi. YAC'lar E. coli'de büyüyen küçük plazmidler klonlanarak yapıldı (şekil 8.36). YAC vektörlerin her iki ucunda telomer dizisine sahip bir

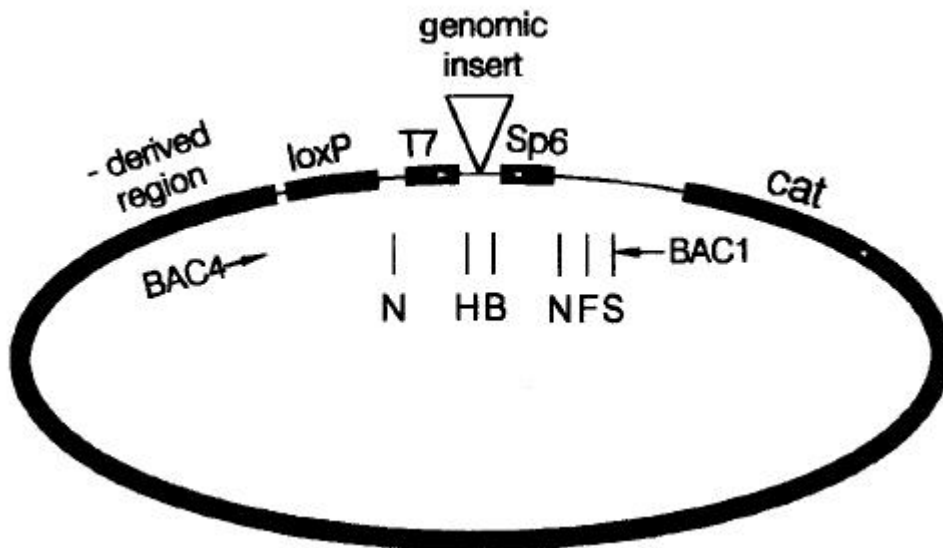
- Sentromer dizisi
- DNA replikasyon orijini
- Vektörün her bir kolunda seçici markırlar vardır.

Büyük fragmentler YAC'ın her iki kolunun arasında oluşan çoklu klonlama bölgesinden klonlanırlar. Bunun anlamı plazmid hem klonlama bölgesinde hem de birleşen telomer dizilerinin arasındaki bölgeden kesilir. Sonuçta vektör kolları iki plazmid arasında bölünür. Vektör kolları E. coli gibi bir restriksiyon enzimiyle kısmen kesilmiş yüksek molekül ağırlıklı DNA'ya ligasyon edilebilir. Rekombinant DNA'lar kimyasal olarak muamele görmüş s. cerevisiae'ye sunulur. Kimyasal muamele onların DNA'yı almasını sağlar. Yaklaşık 1 mB büyüklüğünde YAC'lar yaratılmıştır. Büyük bakteriyel klonlama sistemleri E. coli'nin iyi karakterize edilmiş bağımsız bir şekilde replike olan ekstra kromozomal DNA elementlerine dayanır.



P1 yapay kromozomlar (PACs) P1 bakteriyofajı için vektör sekanslarını kullanırlar. Oysa bakteriyel yapay kromozomlar (BACs) üreme (F) faktörüne dayanır (şekil 8.37). P1 bakteriyofajı ekstra kromozomal, düşük kopyalı plazmid ve yüksek kopyalı litik faj gibi replike olurlar. PAC'larda litik replikonun indüklenmesi büyük miktardaki PAC DNA'nın sentez edilebildiğini garanti etmektedir. Hem P1 bakteriyofajı hem de F-faktör genomları 100 kb büyüklüğünde olduğu halde bu genomun sadece küçük bir parçası temel fonksiyonlar için klonlanır ve klonlama için temizlenebilir.

E. coli DNA'sının 2.5 mB'a kadar olan kısmının F-plazmidler için de kararlı bir şekilde korunduğu bilinmektedir. Başlangıç olarak PAC'lar etkili transfeksiyon sistemlerinin rekombinant DNA'yı hücre içine sokmak için geliştirilmiştir. Bu rekombinant DNA büyüklüğünü yaklaşık 100 kb'ye kadar sınırlamıştır. Böylelikle bakteriyofaj partiküllerinin içine paketlenebileceklerdi. Daha sonra 250 kb'ye kadar olan PAC DNA'ları elektroporasyon kullanılarak hücre içine sokuldu. Lineer DNA molekülleri olan YAC'lardan farklı olarak PAC'lar ve BAC'lar *E. Coli*'de kararlı olması için çembersel olmalıdır. DNA ligaz tarafından in-vitro sirkülasyonun verimliliği molekülün büyüklüğüyle azalmaktadır. Bu nedenden dolayı PAC ve BAC sistemleri cre-rekombinans olarak adlandırılan P1 kodlayan bölge spesifik rekombinasyon enziminin avantaj sağlanması için gerçekleştirilmiştir. Bu enzim, iki loxP bölgelerinin rekombinasyonunda yardımcı olur. Cre yardımcı rekombinasyon her iki uçta da loxP içeren bir DNA fragmentini çembersel hale getirir. Cre enzimler gibi genleri belirten proteinler BAC ve PAC vektör sekanslarını minimize etmek ve bağımsız gen ekspresyonuna izin vermek için harekete geçerler. Bakteriyel tabanlı PAC ve BAC klonlama sistemlerinin işleyişi YAC sistemlerinden daha kolaydır. Çünkü daha az düzenlemeye gerek vardır ve klon DNA'sının manipülasyonu daha kolaydır (şekil 8.37).

