

Rekombinant DNA teknolojisi

Doç. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI

Rekombinant DNA nedir?

- Farklı biyolojik kaynaklardan oluşturularak birleştirilen, doğada birlikte bulunmayan DNA molekülleri anlamına gelir.
- Rekombinant DNA molekülleri rekombinant DNA teknolojileri ile yapılır.

Rekombinant DNA 3 şekilde yapılır

- Transformasyon:
- Öncelikle vektöre eklenecek DNA parçası seçilir. İkinci olarak restriksiyon enzimleri ile bu parça kesilir. Ardından DNA ligaz ile birlikte DNA vektör içine eklenir. Vektör genellikle bir antibiyotik markırı içerir ki su sayede bu antibiyotiğe maruz kalındığında vektörlü host yaşarken vektörsüz host ölür.

Vektörün konakçı içine yerleştirilmesi işlemine transformasyon işlemi denir. En çok kullanılan konakçı hücre E. Coli. E.coli içine seçici markırları içeren vektörlerin yerleştirilmesi sayesinde transforme hücreler transforme olmamış hücrelerden ayrılır.

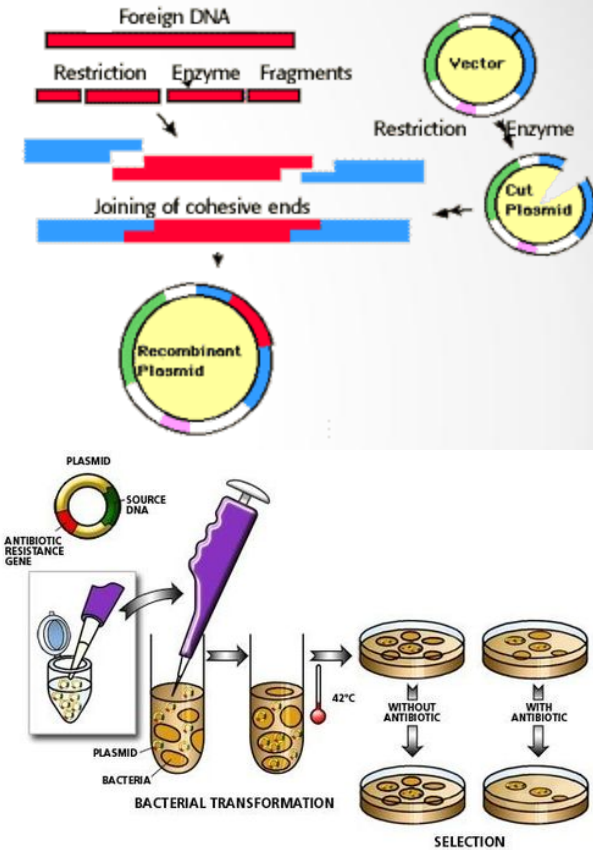


Table 8.3 Some commonly used antibiotics and antibiotic resistance genes.

Antibiotic	Mode of action	Resistance gene
Ampicillin	Inhibits bacterial cell wall synthesis by disrupting peptidoglycan cross-linking	β -Lactamase (<i>amp^r</i>) gene product is secreted and hydrolyzes ampicillin
Tetracycline	Inhibits binding of aminoacyl tRNA to the 30S ribosomal subunit	<i>tet^r</i> gene product is membrane bound and prevents tetracycline accumulation by an efflux mechanism
Kanamycin	Inactivates translation by interfering with ribosome function	Neomycin or aminoglycoside phosphotransferase (<i>neo^r</i>) gene product inactivates kanamycin by phosphorylation

Bakteriyel olmayan Transformasyon

Bu işlem bir öncekine çok benzer. Tek farklılık bakteriyel olmayan transformasyonda konakçı olarak E.coli gibi bir bakteri kullanılmaz.

mikroenjeksiyonda, DNA doğrudan transforme edilecek hücrenin çekirdeğine enjekte edilir.

biolistiklerde, konakçı hücre DNA kaplı tungsten veya altın partiküller gibi mikroprojektiler ile bombardıman edilir.

Faj girişi ile

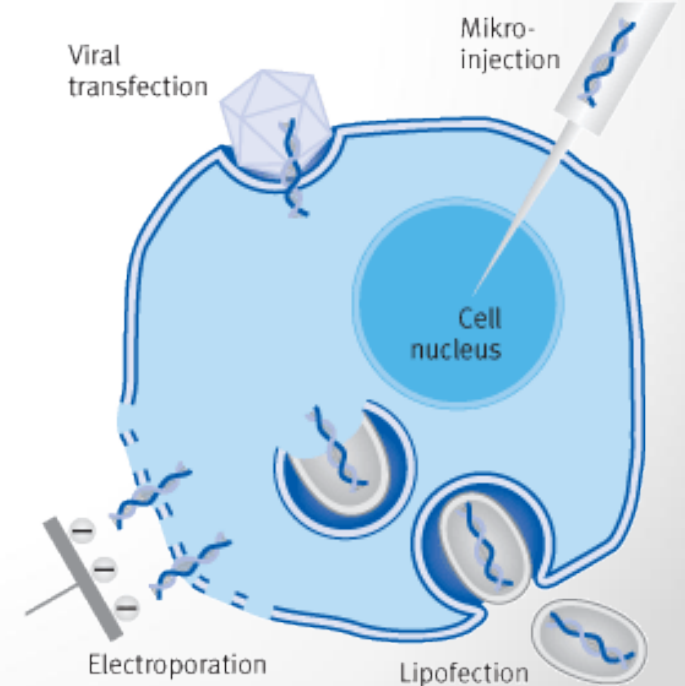
Faj girişi transformasyona eş bir transfeksiyon işlemidir.

Tek farklılık bakteri yerine fajlar kullanılır.

Bu anlamda lambda veya M13 fajları

rekombinanatları

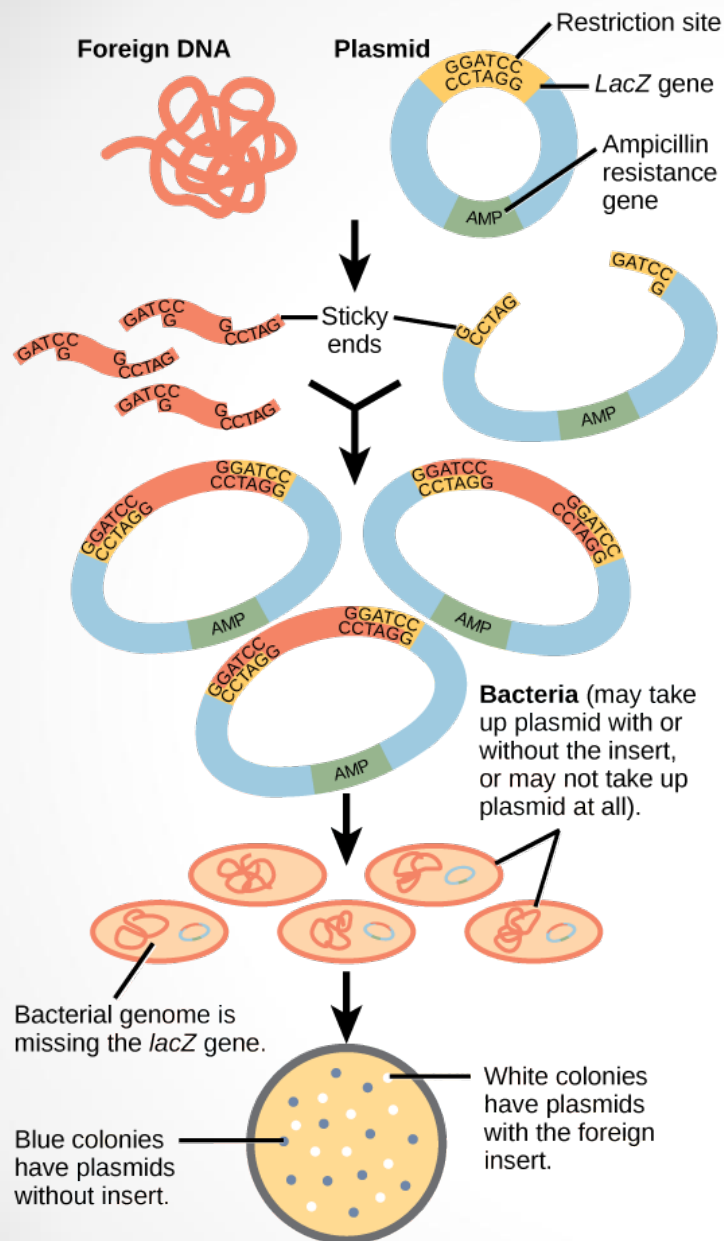
üretmek için kullanılırlar.



