



BYM613

Genetik Mühendisliği

Rekombinant DNA Teknolojisi-I

Hacettepe Üniversitesi
Biyomühendislik Bölümü
2012-2013 Güz Dönemi

Dr. Eda Çelik-AKDUR
edacelik@hacettepe.edu.tr

İçerik (2 hafta)

- Rekombinant DNA teknolojisi
 - Tanımlar ve temel basamakları
 - Restriksiyon ve Ligaz Enzimleri
 - Vektörler
 - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
- Klonlanmış DNA analizi
 - DNA Sekans Analizi
 - Restirksiyon Analizi
 - Jel Elektroforezi
- Rekombinant teknolojinin uygulamaları

#	Başlık	Örnek Ref (lar)/ Notlar	Sunacak Kişi	13 Kasım için Sunum Konularınız
1	Bölgesel Yönlendirilmiş Mutasyon (Site-Directed Mutagenesis)	Burası için web sayfasında bilgi olacak	Dicle	* Max 8 dk, 10 slide * Rapor yok * Slide'lar bana email, 12 Kasım, 17:00 SON. * Referanslara dikkat, en sonda değil, slide içinde ! * Final için 3 sınav sorusu ve cevabı da email. * 2012 basımı 1 makaleden örnek. * Sınıf sizi değerlendirecek, soru soracak. * 1. Ara sınav yerine sayılacak
2	Homolog Rekombinasyon Yöntemi ile gen aktarımı		Ebru	
3	DNA modifying enzymes/DNA binding proteins		Zeynep	
4	Transpozonların DNA manipülasyonlarında kullanımı		Handan	
5	P1 transdüksiyon yöntemi ile gen silinmesi		Olgu	
6	Southern Blotting		Gökçe	
7	Northern Blotting		Bakiye	
8	DNA mikrodizineleme (Microarray)		Nurşen	
9	Kimyasal uygulama ve elektroporasyon ile bakterilerde transformasyon, Transformasyon için Yetkin Hücrelerin (Bakteri) Hazırlanması		Hande	
10	DNA saflaştırma		Araz	
11	Total RNA izolasyonu		Merve	
12	PCR optimizasyonu ve PCR çeşitleri		Göksu	
13	DNA saklama koşulları ve miktar belirleme		İlkay	
14	Moleküler Tanımlama		Gamze	
15	DNA tamir mekanizmaları		Burcu S	
16	Floresansla etkinleşmiş hücre tasnifleyicisi (FACS)		Gökçe Kaynak	
17	PCR için oligonükleotid (primer) tasarımı		Şule	
18	DNA jel elektroforezi, RE ile kesme		Burcu Güven	
19	Derse hiç gelmedi ???		Cem	

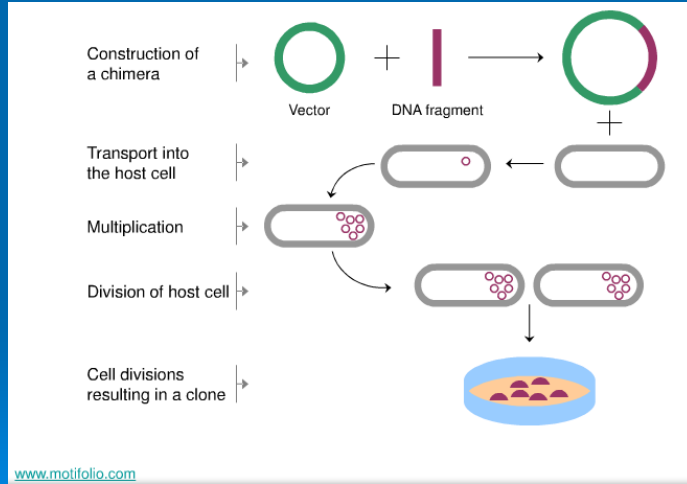
3

Tanımlar

- **Klon:** Genetik olarak birbirinin aynı hücreler grubu
- **Gen klonlama:** Bir genin kopyalarının oluşturulması
 - Ana gen ile aynı (wild-type)
 - Ana genden farklı (mutant)
- **Rekombinant DNA:** Farklı DNA parçalarının birleştirilmesi
- **Rekombinant DNA (rDNA) Teknolojisi:** Rekombinant DNA moleküllerinin bir konak hücreye aktarılarak çoğalmalarını ("klonlama") sağlayan bir dizi işlemi kapsayan teknoloji.

