

GELENEKSEL ISLAH MODELLERİ GEN KLONLAMASI-REKOMBİNANT DNA

Okaryotik Canlılarda (Bitki ve Hayvanlarda) Kullanılan Islah yöntemleri

Islah: Bir hayvan veya bitki türünden daha iyi verim alabilmek amacıyla yapılan işleme verilen addır.

a-Geleneksel ıslah yöntemleri: Canlılar arasında istenilen özelliklere sahip canlıların seçilip çiftleştirilmesiyle ebeveynlere ait özelliklere sahip yeni canlıların elde edilmesidir. Modern genetiksel uygulamalara göre daha uzun sürede gerçekleşir.

b- Modern genetik uygulamaları: Geleneksel ıslah yöntemlerinden farklı uygulamalar yapılmaktadır. Bunlar: melezleme, gen aktarımı yapay dölleme, rekombinant DNA teknolojisi, klonlama, gen klonlaması poliploidi gibi uygulamalar gün geçtikçe yeni yöntemler bulunmaktadır.

1- Melezleme: Farklı genotiplere sahip ebeveynlerin çaprazlanmasıyla yeni bireylerin oluşmasıdır. Bir ırk içinde yapılan melezlemelerde zararlı çekinik genlerin bir araya gelme ihtimali artmaktadır. Tür içi kalıtsal çeşitliliğin oluşması için farklı karakterler bakımından homoziğot bireyler arasında melezlemelerin yapılması tür içi çeşitliliği ve kalıtsal çeşitliliği artırmaktadır. – **Aynı zamanda melezleme:** seçilen farklı karakter ve özelliklere sahip aynı veya komşu türler, alttürler veya varyeteler arasında çaprazlama yapılarak istenilen kalıcı özellikleri taşıyan yeni bitkiler meydana gelebilmektedir..

2. Yapay dölleme: Verimli olduğu düşünülen hayvanlara ait spermlerin sperm banklarında koruma altına alınmasıyla istenilen zamanlarda verimli yumurtaların döllemesini sağlamasıdır. Bu durumda verimli spermelerin verimli olduğu düşünülen yumurtaları dölleme başarısı yüksektir.

3. Poliploidi: Ökaryotik hücrelerde kromozom sayısının 3n ya da daha fazla olması durumlarını kapsar. Genellikle bitkilerde görülmele birlikte hayvanlarda da gözlenebilmektedir. Poliploid bitkiler diğer bitkilere göre daha büyük ve daha gösterişli olabilmektedir. -Poliploidi, bitkilerde ıslah amacıyla da kullanılmaktadır. Bu bitkiler, diploidlere oranla daha verimli olmaktadır. Örnek olarak arpa, buğday varyeteleri verilebilir.

Melezleme, yapay dölleme, poliploidi gibi ıslah çalışmaları biyoteknoloji ve gen mühendisliği kapsamında yapılmaktadır.

4. Rekombinant DNA teknolojisi:

-Farklı canlı kaynaklarında yer alan DNA parçalarının laboratuvar şartlarında birleştirilmesiyle oluşması istenilen DNA molekülüne **Rekombinant DNA** denir. -Bir arada bulunmayan farklı DNA'lara ait parçaların birleştirilmesidir. -Herhangi bir DNA parçasının kendini eşleme yeteneği olan başka bir DNA parçasına yerleştirilmesi ve bu yeni bileşimin çoğaltılması işlemidir. Bu yöntemle DNA'da istenilen her türlü değişim gerçekleştirilebilmekte ve değişik amaçlarla kullanılabilir. -Basitçe "iki farklı organizmanın DNA'larının birleştirilmiş şekli" olarak da tanımlanabilir. -İstenilen özelliğe sahip spesifik genin üzerinde bulunduğu DNA parçasını uygun **restriksiyon enzimleri** ile keserek uygun bir vektöre yerleştirip uygun canlılara aktardığımız, tüm gen işlemlerini kapsayan teknolojidir.

