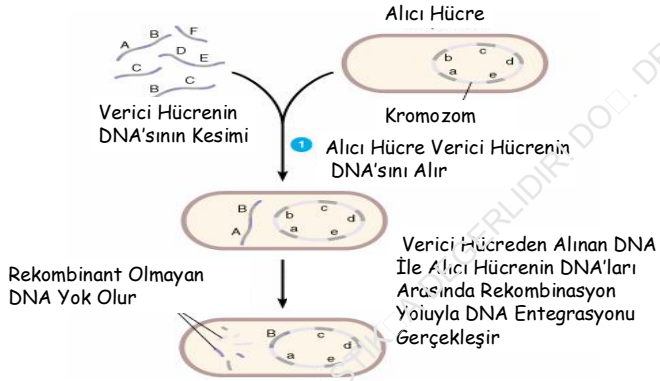
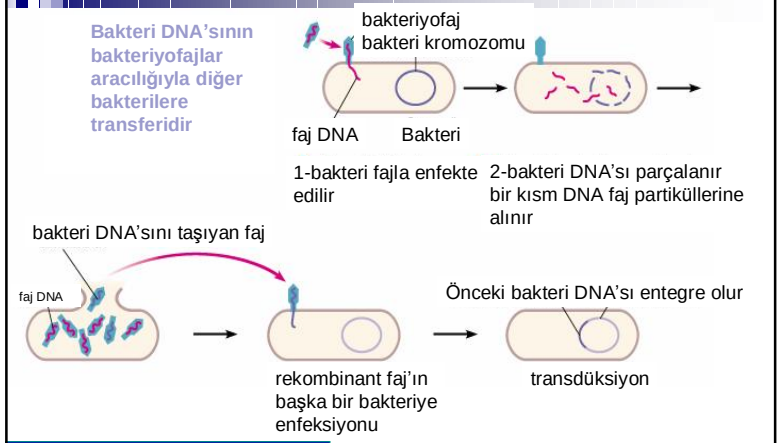
Genetik Transformasyonun Prensibi [Gen Transferi]



GENETİK TRANSFORMASYON SONUCU TRANSGENİK HÜCRE ELDE EDİLİR

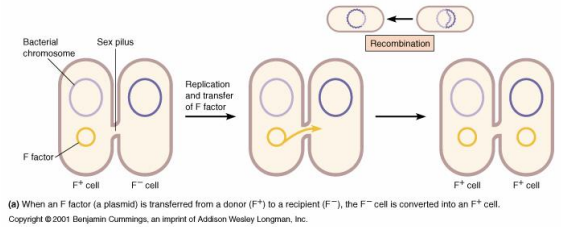
BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLIDIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA



Transdüksiyon [Faj Transformasyonu]

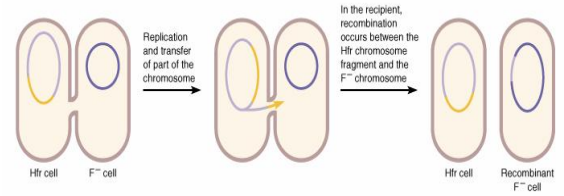
Bakteriyofaj T2, T4, T5, T6, T7, ve λ bu tür olaylar gerçekleştirmektedir

Konjugasyon [Doğal Transfromsayon]



(a) When an F factor (a plasmid) is transferred from a donor (F^+) to a recipient (F^-), the F^- cell is converted into an F^+ cell.

Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.



- **GENETIK MÜHENDİSLİĞİ NASIL ÇALIŞIR VE GDO (GMO) NASIL ELDE EDİLİR:**
- BAŞLICA AŞAMALAR
- 1-Laboratuvar ortamında (*in vitro*) belirli bir genin belirli bir kaynaktan uygun yöntemlerle alınması
- Hangi gen, hangi kaynaktan, nasıl?
- 2-Genin belirli bir yötemle istenilen bitkiye aktarılması
- Hangi yötemle, neden?
- 3-Bitki doku veya hücrelerinin doku kültürü ortamında geliştirilmesi
- Doku kültürü zorunlumu? Neden?
- 4-Aktarılması istenen genin varlığının ve ifadesinin doğrulanması
- Nasıl ve neden?
- 5-Aktarılan genin kalıtımının doğrulanması
- Kalıtım nasıl belirlenir, neden?

DNA KÜTÜPHANELERİ

- DNA kütüphanesi en basit tanımla klonlanmış DNA parçalarını içeren DNA kolleksiyondur.
- Temelde elde edildiği DNA kaynağına göre isimlendirilirler. Bu durumda genomik ve cDNA kütüphaneleridir.
- Bunların dışında elde edildikleri organizmalara görede isimlenirilebilmektedir. Örneğin pamuk genomik kütüphanesi veya pamuk özel kromozom kütüphanesi. cDNA durumunda da benzer bir isimlendirme yapılabilir. Pamuk lif cDNA kütüphanesi, pamuk kök cDNA kütüphanesi gibi.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- cDNA ve gDNA kütüphaneleri değişik şekillerde oluşturulabilmektedir.
- gDNA Kütüphaneleri:
  - Enzimlerle genomik DNA'nın kesimi ve klonlanması,
  - Mekaniksel olarak genomik DNA'nın parçalanması ve klonlanması,
  - Kromozomların önce birbirinden ayırılarak daha sonra kesilerek/parçalanarak klonlanması,
  - Organel DNA'ların ayrılarak kesilip/parçalanarak klonlanması,
- cDNA Kütüphaneleri:,
  - mRNA'nın DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi,
  - Dönüştürülmüş her parçanın klonlanması,

KÜTÜPHANELER NEDEN OLUŞTURULUR

- gDNA:
  - Sekanslama çalışmaları,
  - Gen ve Gen kasetlerininin belirlenmesi,
    - (Promotör, Enhenser, İntron, Ekson, Poliadenilasyon İşareti)
  - Fiziksel haritamaların oluşturulmasında,

- cDNA Kütüphaneleri:
  - Gen tanımlanmasında ve izolasyonunda,
  - gDNA ile karşılaştırılarak gen kasetlerinin oluşturulmasında,
  - mRN'nın saklanmasında,
  - Protein yapı ve fonksiyonlarının belirlenmesinde,

gDNA ve cDNA Farklılıkları

gDNA

- Bütün bir genomu teşkil eden sekanstan oluşur.
- İntron, ekson, promotör ve enhenser DNA dizilerini taşır.
- Kütüphane oldukça geniştir.
- Poliadenilasyon kuyruğu ve başlık sekansı bulunmaz.
- mRNA, rRNA ve tRNA DNA dizilerini taşır.
- Ökromatin ve Heterokromatin DNA'sından oluşur.

cDNA

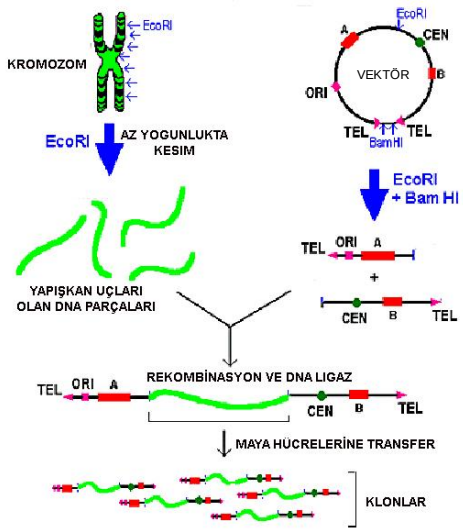
- Belirli bir organ, doku veya hücrede, belirli bir zamanda ifade eden (ekpresyon) gen sekanslarından oluşur.
- Sadece mRNA'yı veya diğer regülatör DNA'ları taşır.
- Kütüphane dardır.
- Poliadenilasyon kuyruğu ve "Başlık" DNA dizilerini taşır.
- Genellikle tRNA, rRNA DNA dizilerini taşımaz.
- Sadece Ökromatin DNA dizisinden oluşur.