4

Moleküler Klonlama (Gen Klonlama)



Şekildeki
“DNA
parçası”
bir gen ise,
“gen
klonlama”

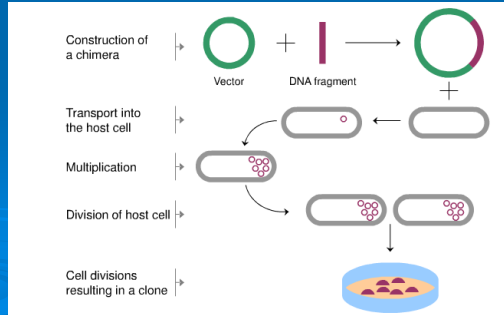
(Kök hücre
teknolojisi
yardımıyla) Daha
kompleks canlı-
ların klonlaması
ayrı bir konu.

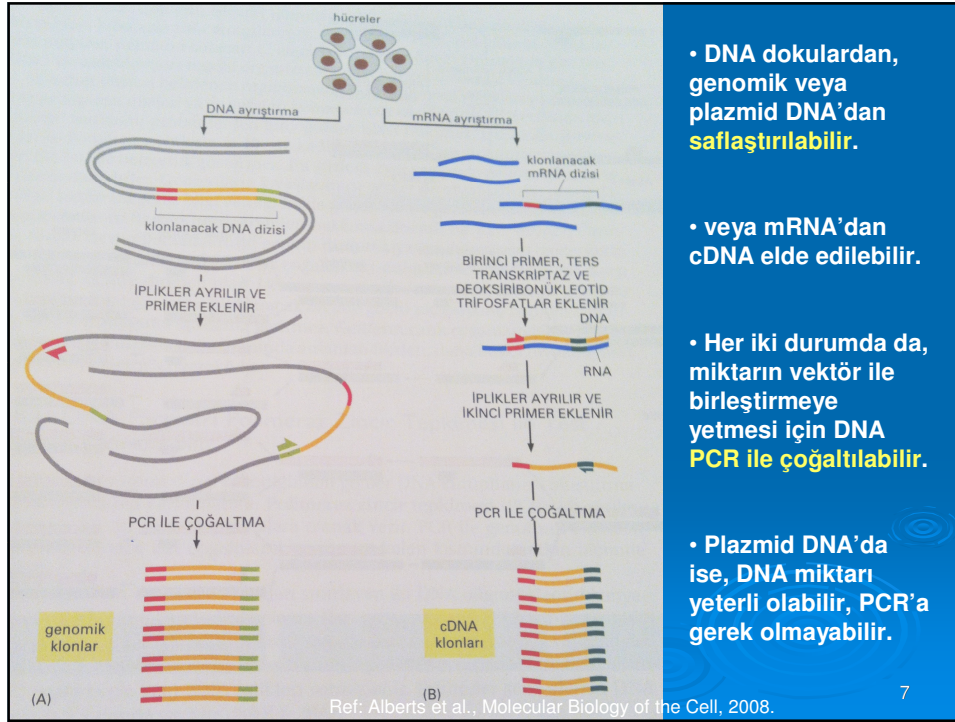
Tüp bebek ikizleri
de klon aslında...

5

rDNA için temel basamaklar

- Doku yada hücreden DNA izole edilir; PCR ve/veya Restriksiyon Enzimleri kullanılarak spesifik DNA parçaları elde edilir.
- Bu parçalar, taşıyıcı DNA (vektör) ile birleştirilir (rDNA)
- rDNA molekülü, çoğaltılmak üzere konak hücreye aktarılır.
- Klonlar izole edilir ve analizlenir.





• DNA dokulardan, genomik veya plazmid DNA'dan **saflaştırılabilir.**

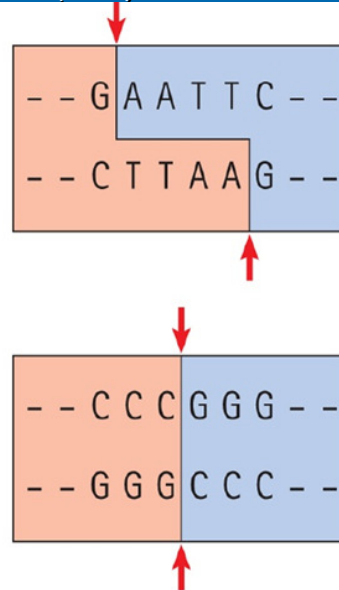
• veya mRNA'dan cDNA elde edilebilir.

• Her iki durumda da, miktarın vektör ile birleştirmeye yetmesi için DNA **PCR ile çoğaltılabilir.**

• Plazmid DNA'da ise, DNA miktarı yeterli olabilir, PCR'a gerek olmayabilir.

Yeterli miktar DNA elde edildikten sonra, Restriksiyon Enzimleri (RE) ile kesilir.

- RE enzimleri DNA'yı 4 - 12 sayıda nükleotid dizisini spesifik olarak tanıyıp keser.
- Bu kesim işleminde bazı enzimler küt uçlu DNA parçaları oluştururken, bazıları da yapışkan uçlu DNA parçaları oluştururlar.



