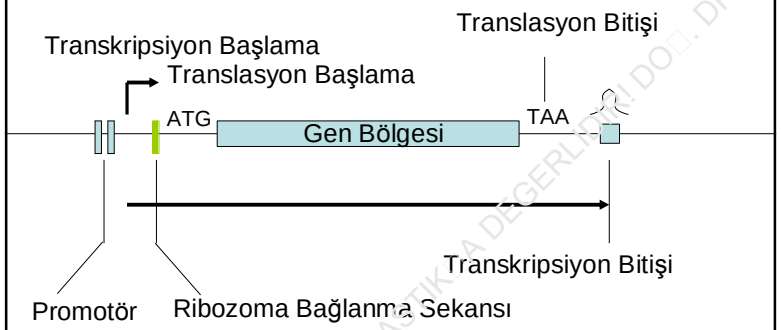
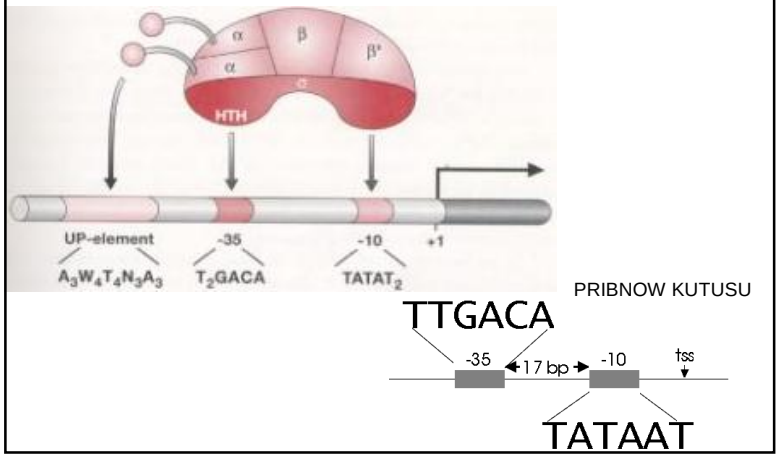
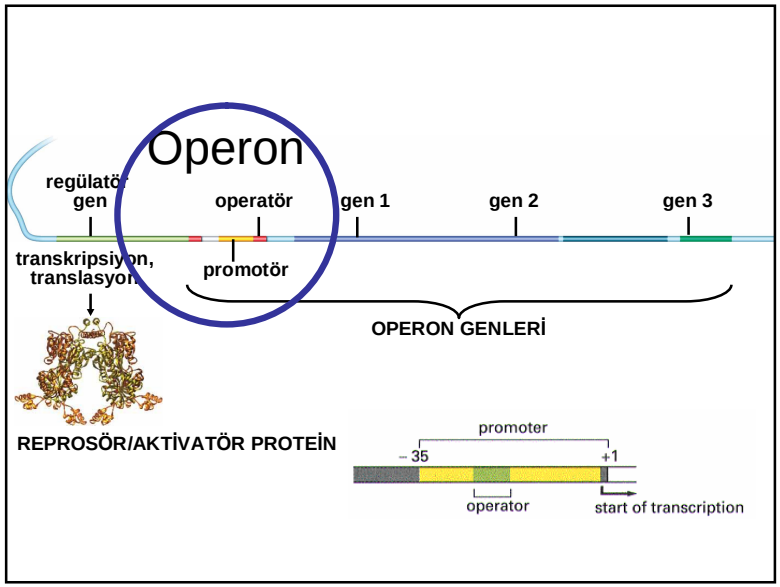
# Basit Bir Bakteriyel Gen Kaseti



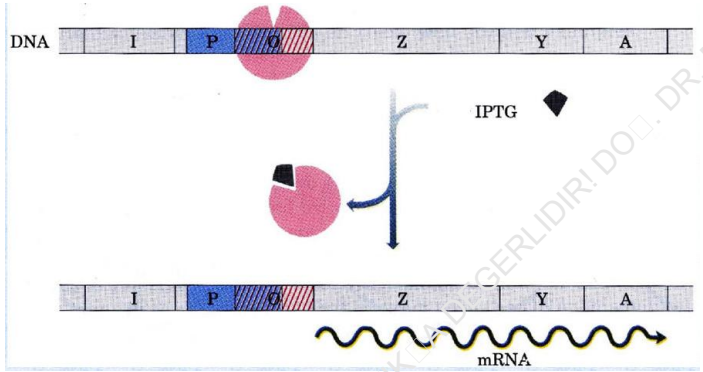

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

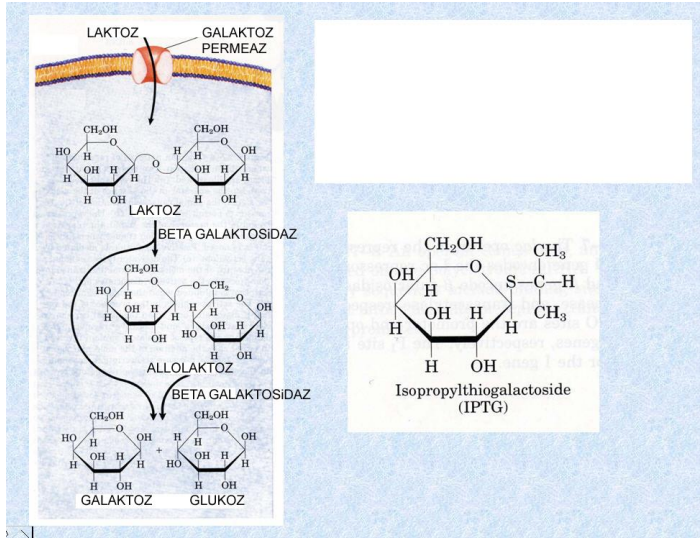
# Prokaryotik Promotör

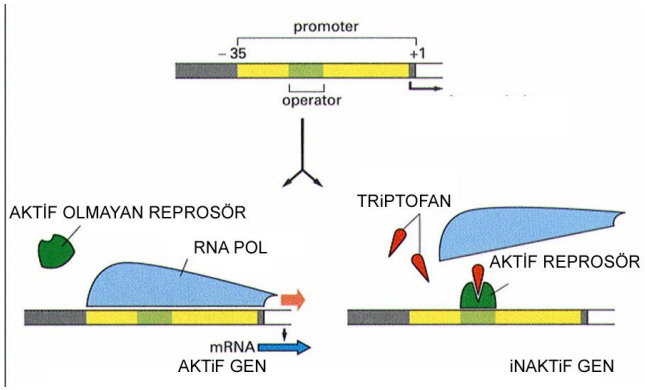


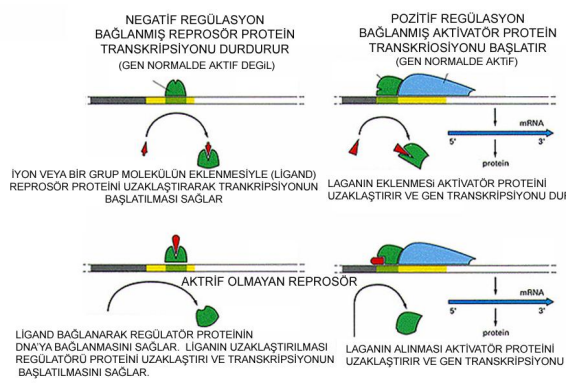




- **Operon**
- Bakteri kromozomunda transkripsiyonu koordine eden DNA ünitesidir.
- Operon Aşağıdaki Kısımlardan Oluşabilir
- **1-Regülatör Gen**
- **Bu tür genler regülatörü proteinleri kodlarlar. Örneğin** laktoz bastırıcı proteini lac I geni tarafından sentezlenir
- **2- operator**
- Regülatör proteinlerin bağlandığı operon DNA dizileridir.
- **3- Promotör**: RNA polimeraz eniziminin bağlandığı DNA dizisidir. RNA sentezi promotör dizilerinden hemen sonraki kısımları kapsar.
- **4-Yapısal ve Fonkisiyonal Proteinleri Sentezleyen Genler:** Örneğin laktoz operonunda bu genler laktoz metabolizmasından sorumlu enzimlerin sentezinden sorumlu ß-galactosidase, ß-galactoside permease, ve ß-galactoside transacetylase

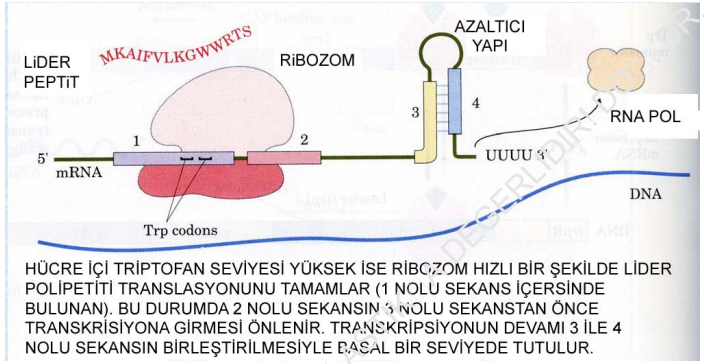


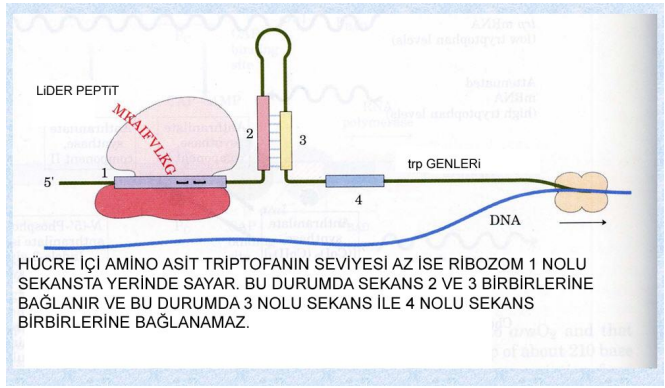




BİLGİ PAYLAŞTIKLARIMIZDIR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

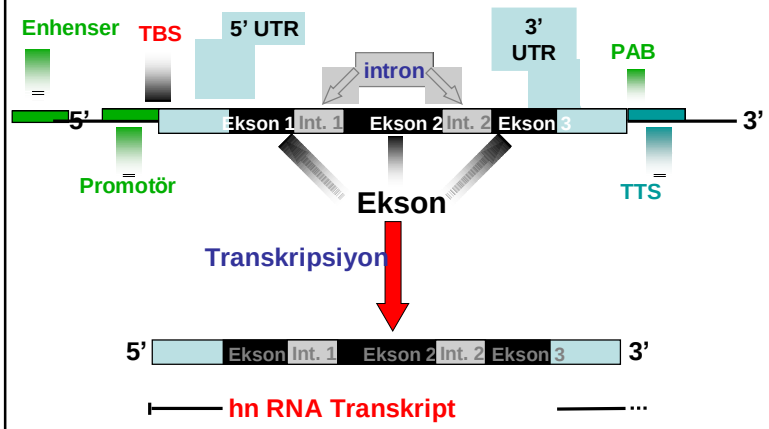


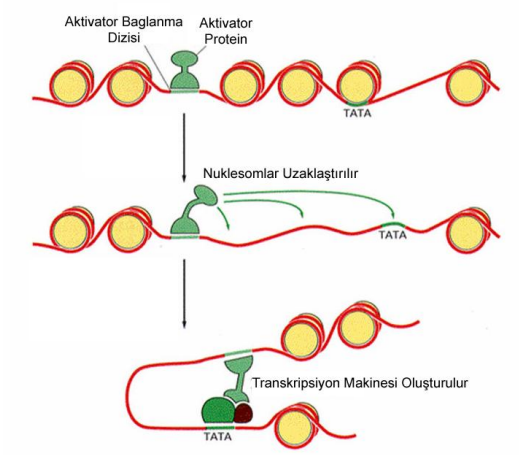

HÜCRE İÇİ TRİPTOFAN SEVİYESİ YÜKSEK İSE RİBOZOM HIZLI BİR ŞEKİLDE LİDER POLİPETİTİ TRANSLASYONUNU TAMAMLAR (1 NOLU SEKANS İÇERSİNDE BULUNAN). BU DURUMDA 2 NOLU SEKANSIN 3 NOLU SEKANSTAN ÖNCE TRANSKRİSİYONA GİRMESİ ÖNLENİR. TRANSKRİPSİYONUN DEVAMI 3 İLE 4 NOLU SEKANSIN BİRLEŞTİRİLMESİYLE BASAL BİR SEVİYEDE TUTULUR.




HÜCRE İÇİ AMİNO ASİT TRİPTOFANIN SEVİYESİ AZ İSE RİBOZOM 1 NOLU SEKANSTA YERİNDE SAYAR. BU DURUMDA SEKANS 2 VE 3 BİRBİRLERİNE BAĞLANIR VE BU DURUMDA 3 NOLU SEKANS İLE 4 NOLU SEKANS BİRBİRLERİNE BAĞLANAMAZ.

# Basit Bir Ökaryotik Gen Kaseti



**ENHENSER GENDEN ÇOK UZAKLARDA VE GENİN ALT VEYA ÜST KISMINDA BULUNABİLMEKTEDİR**

- Çok sayıda regülatör proteinler tarafından tanınır ve bağlanır.

**Enhenser:**

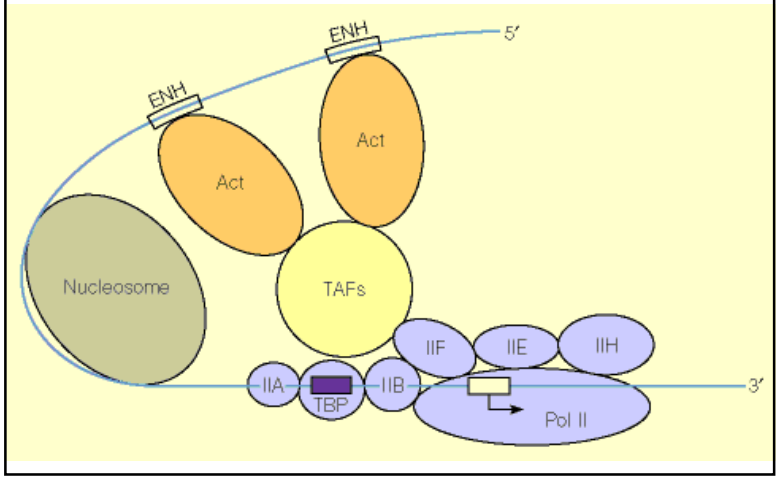
-DNA elementi (DNA'nın KENDISI) olup promotörden çok uzaklarda bulunabilir ve promotörün dolaysıylada genin aktivitesini artırır.