5. Gen klonlaması:

-Bilim adamlarının biyoteknolojik ve gen mühendisliği çalışmalarında bir genin üzerinde bulunduğu DNA parçasının kopyalanıp elde edilmesine **gen klonlaması** denir. -Gen klonlaması çalışmalarında genellikle **bakteriler** kullanılır. -Gen klonlamalarında bakterilerin kullanılmasının nedenleri: **gerek hızlı çoğalmaları, gerek basit yapı olmaları, yapılarının küçük olması gösterilebilir.**

Biyoteknoloji:

-Mühendislik ve teknolojik aletler kullanılarak canlılardan laboratuvar şartları altında geliştirilerek **yeni ürünlerin** elde etme sürecidir. - Özellikle DNA ve hücreyle ilgili konularda kullanılan biyolojik tekniklere verilen ad. -Özellikle bitki, hayvan, mikroskobik canlıların laboratuvar ortamı, kültür ortamlarında geliştirilerek yeni ürünlerin elde etme sürecidir. -mühendislik uygulamalarının canlı sistemlere uygulanmasıyla kısa sürede ticari boyutta oluşturulacak ürünlerin elde edilmesi sürecidir. - Ör: şeker hastalığının nedenlerinden biri olan insülin adlı hormonun bakterilere ürettirilmesi ve oluşan yapay hormonun ticari bir boyut kazanması örnek olarak verilebilir. -Biyoteknolojik olaylarla: Çeşitli hormonlar, kan pıhtılaşma ürünleri, enzimler, aşılarda, yiyecekler, gıda sanayisi, kirli suların arıtılması, suçluların bulunması, hastalıkların teşhis ve tedavisi gibi birçok yönde işlevsellik kazanmaktadır.

Gen Mühendisliği: Özellikle laboratuvar şartlarında canlıların genetik özelliklerinin değiştirilerek canlılara **yeni genetik özellikler kazandırmaktır.**

- Gen mühendisliği çalışmaları biyoteknolojik çalışmaları kapsayacak kadar genişir. -Gen mühendisliği :canlılara ait genlerin ayrıştırılması, başka canlılara aktarılması, çoğaltılması gibi çalışmaları kapsar. -Gen mühendisliği ile özelliklere canlılara yeni genetik ve kalıcı özellikler kazandırılır. - Son yıllarda büyük gelişmeler gösteren gen mühendisliği bilim dalı, tarımda ileri düzeyde üretim çeşitliliği yaratmak için çalışmalar yapmaktadır. - Veya canlıların genleriyle oynanmasıdır. Canlıların sahip olduğu DNA kodlarının değiştirilmesidir. DNA kodlamasının değiştirilmesidir. iyi insanların elinde ucu bucağı olmayan bir teknolojiyi kullanmaktadır. mutantların ortaya çıkışıdır.

Gen Mühendisliği çalışmalarında genellikle 3 farklı temel bulunur:

a- Rekombinant DNA elde edilmesi:
b- Canlı hücreden DNA veya genlerin ayrıştırılması(DNA izolasyonun gerçekleşmesi)
c- Rekombinant (iki bileşimli) DNA'nın başka hücrelere nakli

-Rekombinant DNA(iki bileşimli): İki farklı kaynaktan gelen DNA parçalarının birleştirilmesiyle oluşan yeni DNA molekülüdür.

- İki bileşimli DNA olarak bilinir. Farklı DNA'lardan alınan DNA moleküllerinin birleştirilmesiyle oluşan yeni DNA molekülüdür.

- Rekombinant DNA eldesinde farklı enzimler kullanılır: **Retriksiyon enzimleri ve DNA ligaz enzimleri**

-Retriksiyon enzimleri: bir DNA molekülü üzerinde bulunan pek çok genden istenilen(klonlanacak) (hedef gen) genin kesilip çıkarılmasını sağlayan enzimlerdir. Retriksiyon enzimleri plazmit ve istenilen genin bulunduğu DNA parçasını kesen enzimlerdir.

DNA ligaz enzimleri: Bunlar genelde iki farklı kaynaktan gelen farklı DNA parçalarını tek bir parça yapmak için kullanılır.