Ref: Dr. M. Erayman ders notları.

Restriksiyon Enzimi DNA'nın spesifik bölgesine bağlanır.

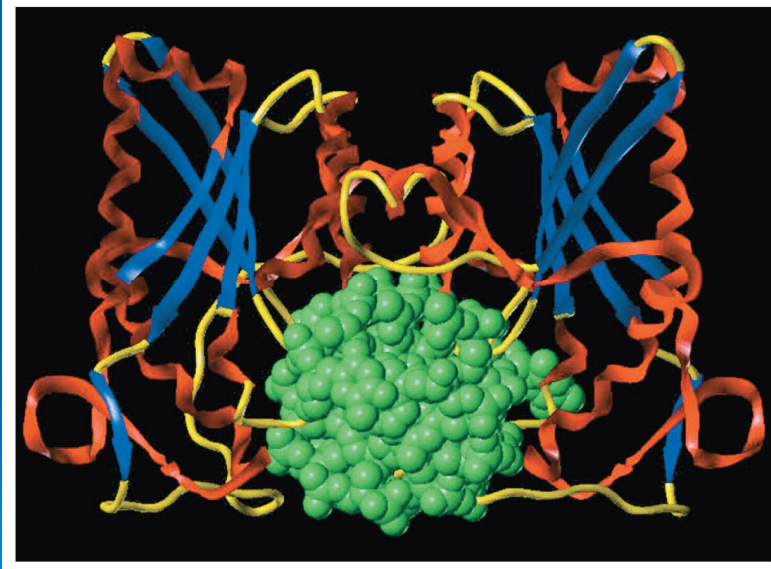


Fig. Pearson Education Inc., 2009

9

Bazı RE örnekleri

Enzyme	Recognition, cleavage sequence	Cleavage pattern	Source
EcoRI			<i>Escherichia coli</i> R
HindIII			<i>Haemophilus influenzae</i> Rd
BamHI			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
TaqI			<i>Thermus aquaticus</i>
AluI			<i>Arthobacter luteus</i>
HaeIII			<i>Haemophilus aegyptius</i>
BalI			<i>Brevibacterium albidum</i>
Sau3AI			<i>Staphylococcus aureus</i> 3A

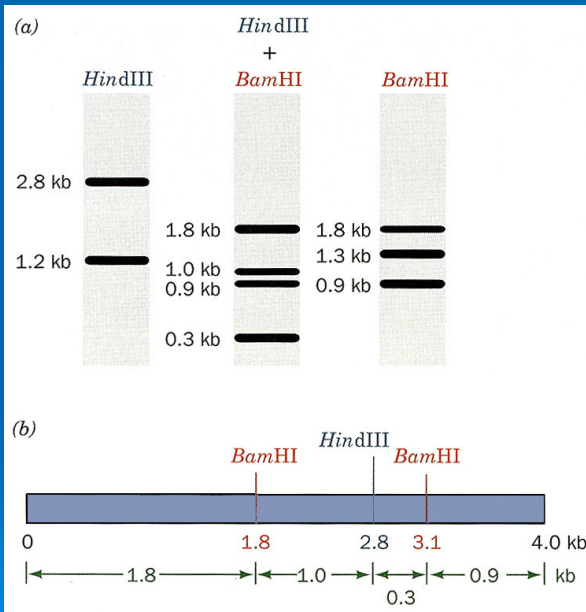
• Bugün 200 den fazla RE (bkz www.neb.com)

• Genelde spesifik DNA dizisi tanır, ve genelde bu diziler palindromiktir (tersten okuyunca aynı).

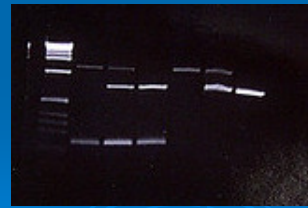
• Bakteri türüne spesifik & savunma mekanizması

Fig. Pearson Education Inc., 2009

10



DNA belirli RE ile
belirli şekilde kesilir
(Fig b) ve jel
elektroforezinde
kontrol edilir (Fig a).



Ref: Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 2008.

11

DNA Ligaz enzimi ile DNA parçaları birleştirilir
(küt uçlu veya yapışkan uçlu olabilir).