Bir rekombinant ürünün yapım aşamaları

- 1. DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması
- 2. Restriksiyon enzimleri ile küçük oligonükleotid fragmanlarının oluşturulması
- 3. Fragmanların vektör içine yerleştirilmesi
- 4. Vektörün konakçıya yerleştirilmesi
- 5. Konakçı replikasyonu gerçekleştirilerek istenilen ürün yeni nesillere geçer
- 6. Klonlanan ürünün eldesi ve analizi

Molecular Cloning



The foreign DNA and plasmid are cut with the same **restriction enzyme**, which recognizes a particular sequence of DNA called a *restriction site*. The restriction site occurs only once in the plasmid, and is located within the *lacZ* gene, a gene necessary for metabolizing lactose.

The restriction enzyme creates sticky ends that allow the foreign DNA and cloning vector to anneal. An enzyme called ligase glues the annealed fragments together.

The ligated cloning vector is transformed into a bacterial host strain that is ampicillin sensitive and is missing the *lacZ* gene from its genome.

Bacteria are grown on media containing ampicillin and X-gal, a chemical that is metabolized by the same pathway as lactose. The ampicillin kills bacteria without plasmid. Plasmids lacking the foreign insert have an intact *lacZ* gene and are able to metabolize X-gal, releasing a dye that turns the colony blue. Plasmids with an insert have a disrupted *lacZ* gene and produce white colonies.

Cloning or expression
vector (plasmid)

Eukaryotic chromosome



Digestion with restriction
endonucleases



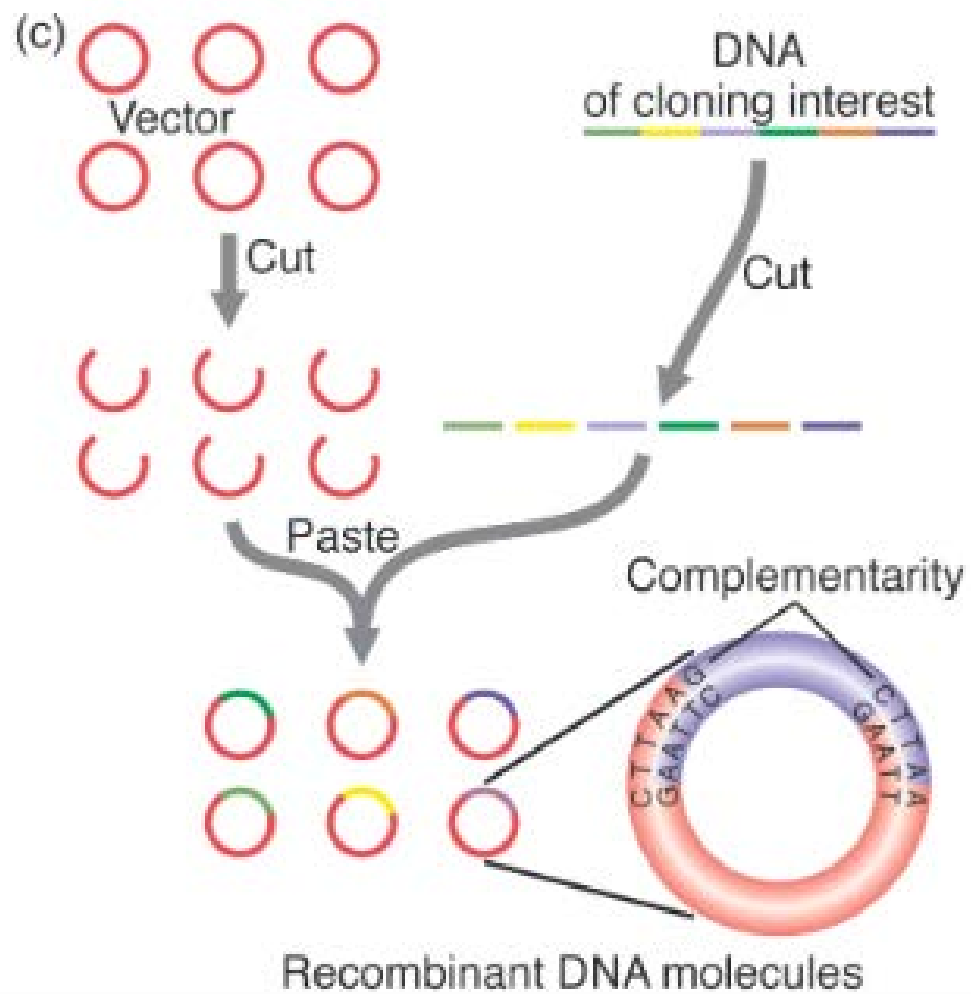
DNA fragment
containing gene
of interest



Ligation

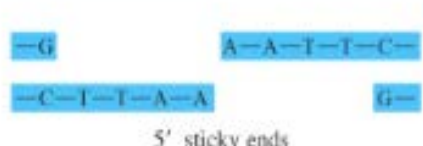
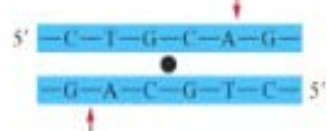
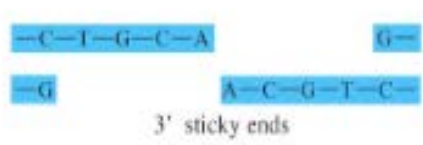
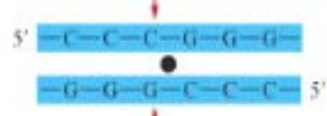


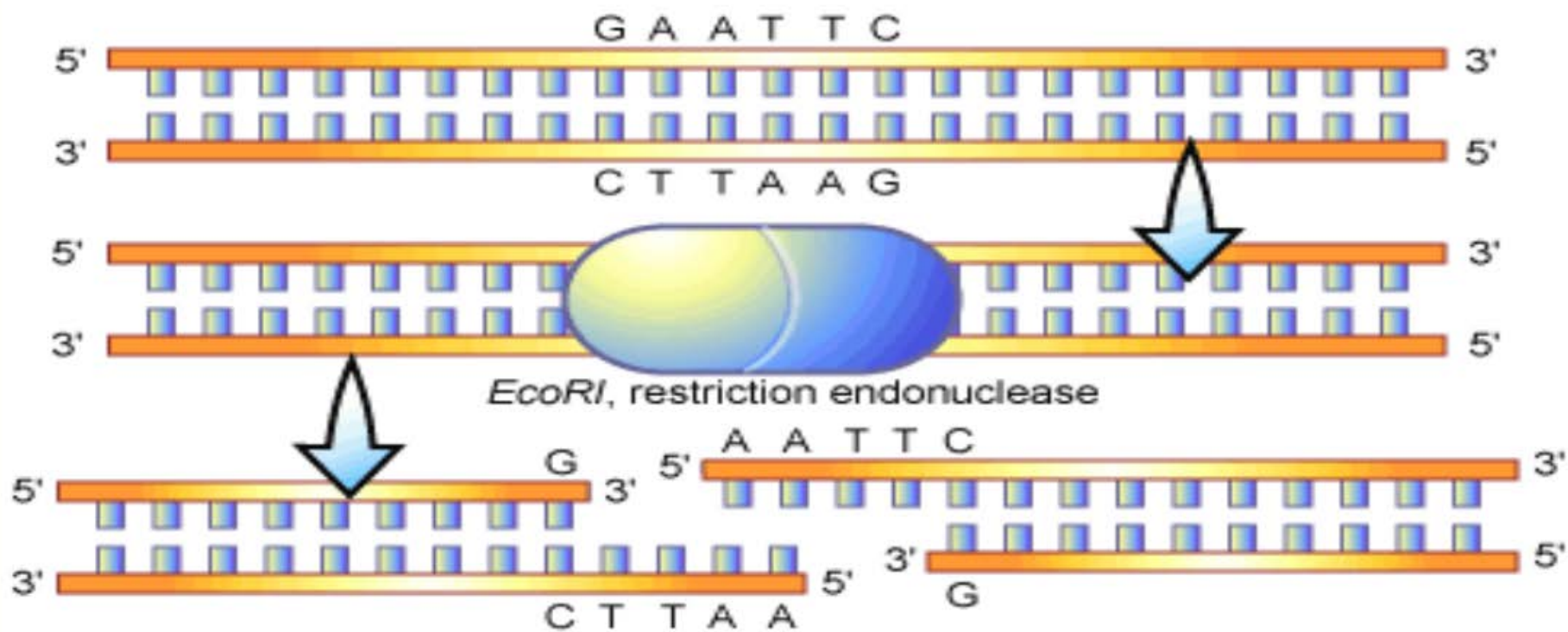
Recombinant plasmids



Restriksiyon enzimleri

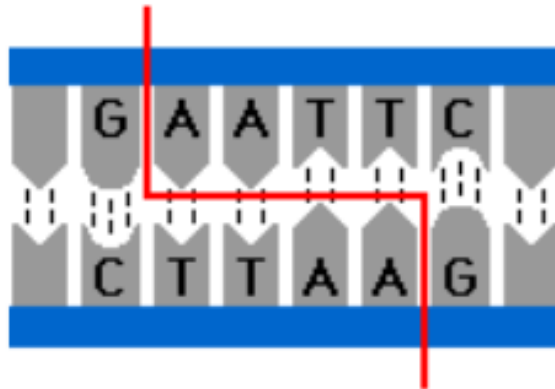
- Restriksiyon enzimleri spesifik tanıma bölgelerinden DNA'ya bağlanır
- Konakçı hücre kendi DNA'sını metilasyon sayesinde korur.