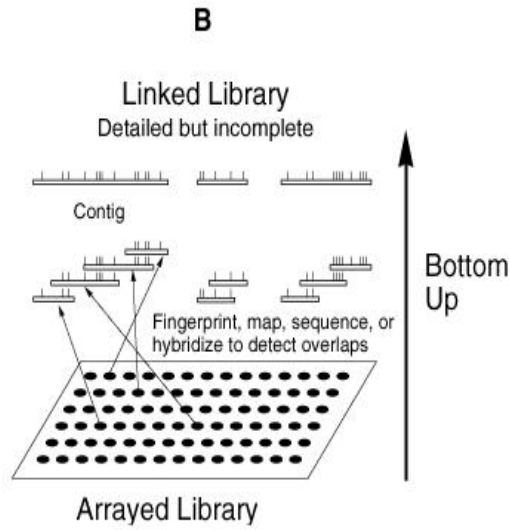


OPTİKSEL HARİTALAMA

Bu metod YAC klonlara, bakteriyofajlara ve doğal maya kromozomlara başarıyla uygulanmıştır. Son zamanlarda bu yarı otomatik hale getirilmiştir ve daha büyük DNA'lar için genişletilmiştir. Optiksel haritalanan DNA molekülleri poly-L-lizin türevleriyle kaplı cam yüzeyler üzerine tutunmasıyla fikse edilmesi gibi hassas bir şekilde akıtılması ile uzatılır. Restriksiyon enzim kesimi fiske edilmiş molekülleri parçalamak için kullanılır. Gerilmiş zincirin küçük bir parçası her bir kesim noktasında genişletilir. Bu bir boşluğu uzaklaştırır ki, bu boşluk DNA örneklerinin boyanmasından sonra floresan mikroskopuyla görülebilir. Görünen her bir fragmentin dış hat büyüklüğü onun büyüklüğünü belirtir. Bununla beraber bu metodun çok önemli bir özelliği de fragmentlerin organizasyon paternleri başlangıç fiksasyonu ile sürdürülür (korunur) ve böylece fragmentlerin sırası hemen bilinir. Çünkü bu tekli molekül metodudur. Bu metot, herhangi bir örnek heterojenitesi ile etkili bir şekilde ilgilenebilir. Yeterli sayıdaki moleküle bakıldığı takdirde örnek içindeki türlerin her bir sınıfının bütün haritası oluşturulabilir.

AŞAĞIDAN YUKARIYA KÜTÜPHANE SIRALAMASI

Bottom-up mapping: Bu yaklaşım kromozomun her biri klonlanmış ve sıralanmış küçük parçalara ayrılmasını içerir. Sıralanmış fragmentler bitişik DNA blokları (contigler) oluşturur.



Oluşan klon kütüphanesi boyut olarak 10000 bç- 1 mb arasında çeşitlilik gösterir. Bu yaklaşımın bir avantajı bu stabil klonların diğer araştırmacılar tarafından ulaşılabilir olmasıdır. Contig oluşumu kromozomal bantlardaki özgül bölgelere kozmidlerin yerleştirildiği FISH ile doğrulanır.

Contig haritalar, bütün bir kromozomal segmentin bitişik küçük klonlarını içeren linked kütüphanelerden oluşur. Küçük bir alanda yerleşmiş genleri bulmak için kullanışlı iken geniş kromozom segmentlerine yayılmış olan genler için zor bir seçenektir. Çünkü her bölge klonlanamaz. DNA prob teknikleri boşlukları doldurmak için kullanılabilir ama zaman alıcı bir yöntemlerdir.

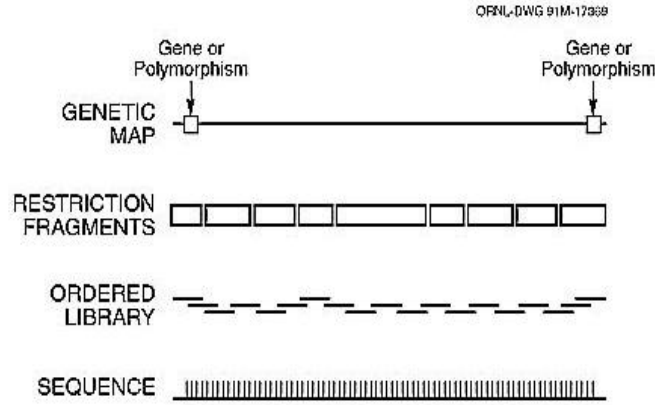


Fig. 10. Types of Genome Maps.