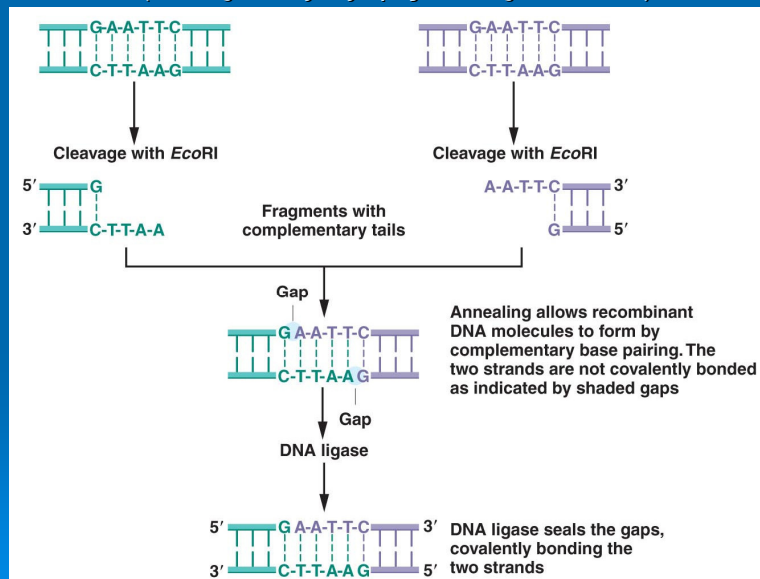


Fig. Pearson Education Inc., 2009

12

DNA ligaz karşılıklı gelen uçları eşleşme olduğu sürece birleştirebilir.

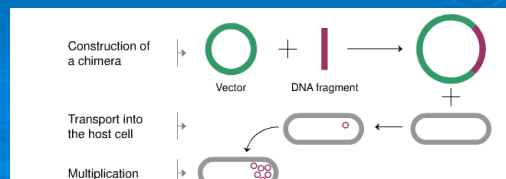
➤ <i>Bam</i> HI	-G	GATCC-
	-CCTAG	G-
➤ <i>Bgl</i> II	-A	GATCT-
	-TCTAG	A-
➤ <u>Sonuç</u>	-GGATCT-	
	-CCTAGA-	

Artık palindromik değil, *Bam*HI veya *Bgl*II kesemez !

13

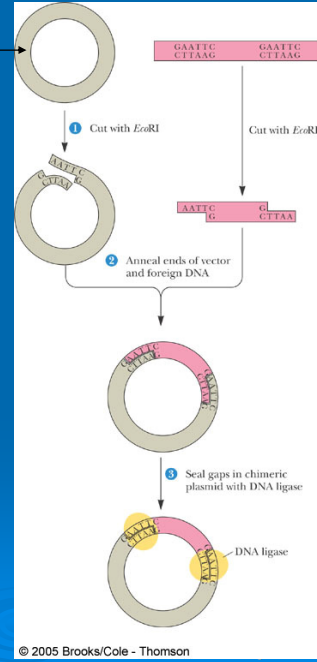
Vektörler : DNA parçalarının taşıyıcısı

- Kendini bağımsız olarak replike edebilmelidir.
- Bir bölgesinde birçok RE için tek kırılma noktasına sahip olmalıdır ki, bu noktadan RE ile kesip yabancı DNA parçası ile birleşsin.
- Üzerinde seçilebilir bir belirleyici (selection marker) taşınmalıdır. Bu sayede yabancı DNA'yı taşıyan konakçı hücreler ayırt edilebilir.
- Konakçıdan kolayca izole edilebilir olmalıdır.



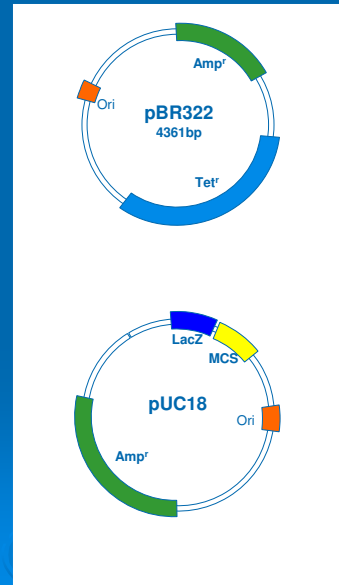
Vektörler

- Plazmid klonlama vektörleri
- Lambda ve M13 bakteriyofaj vektörleri
- Kozmid vektörler
- Mekik vektörler
- BAC (Bacterial artificial chromosomes)
- YAC (Yeast artificial chromosomes)