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		 5' sticky ends
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		 3' sticky ends
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		 Blunt ends

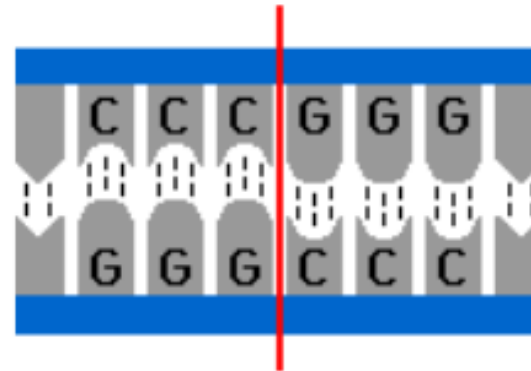


RE's recognize specific Palindromic sequences =
recognition sequences

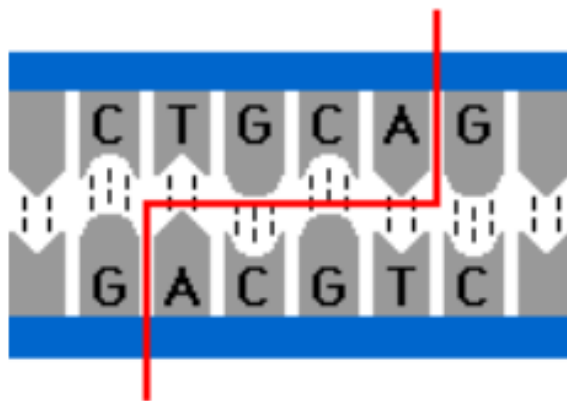
EcoRI



SmaI



PstI



cleavage in offset manner produces
overhangs that provide

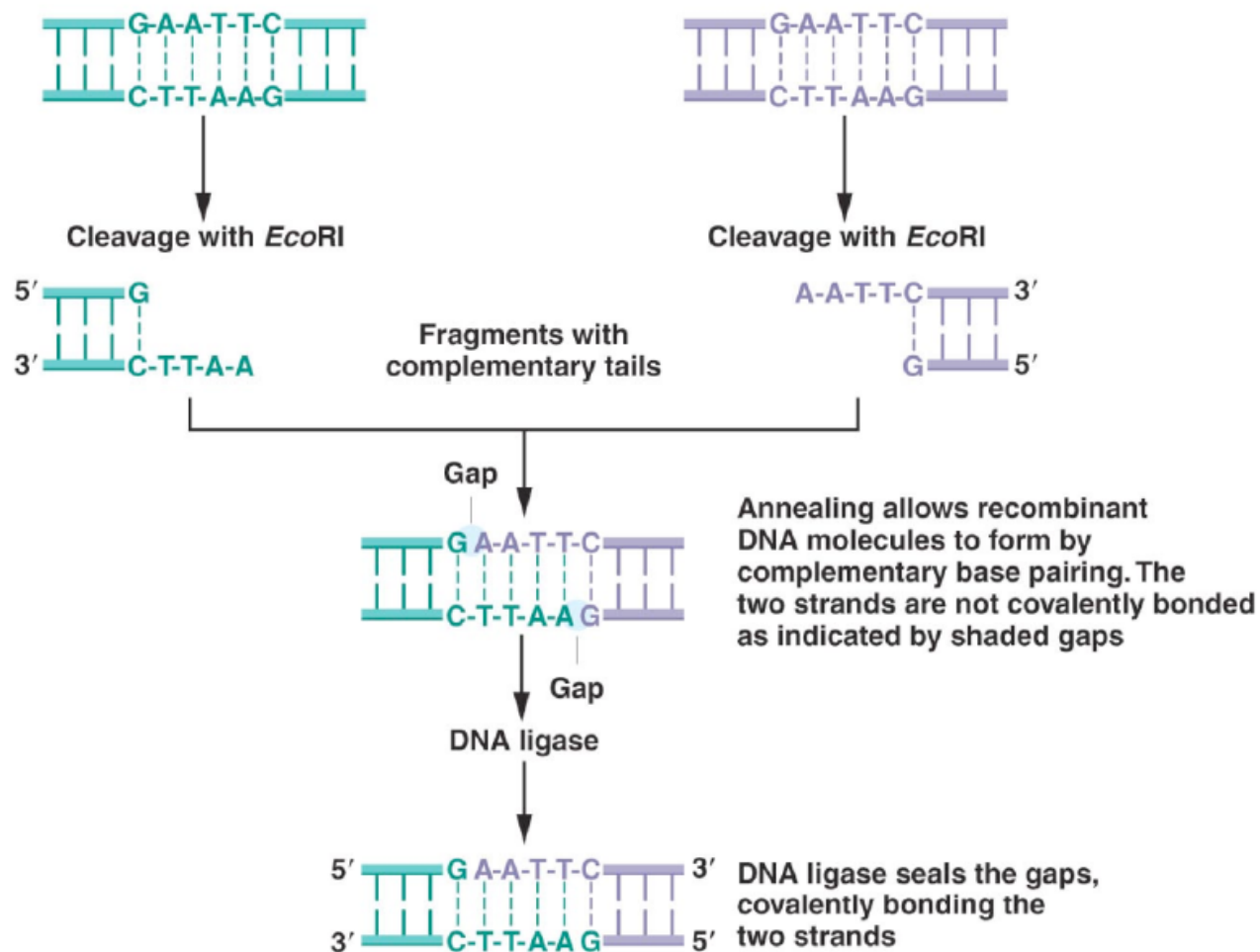
Restriksiyon enzimlerinin özellikleri

İzole edildikleri bakterinin adını alırlar

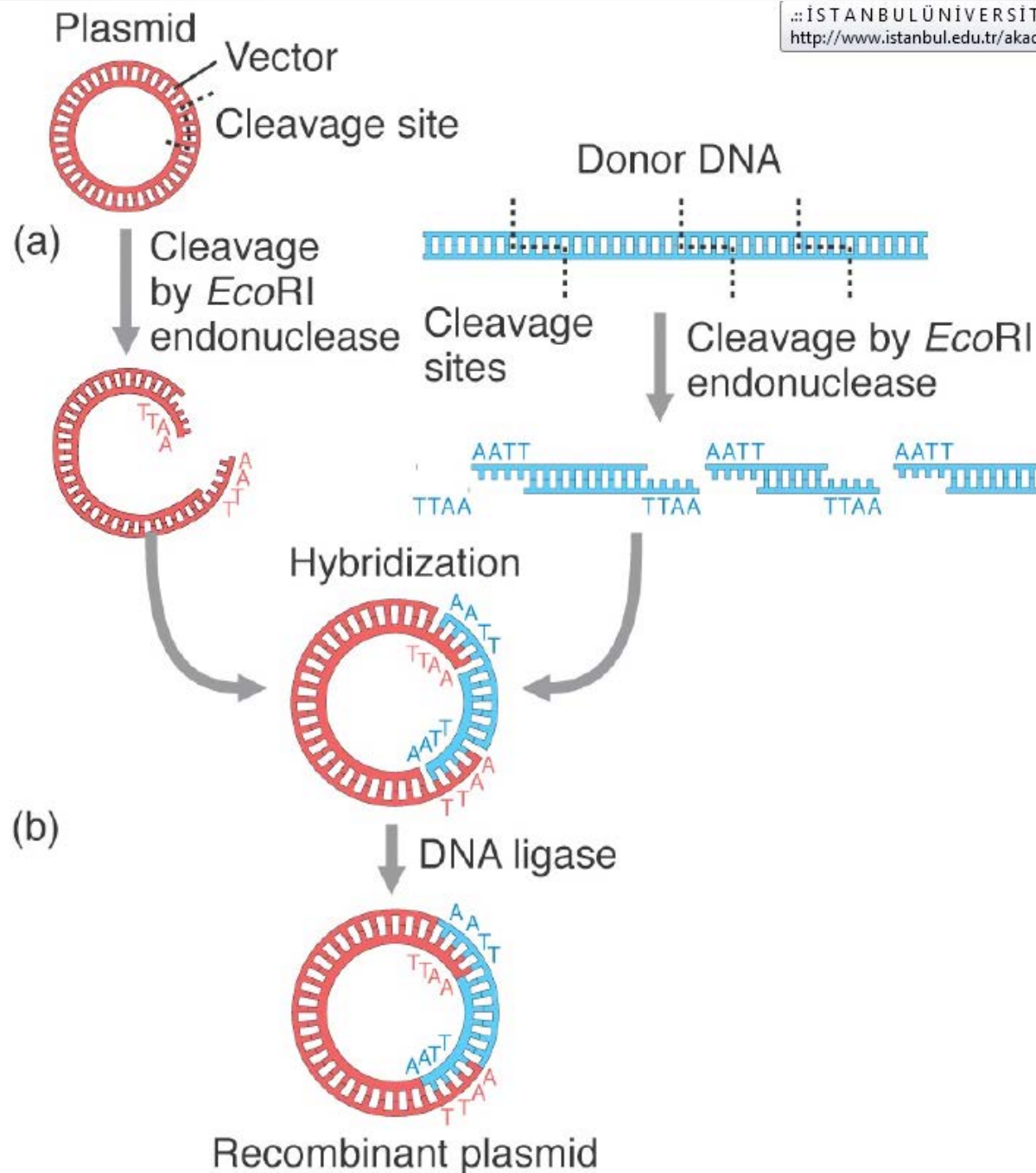
Örneğin EcoRI = E. Coli esheria coli'den izole edilmiştir

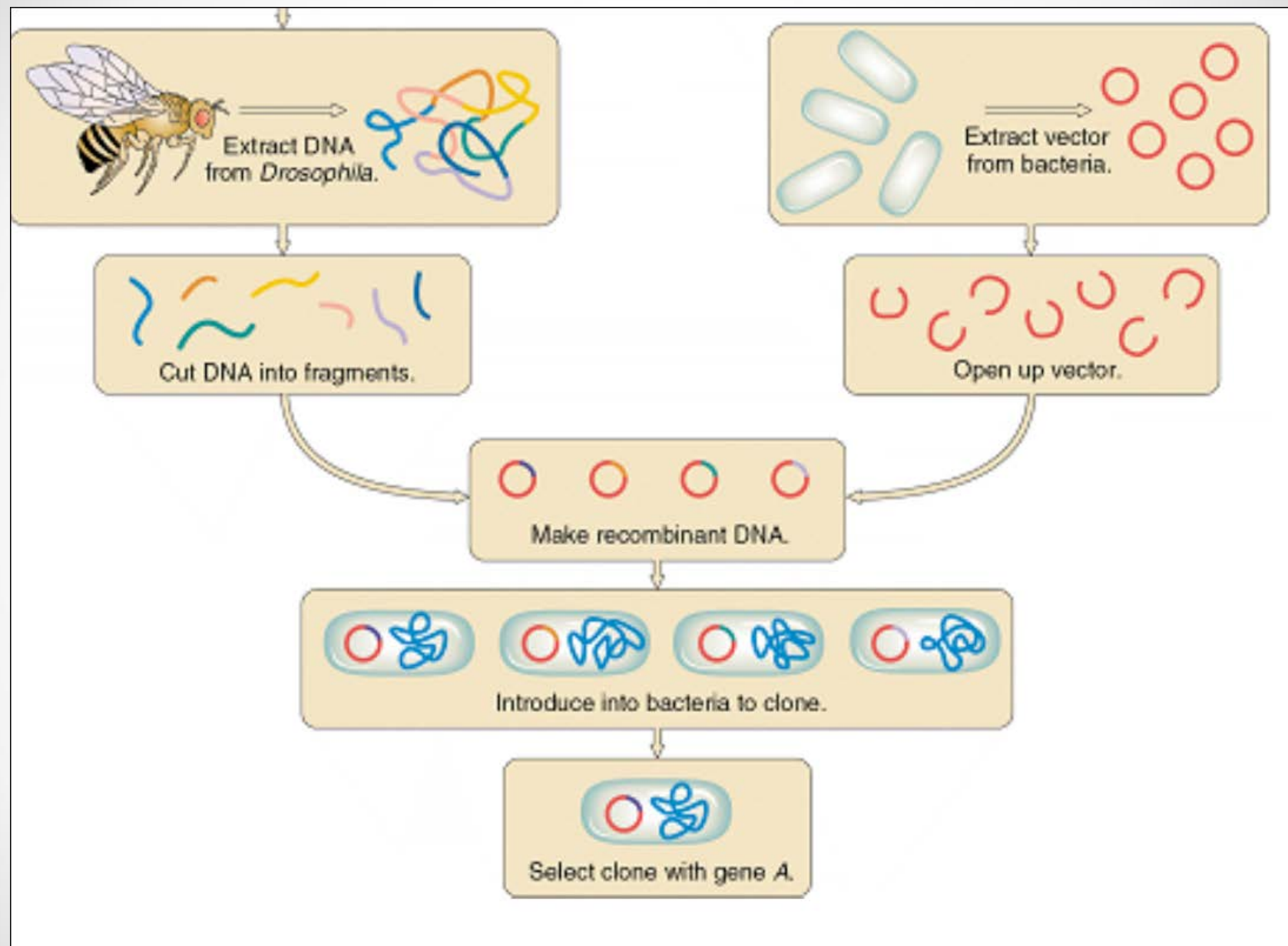
•Küt (Blunt) & Yapışkan (Staggered Cuts) uçlar

- SmaI = Küt uç
- EcoRI = Yapışkan uç(leaves a 5' overhang)
- PstI = Yapışkan uç(leaves a 3' overhang)
- DNA ligasyonu = Eğer uygun yapışkan iki uç varsa uçlar yapışır ve DNA ligaz iki DNA molekülü arasında fosfodiester bağı oluşturarak bu uçları yapıştırır.



- 1). Create Donor DNA fragment, via restriction digest
- 2). Add fragment to a vector, sticky ends hybridize to vector and are pasted using ligase
- 3). Donor DNA is replicated, transcribed and translated, and thus the recombinants can be selected.