BİLGİ PAYLAŞTIK... MEHMET KARACA

gDNA Kütüphanesi Oluşturulması ve Sürdürülmesi

GENOMİK DNA KÜTÜPHANELERİNİN HAZIRLANMASI:
1: RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ 2: KESİMDE OLUŞAN HER BİR PARÇANIN VEKTÖRE EKLENMESİ
3: VEKTÖRLERİN ALICI TRANSFORMASYONU

BU YÖNTEMLE. HERHANGİ BİR HÜCRENİN TEK BİR KROMOZOMU VEYA BÜTÜN KROMOZOMLARI VEKTÖRLERE EKLENEBİLMEKTEDİR

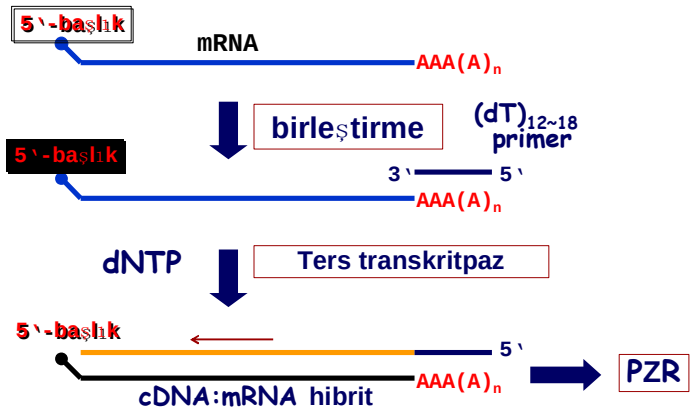


cDNA

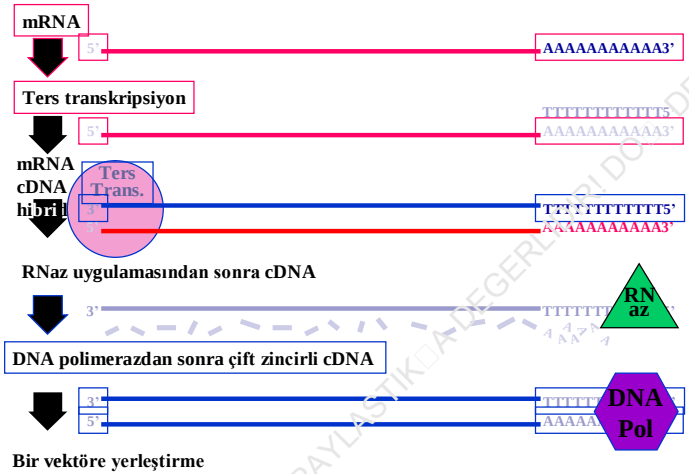
- Ters transkripsiyon mekanizması ile mRNA'nin içerdiği genetik bilgi tekrar çift zincirli DNA formuna çevrilebilir. Bu işlemden sorumlu enzim bir RNA bağımlı DNA polimeraz olan ters transkriptaz (reverse transcriptase)'dır.
- Ticari olarak satılan RNA polimerazların en uygunlarından biri Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)'dür. Bu RNA bağımlı DNA polimeraz RNA yi kalıp alarak 5'-3' doğrultusunda nükleotit ekler ve bu enzimin 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur.
- mRNA-DNA hibritindeki mRNA ribonükleaz H enzimiyle uzaklaştırılmaktadır.

cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Ters Transkriptaz-PZR



cDNA Kütüphanesi Hazırlanışı



BİLGİ PAYLAŞTIK_DEĞERLİ HOCAMIZ DR. MEHMET KARACA

- Kullanışlı bir cDNA kütüphanesi korumak ve üretmek için cDNA'yı bir plazmide (vektöre) aktarılması gerekmektedir.
- Bunu başarmanın iki klasik yolu vardır;
  - cDNA dizi uçlarına "Homopolimerik" kuyruk ekleme
  - Bağlayıcı (Linker) sekans eklemek.
- Homopolimer kuyruk sekansı genellikle terminal transferaz enzimiyle eklenir. Bu enzim DNA'ya bağımsız DNA polimeraz olup, ortamda bulunun dNTP 3-OH ucuna ekler. Bir pürin eklenecekse (A, G) Mg kullanılır, primidin eklenecekse Co kullanılır.
- Reaksiyon şartlarına bağlı olarak üç'ten binlerce baza kadar ekleme yapılabilir.
- Bağlayıcılar tek veya tekrarlı restriksiyon endonükleaz tanınma dizileri içeren tipik palindromik, kısa oligonükleotitlerdir (18-24 mer). Bu durumda eklenecek DNA yapay olarak oluşturulabileceği gibi bazı durumlarda bir DNA parçasıda eklenebilmektedir.

- gDNA ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulması sırasında çoğu durumlarda DNA parçalarının klonlanmasından önce bazı işlemler gerekmektedir. Bunlar:
  - DNA parçalarının sınıflandırılarak (boylarına ve içeriklerine göre) bütün bir genomu veya cDNA ise ifade edilen bütün genleri temsil etmesinin sağlanması.
  - Klonlama işlemlerinde kolaylık ve doğruluk için bazı durumlarda DNA parçalarının uçlarının modifiye edilmesi.
  - Bazı durumlarda ise DNA parçalarının işaretlenerek ileriki çalışmalarda kolaylık ve doğruluğun artırılmasına yönelik işlemler dizini.

cDNA veya gDNA Kütüphaneleri Oluşumunda Kullanılan Bazı Enzimler:

- **POLİNÜKLEOTİTKİNAZ:**
- **Bir DNA sekansının 5'-OH ucuna fosfat ekler. Bu nedenle DNA'nın 5' ucunun radyoaktif veya floresans etiketli fosfatın eklenmesinde (DNA Etiketleme) kullanılır. Aynı zamanda 5' –OH uçlu bir DNA'nın DNA ligaz enzimi için substrat olmasını sağlar. Dolayısıyla ligasyon işlemlerinde kullanılır. cDNA ve gDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında kullanılır.**

- **DNA LİGAZ: Çift sarmallı 2 DNA parçasının birleştirilmesinde kullanılır. Fosfodiester bağı oluşturur.**

- **TERMİNAL TRANSFERAZ: Homopolimer kuyruk (Adeninler, Guaninler, Sitozinler veya Timinlerin) bir DNA'nın 3' –OH ucuna eklenerek kuyruk dizinleri oluşturmada kullanılır.**
- **Eksonükleaz III: Bir DNA zincirindeki 3' ucunu baz baz keserek uzaklaştırılmasında (kısaltılmasında) kullanılır.**
- **Bakteriyofaj Gamma Eksonükleaz: Çift sarmallı bir DNA zincirindeki 5'ucundaki nükleotidler uzaklaştırılarak komplementar sarmalın 3' ucunun çıkıntısının oluşumu sağlanır.**
- **Alkalin Fosfataz: DNA zincirindeki 5' veya 3' ucundaki yada her iki uçtaki fosfatların uzaklaştırılmasıda kullanılır.**

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR!!! DR. MEHMET KARACA

Gen veya genlerin klonlamasında, cDNA, gDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında ve transformasyon veya gen transfer çalışmalarında transfer edilmesi düşünülen gen veya geneleri taşıyan, transformasyon sonrası alıcı hücrenin içerisinde çoğalabilen, veya üzerlerinde taşıdıkları genlerin ekpresyonuyla bir ürün (protein) oluşturabilen lineer veya halka şeklinde bulunan aracı DNA moleküllere **vektör** adı verilirir.

Doğal vektörler plazmitlerdir, yapap vektörler ise doğal plazmitlerin veya DNA dizilerinin yeniden tasarlanmalarıyla elde edilirler.

Vektörler amaçlarına göre 2 ana gruba ayrılırlar:

1) Ekpresyon Vektörleri
2) Klonlama Vektörleri

Ekspresyon ve klonlama vektörleri transfer edildiği alıcı organizmalarda, bu organizmadan bağımsız olarak replikasyon (çoğalma) özelliği gösterirler. Vektörlerin replikasyonları sadece alıcı hücre içerisinde gerçekleşir. Bu nedenle replikasyon orijini içerirler.