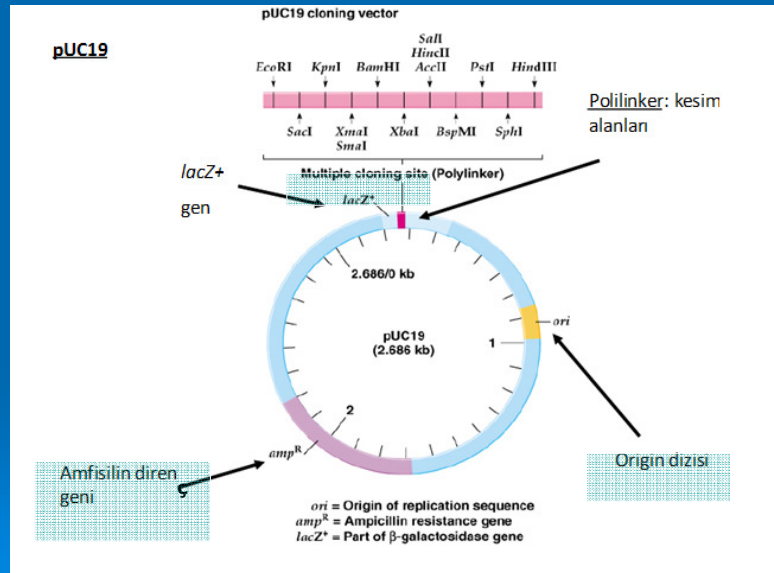


Plazmidler

- Plazmidler bakterilerde kromozom dışı DNA molekülleridir.
- Plazmidler dairesel ve çift-sarmal yapıdadır.
- Restriksiyon enzimleri ile kesilip yabancı DNA parçası (<20kb) eklenerek rekombinant plazmidler elde edilebilir.



Ref: Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 2008.



Ref: Dr. M. Erayman ders notları.

17

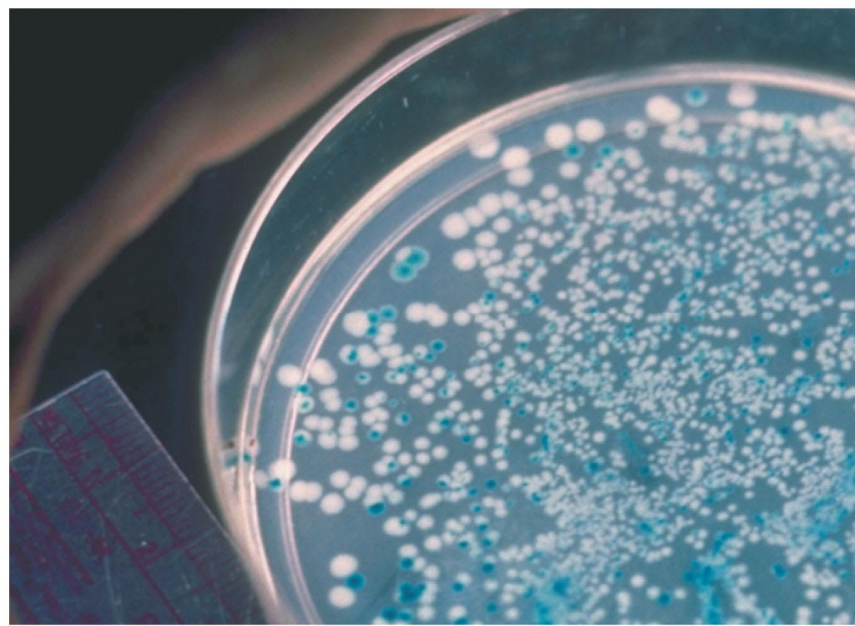


Fig. Pearson Education Inc., 2009

Figure 19.3

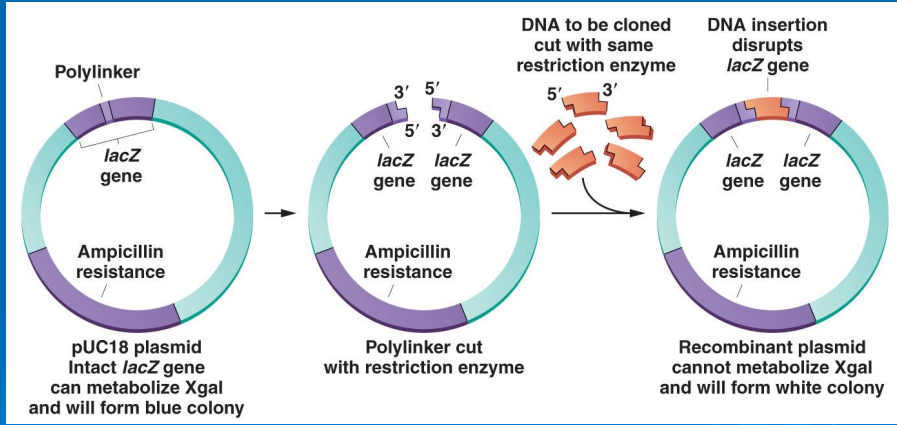
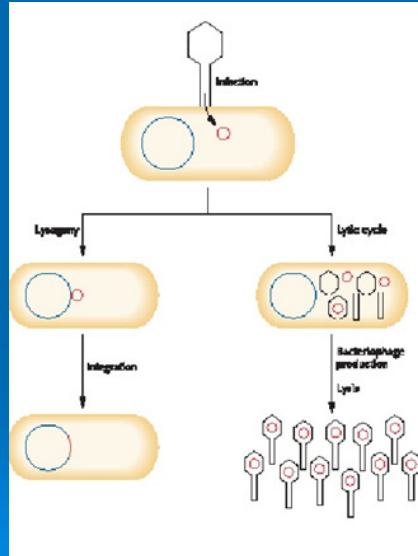