Vektör Tipleri

1. Plazmid (5-10kb)
2. Bakterifajlar (10-40kb)
3. Kosmidler (50kb)
4. BACs, YACs (300-1000kb)

Klonlama vektörleri şunları içermeli

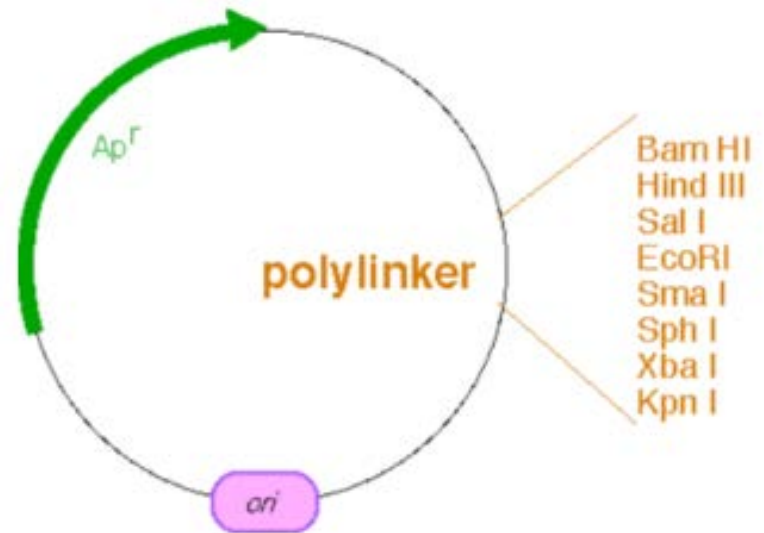
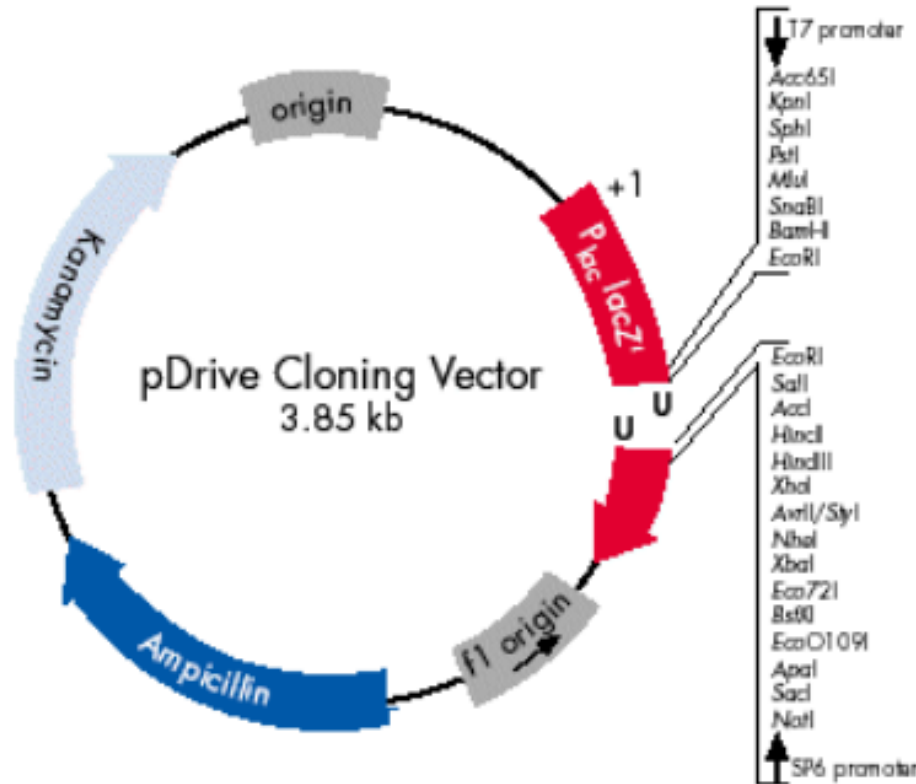
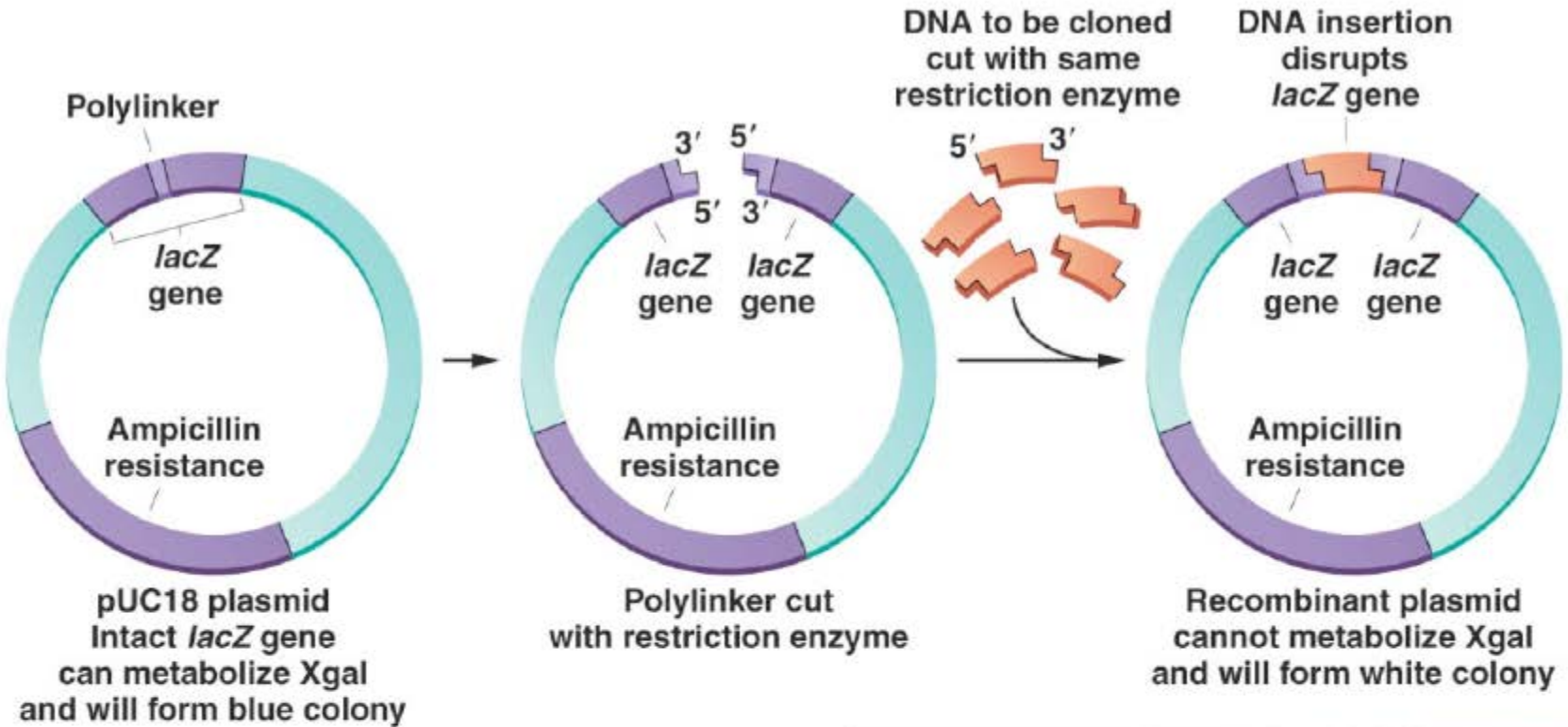


Table 8.2 Principal features and applications of different cloning vector systems.

Vector	Basis	Size limits of insert	Major application
Plasmid	Naturally occurring multicopy plasmids	≤ 10 kb	Subcloning and downstream manipulation, cDNA cloning and expression assays
Phage	Bacteriophage λ	5–20 kb	Genomic DNA cloning, cDNA cloning, and expression libraries
Cosmid	Plasmid containing a bacteriophage λ <i>cos</i> site	35–45 kb	Genomic library construction
BAC (bacterial artificial chromosome)	<i>Escherichia coli</i> F factor plasmid	75–300 kb	Analysis of large genomes
YAC (yeast artificial chromosome)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> centromere, telomere, and autonomously replicating sequence	100–1000 kb (1 Mb)	Analysis of large genomes, YAC transgenic mice
MAC (mammalian artificial chromosome)	Mammalian centromere, telomere, and origin of replication	100 kb to > 1 Mb	Under development for use in animal biotechnology and human gene therapy