- Ekpresyon vektörleri klonlama vektörlerinden farklı olarak aktarılmak istenen genin dokular üzerinde ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici diziler (promotörler, transkrispsiyon, translasyon başlama ve bitiş işaretleri, poliadenilasyon işareti ve ribosoma bağlanma DNA dizileri) içermektedir.

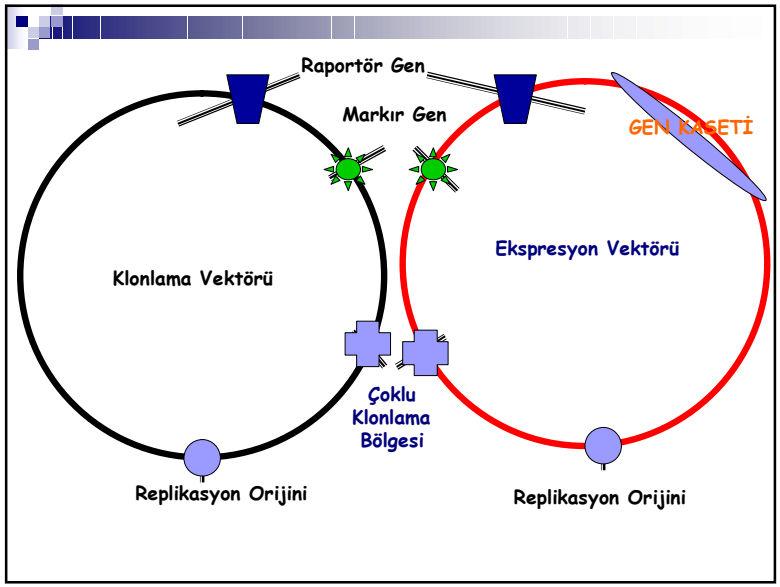
- Ekspresyon vektörleri ayrıca sadece gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların seçimi için seçici bir işaret geni (markır geni yada genleri) içerirler.
- Ekspresyon vektörleri ayrıca aktarılan genin bitkide anlatım yapıp yapmadığının anlaşılmasına yardımcı olmak üzere yer alan raportör gen yada genlerden de oluşur.
- Ayrıca her iki vektör sisteminde yabancı DNA'nın vektöre eklenebilmsei için özel restriksiyon enzim tanıma sekanslarından oluşur.
- Transfer edilecek genin yerleştirildiği DNA dizilerinin sağ ve sol taraflarında ise homoloji tabanlı rekombinasyonu sağlamak amacıyla özel DNA dizileri yerleştirilir.

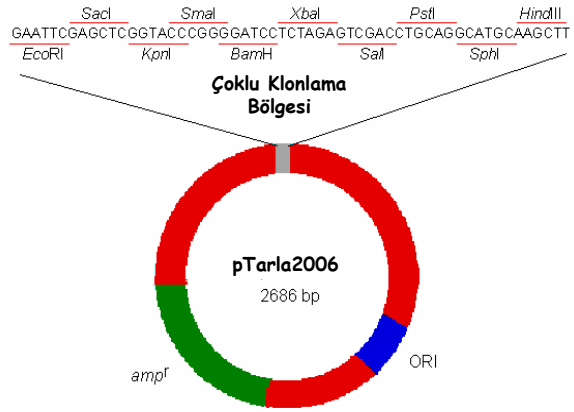
- Ekspresyon Vektörleri Aynı Zamanda Transformasyon Vektörü olarakta kullanılır.
- Transfer edilecek genin organellere mi yoksa nükleusa mı entegre edileceğine göre bu vektörlere özel diziler eklenerek entegrasyonun doğruluğu artırılabilmektedir.
- Plastid (kloroplast) vektörleri, LTR ve RTR olarak gösterilen sağ ve sol plastid hedefleme bölgeleri ile organellere hedeflenirler.
- Belirlenmiş DNA sekansları seçilen bölgeye homologdurlar ve 1-2 kb boyutundadırlar. 50 kb DNA (20-30 genlik) girişi için uygundur.
- Plastid tekrar vektör (pPRV) serileri, trnV-rps12 bölgesine girişi hedeflerler.
- Plastid transgenleri, 5'-PL (promotör ve lider) ve 3'-T kaset (T-terminatör)de ekspresse olurlar.
- PL kasedi, promotör ve translasyon kontrol dizisi içerir.
- Translasyon kontrol dizisi, mRNA 5'-translasyona uğramayan bölge (UTR) veya 5'-translasyon kontrol bölgesi (TCR) olabilir.

BİLGEHAN BAŞARAN DAĞER HOCAMIZ DR. MEHMET KARACA

- Ekspresyon Vektörlerinde Bulunan Gen Kasetlerinde:
- mRNA'ların 5'-UTR'ı mRNA stabilitesi için gereklidir ve dizisi mRNA'nin ribozomlara yerleşmesini kolaylaştırır.
- Transformasyon kasetindeki mRNA 3'-UTR'yi dizisi ise T-3'-UTR, transkripsiyon ve translasyon sonlandırmada görev yapar ve mRNA stabilitesi için gereklidir.

- Vektörler ayrıca az ve çok sayılı vektörler olarakda isimlendirilirler. Az sayılı vektörler hücre içerisinde az sayısa 1-10 arasında bulunurlarken çok sayılı vektörler 100-1000 kopya halinde bulunurlar.





En Çok Kullanılan Raportör Genler

Vektörün ve Transfer Edilmek İstenen Gen Yada Genlerin Alıcı Hücreye Transfer Edilip Edilmediğini Roporlayan Genlerdir.

- **Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)**
  - **Antibiyotik kloramfenikol**
- **ß-galaksidaz**
  - **Mavi Renk**
- **Ateşböceği lusiferaz enzimi**
  - **Floresan Protein**
- **Yeşil Floresan Protein (GFP)**
  - **Floresan Protein**

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Markır Genleri (Seleksiyon Genleri)

- Bu genlerin ürünlerinden yararlanılarak Vektör üzerindeki genlerin alıcı hücreye entegrasyonu sonucu TRANSFORMED (transfer gerçekleşmiş) hücrelerin çoğalmalarına imkan tanınırken transfer edilmeyen hücrelerin ölmeleri sağlanır.
- Antibiyotik Dayanıklılık Genleri
  - kanamycin
- Herbisit Dayanıklılık Genleri
  - Glyphosate 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS)
- Metabolit Genleri
  - Fosfomannoz İzomeraz (Phospomannose Isomerase, PMI veya ManA geni): Ortamda şeker olarak mannoz varsa hücre yaşayabilmektedir.

- **Antibiyotik Dayanıklılık Markır Genleri:**
- *Neo* geni*:* Bu gen neomisin fosfotransferaz II (neomycin phosphotransferase II, NPTII) enzimini sentezler ve bu enzim ise aminoglycoside inaktif eder. NPTII enzimini taşıyan organizmalar ise kanamycin ve neomycin antibiyotik besi ortamında yaşayabilirler.
- **Herbisite Dayanıklılık Markır Genleri:**
- Buctril markalı herbisit ioxynil ve bromoxynil kimyasal içeriklidir. Bu herbisit dikotiledon bitkilerde fotosentezin ışık everesi reaksiyonunu durdurmakta ve dolayısıylada bitki yaşayamamaktadır.
- *Klebsiella pneumoniae* bakterisinden izol edilen bir gen (*bxn*) tarafından sentezlenen nitrilaz (nitrilase) enzimi oxynil ve bromoxynil'i inaktif hale dönüştürebilmektedir. Bu enzim bromoxynil'li 3,5 dibromo-4-hydroxybenzoic acid'te (DBHA) dönüştürmektedir.

ORİJİNLERİNE GÖRE VEKTÖRLER TİPLERİ

- Plazmitler
- Bakteriyofajlar
- Kosmitler
- Bakteri Yapay Kromozomları (BYK: BAC)
- P1 Yapay Kromozomları (PYK: PAC)
- Maya Yapay Kromozomları (MYK: YAC)
- Memeli Yapay Kromozomları (MeYK: MAC)
- İnsan Yapay Kromozomları (İYK: HAC)

Plazmitler:

Bakteri DNA'sı dışında, ekstra olarak bulunan, genellikle halka yapıda ve otonom olarak kendi kendine çoğalabilen mikrokromozomlardır.