Fig. Pearson Education Inc., 2009

19

Lambda (λ) ve M13 Bakteriyofaj Vektörleri



- Bir *E.coli* virüsüdür,
- DNA'sı 48,5 kb'dir,
- Doğrusal λ kromozomunun merkezi bölgesi RE ile kesilir ve yabancı DNA yerleştirilir.
- Klonlanacak DNA ile Lambda DNA'sı birleştirilir ve protein kılıf içinde paketlenir.
- Bu virüs bakteri hücrelerine girerek kendini çoğaltır.
- 10-15 kb'lık klon DNA üretilebilir.

Ref: Dr. M. Erayman ders notları.

20

Lambda Bakteriyofaj Vektörleri

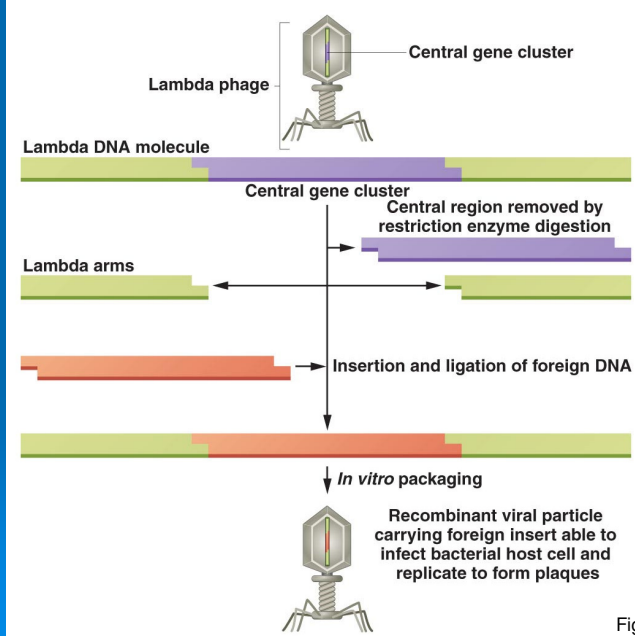
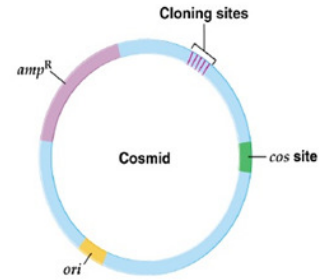


Fig. Pearson Education Inc., 2009

Kozmid Vektörler

1. Lambda ile plazmit kromozomlarının birleştirilmesiyle elde edilmiştir.
2. Doğal yollarla meydana gelmezler. Daireseldir.
3. Antibiyotik direnç geni içerirler. (amp^R)
4. Orijin (ori) bölgesi bulunur.
5. Kesim enzimleri için bir bölge bulunur.
6. Lambda fajının, faj protein kılıfına paketlenmesi için gerekli olan **cos** dizileri içerirler.
7. Yabancı DNA'yı bulunduran kozmitler lambda protein başı içine paketlenir ve enfekte edici faj parçacıkları oluşur.
8. 50 kb'lık DNA taşıyabilirler.

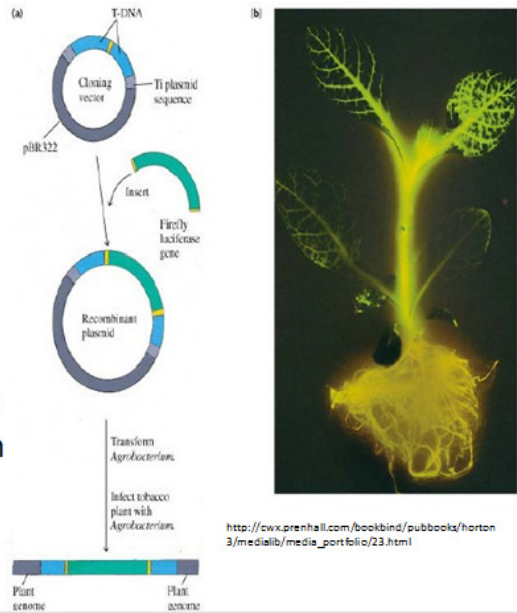


Mekik (Shuttle) Vektörler

- Birden fazla konakçı hücrede replike olabilir (ör. hem maya hem bakteri).
- Kendiliğinden replike olur veya konakçı replike olunca kendini çoğaltabilir.
- Bir organizmadan diğerine genleri taşımak için yaygın olarak kullanılır.