1. Klonlama için kullanılacak olan plazmidler birkaç uygun restriksiyon alanı içermelidirler

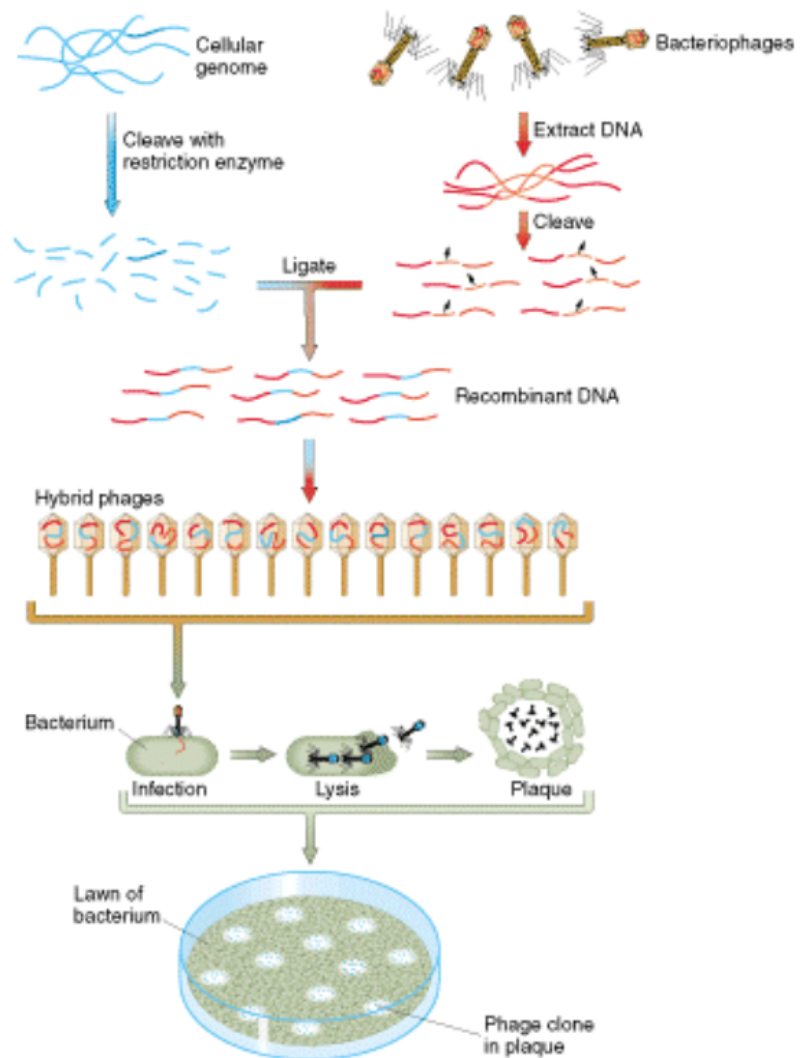
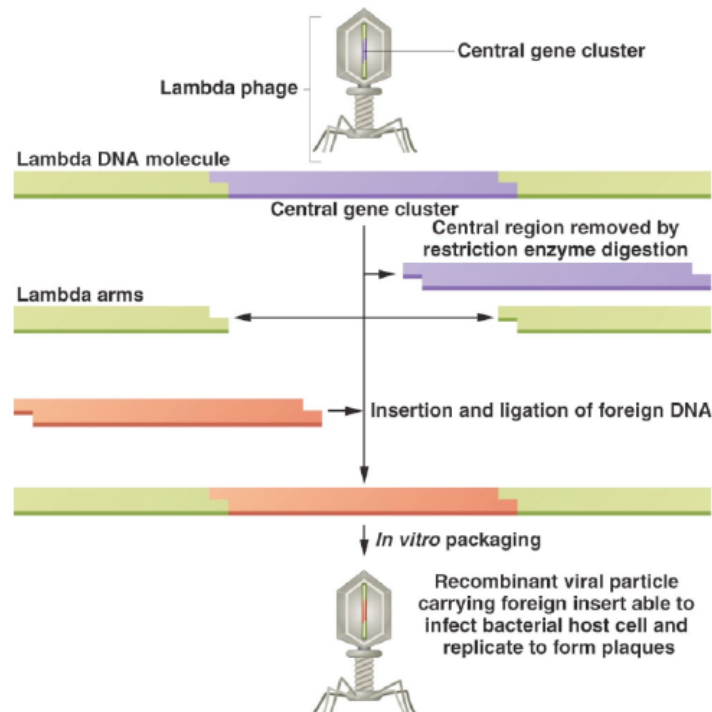