Doğal olarak bulunan plazmitler büyük ve kullanışsız olduklarından, bunların yerine *in vitro* ortamda amaca yönelik olarak hazırlanan yapay plazmit vektörler kullanılmaktadır.

Doğal olarak var olan plazmit DNA'ların üzerlerinde amfisilin (ampiciline), tetrasiklin veya, kanamisin gibi antibiyotiklere karşı direnç genleri taşırlar.

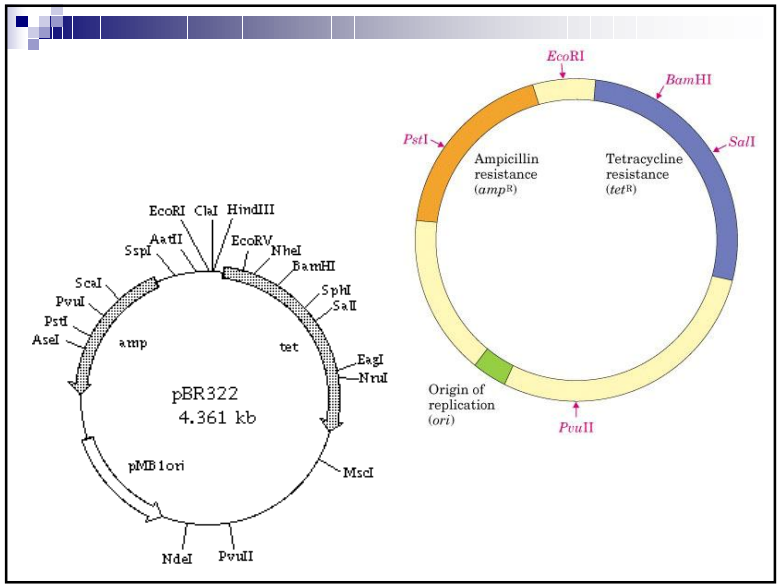
Bunlar bakterilerin bu tür ortamlarda yaşayabilmelerine olanak sağladığı gibi vektör sistemlerinde ise seleksiyonda önemli fonksiyonu olan markır genlerdir.

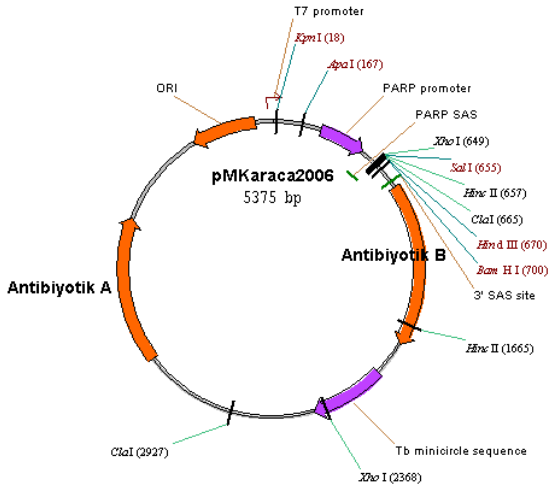
Kullanılan ilk plazmit vektör pBR322 olarak isimlendirilmiştir ve bu vektör 4361 bp DNA içermektedir.

Plazmitler 10 kb varabilen yabancı DNA (sizin tarafınızdan eklenmiş) taşıyabilmektedir.

BILGI PAYLAŞMA AMAÇLI DERSLERİ DR. MEHMET KARACA

- Doğal olarak bulunan vektörler bakteriler arasında eşeyli üreme benzeri gen transferi yapmalarının yanı sıra doğada yayılmış olan bakterilerin antibiyotiklere karşı dayanıklılığını sağlayarak yada ağır metalli ortamlarda, yada aşırı tuzluluk gibi ekstrem şartlarda yaşamalarına veya birbirleriyle bir arada bulunamayacak bakteri türlerinin ayrı ortamlarda bulunmalarına neden olmaktadırlar.





Mekik (Shuttle) Plazmit Vektörleri:

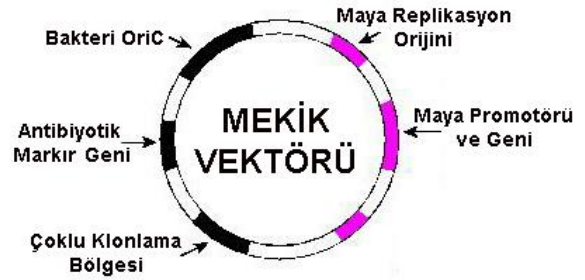
Prokaryotik replikasyon orijini ve promotörleri taşıyan ekspresyon vektörlerine, ökaryotlara ait replikasyon orijini ve promötor de ilave edilirse, bu tipte hazırlanan vektör hem prokaryotik ve hem de ökaryotik (maya hücresi) üzerinde taşıdığı genleri ifade edebilmekte veya çoğalabilmektedir.

Bu nedenle bunlar iki fonsiyonlu plazmitler veya vektörlerdir.

Bu sistem özellikle bazı ökaryotik genlerin bakteride ifade edilememesi durumunda büyük oranda katkı sağlamaktadır.

BİLGİ PAYLAŞTIK ÜRETİR. © DR. MEHMET KARACA

MEKİK (SHUTTLE) VEKTÖR: BAKTERİ VE MAYADA ÇOĞALABİLİR



Bakteriyofajlar

Faj'lar bakteriyi enfekte eden bakteri virüslerdir.

- Virüslerin Çoğalması (Viral Multiplication)
- 1. Virsüler ne enzimleri nede proteinleri üretebilirler ve nede enerji üretebilirler.
- 2. Bir virüsün çoğalabilmesi için önce hücreyi işgal etmesi ve sonrada hücrenin metabolik mekanizmasını (nükeik asit ve protein) kullanarak kendi komponentlerini üretmesi ve tekrar viral partüküller haline dönüşmesi gerekmektedir.

- Fajların (Bacteriophages) Çoğalması
- Genel olarak iki mekanizma yada rota vardır. Litik döngüyle (Liytic cycle) ve Lizogenik döngüyle (Lysogenic cycle).
- 1. Bazı fajlar litik döngü durumunda faj (phage) konukçu hücreyi öldürür. Bu durumda faj genomu konukçu genomuna entegre edilmez.
- 2. Bazı fajlar ise konukçu hücrenin genomik DNA'sına entegre olarak profaj olarak yerleşir. Bu durum ise lisogenik döngü olarak isimlendirilir.

- Bakteriyofajların Bakteri Hücresine Enfeksiyon Aşamaları:
- Litik Döngü
- 1-Bağlanma Fazı: Fajın kuyruk kısmında bulunan kuyruk fiberi bakteri üzerinde bulunan özel reseptör kısımına bağlanır.
- 2-Penetrasyon Fazı:
- Faj enizmleri (lizozome) bakteri hücre duvarında açıklık yaratır. Faj kuyruk kılıfı kasılma yaparak kuyruk kısımının hücre duvarındaki açılmış kısımdan hücre içerisine girmesini sağlar. Faj DNA'sı hücre içerisine bırakılır. Kapsit hücre içerisine girmez.
- 3-Biyosentez Fazı:
- Bu fazda hücre içerisine bırakılmış olan faj DNA'sı transkripsiyona uğratılarak mRNA'lar sentezlenir. Bu mRNA ürünleri faj DNA'sının replikasyonu (ikilenmesi) için gerekli olan faktörleri sentezler. DNA replikasyonu yardımıyla çok sayıda faj genomu ve gerekli olan kapsit proteinleri sentezletilir.

BİLGİ PAYLAŞIM AMAÇLIDIR © DR. MEHMET KARACA

- 4-Olgunlaşma Fazı:
- Oluşturulmuş olan kapsitler ve faj genomu birleşerek olgun virüs partikülleri oluşturulur.
- 5-Çıkış Fazı:
- Bu dönemde bakteri hücre duvarı enzimlerle parçalanarak oluşmuş olan faj partiküllerinin hücrenin dışına çıkması sağlanır.
- Bağlamadan çıkış fazına kadar genellikle 20 ile 40 dakikalık bir zaman geçer ve bu süre patlama süresi, patlama süresi sonucu 50 ile 200 adet faj partikülleri oluşturulabilir ve buda patlama büyüklüğü olarak isimlendirilir.