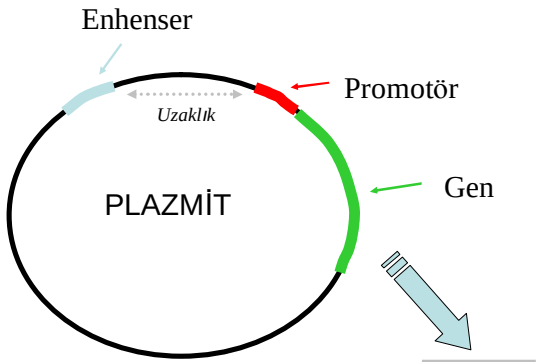
- Promotörün alt veya üzt kısımlarında bulunabilir




BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÜRETİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

## Enhenser



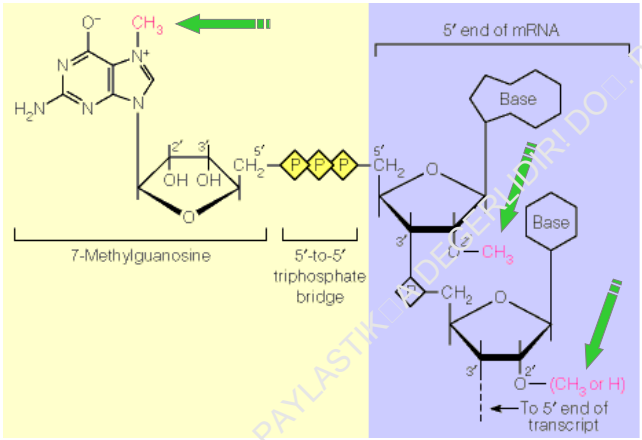

## mRNA Başlığı (Capping)

mRNA'nın 5' ucu özel bir bağ ve guanin le transkripsiyonun başlamasının ardında başlıklanır. Bu olay sadece RNA pol II transkriptinde görülür.

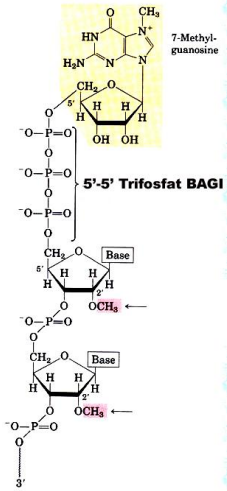
- 5'-başlık yada cap protein sentezinin başlamasında ve ribozomun tanınmasında önemlidir.

- mRNA'nın 5' ucundan stabil olmasını sağlar.

# *mRNA 5'-Başlıklanması (Cap)*




BILGI PAYLASTIKLARIDIR! DO... DR. MEHMET KARACA



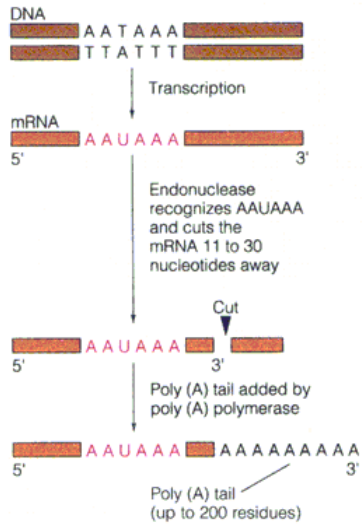

## Poli A – Kuyruğu *(Poliadenilasyon)*

Transkripsiyon genellikle AAUAAA sekansını geçtikten yaklaşık ~20 nükleotit sonra bir nükleaz enzimi AAUAAA nın 10 -30 nükleotid sonrasında bir kesim yapar.

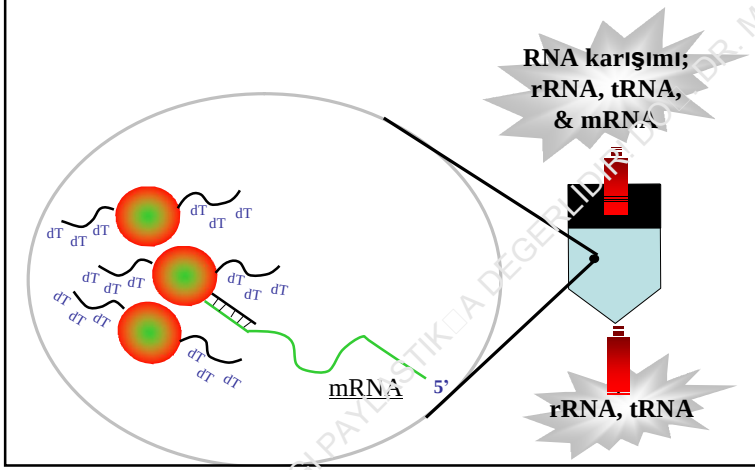
AAUAAA dizisi "poliadenilasyon bölgesidir"

Sonra Poli A poimeraz enzimi 100 – 250 baz uzunluğunda bir kuyruk ekler.

- Mayada ~ 100 baz
- Sinekte ~ 150 baz
- Memelilerde ~ 250 baz

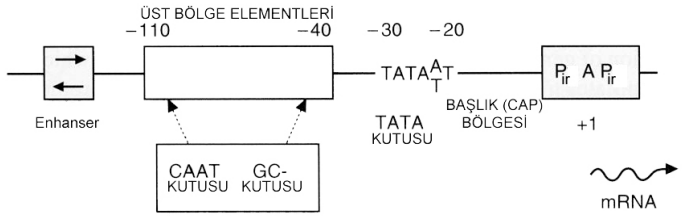


Poly–A kuyrugu yardımıyla bir Poli–dT kolonu matriksine bağlanarak mRNA Ektraksiyonu (eldesi) yapılabilmektedir.




BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR. MEHMET KARACA

# Ökaryotik promotör




Ökaryotik Transkrisiyon:
3 farklı RNA polimeraz

1. RNA pol I: bütün rRNA (5S rRNA hariç)
2. RNA pol II: mRNA ve snRNA
3. RNA pol III: tRNA ve 5S rRNA

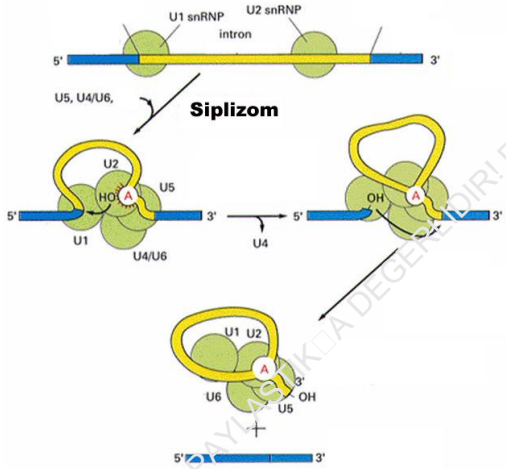
B. Promotörde TATA, CAAT ve GC kutulkarı bulunur

1. TATA kutusu: transkrisiyon başlangıç bölgesinin kurulumunda
2. 2. CAAT ve GC kuruları : TF ve RNA polimerazın bağlanmasında

# Ökaryotlarda Postranskiripsiyonal Modifikasyonla:

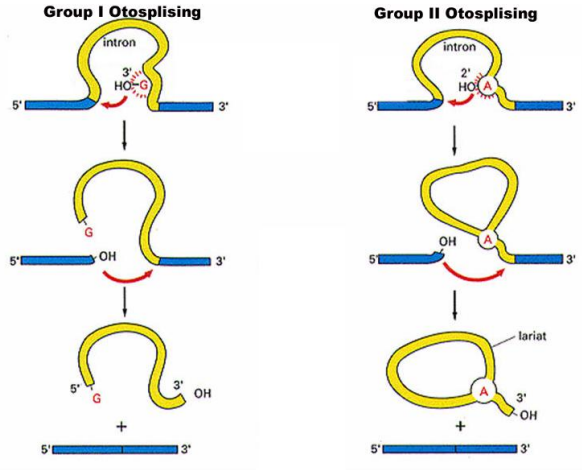
- **1. Başlıklama** (**Capping)**. mRNA stabilitesi ve Ribosoma bağlanma için mRNA'nın 5' ucuna G-nükleotidinin eklenmesidir.
- 2. **3'-Poliadenilasyon**. Genellikle 100-200 nükleotit uzunluğunda A' nin mRNA'nın 3'- ucuna eklenmesidir.
- **3. Splisin:** intronların atılması eksonların birleştirilmesi. Bazı durumlarda ise farklı eksonlar birleştirilerek farklı genler oluşturulabilmektedir.
- **4. RNA Editing**: mRNA baz eklemesi yada çıkarılması veya modifikasyonları

# SPLİSİNG

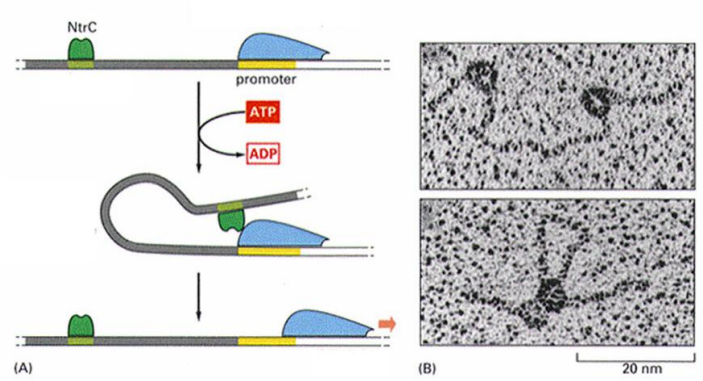



BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLIDIR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

# Oto Splising

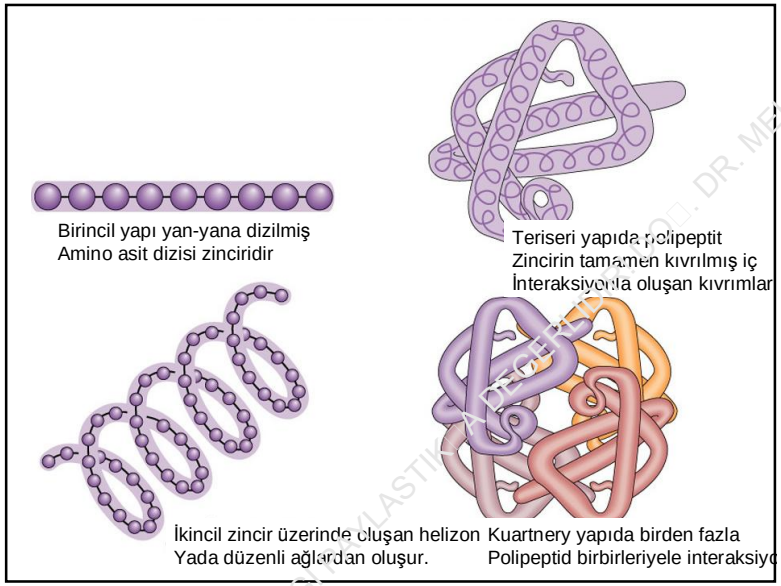


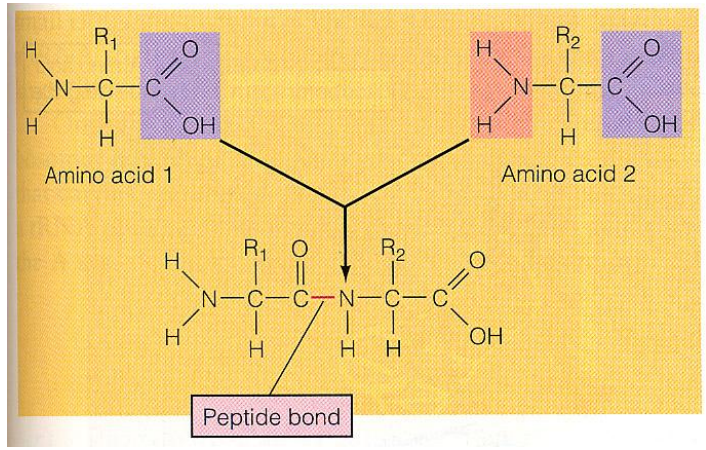

# ENHENSER

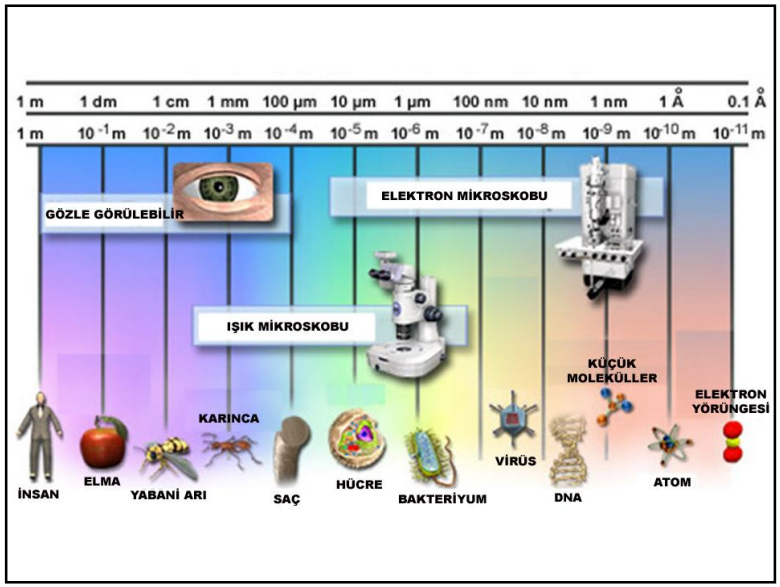



| | | | |
|---|---|---|---|
| Alanine | ala | Leucine | leu |
| Arginine | arg | Lysine | lys |
| Asparagine | asn | Methionine | met |
| Aspartic acid | asp | Phenylalanine | phe |
| Cysteine | cys | Proline | pro |
| Glutamine | gln | Serine | ser |
| Glutamic acid | glu | Threonine | thr |
| Glycine | gly | Tryptophan | trp |
| Histidine | his | Tyrosine | tyr |
| Isoleucine | ile | Valine | val |






PPM: PARTS PER MILLION (MİLYONDA BİR KISIM)

PPB PARTS PER BİLLİON (MİLYARDA BİR KISIM

pH (POTENTIA HYDROGENY): BİR ÇÖZELTİDE BULUNAN ASİT YADA BAZLARIN YOĞUNLUĞUNU GÖSTEREN SKALA (BİYOLOJİK pH 0-14 ARASINDA DEĞİŞİR). MATEMATİKSEL OLARAK pH HİDROJEN İYONLARININ NEGATİF LOGARİTMASI OLARAK HESAPLANIR (pH: LOG (1/[H]))

- mg/L: LİTREDE MİLİGRAM
- MİKRON: MİLİMETRENİN BİNDE BİRİDİR, UZUNLUK BİRİMİDİR
- Molarite: 1 lire çözeltide çözülebilen mol sayısıdır. M= mole/L
- M= g/MA . L

- *1 milyon (1000000) baz uzunluğundaki çifte sarmallı bir DNA' nın boyu 0.34 mm'dır.*
- Örnegin insan DNA si 6 x 109 nucleotid oldugundan insan DNA uzunlugu 204 cm olarak hesaplanabilir.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- Organizmaların Genom Büyüklüğünün Hesaplanması:
- Genellikle bir kontrol genom kullanılarak Flow Cytometry ile belirlenmektedir.
- [1 pikogram DNA (pg) = 0.965 x $10^9$ ]baz çiftine eşittir.