-DNA ligaz enzimleri retriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan genin plazmit(vektör) DNA'sıyla birleşmesini sağlar.

- Genellikle ökaryotik hücreden alınan genin(klonlanan genin) plazmit(vektör) ile birleştirilmesi sağlanır.

-DNA parçalarının ayrıştırılması (DNA) izolasyonu): çeşitli enzimler kullanılarak bir DNA üzerinde yer alan hedef genin ayrıştırılıp elde edilmesidir. Bu aşamada genellikle retriksiyon enzimleri kullanılır.

-Rekombinant (iki bileşimli) DNA'nın başka hücrelere nakli: rekombinant (iki bileşimli) DNA'nın başka hücrelere nakli aşağıda verilen yollarla gerçekleşir: **Elektroporasyon yöntemi, mikroenjeksiyon, transformasyon, gen tabancası yöntemleri** ile olur.

-Elektroporasyon yöntemi: Hücre içeren bir çözeltiye, önce elektrik dalgaları uygulamak suretiyle hücrelerin zarlarında oluşan geçici aralıklar veya delikler kullanılarak rekombinant DNA'nın yabancı hücreye aktarılıdır veya hücrelerin içerisine rekombinant DNA'yı sokma tekniğidir.

- Transformasyon yöntemi: Hücrelerin tuz çözeltisi yardımı ve sıcak-soğuk uygulamasıyla prokaryotik hücrelere ait plazma zarlarının geçirgenliklerinin artırılmasıyla rekombinant DNA'nın yeni hücreye aktarılmasıdır.

-Moleküler biyolojide transformasyon, bir hücrenin içine yabancı bir genin girmesi, bu DNA'nın genomunun parçası haline gelmesi ve DNA'daki genlerin ifade olması sonucu, o hücrenin değişime uğramasıdır. Belli tip transformasyonlar için daha özel terimler kullanılır: DNA'nın hücre içine girmesi bir virüs aracılığıyla olursa buna **transdüksiyon** denir; DNA bakteriyel hücrelerinin birbiriyle teması sonucu birinden öbürüne aktarılmasısa buna konjugasyon denir; doku kültüründeki hücrelerin transformasyonuna transfeksiyon denir. Sifat hali olarak, yani "transformasyona uğramış" anlamında, **'transforme'** kullanılır.

-Mikroenjeksiyon yöntemi: çok ince ve uzun uçlu iğneler yardımıyla rekombinant DNA'nın yeni bir hücreye aktarılması tekniğidir.

-Gen tabancası yöntemi: Bu yolla rekombinant DNA'nın , genellikle altın veya tungstenden oluşan 1-3 mm boyutunda mikroparacıklar, tedavi edici geni taşıyan plazmit DNA'sı ile kaplanır, sonra da bu paracıklara hız kazandırılarak hücre zarını delip, içeri girmeleri sağlanır.

GELENEKSEL ISLAH MODELLERİ GEN KLONLAMASI-REKOMBİNANT DNA

-Gen klonlaması: Rekombinant DNA olan ikili bileşimli DNA oluşması için genin DNA üzerinde bulunduğu yerden kesilip kopyalanmasına **gen klonlaması** denir.

- İstenilen genin(hedef gen) bir taşıyıcıya (vektör= plazmit, virüs) eklendikten sonra bir bakteriye aktarılması sonucu bakteri içerisinde hedef genin pek çok kopyasının oluşmasıdır.

-Örneğin insan ökaryotik hücrede insülin proteinin üretilmesi için şifre veren genin DNA üzerinde retriksiyon enzimi ile kesildikten sonra DNA ligaz enzimi yardımıyla plazmit DNA'sıyla birleştirilip bakteri hücresine konulması sonucu bakteri hücresinde insülin proteinin üretilmesi olarak gösterilebilir.

-Bir DNA parçası olan genin ve DNA'nın bakterilere eklenmesinde genellikle plazmitler kullanılır.

