

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

© Copyright 2021

Bu kitabın, basım, yayın ve satış hakları Akademisyen Kitabevi A.Ş.'ne aittir. Anılan kuruluşun izni alınmadan kitabın tümü ya da bölümleri mekanik, elektronik, fotokopi, manyetik kağıt ve/veya başka yöntemlerle çoğaltılamaz, basılamaz, dağıtılamaz. Tablo, şekil ve grafikler izin alınmadan, ticari amaçlı kullanılamaz. Bu kitap T.C. Kültür Bakanlığı bandrolü ile satılmaktadır.

ISBN

978-625-7451-13-0

Kitap Adı

Rekombinant DNA Teknolojisi

Yazar

Bilge Hilal ÇADIRCI

ORCID iD: 0000-0003-1525-9608

Yayın Koordinatörü

Yasin Dilmen

Sayfa ve Kapak Tasarımı

Akademisyen Dizgi Ünitesi

Yayıncı Sertifika No

47518

Baskı ve Cilt

Vadi Matbaacılık

Bisac Code

TEC000000

DOI

10.37609/akya.347

GENEL DAĞITIM

Akademisyen Kitabevi A.Ş.

Halk Sokak 5 / A

Yenişehir / Ankara

Tel: 0312 431 16 33

siparis@akademisyen.com

www.akademisyen.com

ÖNSÖZ

1950’li yıllarda temelleri atılan ve günümüzde özellikle kimya ve biyoloji gibi temel alanlar olmak üzere tüm dünyada popülerliği artan rekombinant DNA teknolojisi; genetik mühendisliği alanı da dahil olmak üzere, gen işleme, gen klonlama ve genetik modifikasyon tekniklerini içermektedir. İnsanoğlunun yaşamı anlama iç güdüsü ile başlayıp derinlemesine incelendiğinde daha büyük ufuklar açan bu teknikler, tıptan gıdaya, tarım ve hayvancılıktan tekstile pek çok endüstriyel üretimin verimliliğinde pozitif fark ortaya çıkarmıştır. Verimlilikte meydana gelen bu artış işletmelerin bu tekniklere daha fazla kaynak aktarmalarına ve Ar-Ge yatırımlarında önemli bir pay ayırmalarına neden olmuştur.

Modern dünya, ülkeler arasındaki rekabeti daha da sert bir hale getirmiştir. Artık “milli” olan bilimsel gelişmelerin yanı sıra “know how” gelirlerinin önemli bir artış göstermesi ülkeleri yeni çalışmalarda bilim insanlarını destekleme konusunda daha da cesaretlendirmiştir. Milli çıkarlar hayati önem kazanmış ve özellikle genetik bilimindeki gelişmeler milli biyoçeşitliliklerini ülkelerin kendi ellerinde tutma önemini artırmıştır. Gelişmiş ülkelerin eline geçecek olan bu çeşitlilikler ülkeleri başka ülkelerin “kölesi” olmaktan daha öteye götürmeyecektir! Bu amaçla hem bu önemi vurgulayabilmek hem de Türk bilim camiasına katkı sağlamak için bu kitabımı yazma gayreti içerisine girdim. Kitapta her ne kadar rekombinant DNA teknikleri anlatılsa da, ara ara tekniğe ilham veren veya konunun anlaşılması için gerek görülen ilgili temel moleküler biyoloji bilgilerine de yer verilmiştir. Kitabın hazırlanmasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Ataç UZEL’e, bana ilham veren notlarını paylaştığı için teşekkür ederim. Ayrıca kitabın düzenlenmesinde ve resimlerin çiziminde bana yardımcı olan meslektaşlarım Dr.Hakan KARADAĞ ve Dr. Cem EMEKSİZ’e teşekkürü bir borç bilirim.

Kitabımın tıptan eczacılığa, biyomühendislikten moleküler biyolojiye, biyoloji bilimleri ile ilgilenen tüm meslektaşlarıma ve öğrencilere faydalı olmasını dilerim...

2021

Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	iii
GİRİŞ.....	1

I. KISIM

BÖLÜM I: GENETİK MATERYAL VE BİYOTEKNOLOJİ

1. Nükleik Asit Kimyası.....	4
1.1. Azotlu Baz.....	4
1.2. Pentoz Şeker.....	5
1.3. Polinükleotidler.....	6
2. DNA' nın Yapısı.....	8
2.1. Watson-Crick Modeli.....	8
2.2. Baz Eşleşmesi.....	9
2.3. DNA Farklı Sarmal Formları.....	10
2.4. DNA'da Özel Baz Dizilimleri.....	12
2.5. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats).....	13
2.5.1. Nükleik Asit Temelli Bağışıklık Mekanizması: CRISPR sistemi.....	14
3. RNA' nın Yapısı.....	15
3.1. Katalitik RNA'lar.....	17
3.1.1. Hücreden salınacak yeni sentezlenen proteinleri tanıma.....	17
3.1.2. sRNA'nın bir mRNA'ya baz eşleşmesi ile bağlanması ile translasyonu önlemesi.....	18
3.1.3. Antisens Teknolojisi.....	18
3.1.4. Enzimatik aktivite gösteren RNA'lar.....	20
3.2. RNA İnterferens (RNAi).....	22
3.3. Gen Tedavisi.....	23
3.4. Gen tedavisi ve kanser.....	24