- 1 M: 1000 mM
- 1 mM: 1000 mikroM
- 1 mikroM: 1000 nanoM
- 1 nanoM: 1000 pikoM
- 1 pikoM:1000 femtoM
- 1 femtaM: 1000 attoM
- m: mili, µ: mikro, n: nano, p: piko, f: femto, a: atto

- M: molarite, mol:mole, Da: dalton, k: kilo, kb: kiobaz, bp: baz çifti, 1kb: 1000 baz çifti

- 1 megabaz: 1000 kb
- 1 gigabaz : 1000 megabaz

- MA: moleküler ağırlık
- kütle ağırlıgı: Da, 1000 Da =1 kDa

- MKA: moleküler kütle ağırlıgı g/mol

- Stok veya ana stok: moleküler çalışmalarda iş gücü, cam veya plastik giderelerinden ve kimyasal ölçümlerin doğru şekilde hesaplanabilmesi amacıyla stok solüsyonlar hazırlanır. Bu stok çözeltileri normalin çok üzerinde konsantrasyonlarda hazırlanır ve X semboli katmala anlamındadır, kaç kat katlandıysa o rakam başa eklenir. Örneğin 8X: normalden 8 kat daha konsantre anlamına gelir.

- Sotoklardan istenilen konsentrasyonda yeni çözeltiler oluşturulur. Bunun için genel bir formul olan
- C1 x V1 = C2 x V2 denklemi kullanılır.
- C1: Genelde stok konsantrasyonu, V1: stoktan alınacak hacim miktarı, C2: yeni çözeltideki konsantrasyon ve V2 yeni çözeltinin toplam hacmi'dir.

- Amino asitlerin ortalama kütle ağırlığı: 120 Da'dır.
- Nükleik asitlerin ortalama kütle ağırlıgı 660 Da (4 dNMP bp) olarak hesaplanmıştır.

- İster DNA olasun ister amino asit zinciri olsun yukarıdaki kurallar kullanılarak zincirin kütle ağırlığı hesaplanabilir.

- %v/v: 100 ml solisyonda çözülen diğer madde
  - ÖRNEĞİN ALKOL VE SU

- %w/w 100 g da bulunan diğer madde g cinsinde
  - ÖRNEĞİN AGAR VE NaCl
- %w/v: 100 ml'de bulunan g cinsinden diğer madde
  - ÖRNEĞİN SUDA ÇÖZÜLMÜŞ ŞEKER

BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLIDIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- 1-Aşağıdaki buffer solüsyonlarını hazırlamak için gerekli miktarları hesaplayınız ayrıca pH yı istenen düzeye getirmek için gerekli kimyasal materyalin ismini belirtiniz?
- 200 mL'lik 3 M sodium asetat, pH 5
- Molarite (M) bir litre çözücüde bulunan çözünenin mole cinsinden miktarıdır. Bir kimyasal maddinin ne kadar mole oldugu elediki tartılan miktarin (g) o kimyasalin moleküler ağırlığına (MW buda g/mole ağırlığıdır) bölünmesiyle bulunur. Örnegin elinizde 90 g glikoz varsa bu yaklaşık 0.5 mole glikoz demektir ve eğer bu 0.5 mole glikoz'u 1 L çözeltide çözerseniz M (molarite 0.5) demektir. 1 M=1000 mM (milimolarite)=1000000 mikromolaritedir (µM).
- Soruya dönelim förmülümüz M=mole/L bu da =g/MW x L
- Şimdi değerlerimizi formüldeki yerlerine koyalım, soru bizden ne kadar g NaAc gerktiğini soruyor
- Formulumuzde M=g/MW x L yani 3=g /82.04 x 0.2 buradan ÇARP-BÖL-TOPLA-ÇIKAR ilkesi geregi 3=g/16.4 buradanda g'yi çekersek g=3 x 16.4 =49.2 gram NaAc gerektiğini görürüz. Bu miktarı 300 mL lik bir behere koyup ve yaklaşık 150 mL su ekleyip çözdükten sonra, bir pH metre kullanarak seyreltilmiş HCl kullanarak pH 5.0'a ayarlanır ve 200 mL tamamlanır.

- 500 mL'lik 50 mM glikoz, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
- Toplam hacim 0.5 L olcağından, önce her bir kimyasaldan ne kadar almamız gerektigini bulumamız gerekmektedir. İstenen konsentrasyon mM cinsinden oldugundan M=g/MW x L formülümüz şimdi mM=mg/MW x L olacaktır. Formül gereği 500 mL de 50 mM glikoz bulunması için 50 mM=mg/180.2 x 0.5 yani 4505 mg veya 4.5 g glikoz, yine aynı formülü kullanarak 1.68 g EDTA ve 1.97 g Tris-HCl bulunur ve bu miktarlar ayrı ayrı tartılarak hazırlanır. 800 mL lik bir behere önce 200 mL H2O da EDTA yı çözmek gerekir. EDTA'nın çözünürlüğü pH ya bağımlıdır. Az miktarda NaOH katarak EDTA'nın çözünülürlüğünü artırabilirsiniz. Daha sonra hesaplanan miktarlardaki glikoz ve Tris-HCl katılır pH 0.5 M NaOH kullanılarak 8.0 getirilir ve çözelti 500 mL'e ayarlanır.

- 100 mL'lik 2.5 M NaCl, %20 PEG-6000
- Yine bizim formülümüzü M=g/MW x L kullanalım, 2.5 M=Xg NaCl/ 58.45 (MW NaCl) x 0.1. Buradan NaCl miktarının 14.6 g oldugunu buluruz. %20 PEG-6000 demek 100 mL de 20 g PEG-6000 demektir. Yani 20 g PEG ve 14.6 g NaOH'li bir behere koyup toplam çözelti hacmine 100 mL le tamamlamamız gerekmektedir.
- 25 mL'lik %20 gliserol solüsyonunu %80 gliserol çözeltisinden
- Bu soruyu çözmek için şu basit formülü hatırlamamız gerekir. C1 x V1 = C2 x V2, formülde C'ler konsantrasyonu ve V'ler hacimi gösterir. C1 ve C2 ve V1 soruda verilmiştir. Bu değerleri formüldeki yerlerine koyalım 0.8 x X miktar = 0.2 x 25 mL
- 0.8 X = 5 olacağından X 6.25 mL %80'lik gliserol stoğundan alınır ve 6.25 mL 25 mL'e tamamlanır.

- 5 mL'lik 2.5 mM ATP yi 20 mM ATP stoktan.
- Yine aynı formülü kullanırsak bu soruyuda çözebiliriz. Yani 20 mM x X mL= 2.5 x 5 mL. Buradan 0.625 mL 20 mM ATP stoğundan alınarak bu miktar 5 mL'e tamamlanır. 0.625 mL=625 mikrolitredir.
- Yukardaki soruları daha basıt yöntemlerlede çözmeniz mümkündür. Bu problemlerin yanında labda DNA ve primer konsentrasyonlarını hesaplama, normalite ve seyreltme (dilution) gibi temel matematik hesaplarını bilmeniz gerekir.
- VERİLER
- NaAc 82.04 g/mol
- EDTA 336.21 g/mol
- Tris-HCl 157.6 g/mol
- Glikoz 180.2 g/mol
- NaCl 58.45

BILGI PAYLASTIKÇA DEGERLIDIR DR. MEHMET KARACA

- Protein Sentezinde başlama kodonları
- Genel olarak ökaryotik nüklear genlerde başlama kodonu AUG olmasına rağmen bazı prokaryotlarda ve organel genomlarında GUG ve UUG da başlama kodonu olabilmektedir.
- Protein Sentezinde bitirme kodonları
- Genellikle UAA, UGA ve UAG olmasına rağmen bu kodonlar bazı prokaryotlarda değişik amino asitleride sentezleyebilmektedir.
- Serin amini asiti için kodonlar
- 6 adet kodon serin amino asitini yapabilmektedir bunlar UCU, UCC, UCA, UCG, AGU ve AGC dir.

- Shine-Dalgarno sekansı
- mRNA üzerinde bulunan ve mRNA'yla ribosomal 30S altünitesinin bağanmasını sağlayan Ribosoma bağlanma sekansı SHINE-DALGARNO sekansıdır. mRNA üzerindeki bu sekans 16S rRNA'nın 3' ucuna yakın bir bölgedeki RNA sekansına komplementary olan sekanslardan oluşur. Hekzamer uzunluğunda olan ve mRNA ve yaklaşık olarak başlama kodonu AUG den 10 nt uzakta olan Shine-Dalgarno sekansı AGGAGG den oluşur ve 16S rRNA'da ise onun komplementari sekansı yanı UCCUCC yle baz çifti oluşturur. 30S ribosoma bağlanan mRNA uzunluğu yaklaşık 30 nt uzunlugundadır. Ökaryotlarda da SHİNE-DALGARNO'ya benzer fonksiyonu olan sekanslar bulundugu tahmin edilmektedir.
- 350 amino asit uzunluğunda bir proteini sentezleyebilen mRNA nın boyu (nt) ne kadardır.
- Bir amino asit bir triplet tarafından yapıldığından 350 x 3 =1050 nt dir.
- Palindromik sekans nedir
- Çifte sarmalli DNA sekansı olup her iki yönden okunduğunda aynı sekansları verir. Örneğin 5'GGTACC-3' / 3'CCATGG-5'.

- *in vivo* DNA replikasyonuyla *in vitro* (PCR) DNA replikasyonunu karşılaştırınız?
- Aslında PCR olayı bir hücrede var olan DNA replikasyonunun bir tüp içerisinde yapılmasıdır. Ancak tüpteki reaksiyon hücredekine oranala daha basit ve hata yapma olayı oldukça yüksektir. Bunun yanında oluşan ürün büyüklüğü oldukça küçük ve komlek degildir. Örneğin histonlar ve diger proteinler yoktur. Templete DNA veya oluşturulan yeni DNA'lar supercoiling yapmazlar. Tek bir enzim kullanılmakta olup bu enzimde sadece polimer yapan enzimdir. Replisomlardan sadece DNA polimeraz kullanılmaktadır. DNA replikasyonu sadece tek bir sarmal üzerinde olup sadece tek yönlüdür yani replikasyon çatalı tek yönlüdür. Ama iki farklı primer kullanıldığında iki sarmallı DNA parçası her iki sarmalında 5-3' yönünde yeni bir sarmal yapar. Replikasyon orijininde çak sayıda proteinin oluşturdugu DNA denatrasyonu ın vitro da sadece yüksek ısıyla yapılır. Bu bir zorunluluktur tabi, bunun içinde sıcaklıga duyarlı olmayan DNA replikasyon enzimine ihtiyaç vardır. Yüksek sıcaklıgın neden olabilecegi buharlaşmanın ortadan kaldırılması gereklidir. Proteinlerin in vitroda yapmıı oldgu annealing olayının ın vitroda Mg gibi iyonların kullanılmasına neden olmaktadır. İki komplementary DNA parçacıgının (templet ve primer) negatif yüklerine rağmen anneal yapmaları gereklidir. Aynı anda kalıp DNA sarmallarının annealinin önlenmesi gereklidir. Bunun içinde oldukça fazla miktarda primer kullanılması zorunludur. Fazla primer ve dNTP kullanılması hata şansını artırmaktadır. Hata düzeltme mekanizmaları olan enzimler kullanılması daha bir önem taşımaktadır. In vivoda sadece her hücre döngüsünde olan replikasyon PCR'da 30-40 kez yapılmak zorundadır (bu durum amaca göre değişir). Fosfat buffer PCR da kullanılamamaktadır bunun yerine Tris buffer kullanılmakta. EDTA gibi bufferda bulunabilecek metal iyonlarının baglanması için kimyasallar gerekmektedir. Bir de Tween-20 gibi surfekantlar kullanılarak PCR DNA'larının stabiliteleri artırılmaktadır. PCR bufferlarında amonyumsulfatda PCR enziminin aktıvıtesinde olumlu etkiler yapmaktadır. Mineral yag artık kullanılmamaktadır. In vivoda nukleus membranını taklıt eden mineral yag kullanımı artık zorunluluk degildir.

- Aşağıdaki mRNA sekansında en uzun ORF'yi bulunuz ve kaç nükleotid'den oluştuğunu ve oluşabilen amino asit sekansını yazınız?
- 5'AGCUAACUGAUGUGAUGUCAACGUCCUACUCUAGCGUAGUCUAAAG-3'
- ORF ne oldugunu önce hatırlamak gereklidir. Bir genom sekansında bulunan ve bir başlangiç tripleti (DNA üzerinde ATG veya RNA üzerinde AUG) bulunduran, amino asit yapabilme özelliği taşıyan diger tripletlerle ve herhangi bir bitiş tripleti (TAA (UAA) veya TAG (UAG) veya TGA (UGA)) içeren DNA parçasına OPEN READING FRAME (ORF) yada TRANSLASYON YETENEĞİ OLAN DNA dizileri denir. İlk adım AUG ve herhangi bir stop kodonunu bulmakla başlamalı ancak başlama kodonununda AUG den başka kodonlar da olabilecegi gerçegini unutmamak gerekmektedir. Bunlara ilaveten doğru başlama tripletinin yani ORF1 ORF2 veya ORF 3 den hangisinin en uzun amino asit yapma olasılıgının en fazla oldugunu araştırmak gerekmektedir. OFF 3 te bulunan AUGUCAACGUCCUACUCUAGCGUAGUCUAA ilk bakişta en uzun ORF olup 33 nt oluşmaktadır. Ama diğer olasılıkta eğer biz sekansın yönünü bilmeseydik o zaman 6 adet ORF olacaktı ve bunlar şunlardır.
- Not – işareti aşağıdaki sekanslarda herhangi bir STOP kodonunun varlıgını göstermektedir.

