Doç. Dr. Mehmet Karaca

GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR!© DR. MEHMET KARACA

- Gen Transferi Özetle Tohumdan Transgenik Bitkiye:

TUHUMLAR (DOMATES)

- Transformasyonu düşünülen bitki (transgenik olacak bitkiye ait) tohumlarların temiz hastalık ve zararlardan ari olmalıdır.
- Çimlenme kabiliyetinin yüksek olması önemlidir.



TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU

- Domates tohumları genellikle %20-50'lik hipoklorit (çamaşır suyu) ve % 0.2- 0. Tween 20 solisyonuyal birkaçkez yıkanır ve steril su ile durulanır.
- (Yüzey Sterilizasyonu)



ÇİMLENDİRME



- Temzlenmiş olan tohumlar petri kaplarında hazırlanmış olan besin ortamında çimlendirilir.
  [*Murashige ve Skoogs (MS)]*

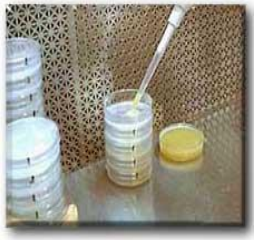
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

EKSPLANT'LAR

- Tohumların ekiminden yaklaşık 7 gün sonra domates tohumlarından kotiledon yaprakları oluşur.
- Kotiledonları içeren fidecikler kesilerek sıvı MS ortamına transfer edilir.
- Bu yapraklar bu örnekte eksplant'dır.
- Eksplant yapraktan, kotiledon yapraktan, embriyodan, hipokotilden, epikotilden oluşabilir.



Beslenme ve İndükleme Tabakasının Hazırlanması



- İçersinde MS/agar bulunan ortamın üzerinde tütün kalus süspansiyon bulunan bir tabaka dökülür/eklenir.
- Bunun amacı tütün kalus süspansiyonunun *Agrobacterium'u indüklemesini saglamaktır.*

FİLTRE DISKLERİNİN HAZIRLANIR

- Oluşturulan besi ortamı ve kallus süspansiyon tabakasının üzeri bir filtre kağıdıyla (Disk) kapatılır.
- Bununla eksplantn süspansiyonun arası kapatılır.



Eksplantların Kesimi

- Kotiledon yaprakları sıvı Besin ortamında tekrar kesilerek kesim yüzeyleri artırılır. Kesim yada yaralanma yüzüyleri Agrobacterium için gen transfer yüzeyleridir.



BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR DR. MEHMET KARACA

AGROBACTERIUM

- Bir gece boyu eksplantlar filtre yüzeyinde tutularak kompatent olmaları sağlanır. Eksplantlar *Agrobacterium* süsoansiyonu ile mumale edilir.



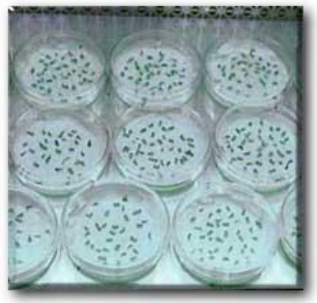
Fazla AGROBACTERIUM Uzaklaştırılır

- Eksplantlarda bulunan fazla *Agrobacterium* filtre yardımıyla uzaklaştırılır.



DNA TRANSFERİ: Ko-Kültivasyon

- Eksplantlar Agrobacterium ile 48 saat kültive edilir (co-cultivation).



Besi Ortamının Hazırlanması

- Ko-kültivasyondan sonra eksplantlar yeni bir besi ortamına alınır. Bu besi ortamında seleksiyon için antibiyotik ve bitki büyüme düzenleyicileri, zeatin riboside bulunur.



Eksplantların Transferi

- Eksplantlar zeatin içeren MS besi ortamına alınır. Besi ortamında kanamisin bulunur.



Rejenerasyon

- Yaklaşık 3 hafta sonra, Eksplantlardan kallus oluşumu başlar. Kallus oluşumu eksplantların yaralı kısımlarından zeatinin etkisiyle gerçekleşir.



Sürgünlerin Oluşumu

- Yaklaşık 6 hafta sonra kallustan çıkan sürgünler Zeatin içeren MS besi ortamına alınır.



BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLENİR © DR. MEHMET KARACA

Köklendirme Ortamı

- Yaklaşık 9 hafta sonra kallustan oluşturulan sürgünlerin kçklendirme işlemine geçilir. Bu ortam zeatin içermez ancak kanamisin içerir.



BİLGİ PAYLAŞTIKLA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Transgenik Bitkiler

- Yaklaşık 11 hafta sonra bitkiler MS besi ortamında ve uygun antibiyotik şartlarda köklenir.



Toprağa Transfer

- Köklenmiş olan bitkiler saksılara transfer edilir. Akkilimasyon yada alıştırma olayı 4-5 gün sürer. Bu aşamaya 13 hafta sonra ulaşılır.



Seraya Transfer

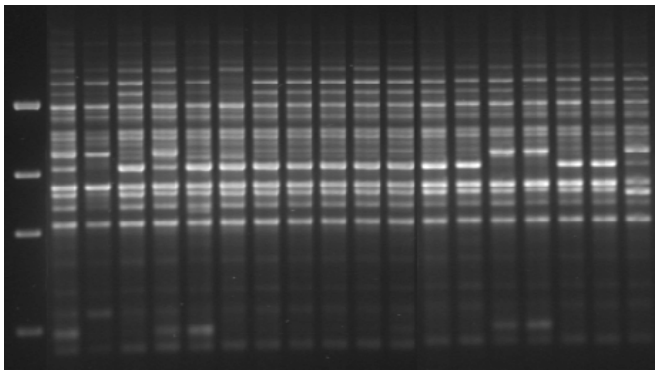
- *Yaklaşık 15 hafta sonra bitkiler seraya transfere hazır hale gelir.*



- Serada yetiştirilen bitkiler trangenik ve trangenik yapım amaçları için analiz edilir.



BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA



DNA MARKIR TEKNOLOJİSİ

- DNA MARKIRLARININ BİTKİ GEN BANKALARINDA KULLANILMASI

- YENİ BİTKİ TEŞHİS VE TANISI
- VAR OLAN GENETİK KAYNAKLARIN SAFLIKLARININ BELİRLENMESİ
- BİTKİ HASTALIK VE ZARALILARININ TESBİTİ
- BİTKİ GEN KAYNAKLARININ KORUNMASI

- DNA MARKIRLARININ KLİNİKTE
- ADLİ TIPTA KULLANILMASI
- HASTALIK TANI VE TEŞHİSİNDE
- BABALIK DAVALARI
- KRİMİNAL OLAYLARDA
- TOHUMLUK VE FİDE
- PATENT

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- DNA MARKIRLARININ BİTKİ ISLAHINDA KULLANILMASI
  - EBEVEYNLERİN BELİRLENMESİNDE
  - GEN HARİTALAMALARINDA
  - YENİ GENLERİN BELİRLENMESİNDE
  - F**2**, BC, RIL (recombinant inbred lines), Isogenic Lines, Near IL
  - DNA MARKIRLARININ GENETİK MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILMASI
  - GMO TEŞHİSİNDE
  - GEN ETİKETLEMEDE

- BİTKİ ISLAHI AÇISINDAN MOLEKÜLER MARKIRLARIN MORFOLOJİK MARKIRLARDAN FARKI
- 1) KALİTATİF VE KANTİTATİF BAĞIMSIZLIK: Çevre, gelişme dönemi ve araştırıcılardan kaynaklanabilecek hataların azlığı.
- 2) YÜKSEK ORANDA POLİMORFİK: Bir genomda bulunan toplam baz sayısı kadar polimorfiklik saptanabilir.
- 3) ÇOKLUK: Çok sayıda moleküler markır olmasına karşın morfolojik markır sayısı azdır.
- 4) KO-DOMİNANTLIK: Bir lotusta mümkün olabilecek genotip belirlenebilir.
- 5) GEN X GEN İNTERAKSİYONU: Epistatik ve pleotropik değildir.
- 6) HIZLILIK VE EKONOMİKLİK
- 7) ÜNİVERSALLIK

- **DNA MARKIR SİSTEMLERİ**
- **RESTRİKSİYON ENZİM VE HİBRİDİZASYON TABANLI**
- Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Lenght Polymorphism, RFLP)
- Minisatellit (Minisatellite)
- Nokta Hibridizasyonu (Dot Blot)
- Genomik Restriksiyon Sınırlarını Tarama (Restriction Landmark Genomic Scanning, RLGS) ve Restriction Mapping

- **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE RESTRİKSİYON ENZİM TABANLI**
  - Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR, RFLP-PCR)
  - Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) veya Bölünerek-Çoğaltılmış Polimorfik DNA Dizileri (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence, CAPS)
  - Terminal Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)
  - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR DOÇ. DR. MEHMET KARACA

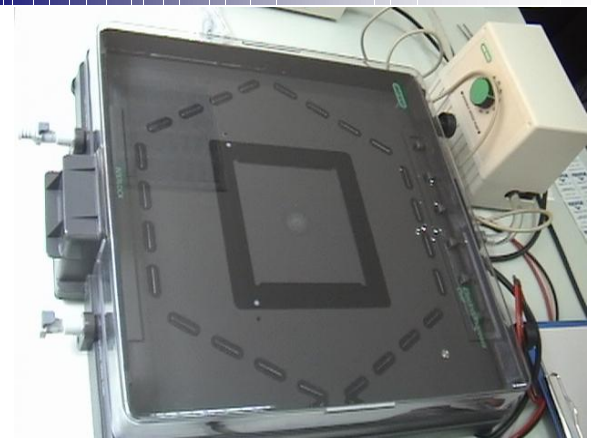
- **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU TABANLI**
- Primere Tabi Polimeraz Zincir Reaksiyonu Polimorfizmi (Arbitrary Primed PCR, AP-PCR)
- Rastlantısal Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi (Random Amplified Polimorphism DNA (RAPD)
- Çoğaltılan DNA Parmakizi (DNA Amplification Fingerprinting, DAF)
- Mikrosatellitler veya Basit Tekrarlı Diziler Polimorfizmi (Microsatelites (Simple Sequence Repeats Polymorphism, SSRP)
- Doğrudan Çoğaltılan Minisatellite DNA (Directed Amplification of Minisatellite DNA, DAMD-PCR) veya Direct Amplified Minisatellite DNA
- Çoğaltılan Sekans Polimorfizmi (Sequence Related Amplified Polymorphism, SRAP)

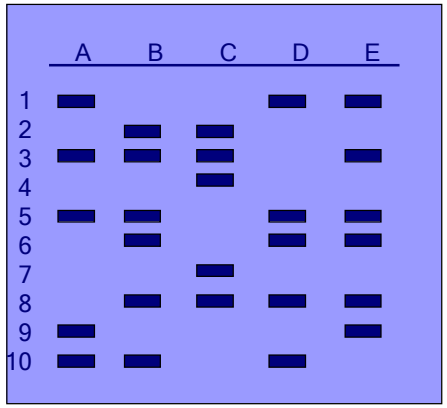
- Belirli Dizileri Çoğaltılan Bölgeler (Sequence Characterised Amplified Region, SCAR)
- Basit Sekans Tekrarları Arası Polimorfizmi (Inter simple sequence repeats, ISSR)
- Doğrudan Çoğaltılan Uzunluk Polimorfizmi (Direct Amplification of Length Polymorphism, DALP)
- Karşılaştırmalı Ayırım (Differential Display, DD)
- Allele Bağlı Özgün Primerler (Allele-specific Associated Primers, ASAPs)
- İntron Tabanlı Uzunluk Polimorfizmi, Intron Fragment Length Polymorphism, IFLP)
- Ligaz Zincir Reaksiyonu (LCR)

- **DNA DİZİ VE ENZİM TABANLI**
- Klevaz Kısım Uzunluk Polimorfizmi (Cleavase Fragment length polymorphism, CFLP)
- Kimyasal Mismaç Kesimi (Chemical cleavage of mismatches (CCM))
- **DNA DİZİ TABANLI**
- Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)
- Heterodupleks Analizi (Heteroduplex analysis, HA)
- Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (Single stranded conformational polymorphism, SSCP)
- Doğrudan Dizi Analizi (Direct Sequencing)
- Genler Arası Bölgeler (Internal Transcribed Spacers, ITS)
- Rastlantısal Çoğaltılmış Mikrosatellit Polimorfizmi (Randomly Amplified Microsatellite Polymorphisms, RAMPO)

- **İN SİLİKO (IN SLICO)**
- İfade Edilmiş Diziler (Expressed Sequence Tags, ESTs)
- Dizisi Etiketli Alanlar (Sequence Tagged Sites, STS)
- **DİĞER YÖNTEMLER**
- Pulsed Field Gel Electrophoresis
- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)
- Kapilar Elektroforesis
- Kromatografik teknikler (HPLC, MS vb)

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR DOÇ. DR. MEHMET KARACA





Mikrosatellitler veya Basit Tekrarli Diziler Polimorfizmi (Microsatelites (Simple Sequence Repeats Polimorfizm)

- Basit tekrarli DNA dizileri genelde bir ile 6 nükleotit uzunlugunda bazlarin ardisik olarak bulunmasi olayidir. Örnegin ikili tekrar ATATATATATATATATATAT seklindedir. Burada ardışık olarak tekrar eden bazlar AT' dir ve bu örnekte AT 10 kez tekrarlanmaktadır ve AT(10) şeklinde ifade edilir. Herhangi bir DNA'nin basit tekrarli olarak isimlendirilebilmesi için önce belirli bir motifin yukaridaki örnekte motif AT'dir ve bu motifin belirli bir sayida bulunmasi gerekir. Genelde ikili bir motifte motif sayisinin en az 8 olmasi bu sekansa basit tekrarli sekan olarak adlandirilmasini saglar.