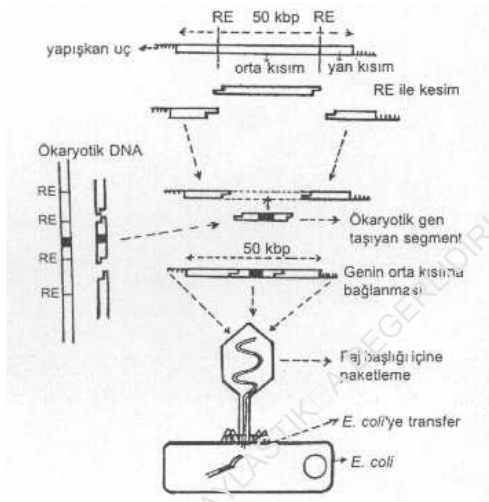
- Lizogenik Döngü
- Bağlanma ve penetrasyon fazından sonra faj DNA'sı bakteri genomuna entegre olur ve faj profaj (geçici faj) olarak bakteri genomuna yerleşir.
- Lizogenik döngüde regülasyon profaj genleri tarafından sağlanır. Bu işlemde ise projaj bazı baskılayıcı faktörler yardımıyla bakteri genomunda atıl kalabilmektedir. Bazı durumlarda profaj hemen litik döngüye geçebilmektedir.
- Profaj taşıyan bakteriler genellikle aynı türde başka fajlar tarafından işgal edilmezler.
- Profaj bakteri bölünmesiyle yeni oluşturulan hücrelere geçebilmektedir. Bazı durumlarda ise profajlı bakteri başka bakterilere gen transferi yapabilmektedir, bu olay konjagusyandan farklı olup transdüksiyon olarak bilinmektedir.

Lambda fajının orta bölgesi, bakteri içinde litik bir üreme için gerekli değildir. Bu bölge, başka bir gen ile yer değiştirebilir. Böyle bir değişme de fajda zararlı bir etki yaratmaz.

Bakteriofajlar plazmitler gibi antibiyotiğe karşı direnç geni taşımazlar.

Lambda bakteriyofajı 50 kb uzunluğundadır ve 20 kb yabancı DNA bu vektörlere (faja) eklenebilmektedir.

Fajın orta bölgesi restriksiyon endonükleaz enzimi ile iki yerinden kesilerek orta segment yada parçası çıkarılır, buraya yabancı gen taşıyan segment (aynı RE ile kesilmiş) fajın orta kısmına yerleştirilir. Sonra, paketleme enzimi yardımı ile faj başlığı içine paketlenir ve buradan da başka bir *E. coli* 'ye transfer edilir. Böylece, yabancı bir gen, faj vektör yardımı ile bakteriye aktarılmış olur.



BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLENİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Kozmitler

- Kozmit vektörler, bir bakteriye ait replikasyon orijinine sahip bir plazmitle, buna birleştirilmiş olan lambda fajı yapışkan ucundan (cos, cohesive ends) oluşturulmuş olan bir hibrit vektör türüdür. Bu nedenle plazmit ve bakteriyofaj vektörlerinin avantajlarını birleştirir.
- Bu tür vektör plazmitlerin daha uzun DNA parçası taşımasına neden olurlar. Kozmit vektör 45-50 kb yabancı DNA taşıyabilirken faj vektör 25 kb dir.
- Plazmitler gibi replike olabilirler ve cos bölgeleri içerdiklerinden faj parçacıkları içerisine de paketlenebilirler.

- Yüksek transformasyon verimliliğine sahiptirler.
- Kozmit DNA'lar replikasyon için gerekli viral genleri taşımadığından konukçu hücreye girdiklerinde virüs etkisi yaratmazlar.
- Viral genler olmadığı için daha büyük DNA parçalarının (45 kb'ye kadar) yerleştirilmesine olanak sağlarlar.

Çift Kos Bölgeli Kozmit Vektörler:

İki cos bölgesine ve iki markır genine (ampR, kanR) sahip vektörlerdir. Kozmitler iki RE ile aynı anda kesildiğinde iki lineer parça elde edilir ve her birinde bir cos bölgesi ve bir marker bulunur. Yabancı gen DNA'sı, iki cos bölgesi arasına entegre edilir.

(Örn: pLFR-5 kozmidi, iki COS bölgesi içerir).

Bakteri Yapay Kromozomu (BAC)

Farklı türlerden alınan 100,000 ila 200,000 baz büyüklüğünde DNA parçalarının bakteride klonlanması ile olur. Klonlandığı zaman hücre içinde birçok kopyası olur.

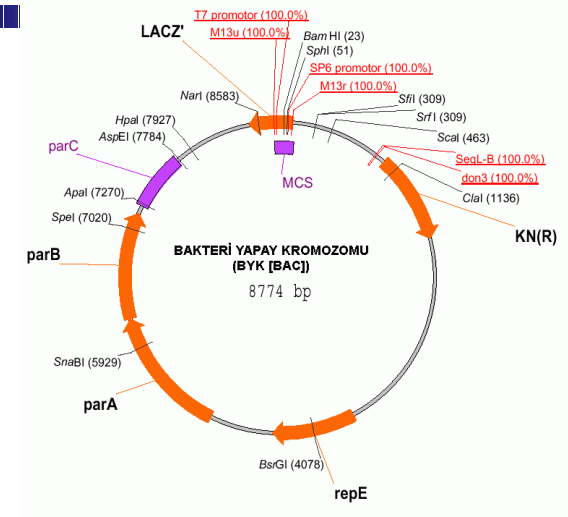
BAC vektörleri doğal olarak var olan büyük bakteri plazmidi F-faktör üzerine kurulurlar.

BAC vektörleri büyük DNA fragmentlerini klonlamada ve özellikle büyük genomların sıradizilerinin eldesinde kullanılırlar.

BAC vektörü 300 kb'a kadar yabancı DNA'yı içine alabilir.

En büyük dezavantajı bazı ökaryotik genlerin transkripsiyonu ve translasyonları BAC ekspresyon vektörlerinde gerçekleşememektedir.

BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLIDIR! DİĞER AMAÇLARI İÇİN DR. MEHMET KARACA

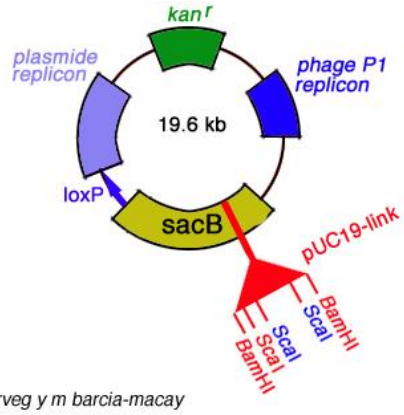


- Kanamisin R, ÇS: 8774 bç, Genomik DNA kütüphanesi, E. Coli OriC, SP6 ve T7 Promotörleri

P1 kökenli yapay kromozom (PAC)

- BAC gibi büyük uzunluktaki genomik DNA'nın klonlanmasında kullanılmaktadır. Bazı PAC'lar mekik özelliğine sahiptir. Bu mekik vektöre hem insanda hemde bakteride çoğalabilmektedir.
- PAC 100-300 kb'lik yabancı DNA taşıyabilir.
- P1 bir bakteriyofaj olup E. Coli trandüksiyonu ile genetik materyal taşımaktadır. P1 genomu lineer ve çifte sarmallı DNA'ya sahiptir.