BÖLÜM II: PLAZMİDLER

1. Plazmidlerin Yapısı.....	27
2. Plazmidlerin Replikasyonu.....	28
2.1. Theta (θ) replikasyonu.....	29
2.2. Dönen halka replikasyonu (Rolling-Circle Replikasyon).....	29
3. Konukçu Aralığı (Host Range).....	31
4. Kopya Sayısının Regülasyonu.....	32
5. Plazmid Replikasyonunun Regülasyonundaki Konukçu Fonksiyonları.....	35
5.1. İnkompatibilite (Uyumsuzluk).....	35

BÖLÜM I: KAYNAK DNA'NIN ELDESİ

1. DNA İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	44
1.1. Hücrelerin Parçalanması (Homojenizasyon):	44
1.1.1. Fiziksel yöntemler ile parçalama:	44
1.1.2. Kimyasal yöntemler ile parçalama	45
1.2. Nükleik Asitleri Ayırma ve Saflaştırma	46
1.3. DNA'nın Ortamdaki Diğer Moleküllerden Ayrılması.....	50
1.4. Bakteriyofaj DNA'nın Hazırlanması	52
2. Nükleik Asitlerin in vitro Çoğaltılması: Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR).....	54
2.1. Nükleik Asitlerin Denatürasyonu ve Renatürasyonu.....	54
2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	55
2.3. PCR'da Sorunlar	61

BÖLÜM II. DNA'NIN SAFLIK, MİKTAR VE BÜYÜKLÜK ANALİZİ

1. DNA'nın Saflık ve Ebatının Belirlenmesi	68
1.1. Spektral Yöntemler	68
1.2. Elektroforetik Yöntemler	68
1.2.1. Agaroz jel elektroforezi	70
1.2.2. Poliakrilamid jel elektroforezi.....	71
1.2.3. Pulse-Field Jel Elektroforezi (PFGE)	72
1.2.4. Kapiler Elektroforez	73
2. Otoradyografi ile DNA Moleküllerini Görüntüleme	73
2.1. DNA'nın etiketlenmesi	73
3. DNA moleküllerinin büyüklüklerinin hesaplanması	75

BÖLÜM III. DNA PARÇALARININ VEKTÖRE BAĞLANMASI: VEKTÖRLER

1. Klonlama Vektörü Olarak Plazmitler	79
1.1. pBR322 Plazmiti.....	80
1.2. İkinci nesil plazmit vektörler.....	81
2. Klonlama vektörü olarak Lamda Bakteriyofaj.....	83
2.1. Değiştirilmiş Lambda Fajları.....	84
2.2. Lambda yer değişim vektörü ile klonlama basamakları	85
3. İnsersiyon ve replasman (replacement) vektörler	86
3.1. Replacement vektörleri.....	86
4. Kosmidler	87
4.1. Kosmid ile klonlama deneyi	87
5. Bakteriyofaj M13 ve türetilen vektörler.....	88

5.1. M13'ün moleküler klonlamada kullanımı	89
6. Bakteriyal yapay kromozomlar (BAC'lar).....	90
7. Maya yapay kromozomları: YAC'lar	91
8. İfade Vektörleri	93
8.1. Vektörlerdeki ifade sinyalleri bir kaset oluşturur:	93
8.2. İfade vektöründe kullanılan promotor örnekleri:.....	94
8.3. Bakteriyofaj promotoru taşıyan diğer plazmit vektörler.....	96
9. pGEM3Z-klonlanan DNA'nın in vitro transkripsiyonu.....	97

BÖLÜM IV. DNA PARÇALARININ VEKTÖRE BAĞLANMASI: DNA MANİPÜLATİF ENZİMLER SERİSİ

1. Nükleazlar	100
1.1. DNA'nın Restriksiyon Endonükleazları ile kesilmesi.....	104
1.2. Restriksiyon Haritası	105
1.3. DNA'nın kısmi kesimi	106
1.4. Uygulama: Restriksiyon Enzimleri İle Kesim	107
2. DNA'yı Modifiye Eden Enzimler.....	109
3. Topoizomerazlar.....	111
4. Polimerazlar	111
5. Ligazlar	113
5.1. Küt uçlu bir moleküle yapışkan uçlar koymak.....	114
5.2. Uygulama: Plazmit DNA'nın Eksraksiyonu ve Purifikasyonu	115
5.2.1. Bakteri kültürünün büyütülmesi.....	115
5.2.2. Bakterilerin toplanması ve lizisi	116
5.2.3. Plazmit vektöre klonlama.....	119
5.2.4. Ligasyon.....	120