- Bu teknik günümüzde oldukça fazla kullanilan bir tekniktir. Nedeni ise polimorfizm orani oldukça fazla olmasi yaninda tekrarlanabilirligi (farkli kisilerin farkli labaratuarlarda yapimis oldugu deneylerden ayni sonuç almalari) oldukça fazla olan bir yöntemdir. Bir PCR metodu olmasi kolay uygulanabimesini saglar. Ancak bu markir sisteminin uygulanabilmesi için çalisilan organizmaya ait primerlerin yani SSR primerlerinin önceden bilimesi gerekmektedir.

BILGI PAYLASTIKLARIDIR © DR. MEHMET KARACA

- Ardışık SSR tekrarların sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımı ile sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir. SSR´ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla lokustaki farklı aleller tesbit edilebilir. (şekil)
- SSR primerlerinin üretiminde genel olarak üç farklı yaklaşım tercih edilmektedir. Bunlar: (1) genomik DNA kütüphanelerinin SSR oligonükleotidleri ile hibridizasyonu yoluyla gözlenmesi, (2) DNA veri bankalarında SSR´ların araştırılması ve (3) akraba bitki türlerinde geliştirilmiş olan SSR-spesifik primerlerin kullanımıdır. SSR- spesifik primer çiftleri (ileri ve geri çalışan primerler) PCR çoğaltımı için mikrosatelitleri çevreleyen diziler temel alınarak dizayn edilirler.

- Mikrosatellitlerin en büyük dezavantajı yeni markör geliştirilmesinin güçlüğüdür. Yeni markörlerin geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problarla melezlenme yoluyla bulunması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel başlatıcı DNA`lar geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da oldukça fazla işgücü gerektiren pahalı bir işlemdir.
- SSR tekniğinin bitkilerde genetik haritalama çalışmalarındaki kullanımı avantajlarından ötürü her geçen gün artmaktadır. SSR´lar yüksek oranda polomorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi verici bir özellik gösterirler. Ayrıca eş baskın markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması da kullanım oranını arttırmaktadır.
- İki primer (sağ ve sol) primer kullanılarak her iki primerin arasında bulunan ardışık tekrar bölgesi amplikon olarak üretilir. Ardışık tekrar sayılarında bulunabilen azalma veya armanın neden oldugu büyüklük farkını bakılarak polimorfizim araştırılır.

SEKANS ILISKILI ÇOGALTILAN POLIMORFIZM (Sequence related amplified polymorphism (SRAP))

- 17 ile 20 nt arasında kullanılan özel primerlerle genomda kodlama yapan DNA parçalarını çogaltamaya dayalı bir metottur. Ko-dominantlık ve tekrarlanabilme özeliği, morfolojik karakterlerle ilişkilerinin fazlalıgı avantajları arasında yer alırken özel primer istegi ise bir dezavantajıdır.
- SRAP iki özel primer kullanır (bir brimer çifti) bu primerlerin 13 ile 15 nt uzunlugundaki sol tarafı (5'-) değişik bazlardan oluşur ve CCGG bazlarıyla uzatılır. Diğer primer ise yine benzer şeklide olup 3'- ucu AATT bazlarıyla bitirilir.

BASIT SEKANS TEKRARLAR ARASI POLIMORFIZIM (Inter simple sequence repeats (ISSR))

- Bu teknikte genellikle tek bir primer kullanılır. Primer uzunluğu 16-20 nt olup duruma göre primerin uçlarından biri 2-4 baz uzatılır. Primerin bu uzantılar içerisindeki kısmında tekrarlı bazlar bulunur.
- ISSR primerine örnek: 5'-AC**AC**ACACACACACACCTC-3'
- Burada CCTC ardışık tekrarın 3'- ucuna eklenen nükleotidleri gösterir
- Çok sayıda lokus aynı anda izlenebilmektedir.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA GÜÇLENİRİZ - DR. MEHMET KARACA

DİZİLERİ BELİRİ ÇOĞALTILAN BÖLGELER (Sequence characterised amplified region (SCAR)

- Bu markır sistemi genellikle RAPD veya AFLP metotlarıyla çoğaltılmış tek bir amplikonun primer uzunluğunu yaklaşık ikiye katlayarak yeniden çoğaltılmasına dayanır.Kısaca tek fragmentini temsil eden lokus önce jel üzerinden alınır, orijinal primerle tekrar çoğaltılır ve çoğaltılan DNA parçasının sekansı yapılır. Yeni primerler eski primer sekanslarını ve ek olarak yeni DNA dizileri içerir yani ilgili lokusa göre yeniden primer dizayn edilir ve PCR amplifikasyonunda kullanılır.
- Bu metodla RAPD veya AFLP teknikleri dominant özellikten ko-dominant özellige, tekrarlanma özelligi artırılmaktadır. SCAR primerlere genelde 18-24 oligo uzunlugundadır.
- Avantajları: PCR metodu oldugundan, Yüksek kalite ve miktarda DNA'ya ihtiyaç yoktur. Tekrarlanabilme kapasitesi oldukça yüksektir.
- Dezavantajı: DNA sekanslamasına ihtiyaç duyar.

Tek Sarmal Konformasyon Polimorfizmi (Single stranded conformational polymorphism (SSCP)).

- Aynı büyüklükteki DNA parçalarının ayırmakta kullanılan bir metottur. Bu metotta tek sarmallı DNA`nın non-denatürasyon poliakrilamid jel elektroforezindeki hareketi izlenir. Bu tekniğin temelini jel üzerinde elektroforez olan bir DNA'nın hareketi DNA'nın büyüklüğü ve bu DNA'yı oluşturan sekansların içeriğine ve bu içerikten dolayı DNA parçacığının kendi üzerine bağlanma veya değişik şekiller almasına dayanır. Bu teknik 100 ile 400 nükleotid uzunluğundaki DNA'larda uygun sonuçlar verebilmektedir. Bu teknik uygun büyüklükteki PCR amplikonlarına uygulanır ve PJE yöntemiyle ayrıştırılır ve izotop, EB veya gümüş nitrat yöntemiyle görüntülenebilir.