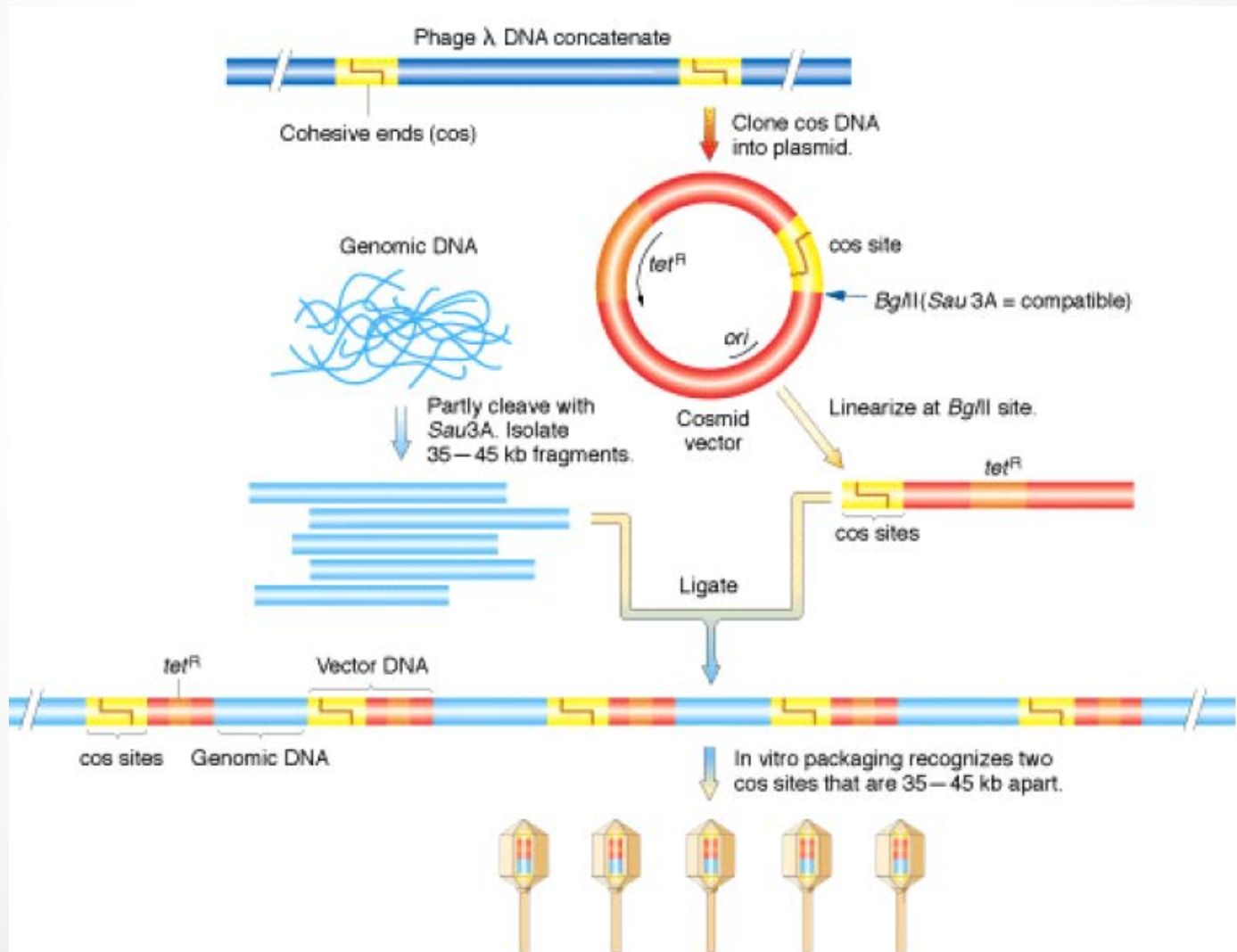
2. Bakteriyofajlar

B. Phage

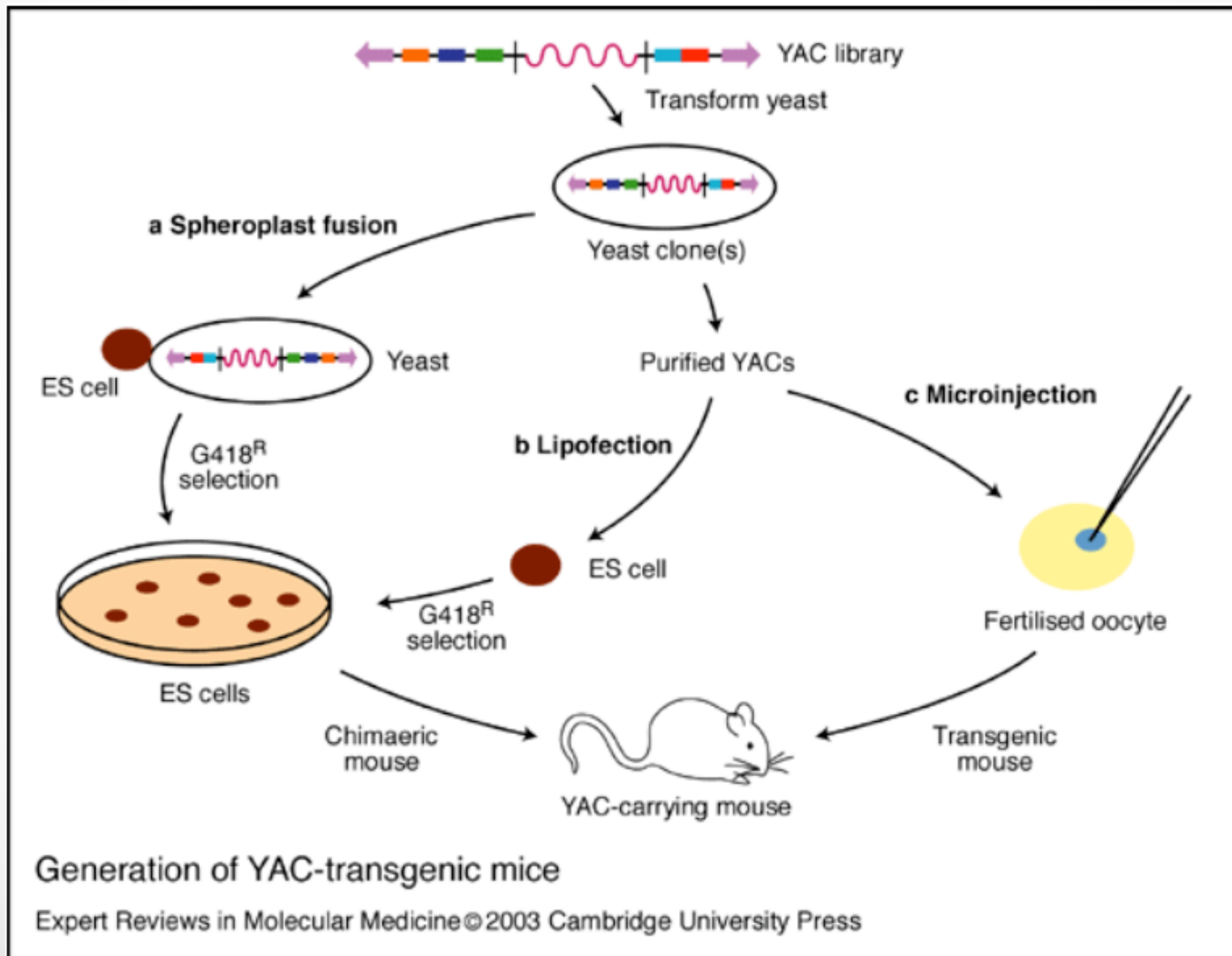
- The central third of **lambda (λ) phage** vectors can be replaced with foreign DNA without affecting the ability to infect cells and replicate
 - 1000X more efficient than plasmids



3. kosmidler: bakteriyofaj ve plazmid parçalarının birleştirilmeleriyle oluşturulmuştur

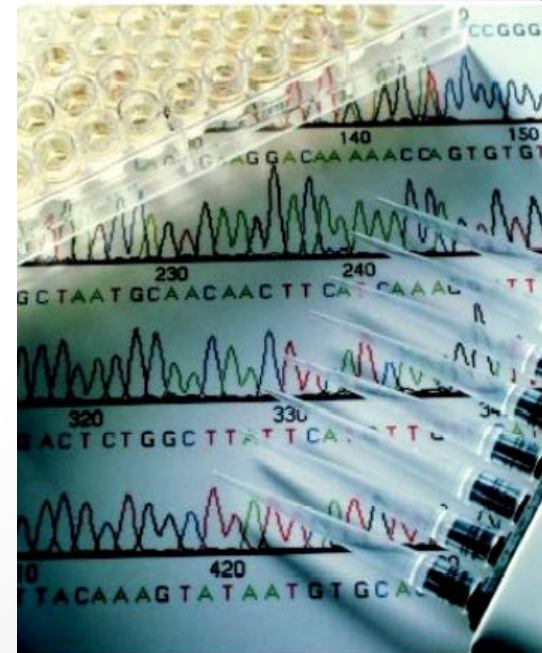


4. Yapay kromozomlar, BACs ve YACs



Moleküler teknikler

- RFLP
- PCR
- DNA Dizileme
- Hibridizasyon
- Genetik mühendisliği



RFLP

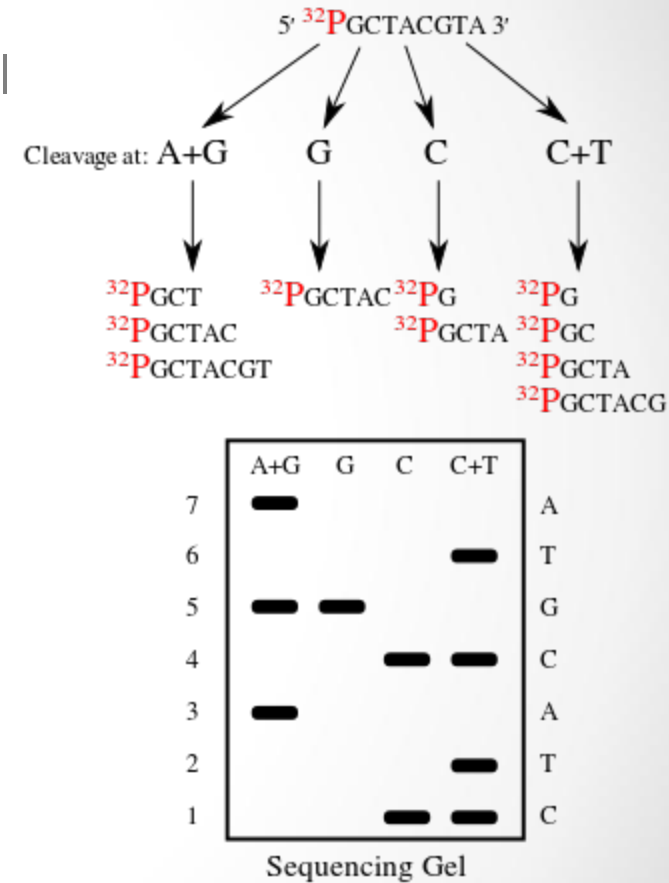
- DNA fragmanlarındaki değişiklikler restriksiyon enzimleri ile kesilerek üretilir.
- Restriksiyon haritalaması: Bir restriksiyon haritası klon DNA segmentinde restriksiyon alanlarının birbirine uzaklığını, dizilişini ve sayısını saptar.

Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan diğer yöntemler

- DNA nukleotid dizisinin hızlı bir şekilde saptanması
 - o Enzimatik Yöntem (Sanger Yöntemi)
 - o Kimyasal yöntem (Maxam-Gilbert Yöntemi)

DNA dizileme Yöntemi

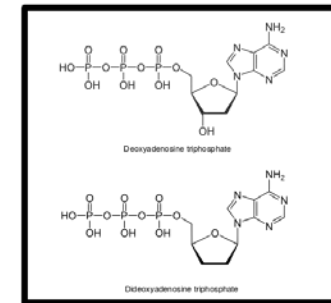
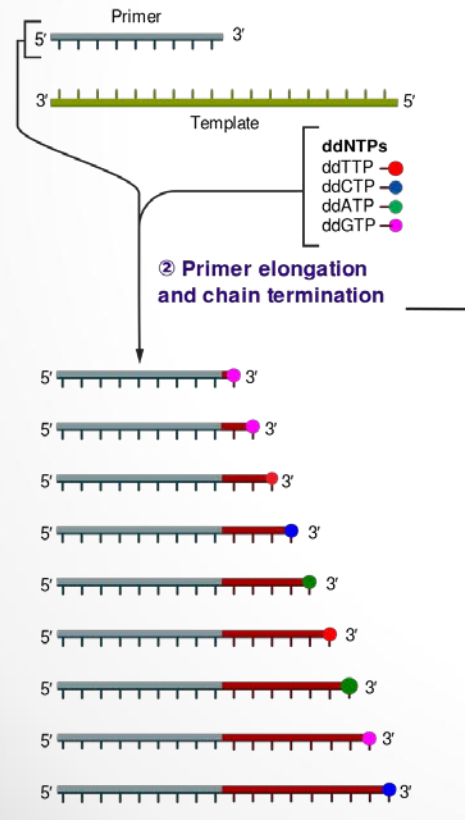
- 1976-1977'de Harvard Üniversitesi'nden Allan Maxam and Walter Gilbert, DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve ardından onun spesifik bazlarda kesilmesi esasına dayanan bir DNA dizileme yöntemi geliştirdi.
- Bu yöntem DNA'nın 5' ucunun radyoaktif olarak işaretlenmesini (gamma- ^{32}P ATP) ve sonra dizilenecek DNA parçasının saflaştırılmasını gerektirir. Dört farklı kimyasal reaksiyonda (G, A+G, C, C+T) uygulanan kimyasal işlemlerle, moleküllerin ufak bir kısmında, DNA'yı oluşturan dört nükleotid bazdan biri veya ikisinde kesikler meydana gelir.