- RNA intronlarından bazıları kendi kendilerini splice etmekte olup bunlara autosplicing yada selfsplicing intronlar adı verilir. Diğer taraftan translasyon olayından sonra oluşan polipeptidden bir kısım polipeptid zinciri kendi kendine splice eder bunlara INTEİN adı verilir. DNA da bulunan bir intron bölgesinde kendi kendisini genomun bir yerinden tamamen çıkarıp başka bir bölgeye taşıdığı gibi bazen de bir kopyasını yapıp genomun diğer bir kısmına taşımaktadır. Bu olay nasıl gerçekleşebilir.
- İNTRON HOMİNG mekanızması örnek gösterilebilir. Eger bir intron transposon özelliği varsa bu işlem oluşabilmekte yani DNA üzerindeki bir intron bölgesi ya kopyalamayla sayısını artırabilmekte yada başka bölgelere taşınabilmektedir. Bu mekanzimalar kopyalama mekanızması ve diğer bir mekanizma ise kesme yapıtırma mekanızmasıdır. Yani Microsoft Word'da bir paragraftaki bir tümceyi kopylalarsınız ve başka bir yere yapıştır yada PASTE edersiniz. Bu burada kopyalamadır. Diger bir durumda paragrafta bir tümceyi KES (CUT) edersiniz diger bir diziye PASTE edersiniz. İşte bu mekanizmaya benzer bir mekanizma ile bir intron genom üzerinde yer degiştirebildiği gibi sayısınıda artırabilmektedir

- Bir transformasyon vektöründe bulunması gereken DNA elementlerini ve fonksiyonlarını yazınız:
- Herşeyden önce in vitro şartlarında vektörün çogaltılmasını sağlayacak bir replikasyon orijini OriC gerek vardır.
- İstedigimiz gen parcacığını koyabilecegimiz bir klonin bölgesi ve bu bölgeyi saran ve restriksiyon enzimlerinin tanıdığı özel kesilme bölgeleri. İstedigimiz geni vektöre entegre olup olmadığını gösteren bir markır. Örneğin genin entegrasyonu sonrası ortaya çıkabilecek bir morfolojik yada enzimsel markır. Vektörün transformasyonunu gösterecek bir gen ve bu genin transformasyonu yapılan organizmanın genomuna entegre oldugunu gösterecek diger bir markır (stable transformasyonu gösterecek olan). İstenilen gen ve bu genin regülasyonunu kontrol eden promotör polyA ve diger regülasyon elementleri. Ayrıca vektörde host genomuna integrasyonu saglayacak sekans benzerligi yada aynı sekansları içeren DNA parcacıkları. Bu DNA elementi homologus rekombinasyonu saglayacagından stabel transformasyonun sıklıgını artıracaktır.
- Transformasyonda Stabel ve geçici (transient) ekpirasyon nedir. Ne amaçla kullanılırlar?
- STABEL TRANSFORMASYON: Transferi yapılan genin nüklear veya organel genomlara entegrasyonu ve bu genin kuşaklardan kuşaklara geçmesin.
- TRANSIENT TRANSFORMASYON: Bu aktarımı yapılan genin kuşaklara yanı yavru generasyonlara geçmemesi sadece transferi yapılmış hücre veya dokularda ekprasyonudur. Transient transformasyon bazı durumlarda vektörün nükleusa girmesi ancak enegrasyonu olmadan istenilen genin ekprasyonudur. Bu durumda transient ekprasyon adı verilir. Bir de daha önemlisi germ hücrelerinin dışında diger hücrelere gen transferi ile bazı hastalıkların önlenebilmesi transient transformasyon olarak isimlendirilebilir.

- Moleküler anlamda gen tanımını yapınız, organel genom genleriyle nüklear genom genlerini karşılaştırınız.
- Bir DNA parçası olup üzerinde herhangi bir polipetid zinciri sentezleyebilecek bir kodon zinciriyle leader ve trailer sekanslarını taşıyan ve ortalama 2-3 kb uzunluğunda olan nükleotid uzunluğudur. Ayrıca bir genin mutlaka polipeptid yapması zorunluluğu yoktur örneğin tRNA, rRNA genleriyle ribozim genleriyle bazi küçük RNA genleri polipeptid yapmazlar ama bunlarda gen olarak nitelenmektedir. Örneğin tRNA genleri deriz. Genellikle organel genleri nüklear genlere oranla daha az sayıda nükleotidten oluşurken organel genleri polisistronik (bir operon üzerinde birden fazla gen bulunabilmektedir) nüklear genler ise çoğunlukla monosistronik (tek promotör) özellikler taşımaktadır. Organel genlerin hepisi dominant özellik taşırken nüklear genler hem dominant hem resesif hemde kodomınant özellikler taşıyabilmektedir. Kodon kullanımı ve RNA editing yönlerinden farklılıklar vardır. Genellikle intron sayısı organel genomlarında daha azdır. Ekprasyon yönünden de farklılıklar olmakta nüklear genler nükleosomlar nedeniyle herzam inaktif konumdan aktif konuma geçirilmek zorundadır. Organel genlerdeki rekombinasyon ve mutasyon oranları nüklear genomlardan farklılık göstermektedir. Organel genleri maternal kalıtım göstermektedir. Organel genom genlerinin translasyon mekanizmalri nüklear genlerden farklı olduğu bibi protein sentezini başlatan veya bitiren kodonlarda farklılık görülmektedir.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR DR. MEHMET KARACA

- İnsan genom projesi bizlere neler öğretti?
- Aslında oldukça fazla bilgiler kazanmamızda etkin olmuştur. Herşeyden önce bir organizmanın genom sekansının bilinmesi herşeyin analşılması anlamına gelmediğini, tek bir nükleotid farklılığının ne kadar önemli olabileceğini, insan genomuna entegre olmuş değişik DNA sekanların bulunduğunu, kromozom üzerinde bulunan genlerin dağılımlarının farklı olduğunu ve bir çok genetik hastalığa neden olan genlerin sekans bilğilerinin elde edilmesini sağlamıştır. Bunların yanısıra belkide moleküler genetikte oldukça kafa karistiran ve C Değeri Çıkmazı (C Value Pardox) nun çözülmemiş olması bizim gen olarak tanımladıgımız sistemler dışında değişik sistemlerin olabileceği şüphesinin artmasını neden olmuştur. Bunun yanısıra bir gen bir polipeptid tanımlamasının da dogru olmadıgını vurgulamiştır. RNA editing. Alternatif Ekson Karişiminin ve post translasyon mekanizmalarinin önemliliği anlaşılmıştır. Biyoinformatik ve Proteomiks gibi yeni bilim kollarının gerekliliği anlaşılmıştır. Ökaryotik genom ve gene tanımlarında moleküler biyoloji derslerinde önemli bir veri tabanı oluşturmuştur. Bunların yanısıra insan genımuna ait bilgilerin özelliklede sekans bilgilerinin tüm insanlıga açılması zorunlulugu anlaşılmıştır. Bunun da temelinde elde fazla bilğinin olmqamasıdır diye düşünüyorum.

- Hücre döngüsünde S evesinin süresi genom büyüklüğüyle ilgilidir. G1 eversi ise bir çok faktörle ilgilidir. Bu faktörlere örnek veriniz?
- Hücre tipi: Bazı hücreler vardırkiş hücre döngüleri sınırlıdır belirli bir döneme kadar hücre döngüsüne girerler ve belirli bir dönemden sonrada G0 da kalırlar.
- Hücredeki Besin Maddelerinin Durumu ve Kullanılabilirliği örneğin meme hücreleri.
- Hücrenin Sağlıkli Olması: Hücrenin herhangi bir hastalık veya zatrarlı etmenine maruz kalması. Ama bazı durumlarda örnegin Ti plasmidinin T-DNA'sının entegrasyonu hücrenin hücre dingüsüne kontrolsüz olarak girmesine neden olabilmektedir.
- G0 evresini kontrol eden faktörler
- Hücredeki organel sayısı ve yeterliligi
- Mıtozun sağlıklı bir şekilde tamamlanıp tamamlanmadıgı.

- Halka formundaki kromozomlarda DNA replikasyonununda bir problem yoktur, Ökaryot kromozomları linear olduğu için kromozom sonlarının replikasyonu bir problem ortaya çıkarır. Bu problem nedir hücre bu problemi nasıl çözer?
- Halka formundaki kromozomlarda problem yoktur çünkü herhangi bir uç sekansı bulunmamaktadır. Bazı plasmitlerin vede bakterilerinde linear genomdan oluştugu bilinmektedir. Bu organizmalarin bazıları bu uç DNA sekanslarını özel proteinlerle kapatma yolunu seçerken bazıları ise replikasyon sırasında halka forma geçerek replikasyonlarını tamamlamaktadırlar. Ökaryot kromozomları linear olduğu için kromozom sonlarının replikasyonu bir problem ortaya çıkarır. Linear yapıdaki DNA'nın 3'-5' yönündeki kalıp DNA'nın sentezlenmesinde bir problem yoktur yanı temlet boyunca yeni sarmalın sentezlenmesi uygun bir şekilde devam etmektedir. Sorun 5'-3' yönündeki kalıp DNA nın sentezlenme işlemindedir. Hatırlayacagınız üzere bu sekans OKAZAKI fragmentlarının oluşturdugu sekansıdır ve bazen okazaki proteinleri adıda verilen özel proteinlerin varlıgıyla sentezlenmektedir. 5'-3' yönündeki kalıp DNA üzerinde enz az bir okazaki fragmenta kadar olan sekansın replikasyonunda sorun vardır. Bu DNA sekansının DNA polimeraz tarafından sentezlenemez, Primerlerin aracı olduğu azalan DNA sentezinde en azından RNA Primer sentezinin gerçekleştiği DNA bölümü replike olmadan kalmak zorundadır. Bu problemin çözümü kromozom sonlarının özel yapısı sayesinde (Telomer) mümkündür. Bütün ökaryotik kromozomların sonunda TG bakımından zengin tekrarlanmalar bulunur. Bunlar (TTAGGG)n den oluşurlar ve 2-15 kb uzunluğundadırlar. Bu spesifik sonyapı olmadan kromozomlar stabil olmazlar, . Telomer insan kromozomlarının sonlarında binin üzerinde 6 Nükleotid Blok halinde bulunur. 5'-TTAGGG-3' sonu, belirli tekrarlamalar sonucu bir DNA sarmalı üzerinde ve uygun komplementer sekans diğer DNA sarmalı üzerindedir.

- Yaşlanmada mitokondrı teorisini ve telomer teorisini kısaca açıklayınız?
- Telomer kaybı teorisi: Zigot aşamasından sonra organizmanın büyüyüp gelişmesi tamamen hücre çogalması yani Mıtozla gerçekleştirilmektedir. Telomerleri yapan enzim olan telomerazin bu mıtotik hücrelerde bulunmamaları nedeniyle her bir hücre dingüsünün S evresinde oluşan DNA replikasyonları sırasında kromozom uçlarının kısalmaları nedeniyle hem kromozomların bütünlüklerini koruyamama hemde bazı önemli genlerin replikasyonla yavru hücrelere geçememeleri nedeniyle hücrelerin yaşlandığı teorisidir. Ölümsüz hücrelerden oluşan Tümör hücreleri bu telomer kaybını her hücre bölünmesinde engelleyebilmek için telomeraz aktivitelerinin artıgı bilinmektedir. Mitekondri teorisi: Mitekondrial solunum zincirinin içinde elektron taşınmasının bozulmasına sebep olduğu, serbest radikaller oluşumu nedeniyle hem mutasyon oranının fazlalıgına hemde Mt-genomunun zarar gördügü fikridir. Enerji ocakları olarak bilinin mitokonri ot-rganellerinin zarar görmesi hem mitekondri hem de bütün hücrelerin zarar görümeleriyle sonuçlandıgı fikri yada teorisidir.. Merkezi sinir sistemi çoğunlukla mitekondrilerin enerji üretimine bağlıdırlar. Mitekondriler sebebiyle yaşa bağlı olarak azalan enerji üretiminin bazı yaşlılık hastalıklarının oluşumuna sebep olduğu tahmin edliyor (Alzheimer hastalığı). Ayrıca mitekondriler yaşam süremize etkili olan zararlı maddelere özellikle serbest radikallere karşı da hassastır

BILGI PAYLASTIKÇA DR. MEHMET KARACA

- Nükleotid biyosentezinde SALVAGE Patway'i ile DE NOVO Pathway'i arasındaki temel farklılığı yazınız ve sizce neden De Novo Pathway'i tercih edilmektedir?
- DE NOVO reaksiyon dizisi Amino asit, Riboz-5- fosfat, Karbondioksit ve Amonyak'tan oluşan öncül moleküllerden başlatılır. Purin halka yapısı birkaç atomun aynı zamanda riboz şekerine eklenmesiyle oluşur. Primidin halkası ise önce orotate'e dönüşür ve Ribozfosfata eklendikten sonra normal primidin haline dönüştürülür. SALVAGE reaksiyon dizisi ise hücre içerisindeki serbest bazlardan ve nükleik asitlerin degredasyonundan, parçalanmasından elde edilen nükleositlerin yeniden yapılanmasıyla elde edilir. Hücrede bulunan serbest pürin ve primidinler adenosinfosforiboziltranferase enzimi ile PRPP kullanılarak Adeninmonofosfat (AMP)'ye dönüştürür.
- De Nova tercih edilmek zorundadır çünkü tek bir hücreden milyarlarca hücrenin oluşturulması sürecinde her zaman yeni oluşturulacak nükleik asitlere ihtiyaç duyulacaktır. RNA ve DNA nin yapı taşını oluşturan Nükleotidlerin hücrede çok fonksiyonları vardır. SALVAGE reaksiyon dizisi yoksa hücrede olan bir hücreden elde edilmesi canlı yaşamının sürdürülmesinde olumsuz etkiler yapabilir. Pahalıda olsa ITHAL degil kendisinin yaptığını tüketme duygusu hücrelerimizde bile vardır.

BILGI PAYLASTIKÇA ÖĞRENELİM DR. MEHMET KARACA

- DNA üzerindeki bilginin yaşamsal faaliyetleri kontrol edebilmesi için 2 önemli aşamadan geçmesi gerekmektedir. Birinci aşamada DNA'nın, üzerindeki bilgiyi diğer bir nükleik asit türü olan RNA'ya dönüştürmesi diğer bir deyişle transkripsiyonu gerekmektedir. Diğer aşamada ise elde edilen RNA'nın, bilgisini yaşamsal faaliyete yani protein veya enzimlere dönüştürmesi diğer bir ifadeyle translasyonu gerekmektedir. Sizce neden bu iki aşama gerekildir?
- Organizmada varlığını bozulmadan koruma ve olabilecek zararları ortadan kaldırmaya yönelik aktiviteleri içermesi, Hücrenin yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan bütün aktiviteleri kontrol etme, Hücrenin devamlılığı için benzerlerinin yapılması, Doğal şartların neden olduğu olumsuz etkileri en aza indirecek sekilde hücreyi degişime uğratarak, gerekli genetik materyali degiştirerek çeşitliliği artırma. Bu özellikleri taşıyan nükleik asitler hücrede bulunan makro elementlerden olup bunlar deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) dir. Bilindiği üzere kalıtsal materyali RNA olan organizmalar vardır ama bu organizmalar yüksek yapılı ökaryotlar sınıfına girmez çogunlükla prokaryot veya düşük düzeydeki ökaryotik virüslerdir. Bu bilgi bize DNA yapısının RNA ya oranla daha komplek ve daha saglam bir kalıtım materyali oldugu fikrini verir. Genomda bulunan kalıtsal materyalin uygun bir şekilde kendi kendisini anlatması ve kendi kendisinin varlığını sürdürmesi zorunludur. Transkripsyon işlemi ise genomda bulunan tüm bilgilerden sadece gerekli duyulanların aktivitelerinin başlatılmasında yine transkripsiyon regülasyon mekanizmasıyla düzenli bir şekilde ekprasyonundan sorumluduır. Yani RNA'nın varlığı hem enerji tasarrufunu hemde regülasyonun daha spesifik olmasına neden olmaktadır. Diğer bir nedeni ise protein sentezinin hücre çekirdeğinde degil stoplazma da yapılması zorunluluğudur. Bunun içinde bir aracı molecule ihtiyacı olup, bu aracı molekül ise hem DNA yapısında hemde protein gibi fonksiyon gösterebilen, ribozim, özelliği olan RNA molekülüdür. Bu molekülün DNA dan daha az stable olmasıda gerekmektedir yani kısa sürede degredasyonuda regülasyonda hayat için oldukça önemlidir. Genomdaki bilginin hangilerinin, ne kadar, nerede ve nasıl ekprasyon olmsınıda yine bu DNA dan RNA ya dönüşüm aşamasıyla ayarlanabilmektedir. DNA üzerinde bulunan vede kromozom yapısının oluşumunda görev alan yapısal elementlerin vede intron sekanslarıyla birlikte bazı diger DNA elementlerinin RNA molekülü üzerinde sadece bir kısmının yani genelerin ekprasyonu saglanır. Diger taraftan klatım maddesi sadece hücre döngüsü sırasında replikasyona uğrarken hücrenin yaşamı boyunca transkripsiyon olayı devamlı olmaktadır
- TRANSLASYON:
- Dört monomerden yani A, T, G, C den oluşan genetik şifrenin uygun bir dille 20 doğal amino asiti sentezleyecek konuma yani kodonkullanım aşamasına getirilmesi gerekmektedir. Bunun yanısıra oluşturulmuş polipeptid zinciri üzerindeki bilgininde posttürtranlasyon regülasyonunda işleme sokulması gerekirse INTEN splicing mekanizmasınında devereye sokulması söz konusudur. Bu durum ayrıca WOBBLE olayı ile missens mutasyonlarının yaratabileceği olumsuzluklarında ortadan kaldırılmasınada yardımcı olmaktadır. Protein sentezinin nükleusın dışında rıbosomlarda gerçekleşmesiyle hem nüklestaki işlemlerin azaltılmasına hizmet etmekte hemde yeni bir gen regülasyon mekanizmasinin yaratılmasında görev almaktadır.