Raslantısal Çoğaltılmış DNA Farklılığı (Random Amplified Polimorphism DNA (RAPD)

- Bu teknikte genellikle 10 nükleotid uzunluğundaki primer (başlatıcı) tek sarlmallı DNA`lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon şartlarının spesifik olmaması rastgele çoğaltıma izin verir. Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil tek bir primer kullanılır (Şekil RAPD). Ancak bu başlatıcı her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılır. Dolayısıyla kullanılan başlatıcının DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. Üretimi yapılan DNA parçaları (amplikon) agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduğunda bazı parçaların bazı genotiplerde üretilip bazılarında üretilmediği gözlenir.

- RAPD tekniğinin avantajları arasında çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az iş gücü gerektirmesi, az miktarda DNA`ya ihtiyaç duyması gelmektedir. Ayrıca polimirfizm oranı çok yüksektir. Bu özellikleri itibariyle otomasyona uygundur. Ancak tekniğin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi güvenilirliğinin sınırlı olmasıdır. Farklı laboratuvarlarda, farklı araştırıcıların elinde ve hatta bir PCR cihazından diğerine farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Tekniğin diğer dezavantajları arasında dominant özellikte markör vermesi ve bu yolla elde edilen markörlerin diğer haritalara transfer edilememesi gelmektedir

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİ ARTAR - MEHMET KARACA

- Avantajları
- 1. RFLP'den daha fazla polimorfik
- 2. Basit ve hızlı
- 3. markırları çevre şarlarından ve gelişme dönemlerinden etkilenmez
- 4. Radyoizotoplar kullanmaz
- 5. mutasyona baglı amlifikasyon
- 6. Az genomik DNA
- 7. Primer başına fazla markır üretebilir
- 8. üniversal primerler kullanır
- Dezavantajları:
- Tekrarlanabilirligi zayıf
- dominant markır
- polimorfizim oranı diğer bazı markırlardan az

Çogaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP),

- Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı veya polimorfizmi anlamına gelen AFLP tekniği RAPD tekniğini ile RFLP tekniginin birleştirilmiş formu olup RAPD tekniginin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte genomik DNA genellikle önce birisi altı, diğeri dört bazı tanıyan iki kesim enzimi (RE) tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA`lar eklenir (Adaptör). Eklenen sentetik DNA`nın yani adaptörün nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA`lar yani primerlerin kullanımıyla nisbeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltma iki aşamada gerçekleşririlir. İlk aşamada her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim yapılır.

- Asıl üretimde ön üretimde elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de tasıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur. Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğu farklarını dahi ayırd edebilen poliakrilamid(dizileme, sekanslama jeli) jel üzerinde hareket ettirilerek farklı genotiplere ait farklılık gösteren parçacıklar tesbit edilir

- AFLP Analizi 5 basamaktan oluşur:
- 1-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleriyle Kesilmesi:
- Genellikle 4 baz spesifik MseI ve 6 baz spesifik EcoRI enzimleriyle genomik DNA kesilir. Oluşan DNA parçacıklarının her iki ucununda EcoRI veya MseI enzimleriyle kesilmiş olabileceği gibi büyük çoğunluğununun bir ucu MseI ve diğer ucu EcoRI kesilmiş olacaktır.
- 2-Çift sarmallı Adaptör Sekanslarının Restriksiyon enzimlerinin kesmiş olduğu kısımlara eklenmesi.
- Çift sarmallı ve belirli sekans dizilerine sahip olan iki değişik adaptör sekansları (Mse1-Adaptör ve EcoR1-Adaptör) hazırlanır. Bir adaptör kesilmiş DNA parçasının bir ucunda diğer adaptör ise diğer ucuna anahtar-kilit benzetmesi şeklinde uyar ve bağlanır. Bağlanmadan sonra Restriksiyon enzimleri tanıma bölgeleri değiştirildiğinden, Mse1 ve EcoR1 enzimleri tekrar bu bölgeleri kesemez. Adaptörler daha sonra DNA ligaz enzimiyle DNA parçacıklarına fosfodiester bağları kurularak kapatılır.

BİLGİ AMAÇLI HAZIRLANMIŞTIR. DR. MEHMET KARACA

- 3 Ön-Seçici PCR.
- Bu basamakta ise iki primer çifti kullanılır. Primerler MseI ve EcoRI primerleri olarak bilinir. Bu primerler adaptör DNA'ya komlementer olup adaptör DNA'lara bağlanırlar. Bunun ötesinde bu primerlerin 3'-uçları adaptör sekansından genellikle 1 yada 2 baz daha uzundur (Not eğer bir baz uzunsa 4 değişik primer, eğer iki baz ise 16 değişik primer oluşur). Ön-Seçiçi PCR'la sadece 3'-ucunda komplementary gösteren DNA parçacıkları arttırılır. PCR genellikle 15 yada 20 döngüyle tamamlanır. AFLP'nin temelide budur. Burada restriksiyon enzimleriyle kesilen ve adaptörlerle kapatılan DNA parçacıklarından sadece yaklaşık olarak 1/16 seçici olarak arttırılır. Diğer bir deyişle bu adımda restriksiyon-ligasyonla oluşturulan kalıp DNA'larda yaklaşık 16 kat azalma gerçekleştirilir.

- 4 Seçici PCR
- Ön seçici PCR ürünleri bu aşamada seyreltilerek seçici PCR'da kalıp DNA olarak kullanılır. Bu aşamada kullanılan primerler ise ön-seçici PCR'da kullanılan primerlerle aynı olup 3'-ucunda genellikle 2 vey 3 nükleotid uzunluğunda fazla baz bulunur. Eğer iki nükleotid ise 4n= 16 (n=2) değişik primer, eğer 3 nükleotid uzunluğunda ise 4 n =64 (n=3) değişik primer kullanılabilir. Her bir PCR için sadece bir çift primer kullanılır. PCR genellikle 30-35 döngüde tamamlanır.
- Eğer primerler herhangi rayoaktif veya floresan etiketlerle etiketlenmemişse AJE veya PJE teknikleriyle ethidium bromide veya gümüş nitrat kullanılarak bandların yani markırların gözlenmesi yapılır. Eğer primerler radyoaktif veya floresan etiketlerle etiketlenmişse ya otoradiografi veya floresan okuyucularla markırlar belirlenir. Floresan etiketli AFLP markırları ya kapılari jel elektroforesiz sistemiyle yada poliakrilamid jelleri okuyan cihazlarla gerçekleştirilir..