P1 kökenli yapay kromozom (PAC)



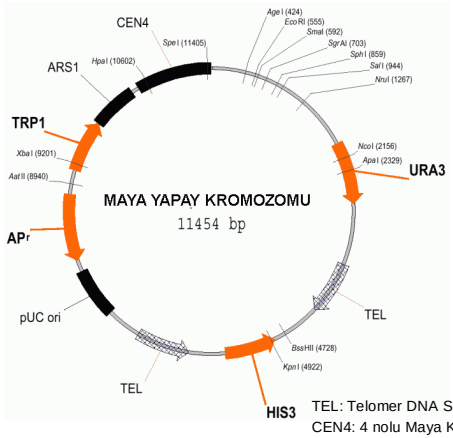
© jp herveg y m barcia-macay

Maya yapay kromozomu (YAC, MYC)

- Çok büyük DNA (200-500 kb veya 1–2 Mb) fragmentlerini kabul edebilir.
- Bir kromozomun önemli öğeleri olan telomerleri, sentromeri ve replikasyon başlangıç noktasını içerirler.

Örneğin pYAC3: Plazmit Maya Yapay Kromozomu 3: 11.4 KB ve halka şeklindedir. Üzerinde CEN4, TELB, TELA bulunur

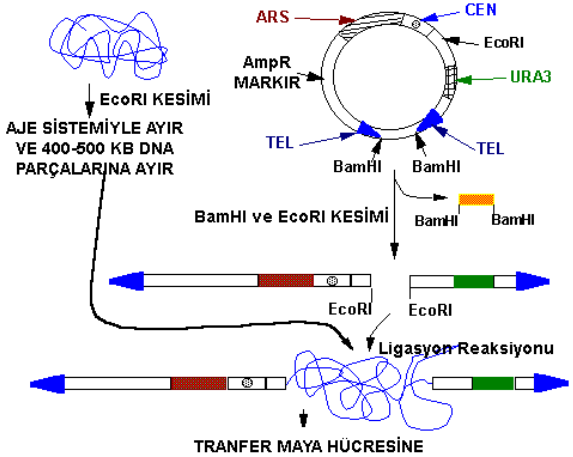
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA



TEL: Telomer DNA Sekansı
CEN4: 4 nolu Maya Kromozomunun Sentromer Sekansı
ARS1: Otonom Replikasyon Sekansı
Seleksiyon Bölgesi: Yeni DNA Sekanslarının Eklenebildiği Sekans Dizileri



- YAC'a yabancı bir DNA'nın klonlanması 4 ana adımda gerçekleşir.
- 1- Genomik DNA restriksiyon enzimi olan EcoRI ile kısmen kesilir ve çok büyük bir DNA parçası elde edilir.
- 2- YAC vektörü ise 2 restriksiyon enzimi ile (EcoRI ve BamHI) ile kesilir.
- 3- Bu iki element EcoRI bölgesinde rekombine olur ve DNA ligaz tarafından kovalent bir şekilde bağlanır.
- 4- Rekombinant YAC vektörü, genomik DNA içeren maya yapay kromozomu transferi ile üretilmiş olur. Bu vektör maya hücrelerini enfekte etmek için kullanılabilir ve sınırsız sayıda kopya üretilebilir.



- Maya yapay kromozomları (YACs) genellikle yabancı DNA'ların (Örneğin insan DNA'sı) çok büyük bir parçasını klonlamak için kullanılan vektörlerdir. Yapay kromozomlar ilk defa tomurcuklanan maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'de uygulanmıştır. Halkasal plazmit maya sentromerinden, replikasyon orijininden, seçici bir işaret geninden ve bir palindromik telomerik yapıdan oluşur.
- YAC'lar karakteristik olarak 250.000 ile 1 milyon baz çifti uzunluğundadır.
- YAC'lar ilk olarak Burke tarafından 1987'de yaratılmıştır. O günden sonra YAC'lar büyük ölçüde fiziki haritalamada, contig yapımında ve harita bazlı gen klonlamasında kullanılmıştır.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR © DR. MEHMET KARACA

- İşlevsel YAC, kendi kendinin çoğalmasını mümkün kılan 3 adet spesifik DNA sekanslarına ihtiyaç duyar:
- **Telomer:** Her kromozomun sonunda bulunur. Doğrusal DNA'yı nükleazlar tarafından kesilmekten korurlar.
- **Sentromer:** Mitotik iğ ipliklerinin bağlanma bölgesidir.
- **Replikasyon Orijini:** DNA replikasyon makinelerinin DNA üzerine tutunmasını sağlayan özel DNA dizileridir.
- Yapay kromozomlara birkaç özel diziler de eklenebilir. Örneğin: **Seçici İşaretler (markır genleri):** Yapay kromozomu alan maya hücrelerinin kolay izolasyonuna imkan verir.
- **Tanıma Bölgeleri :** İki restriksiyon enzimi içerir (EcoRI ve BamHI)

- YAC vektörlerinin esas kullanım avantajı; onların 200-800 kbp büyüklüğünde DNA parçasıyla birleşebilmesidir.
- Maya hücresine klonlanabilen en uzun DNA parçası 0.5 ile 1 milyon nükleotid arasındadır. Bakteri de ise yaklaşık olarak sadece 50.000 nükleotittir. Büyük insertlerin olması daha az klonun incelenmesini sağlar.
- İnsan genomunun tamamını haritalamak için (3x1.000.000.000 nükleotid baz çifti) 100.000'den fazla plazmit klonuna ihtiyaç duyulur fakat yaklaşık 10.000 YAC klonu yeterlidir.
- YAC'ların kullanımının dezavantajı ise düşük transformasyon verimidir (az sayıda transferi gereçekleştirilmiş hücre).

Memeli Yapay Kromozomu (MeYK, MAC)

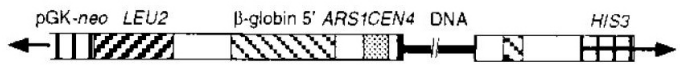
- Memeli yapay kromozomları, kromozomların fonksiyonel bölgelerini (sentromer,telomer,replikasyon orijini) taşıyan ve hücreden bağımsız olarak çoğalabilen moleküllerdir.
- MAC yüzlerce kb büyüklüğünde genomik DNA taşıyabilir.
- MAC oluşumu en yakın örnek olan YAC'a göre çok daha zordur. Çünkü memeli telomeri maya telomerinden 10-100 kat; memeli sentromeri ise maya sentromerinden yaklaşık 1000 kat daha büyüktür. Memeli sentromer ve telomer dizilerinin çok fazla sayıda tekrarlanması da memeli yapay kromozomu oluşturulmasını zorlaştırır.
- MAC'lar gen terapisi için ve transgenik hayvanların üretiminde faydalı olabilecek genlerin hücre içine transferinde kullanılmaktadır.

İnsan Yapay Kromozomu (İYK, HAC)

- HAC'lar, insan DNA dizileri, sentromer dizisi, telomer dizisi ve DNA replikasyon bölgesi olması ile gen tedavisi için avantajları olan bir vektördür.
- İnsan yapay kromozomları (HAC=Human artificial chromosome) YAC ve PAC sistemlerinin başarısının bir ürünü olarak geliştirilmiştir.
- Daha büyük insan DNA'sini taşıması; stabiliteyi sağlayacak sentromer dizisinin olması; kromozom yapısının stabilitesini ve parçalanarak bozulmasını önleyen telomer dizilerinin olması; DNA replikasyon noktası ile bir hücre döngüsünden diğerine normal S fazında replikasyonu düzenleyebilmesi avantajlarıdır.
- 6-10 megabaz uzunluğundadır. Transferi, liposomlar veya reseptörler aracılığı ile yapılabilmektedir.

BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLIDIR. DOÇ. DR. MEHMET KARACA

İNSAN YAPAY KROMOZOMU (İYK=HAC)



Bitki Viral Vektörleri

- Geminivirüs
- TMV (Tütün Mozaik Virüsü)
- CaMV (Karnıbahar Mozaik Virüsü)

Viral vektörlerin ekspresyonu bitkilerdeki yabancı gen sekanslarını ve protein ürünlerini ortaya çıkarır.

Bu sayede bitkilerdeki rekombinant proteinler bitki ve hayvan hastalıklarının kontrolünde yararlı olabilir

Geminivirüsler dairesel tek iplikli DNA genomu ile çok küçük bitki virüsleridir.