- Ökaryotik ve prokaryotik replikonları karşılaştırınız?
- Bakterilerde DNA replikasyonunun oluştuğu DNA ünitesine REPLİKON denir ve her bir hücre döngüsünde tek bir replikon vardır. Replikon replikasyonun başlama noktasına (orijin) ve bitirildiği yada tamamlandığı noktayı (terminus) içerir. DNA da her hangi bir sekans orjine bağlı yada terminus ile orjin arasında olan bölge replikonun parçasıdır ve replikasyona uğrar. Prokaryot ve ökaryotlar arasında en önemli farklılıklardan birisi isi replikasyon şeklidir . Her ökaryotik kromozomu çok sayıda replikon içerir. Birden fazla replikonun ökaryotlarda bulunması DNA replikasyonunun bu tür organizmalarda kontrollü ve korelasyonlu olmasını zorunlu kılar. Ökaryotik kromozomlarda birden fazla replikon olması ve bunların birbirinden bağımsız olarak aktive edilmesi ve replike olmuş replikonun tekrar replike edilmemesi için belirli sinyallere ihtiyaç vardır. Öte yandan kloroplast ve mitokondri genomları replikasyon mekanizması yönünden prokaryotlara benzerler.

- DNA sekanslama işlemlerinde en çok kullanılan method Sanger metodudur bu metodun temel prensibi nedir?
- Bu metodun en çok kullanılma nedenlerinin başında basitliği yanında otomasyona uygunluğuda gelmektedir. Metod enzimatik bir yöntem olup DNA polimerizasyon işleminin seçici olarak sonlandırılmasına bağlıdır. Metodun özü dideoksi nükleotidlerinin (ddNTP) Watson-Crick baz çiftlemesi kuralına dayanarak bir primerle uzatılan DNA replikasyon işleminin 3-OH'in yokluğu ile sonlandırılmasıdır. Metodda radyoaktif etiketleme veya floresans boyalarla etiketlenmiş olan ddNTP' lerin DNA Polimeraz enzimi ve normal dNTP'lerin bir primer eşliginde ve uygun bir buffer ortamında polımerizasyonudur. Reaksiyon 4 ayrı tüpte yapılabileceği gibi tek bir tüptede yapılabilmektedir. Özellikle otomasyon sekanslamalarında tek bir tüp kullanımkatadır. Tek bir tüpte dAdenine, ddAdenine dThymine, ddThymine, dGuanine, ddGuanine, dCytosine, ve ddCytosine bulunmakta ddNTP lar ise mavi, yeşil, sıyah ve sarı renkte floresans boyalarla etiketlenmiş durumdadır. Etiketlenmiş ddNTP lerin konsentrasyonları eşit olup normal dNTP'lerden azdır. Herhengi bir DNA sekansı örnegin 3'-CGGATTCGATCTACGATCGCTACGCATTCAGCATGCATTC-5' 5-3 yönünde bir primerle ve DNA polimeraz enzimiyle reaksiyona sokulduğunda her bir PCR döngüsünde Watson-Crick baz çifti kuralınca sekanslama devam etmekte ancak herhangı bir ddNTP polimerizasyon işlemine girmesi reaksiyonun sonlanmasına neden olmaktadır. Reaksiyon sonucunda her DNA parçası bir ddNTP yle sonlanmakta kapılary veya polıakrilamide gel elektroforesiz yöntemiylede hangi nükleotidin varlıgı anlaşılmaktadır.
- ddNTP hem 3-OH hemde 2-OH yoktur. Dolayısıyla DNA polimerizasyon olayı devam edememektedir.

- Tek ebeveyn kalıtımı (Uniparental inheritance) hayvan ve insanlarda mitekondrinin sadece ve sadece ovumdan zigota taşınması olup spermden zigota geçmez. Organel genomların kendilerine özgü kompartmanlarda bulunmaları ve kendilerine özgü DNA replikasyonunu sağlayan DNA Polimerazlar içerdiğinden nüklear genomla rekombinasyon olmaz. Sizce Neden organel genomlar halen varlıklarını ayrı bir şekilde sürdürüyorlar. GLOBAL DÜZENE neden geçmeyip sınırları ortadan kaldırmıyorlar?
- Endosymbiosis bir organizmanın diğer bir organizma içerisinde yaşamasıdır. Bu durum iki organizmanın birbiriyle kaynaşıp birarada yaşamasıyla mümkündür. Yaklaşık olarak iki milyar yıl önce tek hücreli bir ökaryotik organizmaya en az iki, biri mitokondriyi diğeri kloroplastı taşıyan prokaryotik hücrenin birleşmesiyle 3 genomlu bitki hücresini meydana getiren bir yapının oluşması sağlanmıştır. Genel olarak kloroplat genomunun CYANOBACTERIA dan mitokondri genomunun ise alfa purple bacteria (eubacteria) dan geldigine inanilmaktadır. Endosymbiosis olayı sonrası göze çarpan en önemli özellik yeni eklenen genomların büyüklük oranının hücredeki varlığının azalmasıdır. HETEROPLASMY: birden fazla haplotype'ın tek bir organizma hücresinde bulunmasıdır. Organel genomları bitki hayvan vede çok sayıda düşük ökaryotlarda oldukça önemlidir. Bu organeller enerji kaynaklarıdır. Hem kloroplasta hemde mitokondiride hücrenin yaşamsal kaynagı yani enerji üretimi yapılmaktadır. Bilindigi gibi bu organel genomlari haploid yapı göstermekte ve bu nedenle rekombinasyona ugramamaktadırlar. Bu organel genomlarında bulunan genelerin rekombinasyonları yaşamsal yönden olumsuzluklar yaratabilir. Diger yönden kromozomlar üzerinde her bir kromozom homologuyla bulunur yani her bir genin alternatif formu diger bir kromozom üzerindedir. Organel genomlarda ise bir hücrede bulunan organel gen sayısı ve kopyası oldukça fazladır. Nüklear genomda bu kadar fazla kopyayı taşıyabilmeleri için an az 1000-2000 kopyasının bulunması gerekir buda nuclear genom organizasyonunu zorlaştırabilir. Organel genomda sayılarının çok fazla olması mutasyon şanslarının az olmasıylada ilgilidir. Çevre şartlarına prokaryotic özellik gösterdiginden daha kısa sürede uyabılmekte yani gene eksprasyonlarını daha kısa bir sürede ayarlıyabilmektedir. Organel genomda bulunmalarıyla maternal özellik gösterebilmekte rekombınasyonun verebilecegi olumsuzluklardan etkilenememektedirler. Bir kısım DNA'ları nüklear genomda bulunmaları nedeniyle çok fazla sayıda olan ve değişik organellerde bulunan genomların ortak bir şekilde koordinasyonlarını saglayabilmektedirler.

- Bir amino asit'in kendi tRNA'sına bağlanmasi bu amino asite özel amina asit synthetase tarafindan gerçekleştirilir bunun hücreye faydası nedir?
- Bu durum doğru aminoasitlerin doğru tRNA'lara bağlanması anlamına geldiginden bır nevi proof reading aktivitesidir ve doğru bir polipeptidin sentezlenmesinde oldukça önemlidir. Aminoacyl-tRNA synthetase'ın 3 önemli bağlanma bölgesi vardır. Bunlar tRNA, Amino asit ve ATP bağlanma yerleri yada bölgeleridir. Bir amino asit ATP'yle reaksiyona girerek AMİNOASİT-ADENİLATE oluşur ve PYROPHOSPHATE açığa çıkar. Gerekli enerji ATP tarafından sağlanır. Bu durumda aminoacy-AMP oluşur. Enzim üzerindeki tRNA bağlanma bölgesine bağlı olan tRNA' nın 3'-OH grubu ile enzimin amino acit bölgesinde bulunan aninoacyl-AMP arasındaki reaksiyon oluşur. AMP uzaklaşırken tRNA charged yada yüklü hale gelir. Daha sonra charged-tRNA enzimden ayrılır.

- Ökaryotlarda histonlar neden vardır ve neden lösin ve arjinin'den oluşurlar?
- Hücrede bulunan DNA molekülü histon adı verilen proteinlere ve replikasyon ve traskripsiyonda görevli olan bir çok sayıda proteinlere bağlı bir durumdadır. HİSTON VE DNA nın oluşturduğu yapıya nükleosom (nucleosome) denir. Nükleosom da 8 adet histon proteinleri bulunmakta olup bunlar 2'şer adet H2A, H2B, H3 VE H4'dir. H1 proteini nükleosomda bulunmayıp kalıtım materyalinin ileri paketlenme aşamalarında görev alır. Histon proteinlerinde lösin ve arjinince zengindir ve bu sayede negatif yüklü DNA sarmalına baglanır. Paketlenmenin ilk aşaması nüklesom yapısı ve hıston proteinlerine baglanmiş konumdadir. DNA replikasyonu ve transkripsiyon sırasında veya herhangı bır HATA onarım evresinde hıstonların düzenlü bir şekilde uzaklaştırılması ve yeniden yapılandırılmaları zorunluluk arzeder. Histonların yardımıyla, ökaryoik DNA 100 mg/ml yogunluğa yükselebilmekte ve fazla miktardaki kalıtım materyalini küçük hacimlerde saklayabilmektedir.

- Tek ebeveyn kalıtımı (Uniparental inheritance) hayvan ve insanlarda mitekondrinin sadece ve sadece ovumdan zigota taşınması olup spermden zigota geçmez. Organel genomların kendilerine özgü kompartmanlarda bulunmaları ve kendilerine özgü DNA replikasyonunu sağlayan DNA Polimerazlar içerdiğinden nüklear genomla rekombinasyon olmaz. Sizce Neden organel genomlar halen varlıklarını ayrı bir şekilde sürdürüyorlar. GLOBAL DÜZENE neden geçmeyip sınırları ortadan kaldırmıyorlar?
- Endosymbiosis bir organizmanın diğer bir organizma içerisinde yaşamasıdır. Bu durum iki organizmanın birbiriyle kaynaşıp birarada yaşamasıyla mümkündür. Yaklaşık olarak iki milyar yıl önce tek hücreli bir ökaryotik organizmaya en az iki, biri mitokondriyi diğeri kloroplastı taşıyan prokaryotik hücrenin birleşmesiyle 3 genomlu bitki hücresini meydana getiren bir yapının oluşması sağlanmıştır. Genel olarak kloroplat genomunun CYANOBACTERIA dan mitokondri genomunun ise alfa purple bacteria (eubacteria) dan geldigine inanilmaktadır. Endosymbiosis olayı sonrası göze çarpan en önemli özellik yeni eklenen genomların büyüklük oranının hücredeki varlığının azalmasıdır. HETEROPLASMY: birden fazla haplotype'ın tek bir organizma hücresinde bulunmasıdır. Organel genomları bitki hayvan vede çok sayıda düşük ökaryotlarda oldukça önemlidir. Bu organeller enerji kaynaklarıdır. Hem kloroplasta hemde mitokondiride hücrenin yaşamsal kaynagı yani enerji üretimi yapılmaktadır. Bilindigi gibi bu organel genomlari haploid yapı göstermekte ve bu nedenle rekombinasyona ugramamaktadırlar. Bu organel genomlarında bulunan genelerin rekombinasyonları yaşamsal yönden olumsuzluklar yaratabilir. Diger yönden kromozomlar üzerinde her bir kromozom homologuyla bulunur yani her bir genin alternatif formu diger bir kromozom üzerindedir. Organel genomlarda ise bir hücrede bulunan organel gen sayısı ve kopyası oldukça fazladır. Nüklear genomda bu kadar fazla kopyayı taşıyabilmeleri için an az 1000-2000 kopyasının bulunması gerekir buda nuclear genom organizasyonunu zorlaştırabilir. Organel genomda sayılarının çok fazla olması mutasyon şanslarının az olmasıylada ilgilidir. Çevre şartlarına prokaryotic özellik gösterdiginden daha kısa sürede uyabılmekte yani gene eksprasyonlarını daha kısa bir sürede ayarlıyabilmektedir. Organel genomda bulunmalarıyla maternal özellik gösterebilmekte rekombınasyonun verebilecegi olumsuzluklardan etkilenememektedirler. Bir kısım DNA'ları nüklear genomda bulunmaları nedeniyle çok fazla sayıda olan ve değişik organellerde bulunan genomların ortak bir şekilde koordinasyonlarını saglayabilmektedirler.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR. DR. MEHMET KARACA

- DNA sekanslama işlemlerinde en çok kullanılan method Sanger metodudur bu metodun temel prensibi nedir?
- Bu metodun en çok kullanılma nedenlerinin başında basitliği yanında otomasyona uygunluğuda gelmektedir. Metod enzimatik bir yöntem olup DNA polimerizasyon işleminin seçici olarak sonlandırılmasına bağlıdır. Metodun özü dideoksi nükleotidlerinin (ddNTP) Watson-Crick baz çiftlemesi kuralına dayanarak bir primerle uzatılan DNA replikasyon işleminin 3-OH'in yokluğu ile sonlandırılmasıdır. Metodda radyoaktif etiketleme veya floresans boyalarla etiketlenmiş olan ddNTP' lerin DNA Polimeraz enzimi ve normal dNTP lerin bir primer eşliginde ve uygun bir buffer ortamında polimerizasyonudur. Reaksiyon 4 ayrı tüpte yapılabileceği gibi tek bir tüptede yapılabilmektedir. Özellikle otomasyon sekanslamalarında tek bir tüp kullanımkatadır. Tek bir tüpte dAdenine, ddAdenine dThymine, ddThymine, dGuanine, ddGuanine, dCytosine, ve ddCytosine bulunmakta ddNTP lar ise mavi, yeşil, siyah ve sarı renkte floresans boyalarla etiketlenmiş durumdadır. Etiketlenmiş ddNTP lerin konsentrasyonları eşit olup normal dNTP'lerden azdır. Herhengi bir DNA sekansı örnegin 3'-CGGATTCGATCTACGATCGCTACGCATTCAGCATGCATTC-5' 5-3 yönünde bir primerle ve DNA polimeraz enzimiyle reaksiyona sokulduğunda her bir PCR döngüsünde Watson-Crick baz çifti kuralınca sekanslama devam etmekte ancak herhangi bir ddNTP polimerizasyon işlemine girmesi reaksiyonun sonlanmasına neden olmaktadır. Reaksiyon sonucunda her DNA parçası bir ddNTP yle sonlanmakta kapılary veya poliakrilamide gel elektroforesiz yöntemiylede hangi nükleotidin varlıgı anlaşılmaktadır.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR DR. MEHMET KARACA

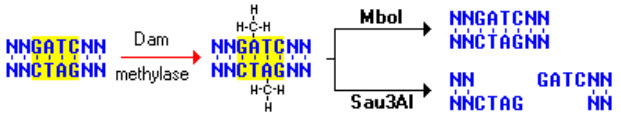
**Metilaz Enzimleri**

Deoksiadenozinmetilaz (deoxyadenosine methylase **Dam methylase)** enzimi metil grubunu GATC sekansındaki adenin bazına ekler: GmATC.