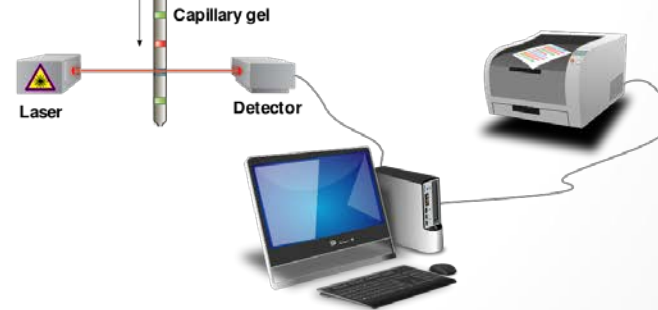
- Zincir sonlandırma yöntemi (veya Sanger yöntemi, onu geliştiren Frederick Sanger'e atfen) Maxam ve Gilbert yöntemine kıyasla daha verimli olduğu, daha az toksik kimyasal ve radyoaktivite gerektirdiği için kısa sürede hızla yaygınlaştı. Sanger yönteminin ana ilkesi zincir sonlandırıcı olarak dideoksinükleotit trifosfatlar (ddNTP'ler) kullanılmasıdır.

① Reaction mixture

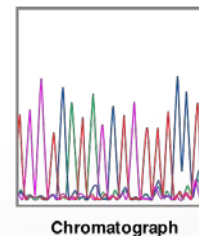
- Primer and DNA template
- DNA polymerase
- ddNTPs with flouochromes
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

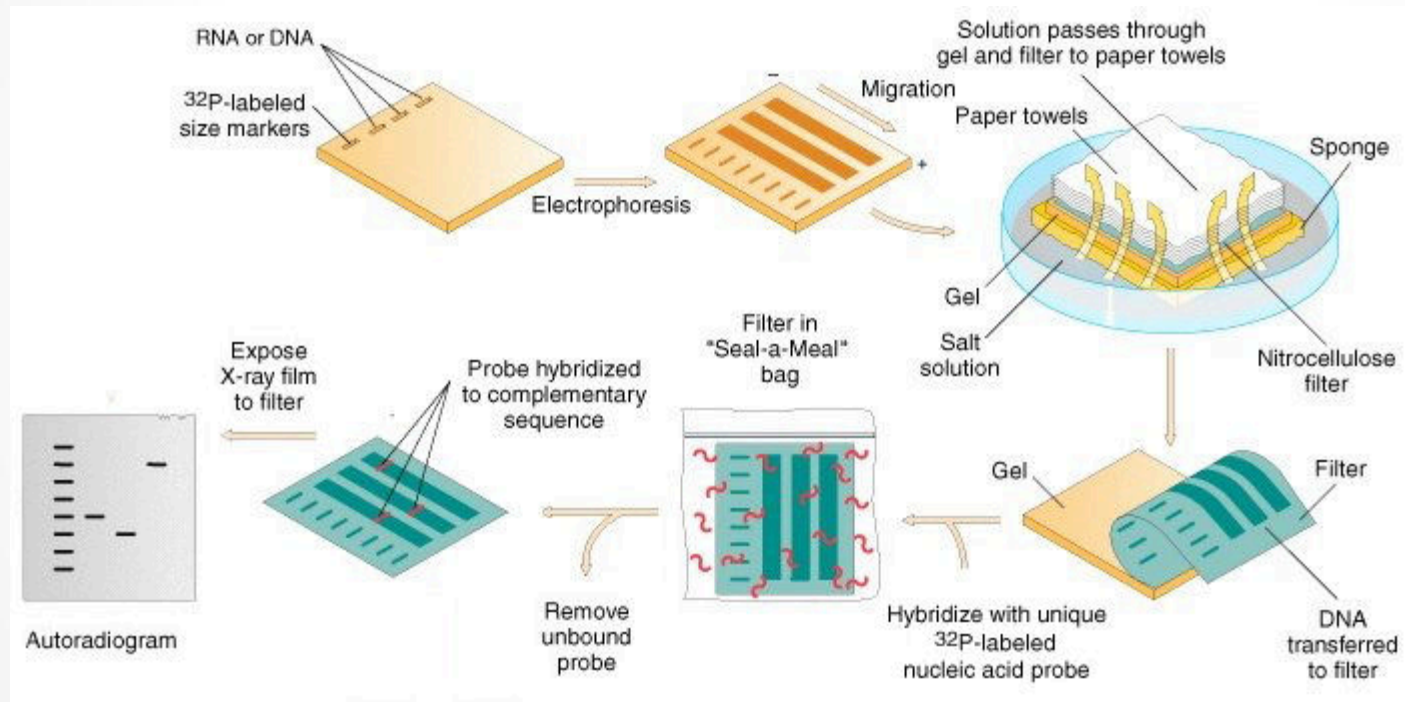


④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



• Nukleik asid hibridizasyonu

- o Southern transferi: DNA hibridizasyonu
- o Northern transferi: RNA hibridizasyonu



- **Genetik Mühendisliği,**

- o Transgenik bitkiler ve hayvanlar üretmek

- Transgen: Yabancı Gen

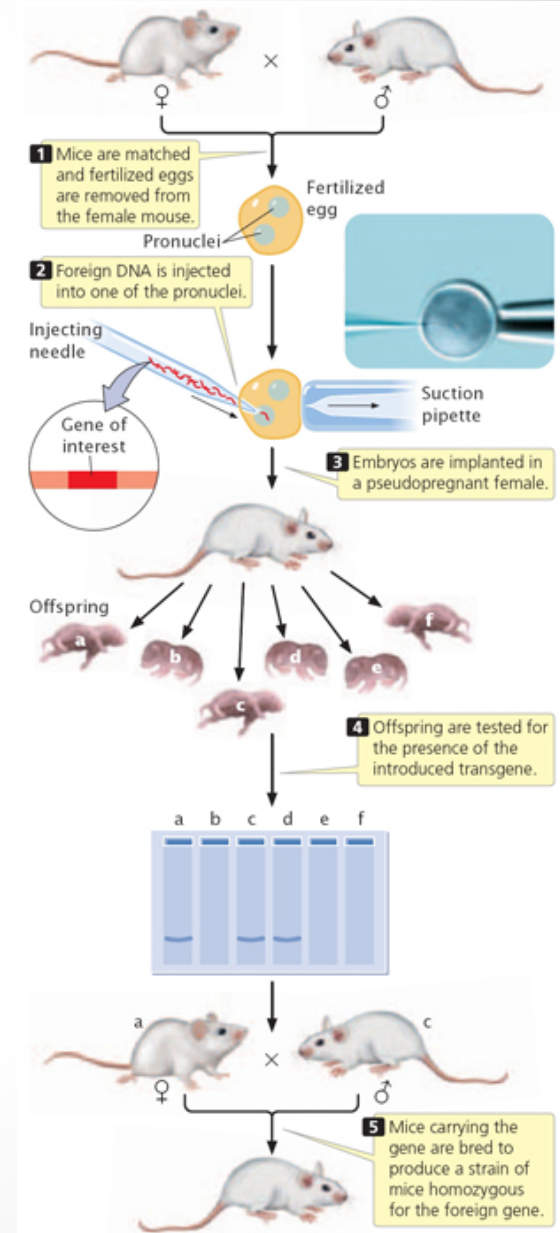
- Transgenik: Yabancı geni taşıyan organizma

- o Transgenik model oluşturmak

Hücrelere yeni gen nakli ile farklı özellikler taşıyan organizmaların üretilmesi

Transgenik hayvan oluřturma yöntemleri

1. Döllenmiş yumurtaya gen transferi ile transgenik hayvan üretimi
2. Embriyogenik kök hücrelerine gen transferi ile transgenik hayvan üretimi



Rekombinant DNA teknolojisinin biyomedikal önemi

- Prenatal tanı (Beta Talassemi)
- Birçok hastalığın moleküler seviyedeki patolojik tanıları, Diabet, Alzheimer vb.
- Genetik hastalıkların moleküler nedeni (Kalıtsal meme kanseri vb.)
- Kanser teşhisi (onkogenler, mutant genler)
- Rekombinant farmasötik ürünlerin üretimi (biyoteknoloji çalışmaları)
 - o Aşı üretimi
 - o Pıhtılaşma faktörlerinin üretimi
 - o İnsülin üretimi
- Gen terapi
- Viral ve bakteriyal enfeksiyonlarda patojenin tespiti (Hepatit virüsü v.b.)
- Adli tıpta suçlunun tayini, babalık tayini
- DNA çipleri
-