BÖLÜM V. KLONLANMIŞ DNA'NIN BİR KONAK ORGANİZMAYA SOKULMASI VE KORUNMASI

1. Transformasyon (Genel Moleküler Biyoloji derslerini hatırlayalım)	127
1.1. Transformasyonda DNA alınınımının mekanizması	127
1.2. Transforme DNA'nın Entegrasyonu	128
1.3. Transformazomlar	129
1.4. B. subtilis'te kompetensin regülasyonu;	130
1.5. Gram (-) bakterilerdeki Kompetens	131
1.6. DNA alınınımının etkinliği.....	132
1.7. DNA Alınınımının Spesifitesi.....	132

1.8. Doğal Transformasyonun Rolü	133
2. Yapay Olarak İndüklenen Kompetens	133
2.1. Kimyasal İndüksiyon:	133
2.2. Elektroporasyon:	134
2.3. Biolistik Transformasyon (Gen Tabancası)	134
3. Transfeksiyon:	135
4. Transformasyonla Haritalama	136
5. Uygulama: Kompetent DH5 hücresi hazırlığı:	136
5.1. Isı Şoku ile Kimyasal Olarak Kompetent Hücreye Transformasyon Protokolü	137

BÖLÜM VI: REKOMBİNANT PLAZMİTLERİN SEÇİMİ

1. α -komplementasyon ile rekombinant plazmitlerin seçimi	140
2. Rekombinant Plazmitlerin Hibridizasyon ile Belirlenmesi	141
2.1. Moleküler Hibridizasyon	141

BÖLÜM VII: DNA DİZİ ANALİZİ

1. Birinci Nesil DNA Dizileme Yöntemleri	144
2. İkinci Nesil Dizileme	146
3. Üçüncü Nesil Dizileme	152

BÖLÜM VIII: KLONLANAN PROTEİN DİZİSİNİN EKSPRESYONU

1. Genel Metabolik Regülasyon Bilgileri	157
1.1. Prokaryotlarda Gen Yapısı	159
1.2. Global (transkripsiyon) kontrol mekanizmalarından; Lac operon	159
1.3. Transkripsiyonun pozitif kontrolü	161
1.4. Aktivatör Proteinlerin Bağlanması	162
1.5. Ökoryotik Gen Yapısı	163
1.6. Transkripsiyonda prokaryot, ökaryot farkları	165
1.7. Arkealarda Transkripsiyonun Kontrolü	167
1.7.1. Transkripsiyonun düzenlenmesi bağlanma ve başlama aşamalarında olur	167
1.7.2. Gen İfadesi (Ekspresyonu) ve İşlevini İnceleme	168
2. Füzyon Proteinler	170
2.1. Füzyon Proteinlerinin Saflaştırılması	172
2.2. Füzyon Proteinlerinin Affinite Purifikasyonu	174
2.2.1. Füzyon proteinin kesimi	174
Kaynaklar	178

KAYNAKLAR

- Avery OT, MacLeod CM, McCarty MI (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Deoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type III. *Journal of Experimental Medicine*. 79 (2): 137–158.
- Birge EA (2006) *Bacterial and Bacteriophage Genetics* Springer-Verlag, New York.
- Gündoğdu R, Çelik V (2009) RNA İnterferans (RNAi) Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 25:34 – 47.
- Heather JM, Chain B (2016) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA Genomics 107 1–8
- Jeremy W. Dale, Simon F. Park (2004) *Molecular Genetics of Bacteria*, 4th Edition, John Wiley and Sons, West Sussex, England.
- Karaboz I, Çolak C (2007) Antisens Teknolojisi Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 2: 14-31
- Klug WS, Cummings MR *Genetik Kavramlar* Çev.Ed. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Madigan MT, Martinko JM (2010) *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi* Çev. Ed. Çökmüş, C, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Metzker ML (2010) Sequencing Technologies-the next generation. *Nature Reviews-Genetics*, 11: 31-46
- Nelson DL, Cox MM *Leninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çev.Ed. Nedret Kılıç, Palme Yayıncılık, Ankara
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork, USA
- Sandhu SS (2010) *Recombinant DNA Technology*, IK. International Publishing House Pvt Ltd New Delhi India.
- Synder L, Champness W (2003) *Molecular Genetics of Bacteria*, 2.Ed. ASM Press Washington USA.
- Temizkan G, Arda N (1999) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M Tanyolaç B (2010) *Moleküler Biyoloji Nobel Yayın Dağıtım*, Ankara.