23

- Örneğin;
- Ateş böceğinin luciferase geni plazmide yerleştirilir ve *Agrobacterium*'a aktarılır.
- *Agrobacterium*'da çoğaltılır ve tütünü enfekte ederek gen aktarım işlemi tamamlanmış olur.



Ref: Dr. M. Erayman ders notları.

24

Bakteri Yapay Kromozomları Bacterial Artificial Chromosomes (BAC)

- 100-500 kb DNA taşıyabilir !
- Antibiyotik direnç geni, RE bölgeleri, F faktör genlerini içermektedir.
- Genom sekanslama projeleri için uygundur.

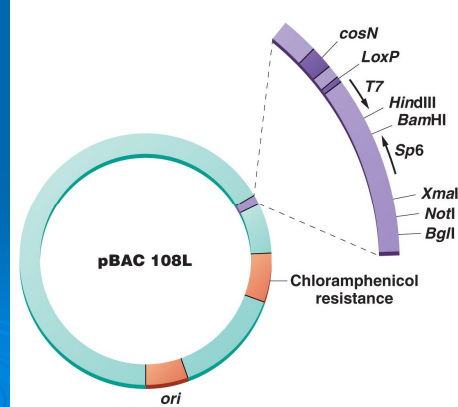


Fig. Pearson Education Inc., 2009

Ekspresyon Vektörleri

- Promotör bölgesi bulunan vektörlerdir (plazmid, mekik, vs olabilir).
- Bir proteini yüksek miktarda üretmek için kullanılır.

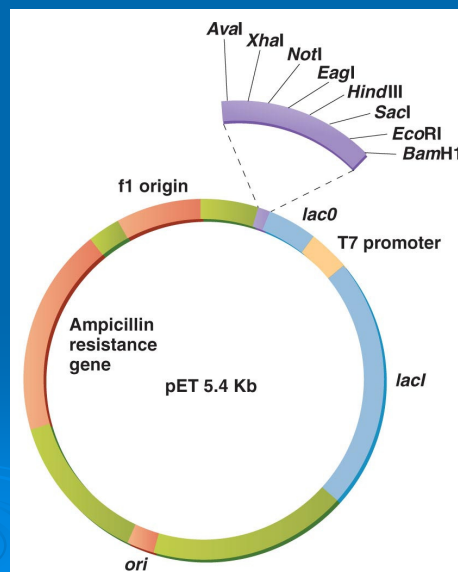


Fig. Pearson Education Inc., 2009

Maya Yapay Kromozomları Yeast Artificial Chromosomes (YAC)

- Kendine ait sentromer ve her iki uçta telomerlerin bulunması kromozom özelliği katmaktadır
- Kendini replike eden sekansa (ARS: Autonomously Replicating Sequence) sahip olduğundan replike olur
- Seçici maya genleri içerir
- RE kesim bölgesi bulunur
- 1 Mb DNA taşıyabilir !
- Maya hücresinde çoğalabilir
- İnsan Genom Projesinde kullanılmıştır

27

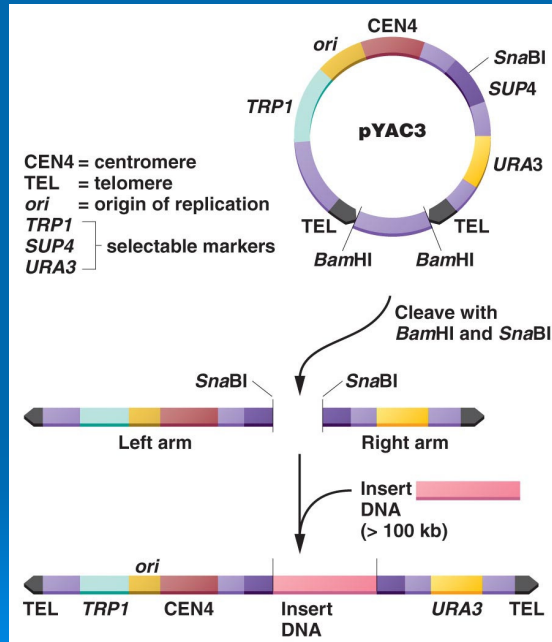


Fig. Pearson Education Inc., 2009

28

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Polymerase Chain Reaction (PCR)

- 1984: Mullis ve arkadaşlarının keşfi, daha sonra Nobel ödülü
- ng mertebesinde DNA'yı $>10^6$ kat çoğaltır
- Sıcaklığa dayanıklı (thermostable) DNA polimeraz (Taq, Vent, Pfu, vs.), gene özgü oligonükleotidler (primer) ve dNTP'ler ve tampon gereklidir.