Geminivirüsler bitkilerdeki yabancı gen amplifikasyonları için tek elverişli replikasyon vektörü gibi kullanılırlar.

Doku kültürü teknikleri kullanılarak, monokotil ve dikotil türlerini içine alan geniş bir dizi konakçı içinde gen ekspresyonu düzeninin analizi için uydurulmuşlardır.

CaMV (Karnıbahar Mozaik Virüsü)

CaMV küçük izometrik bitki virüsleri grubundan dairesel çift iplikli genomlu bir virüstür.

Bitkiler için potansiyel genetik vektör olarak kullanımlarından dolayı önemli bir yere sahiptirler.

CaMV taneciklerinden gelen DNA, hassas yaprakların yüzeyine sürtündüğü zaman bitkileri enfekte edebilir ve virüs üretimine neden olabilir.

Ayrıca, birçok CaMV soyunun bütün kromozomu bakteri konakçılarına plasmid ve phage lamda vektörleri ile yayılabilir.

Bunlar bitkileri enfekte etmede başarıyla kullanılmışlardır.

- CaMV kullanılarak bitkide yabancı DNA'nın üremesi sağlanır.

BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLI DERS NOTLARIDIR. DR. MEHMET KARACA

İleri Vektör Sistemleri

- İkili "Binary" Vektörler
- Vir bölgesinin trans-hareket özelliğinden yararlanarak bu vektör sistemleri geliştirilmiştir. *Agrobacterium* içerisinde birbirinden bağımsız olarak replike olan iki plazmitden oluşmaktadır.

- "Binary" Vektörlerin Özellikleri:
- T-DNA içerisinde bulunan ve bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolaylıkla klonlanabileceği bir klonlama bölgesi hem E. coli hem de Agrobacterium'da fonksiyonel olan replikasyon orijini E.coli ve Agrobacterium'da seçici bakteriyel işaret geni Bitkide işlev yapan seçici işaret geni bulundururlar.

- "**Ko-Entegratif" Vektörler:**
- Bu vektör sisteminde sınır bölgeleri kalacak Ti plazmidinin T-DNA bölgesinin büyük bölümü çıkartılarak yerine, küçük bir E. coli klonlama plazmidine (alıcı) homolog yapıda bir DNA parçası yerleştirilmektedir.
- Bitkilere aktarılacak olan gen, işaret geni ile birlikte önce bu aracı plazmidlere E. coli içerisine klonlanırlar.
- Aracı plazmidler alıcı vektörün bulunduğu A. *tumefaciens*'e aktarıldıklarında, tek homolog rekombinasyon ile Ti plazmidinin T-DNA bölgesine entegre olurlar.
- Ko-entegratif vektörlerin özellikleri:
- Bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolayca klonlanabileceği klonlama bölgesi,
- E.coli ve Agrobacterium'da aktif olan seçici bakteriyel işaret geni,
- Bitkide işlev yapabilen seçici işaret geni,
- E. coli içerisinde fonksiyonel olan, ancak Agrobacterium'da etkili olmayan bir replikasyon orijini bulundururlar.

LABARATUVARDA GÜVENLİK

- Çalışan kişinin ve çalışma materyalinin korunması için;
- Çalışma sırasında belirli labortuvar kurallarının, yöntemlerin, altyapı ve cihazların güvenli bir şekilde kullanılmasıdır.

- **1. ANA KURAL:**
- **TEMEL KURAL "BİLMİYORSAN SOR"! YOKSA MOR OLURSUN**



•Herhangi birşey yemekten ve içmekten kesinlikle kaçınılmalı

•Koruyucu gözlük, yüz koruyucu, eldiven ve önlük kullanmaya özen gösterilmeli

•Uygun giysiler giyilmeli (ayakkabılar kapalı olmalı, palto gibi hareket kısıtlayıcı ya da pahalı ve zarar görebilecek giysiler giyilmemeli).

•Takılabilecek aksesuar (uzun kolye, bilezik) kullanılmamalı

•Özel durumlarda Saçlar kapanmalı veya bağlanmalı

BİLGİ PAYLAŞTIK_ALTERLİBİRİ DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Çalışırken:

- Kimyasalları kullanmadan önce etiketler dikkatle okunulmalı. Eğer kimyasal ile ilk kez çalışılacaksa, öncelikle güvenlik etiketini okunmalı (MSD dosyası)
- Kimyasallara çıplak elle dokunulmamalı (asla tatlarına bakmayı denemeyin)
- Tutuşmaya neden olabilecek 'hot plate' gibi aletlerin yanında yanıcı sıvılar bulundurulmamalı,
- Belirtilen prosedür takip edilmeli, işlem çok zor yada açık ifade edilmemiş ise mutlaka yardım alınmalı!

Çatlamış yada kısmen kırılmış cam eşyalar hiçbir çalışmada kullanılmamalı,

Herhangi bir kimyasal madde döküldüğünde hemen sorumlulara bildirilmeli veya MSD doğrultusunda hareket edilmeli (Osmiyum tetroksit),

•Deneyinizi bitirdiğinizde çalışma alanı temizlenmeli.
•Çalışma alanınız için uygun olan temizleyiciler kullanılmalı,
•Laboratuvardan ayrılmadan önce, kullanılan kişisel koruyucu ekipmanlar temizlenmeli ve eller mutlaka yıkanmalı.



Laboratuar atıkları uygun atık kaplarında toplanmalıdır,

- Kırık cam, bistüri, agaroz ve poliakrilamid jeller genel çöplüğe atılmamalı,
- Kimyasal atıklar etiketli özel kaplarda toplanmalı ve uygun şekillerde uzaklaştırılmalıdır.

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ LABORATUARINDA GÜVENLİ ÇALIŞMA İLKELERİ

- Çalışma öncesi eller sabunlanır ve alkollenir (%70).
- Alkol ve asit içeren solüsyonlar çeker ocak içinde hazırlanır.
- Doku kültürü çalışmaları öncesi ve sonrasında çalışma kabininin içi %70'lik alkol ile silinir.
- 5-10 dakika UV ışık açılır. UV kaynağına hiçbir şekilde çıplak gözle bakılmamalı yada cildinize doğrudan yansımamalıdır.
- Etidyum bromid içeren agaroz jellerin tutulduğu eldivenler ile hiçbir yere dokunulmamalıdır.
- Kontamine olmuş besiyerleri (bitki veya bakteri materyali gibi) otoklav edildikten sonra normal çöpe atılır.
- Atık Otoklavı ayrı bir şekilde bulunmalıdır.

BİLGİ PAYLAŞIM AMAÇLIDIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Dekontaminasyon:

Hedef organizmanın tamamen yok edilmesi:

- –Otoklav ile sterilizasyon
- –UV
- –Sodyum Hipoklorit (Çamaşır suyu- 50 g/l klor içerir).
- –DEPC (DiEthyl PyroCarbonate).

-Laboratuarı dezenfekte etmek için 1 g/l konsantrasyonunda klor kullanılmalıdır (%2)

- –Deterjanlar
- –Alkol (70%)

Otoklav:

- Atık ve temiz materyallerin sterilizasyonu farklı otoklavlarda yapılır.
- Biyolojik atık torbası :
  - –121^{O}C'de en az 20-30 dakika tutulmalı
- Otoklavlanacak bütün maddeler kapların içine konulmalı
- Otoklav haznesi buharın eşit dağılması için çok fazla doldurulmamalı,
- Sıvı otoklavlamalarda şişeler tam doldurulmamalı en az 1/3 boş tutulmalıdır.

Alkoller:

Etanol ve 2-propanol benzer dezenfektan özelliğine sahiptir.

- Bakteri, fungus ve lipid içeren virüsler karşısında aktiftirler.
- En yüksek etkiyi yaklaşık %70'lik konsantrasyonda gösterirler.
- Deri ile temas süresi 10 saniyeden, yüzeyler ile teması ise 3 dakikadan daha az olmamalıdır.

Eldivenler:

- Tek kullanımlık plastik olanlar
- Kalın deri veya kumaştan olanlar
- Temiz alanlara (kapı tokmağı, bilgisayar klavyesi, fare) eldivenle dokunulmaz ve laboratuar dışında eldiven ile dolaşılmaz.
- Bazı doktorların yaptığı gibi üniversite yemekhanesine lab elbisesiyle gelinmemeli.