DNA-KAPİLER ELEKTROFORESIS (Capillary Electrophoresis (CE))

- Kapiler elektroforesis (KE) elektroforetik ve likit kromotografik tekniklerin birleştirilmesiyle oluşturulmuş bir sistemdir. Oldukça değişik sistemler geliştirilmiş olup bu tekniklerle hem elektriksel yükleri olan hem de nötr moleküllerin ayrışmasında kullanılmaktadır.Nükleik asitler, proteinler, glikoproteinler, peptitler, karbonhidratlar, organik ve inorganik iyonları ayrıştırılmasında ve analizinde kullanılır.
-

- Kapiler genellikle iç çapı 50 µm ve uzunluğu 1 metreye kadar varan cam veya özel fibrelerden (silicate glass capillary) yapılan ince çubuk şeklinde bir nesnedir. Kapileri jelle doldurulur, oldukça küçük yoğunluktaki (10 nL) DNA moleküllerine 20 ile 30 kV elektrik akımı verildiğinde DNA Kapiler içerisinde ilerler (+ den – yöne). Kapiler üzerinde özel bir pencereye geldiğinde lazer kaynağından gelen enerjiyle DNA üzerinde bulunan etiketler (Floresan) enerjilerini yükseltir ve bu enerji LCD kamera tarafından kayıt edilerek ya bantlar halinde yada pikler halinde bilgisayar ekranına yansıtılır veya ana belleğe yüklenir. Değişik analiz yöntemleriyle incelenerek yorumlanır. Bu teknik DNA sekanslamada, PCR-RFLP (CAPS), SNP, SSRLP, AFLP, SSCP ve DD analizlerinde oldukça yoğun olarak kullanılmaktadır.
- Bu teknik: PAHALI, Ancak: Yüksek çözünürlüklü ve yüksek duyarlılıktadır.

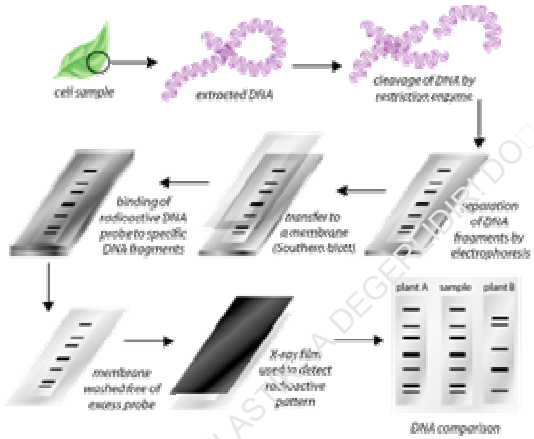
BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR. MEHMET KARACA

Sınırlandırılmış Kısım Uzunluk Polimorfizmi, SKUP, (Restriction Fragment Lenght Polymorphism (RFLP)

- Bu markırlar çeşitli şekillerde etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA) araştırılan bir DNA populasyonunda benzer veya aynı dizilişteki DNA`ya melezlenebilmesini baz almaktadır.
- RFLP analizi dokulardan izole edilen genomik DNA`nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince (Restriksiyon Endonukeazlar) spesifik olarak kesilmesi, genellikle Agaroz Jel Elektroforesiz yöntemiyle ayrıştırıldıktan sonra ve prob DNA`nın melezlendiği DNA (Souther Blot) analizi esasına dayanır.

- Genomik DNA`nın kesimi tipik olarak 4-6 nükleotid dizileri tanıyan enzimlerce yapılır. Kesim sonrasında DNA bir jel destek sistemi içinde elektroforeze tabi tutulduğunda taşıdığı negatif yüklerden dolayı pozitif yöne doğru hareket edecektir. DNA`nın bu hareketi kütlesinin logaritmasıyla ters orantılıdır. Yani küçük parçacıklar daha hızlı hareket edecektir. Kesilen parçalar elektroforez sonucunda jel içinde büyüklüklerine göre sıralanırlar. Bu sıralanma sonrası DNA jel ortamdan daha kullanışlı olan naylon filtrelere tek ipçik halinde Southern transfer metoduyla transfer edilir.

- DNA`yı jel üzerindeki dizilişinin aynı şekliyle tek iplik halinde taşıyan filtreler üzerine çeşitli biçimlerde etiketlenmiş ve tek iplik haline getirilmiş prob DNA uygulanır. Eğer prob DNA ile filtredeki DNA birbirinin aynı veya benzeri ise prob DNA kendisine benzer dizilişi taşıyan parçanın üzerine yapışır. Karşılaştırılan iki genotip arasında prob DNA`nın yapıştığı bölge etrafında DNA kesim enziminin kesme motifi bakımından bir farklılık (polimorfizm) varsa probun yapıştığı parça büyüklüğü iki ebeveyn arasında değişiklik gösterecektir. Prob DNA üzerindeki etiketin gözlenmesiyle iki ebeveyne ait DNA`lar birbirinden ayırd edilir. Bu ayırd etme bir açılma populasyonunda yapıldığında açılım gösteren bireylerin prob DNA`nın temsil ettiği lokus bakımından genotip analizi tamamlanmış olur.



BİLGİ PAYLAŞTIĞINA DEĞER! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- Deterjanlar/Surfektant
- Sıvılaştırma, Tekrar Kristalleştirme, Denaturasyon
- Deterjanlar İyonik (Yüklü) Veya Yüksüz (Non-Ionic) Olabilirler.
- İonik Dterjanlar
- Anyonik: Negatif Yüklüdür
- Sodyum Dodesil Sülfat, Lityum Dodesil Sülfat, Sodyum Lauroyilsarkosin (Sarkosiyl)
- Katyonik: Pozitif Yüklüdür
- Setilmetyammonyumbromit, Setiltrimetilamonyumbromit (Ctab)
- Zivitteronik: Pozitif Ve Negatif Yüklü
- Betanin, Sulfobetain

- İyonik Olmayan Deterjanlar Membran Proteinlerini Aktivitelerini Bozmadan Çözer. Bu Deterjanlar Suyu Seven Proteinleri Diğerlerinden Kolayca Ayırabilir.
- Tween 20
- Triton X-100
- Tampon Çözeltiler
- Bunlar Aqueous (Sudan Yapılmış, Sulu) Çözeltiler Olup İçerisinde Bir Kısım Nötürleşmiş Zayıf Asit Ve Baz İçeren Çözeltilerdir. Bu Çözeltiler Yüksek Oranda Olmamakla Birlikte Yüksek Miktarda Asit Veya Baz Eklemelerde Ph Degişimine Drençlidir.