-Plazmit: Genellikle bakteri sitoplazmasında bakteriyel kromozomdan bağımsız olarak kendini eşleyebilen, kendi kendine bölünebilen, küçük halkasal yapıdaki DNA parçaları olarak tanımlanır.

Plazmid, kendi kendini eşleyebilen, kromozomdan ayrı bir DNA parçasıdır.

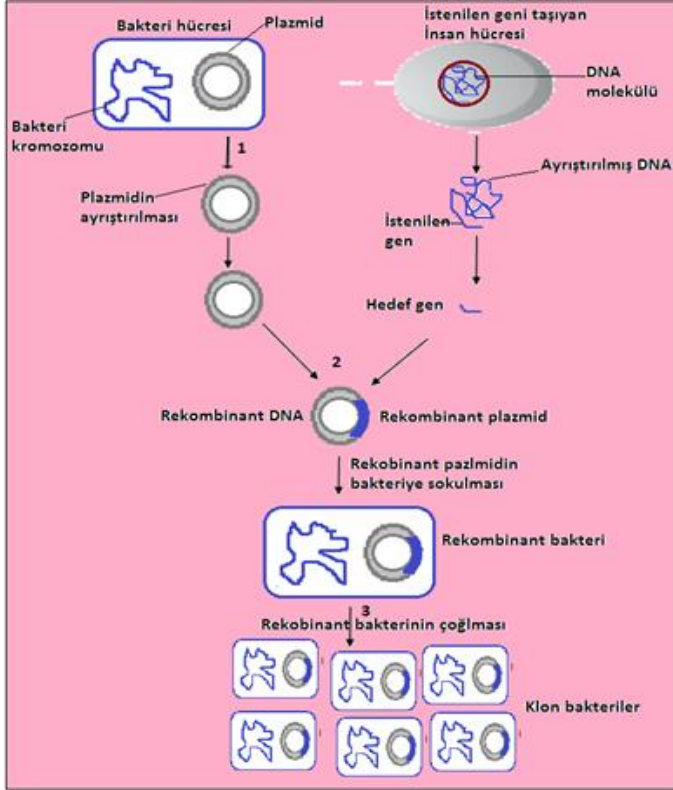
-Tipik olarak dairesel ve çift sarmalıdır. Genelde bakterilerde, bazen ökaryotlarda da (örneğin *Saccharomyces cerevisiae*'deki 2 mikrometre plazmid) bulunur.

-Plazmitler bakterilerin antibiyotige karşı direnç kazanmasını veya birbiriyle birleşmesini sağlayan mini kromozomlar olarak kabul edilebilir.

- Plazmitler konjugasyon sırasında bir bakteriden diğer bir bakteriye aktarılabilmektedirler.

-Gen klonlamada bakterilerin kullanılmasının nedenleri olarak: bakterilerin gerek hızlı çoğalmaları, gerek basit yapıları olmaları, gerek küçük olmaları nedeniyle biyoteknolojik çalışmalarda bakteriler kullanılmaktadır.

Gen klonlaması örneği aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



bu işlemlerde gerçekleşen bazı aşamaları aşağıda verildiği gibi özetleyebiliriz.

1. İstenilen (hedef gen) genin taşıdığı DNA molekülünde yer alan genin önce tespit edilir.
2. Retriksiyon enzimi kullanılarak ökaryotik DNA üzerindeki genin kesilip ayrıştırılır (izole edilir).
3. Yine aynı enzim kullanılarak vektör (plazmid, virüs) DNA'sının belli bir kısmından kesilir.
4. DNA ligaz enzimi kullanılarak ökaryotik hücreden gelen hedef genin vektör DNA'sıyla birleştirilir ve bu aşamada rekombinant DNA (iki bileşimli DNA) elde edilir.
- 5- Rekombinant DNA'yı taşıyan vektör bakteri hücresine aktarılır. Burada rekombinant bakteri elde edilmiştir.
- 6- rekombinant DNA'nın bulunduğu bakteriler kültür ortamında çoğaltılmasıyla yeni bakteriler (klon) oluşur. (Klon: eşeysiz üremeye oluşmuş genetik yapısı aynı olan canlıların bulunduğu yapılar) zamanla sayıları artan klonlardan istenilen genin taşıyan bakteriler ayırılır.