Deoksisitozinmetilaz (Dcm methylase) bu enzim ise ikinci sitozine CC(A/T)GG metil ekler CmC(A/T)GG.

Metilasyon birçok restriksiyon enziminin kesme özelliğini engellemektedir. Örneğin MboI ve Sau3AI (isoschizomer) her ikiside GATC tanır ve keser.

Dam metilaz GmATC MboI kesemez ancak Sau3AI kesebilir.




- **Restriksiyon Enzimlerinde Yıldız Aktivitesi (Star Activity)**
- Yüksek pH (>8.0) veya düşük tuz
- Gliserol > 5%
- Yüksek enzim konsantrasyonu(>100 U/ug)
- DMSO, etanol veya kloroform

- **Nükleazlar: DNaz ve RNaz**
- **(Nucleases: DNase and RNase)**
- **-DNase I ve RNase A** (Sığır Pankreasından)
- **-Deoxyribonuclease I**: çsDNA veya tsDNA'yı genellikle (C veya T) bazlarından keser. Endonükleaz'dır. Reaksiyon sonunda 5'-phosphorylated di, tri ve tetranükleotidler oluşturulur.
- Mg'un bulunması halinde DNase I çsDNA'nın herbir sarmalını rastgele keser.
- Mn'ın bulunması durumunda çsDNA'nın her ikisinide keserek düz uçlu parçalar veya 1-2 baz uzunluğunda asılı uçlar yapar. Bu enzim RNA kesemez.
- RNA ekstraksiyonunda DNA'yı uzaklaştırma. DNase footprinting metoduyla DNA-protein arasındaki interaksiyonların analizinde.
- nick translasyon (probe).

- **Ribonuclease A** (endoribonuclease) Bu enzim tsRNA'yı 3' ucundaki pirimidinleri hidrolize eder. Reaksiyon sonucunda 3'-OH yerine 3'-phosphorylated mononükleotiler ve oligonükleotitler oluşur.
- DNA ekstraksiyonu
- Bu enzim RNA:DNA hibridinde mismatches olduğu yerlerde RNA sarmalını hidrolize eder
- **Exonuclease III** (E. coli)
- çsDNA'nın 3' uçlarındaki bazları hidrolize eder. Tercih ettiği DNA düz uçlu veya 5' çıkıntılı çsDNA'dır.
- çsDNA'daki nick'leri açarak tek baz uzunluğunda boşluklar yapar. 3' protruding (çıkıntı yapan) uçları tercih etmez ve tsDNA'ya dokunmaz. Bu enzim en çok lineer DNA uçlarında nick'ler yapmak için kullanılır

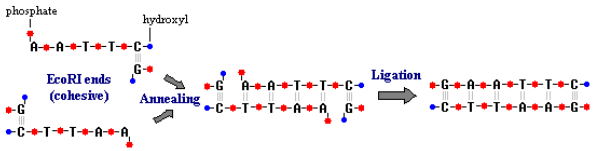
BİLGİ ÜNİVERSİTESİ DENİZLİDİR.EDU.TR DR. MEHMET KARACA

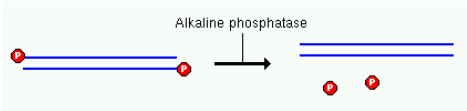
- **Mung Bean Nuclease** (Mung bean sprouts)
- tsDNA'yı 5'-phosphorylated mono veya oligonucleotidelere hidrolize eder. Yüksek konsantrasyonda kullanılırsa çsDNA'yıda hidrolize eder. Çentik uçlu DNA'yı düz uçlu hale dönüştürür.
- **Nuclease BAL 31 (**exonuclease)
- çsDNA'nın her iki ucunu hidrolize ederek degrede eder. Nick'lerdeki DNA'yıda hidrolize eder. çsDNA endonükleaz aktivite gösteremez. çsDNA'ların kısaltılmalarında kullanılır.
- **Nuclease S1**(*Aspergillus*)
- Enzim konsantrasyonuna göre substratları farklıdır. Düşük konsantrasyonlarda tsDNA veya RNA hidrolize eder. Yüksek konsantrasyonlarda ise (DNA:DNA, DNA:RNA ve RNA:RNA) hidrolize edilir
- Normal konsantrasyonlarda çsDNA nicklerden veya küçük boşluklardan hidrolize edilir.
- DNA:RNA hibrit (S1 nuclease mapping) ve düz uçlar yapmada kullanılır.

**DNA Ligaz (DNA Ligase)**

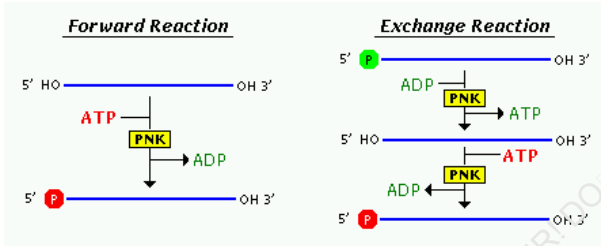
Bu enzim (T4 bakteriyofaj kökenli olup) 5'-P ile 3'-OH arasında fosfodiester bağını yapar. Kofaktörü ATP'dir. E. coli kökenli enzim isi NAD kullanır.

**İki veya daha fazla sayıda DNA parçacığı (blunt veya cohesive (sticky) uçlu ATP içeren buffer (0.25 to 1 mM) T4 DNA ligaz**



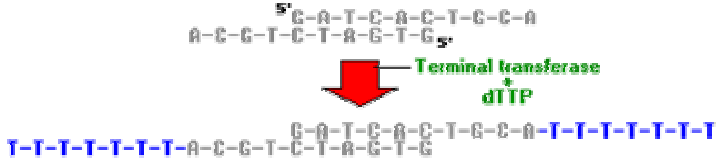

- **Alkalin Fosfataz (Alkaline Phosphatase)**
- **Bacterial alkaline phosphatase (BAP)** : Reaksiyonunun durdurulması zor.
- **Calf intestinal alkaline phosphatase (CIP)**: BAP'dan daha az aktif ama reaksiyonunu durdurmak kolay. Proteaz (protease) yıkımı veya (75oC for 10 dk, buffer 5 mM EDTA).
- **Shrimp alkaline phosphatase** (SAP): kolayca inaktive edilebilir (65C 15 dk)
- Kullanımı: klonlama ve etiketleme,
- Düz (blunt) veya 5'- içte gedik (recessed ends)'in defosforilizasyonu için yüksek konsantrasyonlarda kullanılır.

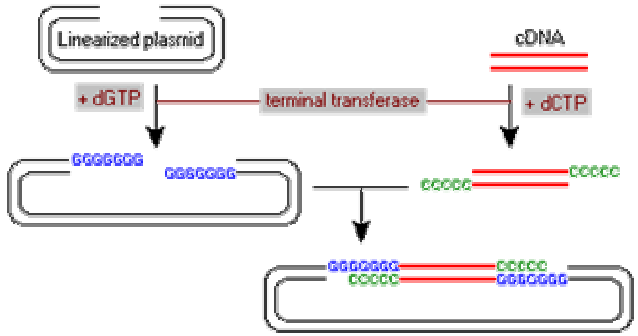



- **(gamma fosfat) DNA veya RNA'nın 5' ucunda transferini sağlar.**
- KULLANIMI
- Fosforilizasyon (linkers, adaptors, ligation)
- Etiketleme (32P)

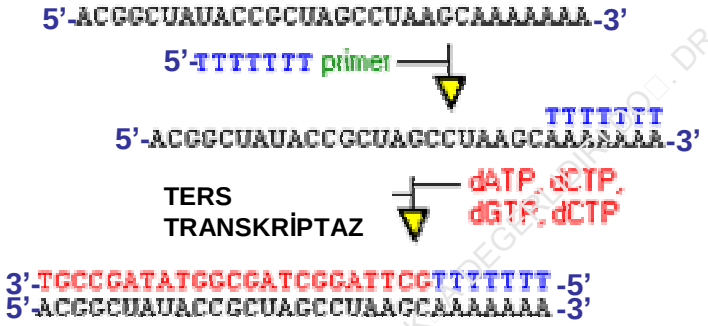
BİLGİ PAYLAŞTIRMA DEĞERLİDİR!!! PROF. DR. MEHMET KARACA

- **TERMİNAL TRANSFERAZ (Terminal Transferase)**
- Bu enzim genellikle tek sarmallı DNA'nın 3' ucuna veya çift sarmallı DNA'nın 3' çıkıntılı uçlarına nükleotitlerin (dNTP) sentezini yapar. Bu DNA polimeraz kalıp gerektirmeyen DNA polimerazlara örnektir. Kofaktörü kobalt elementidir. Bu enzimin aktivite etkinliği az olmakla birlikte ucu düz çifte sarmallı DNA'nın 3'-OH kısmına da ekleme yapabilmektedir.
- DNA'NIN 3' ucunun etiketlenmesinde




- **Ters Transkriptazlar (Reverse Transcriptases)**
- Bu gruba giren enzimler RNA-bağımlı (güdümlü) DNA polimerazlardır (RNA-dependent DNA polymerase).
- Bu enzim DNA polimeraz aktivitesiyle *in vitro* şartlar altında hem tek sarmallı RNA hemde tek sarmallı DNA zincirinde RNA veya DNA primerinin varlığında komplementary DNA zincirini sentezleyebilmektedir.
- RNaz H Aktivitesi (**RNase H activity):** RNaz H (RNase H) bir çeşit ribonükleaz (ribonuclease) olup fonksiyonu RNA zincirini RNA-DNA hibridinden parçalayarak ayırmaktır. Bu enzim hem endonükleaz hem de eksonükleaz aktivitesine yani hidrolize ederek parçalama aktivitesine sahiptir.




BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR - DOÇ. DR. MEHMET KARACA

# BU DERSTE İŞLENECEK OLAN DNA TEKNİKLERİ

1. Elektroforesiz
2. Restriksiyon Enzimleri
3. PZR

## *Elektroforesiz*

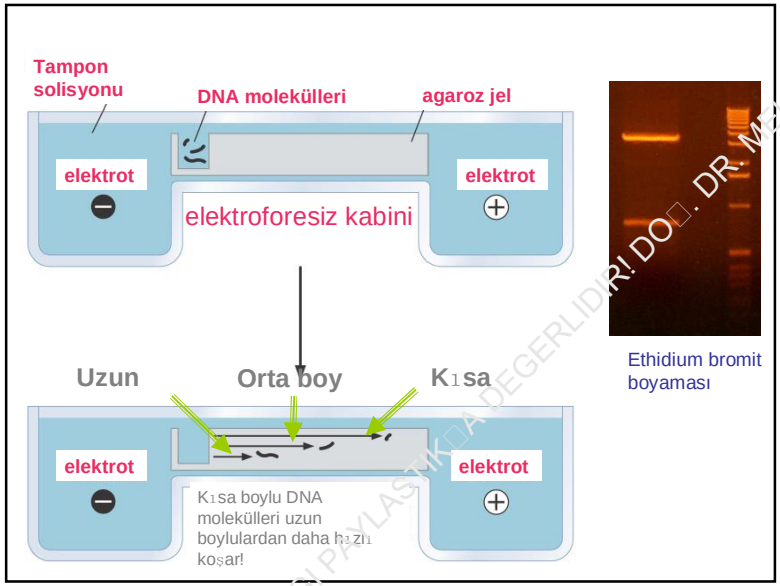
1. Jel elektroforesis yöntemiyle negatif yüklü DNA ve RNA molekülleri şekillerine, büyüklüklerine ve topolojik özelliklerine (sekonder yapıları) göre ayrıştırılırlar

**Jel matriks jelimsi maddelerler biyolojik moleküllerin desteklenmesi, ve hareket etmelerini sağlayacak şekilde porlar (açıklıklar) içeren, DNA ve RNA'ya bağlanmadan ve yapısın etkilemeyen matriklerdir**

***Agaroz*** **ve poliakrilamit en çok kullanılan jel matriks maddeleridir.**

## *Elektroforesizin Prensibi*

- DNA RNA molekülleri negatif yüke sahiptirler bu nedenle iki kutuplu bir jel matriksine kondukları an pozitif yüklü kutuba yönelirler.
- Pozitif kutuba yönelmede lineer DNA molekülleri boylarına göre hareket edebilirler. Küçükler büyüklere göre daha hızlı hareket eder.
- Halka şeklindeki DNA'lar topolojileri hareket hızları farklıdır
  - Aynı büyüklükteki DNA'lar ancak farklı şekildeki olanlar farklı hızda hareket ederler.
    - Süperkıvrımlı DNA lineer DNA'dan hızlıdır, Lineer DNA'da kesikli veya halka DNA'lardan hızlıdır.