- İyi Tampon Çözelti:
- Buffer Aralıgı: Buffer Kapasitesi İstenilen Ph Nın 1 Üstünden Veya 1 Altınadan Fazla Oynamamalıdır.
- Sıcaklık: Yüksek Sıcaklıklarda Ph Degerini Korumlaı
- Konsantrasyon: Asit Baz Dengesi %50 Oranını Geçmemelidir
- Spektral Özellik: 240-700 Nm Dalga Boyunda Absorbe Etmemeli. Renksiz Olmalı
- Suda Kolay Diğer Solventlere Dayanıklı

- Lityum Klorit: Rna Moleküllerini Hızlı Ve Etkin Şekilde Çökertir Ancak Dna, Protein Ve Serbest Dntp Yavaş Çökeltir.
- Cdna Ve Translasyon Çalışmalarında İnhibitörleri Uzaklaştırmada Kullanılır.
- DNA Ve RNA Ektraksiyonlarında Etkin Bir Şekilde Kullanılır.
- Fenol Ve Kloroform: Protein Denaturasyonu, Protein-Dna Kompleksinde Proteini Etkin Şekilde Denature Ederek Çökeltir.
- Fenol Kullanımında pH'
- Fenol Karışımının pH 7'den Yukarıda İse: Dna Ve Rna Sulu Solisyonun Üst Kısmında Ve Protein Orta Fazda (İnterfaz) Bulunur. (Dna Ekstraksiyonu).
- pH Nin 7 Ve 4.5 Arasında Dna Denature Edilir Ve Proteinlerle Birlikte İnterfazda Bulunur.
- RNA Ekstraksiyonu İçin pH 4.5 Olmalı Ve Bu Durumda Rna Üst Sulu Fazda İnterfazda Dna Ve Protein Bulunur.

BİLGİ PAYLAŞIM AMAÇLIDIR. DR. MEHMET KARACA

- Western Blot Analizi
- Bu Teknik Hızlı Ve Güvenilir Bir Metot Olup Saflaştırılmış Protein Ve Protein Karışımlarını Karakterize Etmede Yaygın Olarak Kullanılmaktadır.
- Bu Teknik Jel Elektroforesis Ayrım Teknigiyle (Resolasyon) Affınity Kromotografisinin Antijen-Antibody, Enzim-Substrat İlişkisinden Yararlanır.
- Bu Teknikte Tek Bir Tek Bir Antıbody Kullanılabildiği Gibi Birden Fazlada Antıbody Kullanılabilir.

- **NÜKLEİK ASİTLERİN JEL'DEN MEMBRAN'A TRANSFERİ**
- Elektroforesiz, jel üzerindeki nükleik asitleri denatürasyona (NaOH) tabi tutulur (tsDNA), tsDNA'ları membran üzerine transfer edilir, membran'ı 80**o**C ısıtarak hedef NA'in tam olarak bağlanmasını sağlanır, membran üzerineki tsDNA ile prob tsDNA veya RNA moleküllerini hibridizasyona tabi tutulur, görüntülenir.

- **Revers Transkriptazlar (Reverse Transcriptases)**
- Bu gruba giren enzimler RNA-bağımlı (güdümlü) DNA polimerazlardır (RNA-dependent DNA polymerase).
- 1-DNA polimeraz aktivitesiyle *in vitro* şartlar altında hem tek sarmallı RNA hemde tek sarmallı DNA zincirinde RNA veya DNA primerinin varlığında komplementary DNA zincirini sentezler.
- 2- RNaz H Aktivitesi (**RNase H activity):** RNaz H (RNase H) bir çeşit ribonükleaz (ribonuclease) olup fonksiyonu RNA zincirini RNA-DNA hibridinden parçalayarak ayırmaktır (degradation). Bu enzim hem endonükleaz (endonuclease: zincirin ortalarından) hemde eksonükleaz (exonuclease: zincirlerin uç bölgelerinden) aktivitesine yani hidrolize ederek parçalama aktivitesine sahiptir.

- Ticari olarak, tek bir polipeptitten elde edilen Moloney murine leukemia virus ve iki polipeptitten oluşan Avian myeloblastosis virus den elde edilen reverse transkriptazlar en fazla kullanılan enzimlerdir. Her iki enzimde aynı oranda polimeraz aktivite gösterirken murine leukemia virus enziminin RNase H aktivitesi diğerinden daha az olduğundan uzun mRNA'larda tercih edilebilir.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR PROF. DR. MEHMET KARACA

- **Kullanımı**
- cDNA'ların sentezleri yapılır. Ortamda mRNA, 12-18 nükleotit uzunluğunda timin (oligo dT) primerlerinin ve enzimin bulunması durumunda, mRNA'ların 3' ucunda bulunan çok sayıda adenin bazlarının oluşturduğu poly A kuyruğuna önce oligo dT primerinin komplementary yapısından dolayı eşleşip oligo dT primerinin ucundaki 3-OH'den itibaren enzim kalıp DNA'nın 3-5' yönünde polimerizasyon yapmasıyla sonuçlanır. RNA zincirinin komplementarisi olarak sentezlenen bu ilk sarmala birinci cDNA sarmalı adı verilir
- Tersten Transkripaz PCR: (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction:). mRNA miktarlarını, varlık/yokluk, prob sentezinde, Karşılaştırmalı Ayırım (Differential Display), RNA hibridizasyonu (Northern blotting), Nokta hibridizasyonu (Dotblot Analysis) yöntemlerinde kullanılan bir PCR tekniğidir.

- **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.

- **Polinükleotit Kinaz (Polynucleotide Kinase)**
- **Bu enzim ATP'de bulunan fosfatı (gamma fosfat) DNA veya RNA'nın 5' ucunda transferini sağlar.**
- KULLANIMI
- Fosforilizasyon (linkers, adaptors, ligation)
- Etiketleme (32P)

- **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.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR DR. MEHMET KARACA

- **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**

- **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.

- **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.

BİLGİ PAYLAŞIMI AMAÇLIDIR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- **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.
- **Ribonuclease T1** (endonuclease)
- RNA 3' daki guanini fosfatları uzaklaştırarak oligonucleotides terminal guanosine 3' phosphates oluşturur
  DNA:RNA hibridindeki komplementeri olmayan RNA kısmını uzaklaştırır.

- **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.
- ClaI RE ATCGAT tanır bu bölge Dam methylase için substrat değildir ancak bu sekansın sonuna C veya başlangıca G gelirse Dam tanır ve ClaI kesemez

- **Ribonukleaz içermeyen bir çevre yaratmak**
- Ribonukleazların inaktivasyonu zordur. İzolasyon sırasında veya sonrasında RNaz aktivitesi gösteren herhangi bir etkenden kaçınmak çok önemlidir. İzolasyon materyalinin elde edilişinin güç olduğu durumlarda bu olay çok daha fazla önem arz etmektedir. Bahsedilen kısa notlar örneğinizde kontaminasyonu engellemeye yardım edecektir.
- RNaz kontaminasyonunun en yaygın kaynakları uygulayıcıların elleri, bakteriler ve havada serbest bulunan toz partiküllerindeki küflerdir. Bu tip kontaminasyonu önlemek için tüm süreç boyunca eldiven kullanıp steril uygun bir mikrobiyoojik yöntem kullanın.