7. İstenilen genin taşıyan (Rekombinant DNA'yı taşıyan bakteriler) ayrıştırılarak farklı amaçlar için kullanılır.

8. İstenilen genin taşıyan bakteriler farklı uygulamalara tabi tutularak istenilen gen(hedef gen) ve genin şifre vermesiyle bakteri sitoplazmasında oluşan proteinler ayrıştırılır ve amaç doğrultusunda kullanılır.

9. İstenilen yani hedef gen yani ökaryotik hücreden kesilip ayrıştırılan gen ökaryotik hücrede hangi proteinin oluşması için veriyorsa bakteri hücresinde de aynı proteinin sentezi için şifre verecektir. Yani istenilen gen (hedef gen) bakteri sitoplazması ve ökaryotik hücrede aynı proteinin sentezi için şifre verecektir ve her iki durumda oluşan proteinler aynı yapıda olacaktır.

Gen klonlamasıyla:

- Hastalıklarla mücadele daha da kolaylaşmaktadır.

-Normal yollarla elde edilmesi zor olan veya çok pahalıya mal olacak ilaçların üretimi(ör:insülin hormonunun üretimi) mümkün olabilmektedir.

-Bu yolla üretilen insülin hormonu şeker hastalığında kullanılmaktadır.

- bitkiler gen aktarımı bitkilerin zararlılara karşı daha dayanıklı olabilmektedir.

- ilaçlar tedavisi mümkün olmayan virüs kökenli hastalıklara karşı mücadele için aşı üretilebilmektedir.

Bu yolla büyüme hormonu, insülin hormonu, kalsitonin hormonu tiroksin hormonu üretilebilmektedir.

- Enzimler, hormonlar, aşılarda, pıhtılaşma faktörleri, antibiyotik, interferon üretimi de mümkündür.

-Rekombinant DNA(iki bileşimli): İki farklı kaynaktan gelen DNA parçalarının birleştirilmesiyle oluşan yeni DNA molekülüdür.

- İki bileşimli DNA olarak bilinir. Farklı DNA'lardan alınan DNA moleküllerinin birleştirilmesiyle oluşan yeni DNA molekülüdür.

- Rekombinant DNA elde edilmesinde farklı enzimler kullanılır: Retriksiyon enzimleri ve DNA ligaz enzimleri

-retriksiyon enzimleri: Bir DNA molekülü üzerinde bulunan pek çok genden istenilen(klonlanacak) (hedef gen) genin kesilip çıkarılmasını sağlayan genlerdir. Retriksiyon enzimleri plazmit ve genin bulunduğu DNA parçasını kesen enzimlerdir.

-retriksiyon enzimleri ve DNA ligaz enzimleri rekombinant DNA yapımında kullanılır.

DNA ligaz enzimleri: Bunlar genelde iki farklı kaynaktan gelen farklı DNA parçalarını tek bir parça yapmak için kullanılır.

-DNA ligaz enzimleri retriksiyon enzimleri kesilmiş olan genin plazmit(vektör) DNA'sıyla birleşmesini sağlar.

- Genellikle ökaryotik hücreden alınan genin(klonlanan genin) plazmit(vektör) ile birleştirilmesi sağlanır.

-DNA parçalarının ayrıştırılması (DNA izolasyonu): Çeşitli enzimler kullanılarak bir DNA üzerinde yer alan hedef genin ayrıştırılıp elde edilmesidir. Bu aşamada genellikle retriksiyon enzimleri kullanılır.

-Rekombinant (iki bileşimli) DNA'nın başka hücelere nakli: Rekombinant (iki bileşimli) DNA'nın başka hücelere nakli aşağıda verilen yollarla gerçekleşir: Elektroporasyon yöntemi, mikroenjeksiyon, transformasyon, gen tabancası yöntemleri ile olur.