BİLGİ PAYLAŞIMI DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

## Elektroforesiz

**FARKLI BOYDAKI DNA MOLEKÜLLERİN AYRIŞTIRMA İŞLEMLERİNDE FARKLI JEL MATRİKSİNE KULLANILMALIDIR**

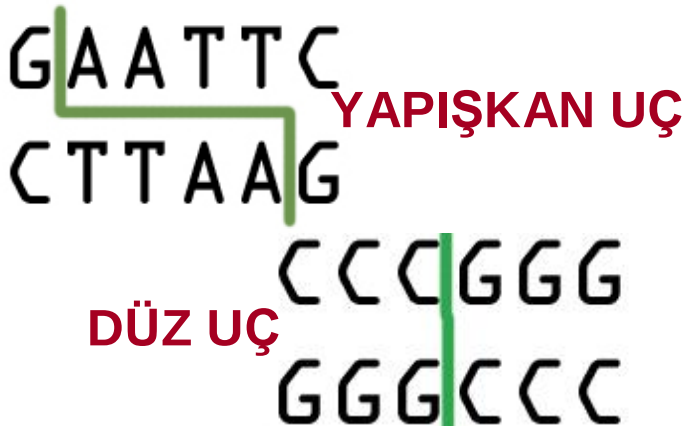
- **KÜÇÜK BOYLU DNA İÇİN (20-200 baz uzunluğunda): poliakrilamit jel**
- **BÜYÜK BOYLU DNA (100-100000): agaroz jel**
- **ÇOK BÜYÜK DNA (>30-50 kb): kesikli elektrikse alan jel elektroforesiz ve agaroz**

## Restriksiyon Enzimleri (RE)

- **Spesifik endonükleazlardır. Kısa ancak spesifik DNA sekansını tanır ve tanıdığı bölgeyi yada bu bölgenin yakınlarındaki bölgeden DNA keser**
- **Tanıma yada tanınma bölgesindeki DNA sekansı spesifik bir dizilime sahip olup PALİNDROMİK dizi yada sekansları vardır.**
- **Polindromik sekanslar 2, 4, 6, 8 veya daha uzun DNA dizisi içerebilir.**
- **Palindrome dizisi DNA sekans dizilişi olup komplementer sekansının bir ucundan okumayla diğer sekansaın zıttından okunduğunda aynı sekans dizisi okunur.**

- **Restriksiyon Endonuklaz Tipleri**
- **Biyokimyasal açıda RE üç tip altında isimlendirilmektedir. Tip I, II ve III. Tip I ve Tip III her ikisinde de metilaz ve restriksiyon (kesme) aktiviteleri enzimin üzerinde bulunur. Bu enzimler DNA üzerindeki özel dizileri tam olarak tanıyabilmelerine ragmen kesme işlemleri tanıma bölgeleri çevresinde gerçekleştirmektedirler. Bazı durumlarda çok uzak dizilerden bile kesim yapılabilmektedir.**
- **Tip II restriksiyon enzimlerinde ise restriksiyon aktivitesi metilaz aktivitesinden bağımsızdır ve bu tip enzimler tam olarak tanıma noktasından kesebilmektedir.**

- **RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ'LAR**
- **Restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri çift sarmallı DNA'da bulunan özel sekanslarından kesen enzimlerdir. Bu enzimler çift sarmallı DNA nın her bir sarmalından fosfodiester bağlarını genellikle polondiromik sekanslardan keser.**
- **Restiriksiyon enzimleri ligaz enziminin tam anlamıyla tersini yapan enzimlerdir. RE enzimi ve DNA ligaz enzimi yardımıyla farklı orijinlere sahip DNA kesilip yeniden birleştirilebilir (Splicing)**
- **Restriction tanımı RE'nin ilk olarak E. coli bakterisinde keşfedilmiş olup E. coli RE baktriofaj DNA'sının E. coli'ye entegre olmasını koruması, restriksiyon etmesiniden esinlendiğinden bu isim verilmiştir.**
- RE DNA'yı rastgele kesmez ve tanıma dizileri **denilen özel sekansları bu DNA üzerinde olması gerekmektedir. Bazı RE bir sarmalı kesim noktasının tam karşısındaki sarmalıda keser bu tür RE düz uç bırakırlar. Diğer bazı RE ise yapışkan yada dişli uç yaparlar.**




- **Palindromik Diziye Örnek:**
  **5′-GAATTC-3′**
  **3′-CTTAAG-5′**
- **Restriksiyon enzimleri (RE) bakterilerden izole edilirler**
  - **RE isimi izole edildiği bakteri adını taşır**
  - **Cins isminin ilk harfini alır ve sonraki birkaç harfini küçük harflerle alabilir**
  - **Diğer harfler ise varsa bakteri türünü veya ırkını gösterir**
  - **Roma rakamı ise aynı bakteriden izole ediliş sırasını gösterir.**
  - **Roma rakamı dışındaki harfler italik olarak yazılır**

- **Örneğin: *EcoR*I**
  - **E: *Escherichia (cins)***
  - **co: *coli (türü)***
  - **R: R ırkı**
  - **I: *Escherichia coli* R ırkından bu enzimin izole edliş sırası**

BILGI PAYLAŞMA DERNEĞİ DOÇ. DR. MEHMET KARACA

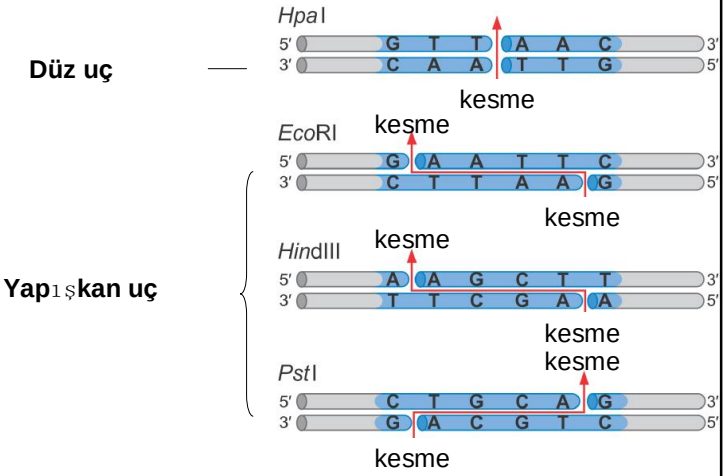
## *Restiriksiyon endonünükleaz*

- Kesme olasılığı:

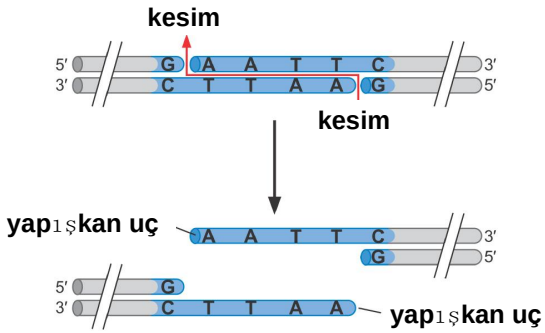
  1/4096 $(4^{-6})$

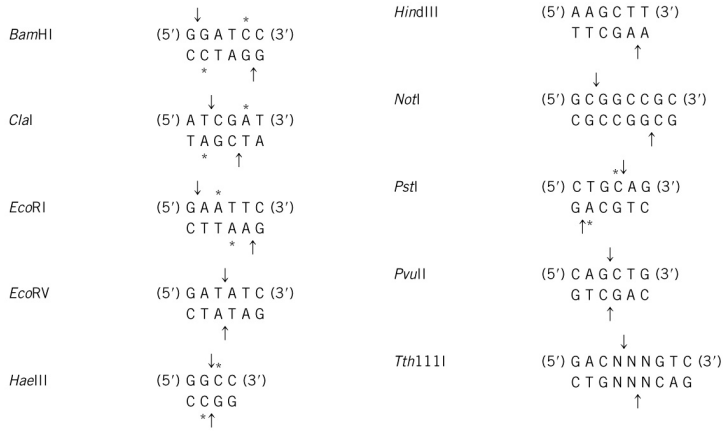
BILGI PAYLASTIK□A DEGERLIDIR! DO□. DR. MEHMET KARACA

## *Restriction digestion*




## **Restriksiyon Endonükleaz**

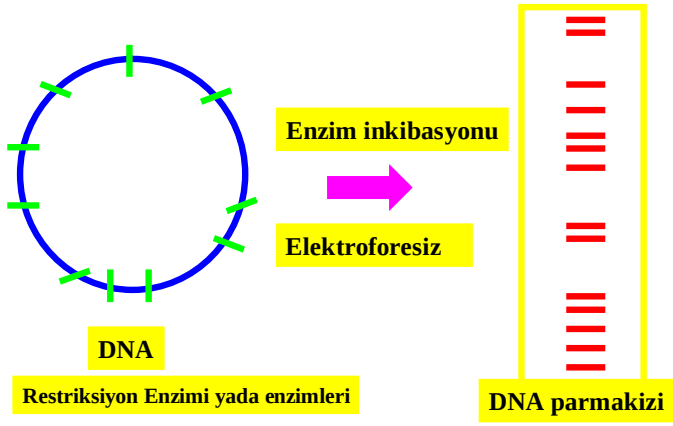


| Enzim | Kaynak | Tanıma Sekansı | Kesim |
|---|---|---|---|
| EcoRI | *Escherichia coli* | 5'GAATTC3‘<br>CTTAAG | 5'---G AATTC---3‘<br>3'---CTTAA G---5' |
| BamHI | *Bacillus amyloliquefaciens* | 5'GGATCC3‘<br>CCTAGG | 5'---G GATCC---3‘<br>3'---CCTAG G---5' |
| HindIII | *Haemophilus influenzae* | 5'AAGCTT3‘<br>TTCGAA | 5'---A AGCTT---3‘<br>3'---TTCGA A---5' |
| TaqI | *Thermus aquaticus* | 5'TCGA3‘<br>AGCT | 5'---T CGA---3‘<br>3'---AGC T---5' |
| AluI | *Arthrobacter luteus* | 5'AGCT3‘<br>TCGA | 5'---AG CT---3‘<br>3'---TC GA---5' |

BILGI PAYLAŞTIK_AFYONKARLIOĞLU_DR. MEHMET KARACA

## Restriksiyon Endonükleaz Haritalaması




- Restriksiyon Endonükleazların Kullanım Alanları:
- Çeşit Ayrımında: RE Haritaları
- Fiziksel Haritalama: RE Haritaları
- Gen Dizilerinin Belirlenmesinde
- Klonlama Çalışmalarında
- PZR-RE Yöntemi
- RE-PZR Yöntemi

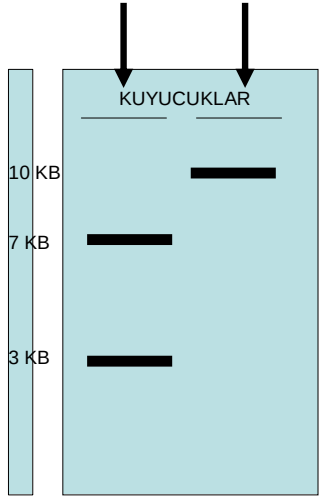
## RE HARİTALAMALARI

- RE ENZİM YADA ENZİMLERİNİN BELİRLİ BİR DNA’NIN (HALKA YADA LİNEER DNA) MUAMELE EDİLMESİNİN ARDINDAN AGAROZ JEL ELEKTROFORESİZ YÖNTEMİYLE AYRIŞTIRILIR VE DNA’NIN ÜZERİNDEKİ RESTRİKSİYON ENZİMLERİNİN KESİM NOKTALARI BELİRLENİR.

- EN BASIT RESTRİKSİYON HARİTALAMASI TEK ENZİMİN KESİM NOKTASININ BELİRLENMESİDİR:
- BUNUN İŞİN DNA PARÇASI VE BİR RESTRİKSİYON ENZİ UYGUN SICAKLIK VE ENZİM SOLİSYONU (ENZİM, KOFAKTÖR, GEREKLİ OLAN DİĞER ALT TEPKENLER (BSA, TRİS, KCI, VS) BELİRLİ BİR SÜRE MUAMELE EDİLİR. DAHA SONRA KESİLMİŞ VE KESİLMEMİŞ DNA BİR AGAROZ JEL ÜZERİNDE ELEKTROFORESİZ İŞLEMİNE TABİ TUTULARAK ANALİZ EDİLİR VE YORUMLANIR.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR DR. MEHMET KARACA

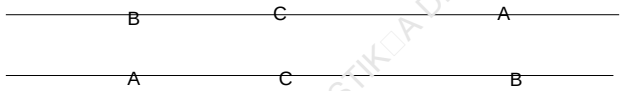
- Örnekte lineer bir DNA üzerinde tek bir kesim noktası görülmektedir.
- Eger DNA halka şeklinde bir DNA olasaydı ve yine yandaki analiz elde edilseyde bu durumda 2 RE kesim bölgesi tesbit edilmiş olurdu




- Gerçek RE haritalamalarında birden çok fazla RE kullanılır ve analiz sonucu DNA'nın lineer mi yoksa halka şeklinde mi olduğuda anlaşılabilir.
- Bu tür çalışmalar nasıl gerçekleşir?

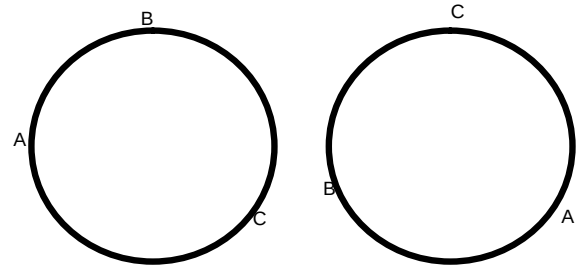
- Örneğin 3 RE kullanılıyor olsun bu durumda birden çok RE kesim reaksiyonu oluşturulması gerekir. RE örnegin HindIII, MseI, EcoRI, olsun.
- 1-DNA önce her bir RE' ile ayrı ayrı reaksiyona sokulur.
- 2-Her bir reaksiyona 2 enzimle devam edilir (Örneğin HindIII ve MseI, HindIII ve EcoRI, MseI ve EcoRI, MseI ve EcoRI)
- 3- Her 3 enzim birden kullanılarak çalışma sürdürülür.