29

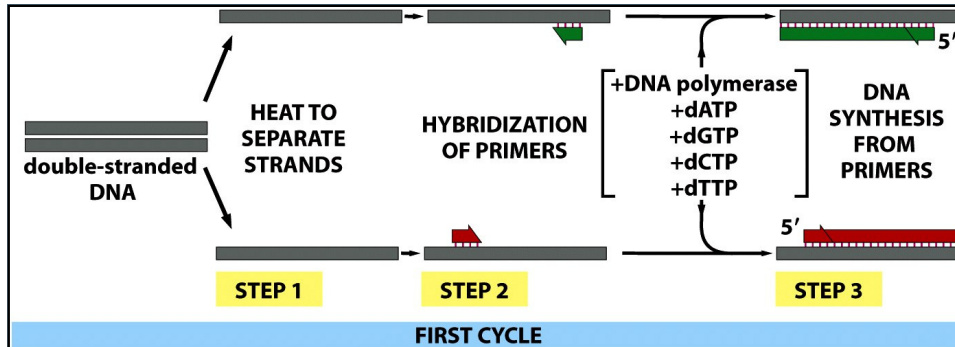
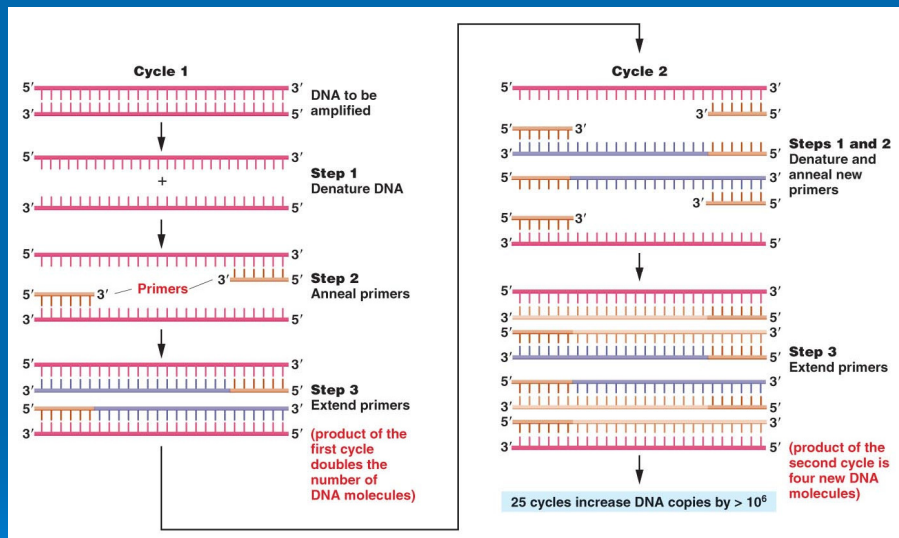


Figure 8-45a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Temel 3 aşama 30-35 döngü (cycle) tekrarlanır:

- 1. Denatürasyon (90-95 °C):** Dupleks DNA'nın (çift iplikçikli DNA) yüksek sıcaklıkta tek iplikçiklere ayrılması
- 2. Hibridizasyon (Annealing) (50-70 °C) :** Primerlerin uygun sıcaklıkta hedef DNA'ya bağlanması.
- 3. Amplifikasyon (Extension) (70-75 °C) :** DNA polimeraz ile primerin 3'OH grubuna nükleotitlerin eklenerek DNA'nın uzatılması.

30



N döngü sonrasında 2^{n+1} kopya

Fig. Pearson Education Inc., 2009

31



A Thermal Cycler

Örnek Protokol

Component	Volume (µl)	Final Concentration
ThermoPol Reaction Buffer (10X)	5 µl	1X
Deoxynucleotide Solution Mix (10 mM)	1 µl	200 µM
Upstream Primer (10 µM stock)	0.5–2.5 µl	0.1–0.5 µM
Downstream Primer (10 µM stock)	0.5–2.5 µl	0.1–0.5 µM
DNA Template	determined by user	
Vent DNA Polymerase*	0.1–0.5 µl	0.2–1.0 units
MgSO ₄	determined by user	1–6 mM
Nuclease free water	Bring reaction to a final volume of 50 µl	

Initial Denaturation	95°C	2–5 minutes
20–30 Cycles	95°C	15–30 seconds
	55–65°C	15–30 seconds
	72°C	1 minute per 1000 base pairs
Final Extension	72°C	5 minutes
Storage	4°C	∞

www.neb.com