BİLGİ PAYLAŞTIĞA DEĞERDİR! DO□. DR. MEHMET KARACA

Laboratuar malzeme ve cihazlarıyla ilgili uyulması gereken temel kurallar:

-Mümkün olduğunca plastik malzeme tercih edilmeli

-Buzdolapları, derin dondurucular ve kuru buz kutuları belli aralıklarla çözülmeli, temizlenmeli ve içindeki malzemeler etiketlenmeli, eski etiketler kontrol edilerek okunurluğu kontrol edilmelidir.

-Biyogüvenlik kabinlerinde kabin içindeki malzeme sayısı en az düzeyde tutulmalı, kabin içine alınacak malzemelerin yüzeyi ve kabin yüzeyi dezenfektanla silinmeli,

-Santrifüj tüpleri tercihen plastik olmalı, tüplerin dengeli olmasına dikkat edilmeli, metal tüplerin ağırlıklarının eşitlenmesinde korozyona yol açacak solüsyonlar kullanılmamalı, tüplerin fazla doldurulmamasına dikkat edilmeli, santrifüj haznesi, rotorlar ve tüpler her gün çatlaklar ve korozyon açısından kontrol edilmelidir.

Bulaşıcı materyaller ile çalışırken dikkat edilmesi gereken kurallar

- Eldiven giyilmeli, koruyucu gözlük ve kalkan kullanılmalı
- Örnek kapları tercihen plastik olmalı, etiketlenmeli
- Dökülmeleri önlemek üzere örnek kapları ikinci bir kabın içine koyulmalı
- Örnekler biyogüvenlik kabinlerinde açılmalı
- Ağızla pipetleme yapılmamalı, örnek pipetle çekip-bırakma yöntemiyle karıştırılmamalı
- Kontamine- tekrar kullanılabilir malzemeler dezenfektan içinde 1 gün bekletilmeli
- Her çalışma sonrası çalışma alanı uygun bir dezenfektanla dekontamine edilmelidir

TEHLİKELİ KİMYASALLAR:

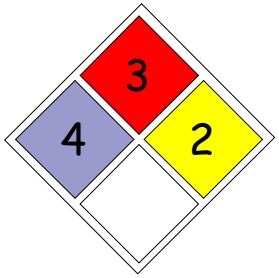
Tehlikeli maddeler, tehlikeli maddelerin taşınması ile ilgili yönetmelikler uyarınca ya da tehlikelerinin derecesine göre sınıflandırılırlar.

Reaktiflik, bozunma hızı, yangın veya sağlık tehlikesi ya da toksik etkilere göre sınıflandırma yapılır.



Renk ve Rakam Kod Sistemleri

NFPA Tipi Etiket



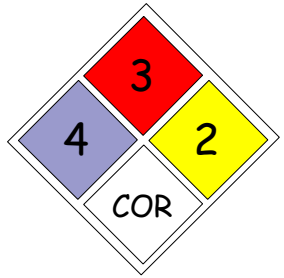
Renk

- Kırmızı = Yangın
- Sarı = Reaktif
- Mavi = Sağlık
- Beyaz = Özel malzeme
- veya kişiler

Rakamsal

- 0 = Minimal
- 1 = Az
- 2 = Orta
- 3 = Önemli
- 4 = En Yüksek

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLERİ DO□. DR. MEHMET KARACA



Beyaz Karede Bulunabilecek Kodlar

- OX = Oksidan
- ACID = Asit
- ALK = Alkali
- COR = Aşındırıcı
- W = Su Kullanılmaz

Soluma ,Kimyasallar tahrişe, hassasiyete, alerjik reaksiyonlara, solunum rahatsızlıklarına veya **kansere** neden olabilirler.

Temas, Deri ile temas kimyasal yanıklara, gözde konjuktivite veya sistemik zehirlenmeye neden olabilirler.

Ağızdan alma, Zehirli kimyasallar, ağızla pipetleme yaparken veya yiyecek ve içeceklerin bu kimyasallarla kontaminasyonu sonucunda kazayla yutulabilir.

Kesik, Deriden zehirli kimyasallar kesikler, sıyrık veya iğne batması yoluyla vücuda girebilir.

Kimyasalların Toksik Etkileri:

Solunum sistemi, kan, akciğerler, böbrekler, sindirim sistemi ve diğer dokular olumsuz yönde etkilenebilmektedir.

Bazı kimyasallar karsinojendirler.

Bazı çözücü buharları toksiktir.

Yukarıda sayılan ciddi etkilerin yanı sıra, geç olarak ortaya çıkabilen uyuşukluk, koordinasyon bozukluğu gibi belirtiler olabilir.

Pek çok organik çözücü ile uzun süreli temas, deri hasarına yol açar. Bu derinin yağ kaybetmesine bağlı olabildiği gibi alerjik ya da korozif belirtiler de oluşabilir.

Kimyasalların Ortama Dökülmesi:

Madde üreticileri dökülme durumunda yapılacakları belirten uyarılar hazırlamışlardır.

-Koruyucu elbise ör: sıvı geçirmez kauçuk eldivenler, koruyucu ayakkabı/botlar respiratörler,

- Süpürge, faraşlar,

- Cam toplamak için cımbızlar,

- Paspaslar, havlu kağıtları,

- Kovalar,

BILGI PAYLASTIKÇA DEGERLIDIR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- Asitleri nötralize etmek için sodyum karbonat (Na2CO3) veya sodyum bikarbonat (NaHCO3)
- - Kum,
- - Yanıcı olmayan deterjanlar.
- Sıvı dökülmelerinde aşağıdaki şekilde nötralizasyon yapılmalıdır :
- - Asitler, korozif kimyasallar sodyum karbonat (Na2CO3) veya sodyum bikarbonat (NaHCO3)
- - Alkaliler kuru kum ile kaplanmalı

Tehlikeli Bir Kimyasalın Dökülmesi Halinde Yapılacaklar

1. Biyogüvenlik sorumlusuna haber verilir, görevli olmayan personel olay yerinden uzaklaştırılır.

2. Kontamine olanlara yardım edilir.

3. Dökülen madde yanıcı ise, alevler söndürülür, açık olan gazlar kapatılır, kıvılcıma karşı elektrik ana şalteri kapatılır.

- 4. Dökülen maddenin kokusu solunmamaya çalışılır.
- 5. Havalandırma mümkünse çalıştırılır.

- Çok miktarda bir sıvı dökülmesinde oda boşaltılmalı, pencereler açılmalıdır. Dökülen madde yanıcı ise, alevler söndürülür, açık olan gazlar kapatılır, kıvılcıma karşı elektrikli cihazların fişleri prizden çıkarılır.

BİTKİLER GEN AKTARIMI:

En genel anlamıyla bitkilere gen aktarımı; fonksiyonel olarak belirlenmiş doğal ya da sentetik nukleik asit dizilerinin (GENLERİN) bitki hücrelerine genetik mühendisliği veya rekombinant DNA teknikleri kullanılarak aktarılmasıdır.

Genetik transformasyon olarak adlandırılan bu süreç:

1) Yabancı nukleik asit molekülünün hücreye girişi (insersiyon)
2) Genoma bağlanması (entegrasyon) ,
3) Genin anlatımın yapılması (ekspresyon; ifade)
4) Yavru döllere aktarımı aşamalarından oluşur.

BİLGİ PAYLAŞIM DEĞERLENDİRİCİSİ: DR. MEHMET KARACA

GEN AKTARIM METOTLARI

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Agrobacterium rhizogenes*
- *Virüsler*
- *Makroenjeksiyon*
- *Biyolistik (Partikül Bombardımanı)*
- *Gen Tabancası*
- *Mikroenjeksiyon*
- *Kimyasal Porasyon*
- *Elektroporasyon*
- *Polen transformasyonu*
- *Zigota veya embriyoya DNA emdirilmesi*
- *Fiberler aracılığıyla DNA aktarımı*
- *Sonikasyon*
- *Desikasyon*