İstatistik değerlendirmeler metoda göre seçilmelidir: Linkaj analizi için; LOD Skor (Logarithm of Odds Ratio) analizi uygulanır. LOD Skor: Linkaj saptanması olasılığının linkaj gözlenmemesi olasılığına oranının logaritmik değerde ifade biçimidir. Başka bir deyişle aranılan genin, test edilen kromozom lokusunda olması olasılığının ilgili lokusta bulunmaması olasılığına oranıdır. Sonuçta çıkan değer arttıkça lokalizasyonun saptanması olasılığı da artacaktır. Örneğin bu değer 5 gibi bir sayı çıkarsa aranılan genin test edilen kromozom lokusundan seçilen marker'a bağlantı göstermesi olasılığı bağlantı olmaması olasılığından 105 kez (100.000 kez) daha fazla olacaktır. Negatif değerler de lokustan uzaklaşıldığının göstergesidir. LOD Skor = 3 ve üstü olan değerler bağlantıyı desteklemesi açısından anlamlı kabul edilirken 2 ve giderek negatifleşen değerler ise kesin olarak bağlantı yokluğunu destekler. Aradaki değerler yoruma açıktır. Lokusun ispatlanabilmesi için bir dizi farklı işlem yapılması gerekebilir (aile ve örnek sayılarının artırılması, genomun diğer bölgelerinin araştırılması vs. gibi). Burada önemle belirtilmesi gereken nokta bu analizde sonuçta bulunan bir olasılık değeridir ve saptanan lokus hakiki lokus olmayabilir. Nitelikten sorumlu ilgili gen ve gen içi mutasyon gösterilinceye kadar lokus informasyon-yonu yanıltıcı olabilir.

Fiziksel ya da moleküler haritalar, genomik DNA'nın klonlanmış parçalarının düzenlenmesiyle oluşturulurlar ve baz çifti sayılarına göre ayarlanmışlardır. Genetik haritadan farkı burada direkt olarak DNA'yı oluşturan bazların sırası belirlenmiştir. Böylelikle genlerin fiziksel yapıları kesin olarak ortaya konabilmektedir. Haritalama projelerinin en son aşamadaki amacı olan fiziksel harita en yüksek rezolüsyona sahiptir. Diğer yandan, ökaryotik genomun çok küçük bir yüzdesi ifade olunduğu için, bazı fiziksel haritalama yöntemleri, sadece transkripsiyonun gerçekleştiği dizilerin tanımlanmasına yönelmiştir. Genetik haritada olduğu gibi insan genomunun fiziksel haritası da 24 farklı kromozom için oluşturulur. Farklı kromozomlar için bağlantılı polimorfik marker gruplarını gösteren genetik haritaların tersine, farklı tiplerde fiziksel haritalar oluşturmak mümkündür.

Fiziksel haritalamanın en son hedefi DNA baz dizisinin çıkarılmasıdır. Ancak geniş DNA bölgelerinin dizi analizinin yapılması teknik açıdan güç olduğu için haritalamada çözünürlüğü 1 Mb'dan daha aza indiren iki ana yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak "Restriksiyon Haritalama" ve doğal olarak uzatılmış ya da yapay olarak uzatılmış kromatin ya da DNA fiberlerinde yüksek çözünürlüklü FISH'dir.

Rekombinant gen teknolojisindeki son gelişmelerle birlikte genomik DNA parçalarının klonlanması ve karakterizasyonu ile detaylı bir gen haritası elde etmek mümkün hale gelmiştir. Sonuçta da sadece gen yapısı hakkında bir kaynak olmakla kalmayan aynı zamanda genomda dizi organizasyonu, gen ve genomların evrimi hakkında da son derece değerli bir kaynak olan tüm bir

genomun DNA dizisinin elde edilmesi mümkündür. Günümüzde, pekçok model organizmanın örneğin; bakteri, *S.cerevisiae*, *C.elegans*, *D.melanogaster*, *F.rubripes*, *D.erio*, insan gibi organizmaların genetik ve fiziksel haritalarını çıkararak sonuçta, tüm genom dizilerinin saptanmasını amaçlayan çok yoğun bir şekilde devam eden bir uluslararası işbirliği sürmektedir ve bu model organizmaların bazılarının tüm genom dizi analizi tamamlanmıştır. Genomların haritalanması, analizi ve dizi analizi ile ilgili disipline "genomiks,, adı verilmiştir.

Tüm dünyada binlerce bilim adamının yaklaşık 15 yıl süren çabaları sonucunda insan DNA'sının hemen hemen tamamlanmış nükleotid dizisi yani haritası ortaya çıkmıştır. Gen haritaları sayesinde bitki ve hayvan üreticileri genetik olarak iyileştirilmiş kalitede üretim yapabilirken, insan genom haritasının çıkarılması açısından bakıldığında, biyokimyasal temeli bilinmeyen genetik hastalıklara neden olan genlerin özgül bir kromozom ya da kromozom bantı üzerine haritalanması, soyağaçları üzerinde bir marker ile olan bağlantısına dayanarak bu genin izinin sürülmesi (gene tracking), hastalığın tedavi edilmesi, insan ırklarının evrimleri ve ırkların dünya üzerinde göç yollarının çıkarılması mümkün olacaktır.