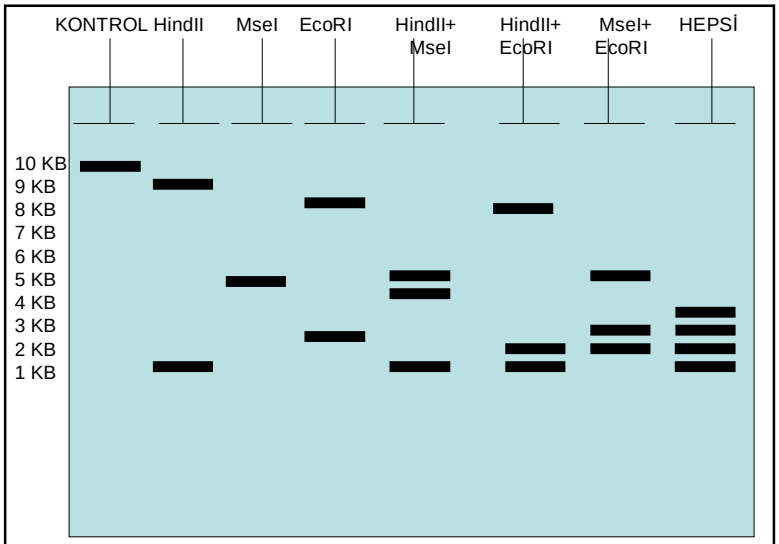
- RE HARİTALAMALARI İÇİN ÖNEMLİ İP UÇLARI:
- BİREYSEL ENZİM REAKSİYON SONUÇLARI DİKKATLE İNCELENEREK KESİM NOKTA VE BÜYÜKLÜKLERİ İLE 2 Lİ VE 3 LÜ KESİMLERDE OLUŞAN YENİ DNA PARÇALARININ VARLIĞI TESBİT EDİLMELİDİR.
- 2 Lİ VE 3 LÜ REAKSİYONLARDA OLUŞAN YENİ DNA PARÇALARI BİR RE ENZİMİ ÜZERİNDE DİĞER BİR RE'İM KESİM NOKTASI OLDUĞUNUN BELİRTİSİDİR.
- LİNEER DNA'LARDAKİ RE HARİTASINA BAKARAK DNA'YI TAM SOLDAN SAĞA YADA SAĞDAN SOLA MI DİZAYN EDİLECEĞİ ÖNEMLİ DEGİLDİR

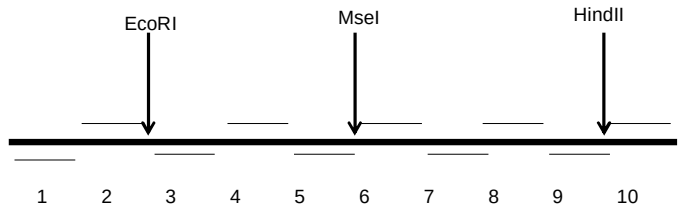



BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR DR. MEHMET KARACA

- EĞER ÜZERİNDE ÇALIŞILAN DNA HALKA ŞEKLİNMDE BİR DNA İSE YİNE BİR HALKA ÜZERİNDE DE DÖNGÜ YÖNÜ ÖNEMLİ OLMAYABİLİR



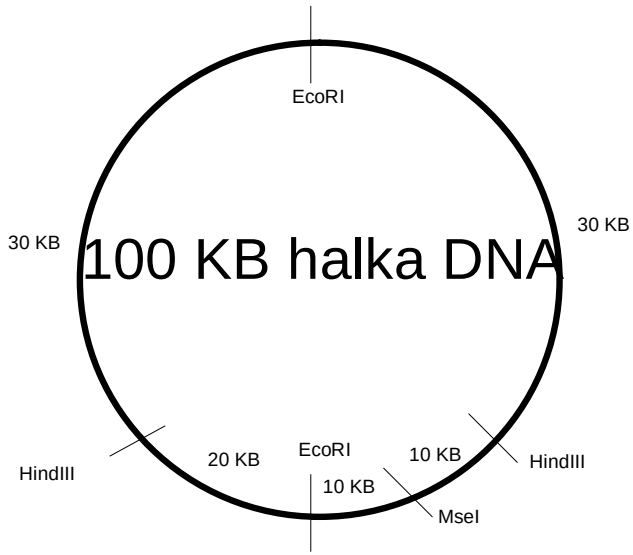
# RE HARİTALAMA (ÖRNEK)

- Üzerinde çalıştığınız bir DNA önce EcoRI RE kestiniz ve 50 KB uzunluğunda tek band, aynı DNA'yı HındIII enzimiyle kestiğinizde 60 KB ve 40 KB'lik 2 band elde ettiniz, aynı DNA'yı MseI enzimiyle kestiğinizde ise 100 KB tek band elde ettiğinizi gördünüz. Denemeye EcoRI ve HindIII enzimiyle devam ettiğinizde ise biri 30 KB diğeri 20 KB boyunda 2 band görürken, EcoRI ve MseI kesimde 50 KB, 40 KB ve 10 KB'lik 3 band, HindIII ve MseI ile kesimde 60 ve 40 KN'lik 2 band görürken her 3 enzimi kullandığınızda da 30, 20 ve 10 KB 3 band gördüğünüze göre:
- 1) Bu DNA lineer mi Yoksa halka şeklinde mi? Neden?
- 2) Bu DNA'nın uzunluğu nedir? Neden?
- 3) Bu DNA üzerinde EcoRI, MseI ve HindII RE kesim noktalarını ve bu kesim noktaları arasındaki DNA parçalarının uzunluklarını gösteriniz?

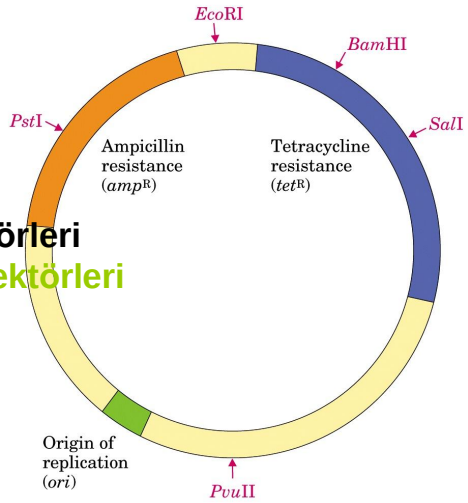
BILGI PAYLAŞIMA DESTEK AMACIYLA DR. MEHMET KARACA

# YANITLAR:

- Kontrol olarak hiç RE kullanmadan bu DNA'yı Agaroz JKel Elektroforesizde analiz ederim ve elde ettigim DNA büyüklüğünü not ederim. Yanıtta bunu 100 KB olarak görmeniz açıktır. HindIII enzimiyle kesildiğinde 60 ve 40 KB'lik 2 band çıkarken EcoRI kesimi tek bir 50 KB'lik band ve MseI kesimi tek band olarak 100 KB verdiğinden dolayı bu DNA'nın toplam uzunluğu 100 KB'dir. Ayrıca tek bir kesimde tek band elde edildiğine göre bu Halka şeklinde bir DNA'dır.

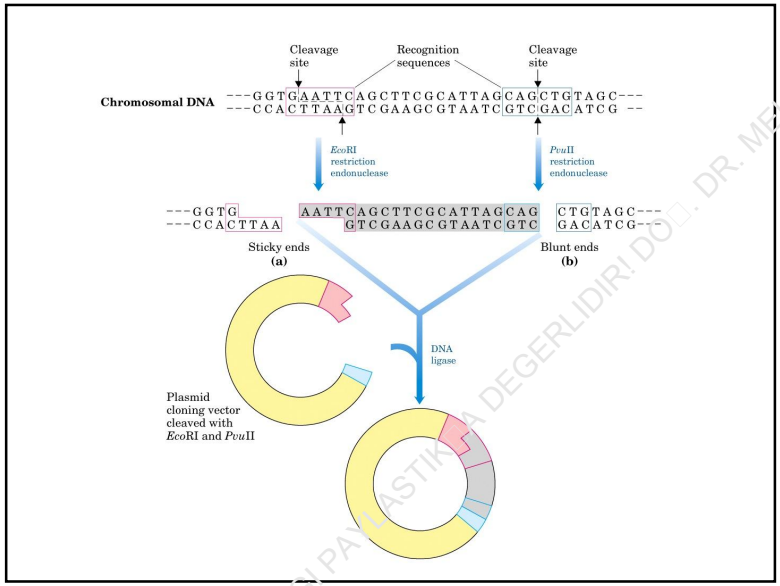



# Vektörler

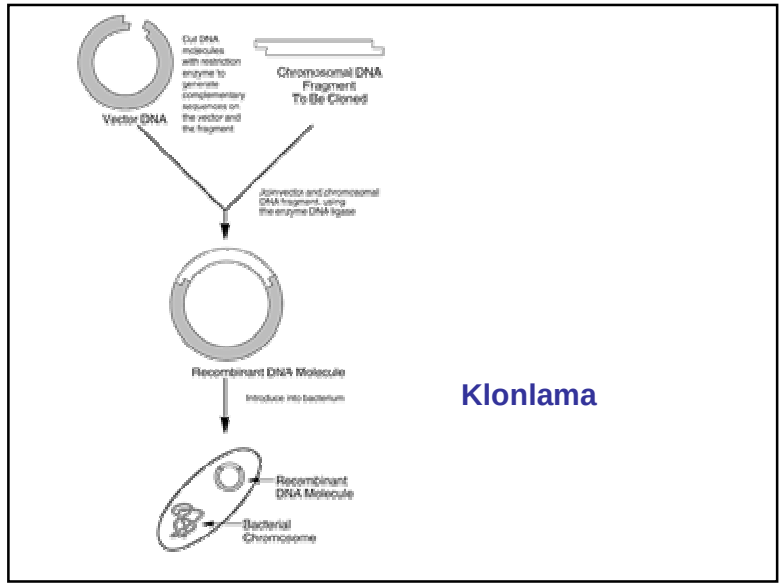



**Klonlama Vektörleri**

**Sekanslama Vektörleri**




BILGI PAYLASTIKCA DEGERLIDIR! DOC. DR. MEHMET KARACA

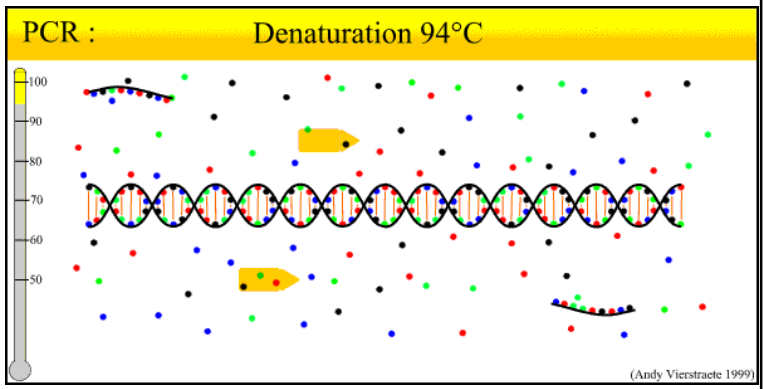



**Klonlama**

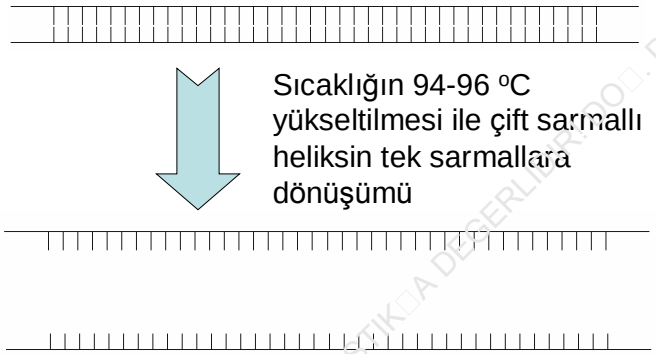
Polimeraz Zincir Reaksiyonu

# PZR

**DNA çoğaltımında kullanılan yöntem olup tek veya çift sarmallı DNA 2-4 saatlik bir sürede milyonlarca çoğaltılabilmektedir.**



# 1. Basamak: Denatürasyon

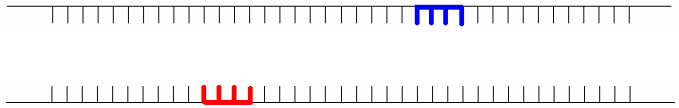


Sıcaklığın 94-96 ºC yükseltilmesi ile çift sarmallı heliksin tek sarmallara dönüşümü

BILGI PAYLAŞTIKÇA DEĞERLENİR. DR. MEHMET KARACA

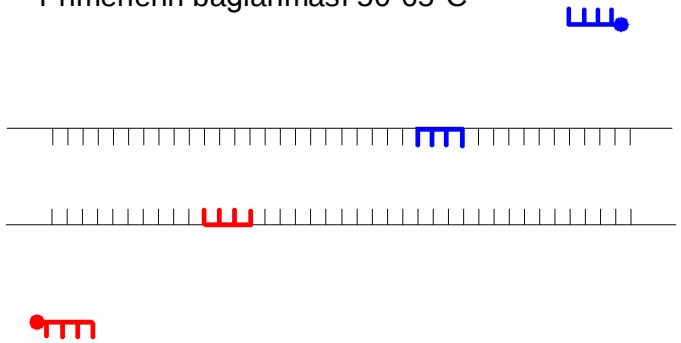
# Primerler

- **Küçük uznuluklarda DNA dizileri olup 5 ila 30 baz uzunlugundadır (genellikle 18-22 nükleotit uzunluğunda). Bazen çok spesifik şekilde dizi edilerek özel genlerin belirlenmesinde kullanıldıkları gibi bazı durumlarada konsensus dizileri içererek farklı DNA parçlarının PCR analiz edilmelerinde kullanılırlar.**



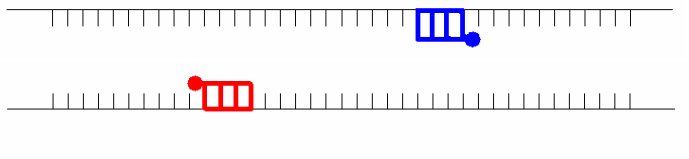
# 2. Basamak Annealing

- Primerlerin bağlanması 50-65ºC



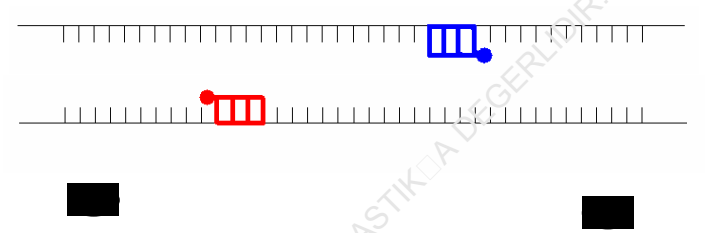
# Annealing

- Primerlerin bağlanması 50-65ºC



# Polimerizasyon

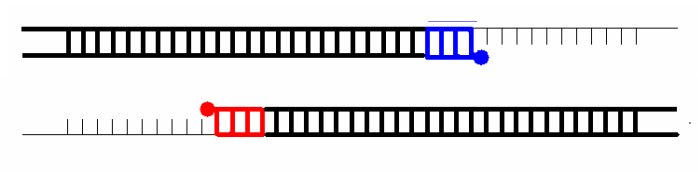
• Sıcaklık tekrar 72℃ yükseltilir ve DNA polimeraz enzimi Mg++ kofaktörlüğünde deoksiribonükleotit trifozfatları polimerleştirerek yeni sarmallar sentezler



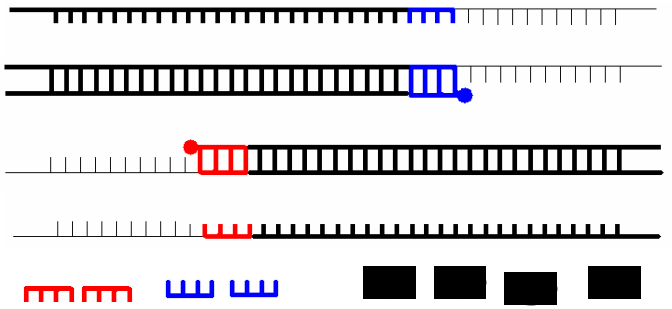
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLENİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

• **Polimerizasyon**:

•Sıcaklık tekrar 72℃ yükseltilir ve DNA polimeraz enzimi Mg++ kofaktörlüğünde deoksiribonükleotit trifozfatları polimerleştirerek yeni sarmallar sentezler



• Denatürasyon, Annealing ve Polimerizasyon 30-40 kez tekrarlanır



# PZR