- RNA ile temasta mümkün olduğunca steril plastik ekipman kullanın. Bu materyaller genelde RNaz içermezler ve dolayısı ile ilave bir RNaz inaktivasyonu gerekmez.
- Kullandıktan sonra atılmayan cam ve plastik malzemeler için kullanmadan önce RNaz içermediğinden emin olmak için RNaz inaktivasyonu gerçekleştirin. Cam ekipmanı 200°C'de gece boyu inkubasyona bırakın ve 0.1N NaOH, 1mM EDTA yı takiben RNaz içermeyen su ile kullanmadan önce plastik malzemeyi tam olarak su ile durulayın.
- Uygulayıcının hazırladığı solüsyonlar 0.05% dietil pirokarbonat (DEPC) ile oda ısında gece boyu muamele edilmeli ve sonrasında iz miktarda bile DEPC kalmaması için 30 dakika otoklavlanmalı. **Not:** Tris tamponları DEPC ile muamele edilemez.

BİLGİ PAYLAŞIM AMAÇLIDIR. DR. MEHMET KARACA

- Protein analizleri, fen bilimleri araştırmaları ve farmosötik endüstrisinde önemli bir araç olarak karşımıza çıkar.
- Protein Analizinin Amaçları:
- Hastalıkların Kesin Tanısının Konmasında
- - kalıtım tipinin belirlenmesi (X'e bağlı,
- dominant)
- - Gendeki mutasyonların araştırılmasında nereden başlanması gerektiğinin belirlenmesi
- Bazı durumlarda prognosis için yardımcı
  - ☐ Mutasyon tipinin belirlenmesi (ör: çerçeve kayması)
  - ☐ Gen terapi için hayvan modellerinin geliştirilmesi

- Mutasyonları içeren işlevsel olarak önemli bölgelerin yerleşimlerinin belirlenmesi
- Birbirleriyle etkileşim içinde olan proteinlerin tanımlanması
- En çok karşımıza çıkan çalışma alanları ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assays) ve Kütle Spektrometrisi (MS)'dir.

- ELISA: hedef bir molekülü spesifik olarak tanıyan ve bağlanan antikorlar, enzimler ile kombine kullanılarak bağlanma olayı sonrasında hedef molekülün pikogram düzeyine kadar saptanmasında kullanılır.
- Kullanım Alanları:
- - Potansiyel ilaç adaylarının optimizasyonu ve sınıflandırılması
- - Klinik öncesinde hayvansal çalışmalarda ve klinikte insan kaynaklı örneklerin araştırılması
- - Endüstride ürünlerin test edilmesi (kalite kontrol)

- MS (Kütle Spektrometrisi)

Alet içine enjekte edilen örnek, iyonize edilir bir vakum odasında elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek, dedektöre gönderilir, böylelikle duyarlı ve kesin molekül ağırlık ölçümleri yapılmış olur.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- Proteom terimi ilk kez Avustralyalı araştırmacı Marc Wilkins tarafından 1994'te kullanılmıştır.
- Proteom, genom veya doku, hücre tarafından ifade edilen proteinlerin tümünü kapsar; (PROTein genOME)
- Proteomik; ise dinamik bir terim olup farklı koşullarda hücre, doku veya vücut sıvılarındaki proteinlerin kantitatif analiz teknolojisi olarak tanımlanır. (PROTein genOMİCS).
- Hangi proteinler (polipeptidlerin) anlatımı olur?
- Her bir proteinin ne kadarı bulunmaktadır?
- Hangi hızla yapılır ve yıkılırlar?
- Hangi post-translasyonal modifikasyonlar bulunur?
- Nelerle etkileşime girerler?
- Biyokimyasal aktiviteleri nelerdir?
- Atomik düzeydeki yapıları nasıldır?

- Proteomik Araştırmalardaki Genel Strateji:

- Örneklerin Hazırlanması (Saflaştırma, çözünürleştirme, yüksek miktarda bulunan proteinlerin uzaklaştırılması)
- Protein ve Peptidlerin ayrılması (2D-elektroforez; 2D-sıvı kromatografisi)
- - Ayrılan proteinlerin ve peptitlerin değerlendirilmesi (Kütle Spektrometrik Teknikler: MALDI-TOF, ESI-TOF, LC-MS/MS ve peptit kütle parmak izi)

- Proteinlerin solübilizasyonu; kaotropik ajanların (üre, tiyoüre vb.), indirgeyici ajanların (dithiothreitol, tribütilfosfin vb.), deterjanların (CHAPS, CHAPSO, Triton X-100, vb.), tamponların (Tris) ve amfolitlerin (farklı pH aralıklarında gradient oluşturucu) varlığında gerçekleştirilir.

- Bunların seçimi 2D jel elektroforezinin ilk adımı olan İzoelektrik odaklama tekniğine göre yapılır.

- IEF ya tüp jellerde veya IPG stripleri (immobilize pH gradient stripleri; kullanıma hazır) ile gerçekleştirilir

Teknoloji Koruma Sistemi (Öldürücü Gen)

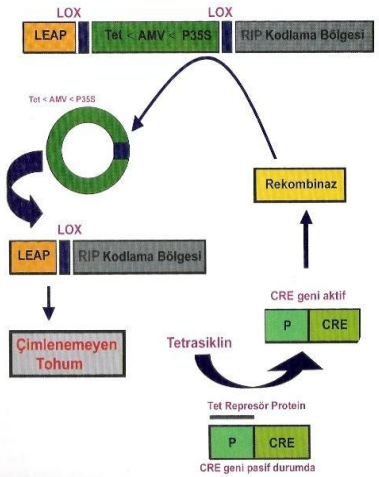
TKS adı verilen sistem günümüzde üç önemli unsurun bir araya getirilmesi ile oluşturulmuştur:

1. Zehirli bir proteinin sentezlenmesini kodlayan, tohum gelişmesinin son aşamasında etkili olup bitkinin diğer kısımlarına etki etmeyecek bir gen.
2. Yeterli miktara tohumun üretilebilmesi için içerisinde zehirli molekülü oluşturacak geni taşıyan ama birçok jenerasyon oluşumuna izin verecek bir metot.
3. Tohumların ekiminin ardından, aktarılan geni aktif hale geçirecek bir metot.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÇOĞALIR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

Teknoloji koruma sistemi için yapılan araştırmalarda kullanılan genetik yapı ve yöntemler şunlardır:

- Kimyasal bir etkileşme sonucu aktif hale geçebilen, bütün hücrelerde ve her zaman aktif bir promotor.
- Özel bir DNA dizisini, belirli bir bölgeden kesebilen bir enzim " Site specific recombinase, CRE "
- Embriyolojik gelişmenin sonlarında etkili olan bir promotor " Late embryogenesis-specific promotor, LEAP"



- TKS sisteminin genetik mekanizması:
- **LEAP**
- **LOX:** CRE için tanınabilecek özel DNA dizileri
- **RIP:** Ribozomların çalışmasını engelleyen bir proteini sentezleyen gen dizisi
- **CRE:** Rekombinaz enzimini sentezleyen gen dizisi

Hormon		Bitki Doku Kültüründe
Oksin (Auxins)	Indole-3-Acetic Acid Indole-3-Butyric Acid Indole-3-Butyric Acid, Potassium Salt α-Naphthaleneacetic Acid 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid p-Chlorophenoxyacetic acid Picloram Dicamba	Yüksek konsantrasyonda adventif kök Düşük konsantrasyonda adventif sürgün Somatik embriyo indükleme Hücre bölünmesi indükleme Kallus oluşumu ve büyüme Aksilary tomurcuk inhibasyonu Kök gelişimi inhibasyonu
Sitokinin (Cytokinins)	6-Benzylaminopurine 6-γ,γ-Dimethylallylaminopurine (2iP) Kinetin Thidiazuron (TDZ) N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'Phenylurea Zeatin Zeatin Riboside	Adventif sürgün oluşumu Kök oluşumu inhibasyonu Hücre bölünmesini teşvik eder Kallus oluşumu ve gelişimini düzenler Sürgün gelişimini durdurur Yaprak senesensini inhibe eder
Giberalin (Gibberellins)	Gibberellic Acid	Sürgün oluşumunu tetikler Tohumdan, tepe tomurcuğundan ve embryo dormansiden kurtulur Adventif kök oluşumunu engeller
Absisik Asit (Abscisic Acid)	Abscisic Acid	Yumru yada soğan oluşumu teşviki Embryo olgunlaşması teşviki Dormansiye geçişi teşvik
Poliaminler (Polyamines)	Putrescine Spermidine	Adventif kök oluşumu teşviki Somatik embryogenesis teşviki Kök gelişimi teşviki

DNA SEKANLAMA

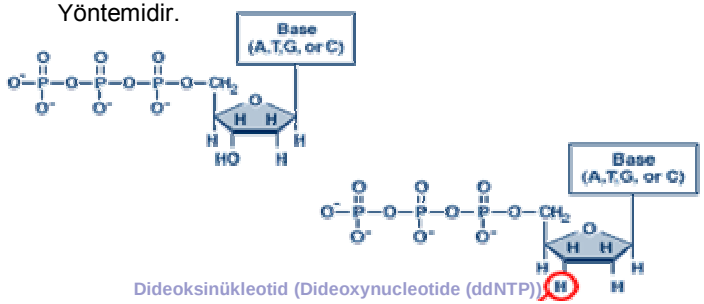
- **“Sekanslama”** nükleik asit sıralamasını bilmektedir.
- Nükleik asit sıralaması amino asit sıralamasını, amino asit sıralaması da proteinin yapısını ve fonksiyonunu belirler (Proteomiks)

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA

- Tarihsel anlamda 2 ana sekanslama yöntemi bulunmaktadır:
- Maxam & Gilbert, Kimyasal sekanslama
- Sanger, Dideoksinükleotit Yöntemi
- Günümüzde Sanger metodunun prensipleri kullanılarak sekanslama işlemleri gerçekleştirilmektedir.

DNA SEKANSLAMA

- DNA parçasının veya herhangi bir genomun tüm nükleik asit dizisinin yani A, T, C, ve G’lerinin belirlenmesidir.
- Günümüzde kullanılan yöntem DİDEOKSİ (SANGER) Yöntemidir.



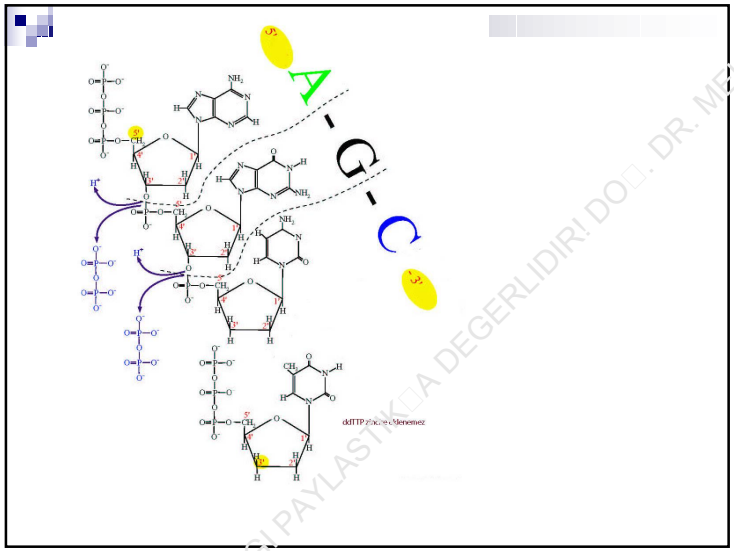
Dideoksinükleotid (Dideoxynucleotide (ddNTP))

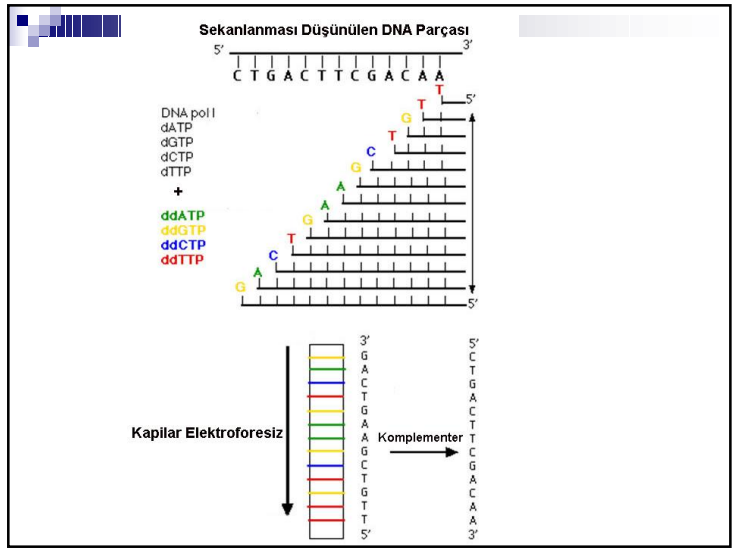
Sanger Yöntemi İçin:
1) Kalıp DNA kopyaları (DNA Sekansı Belirlenecek olan)

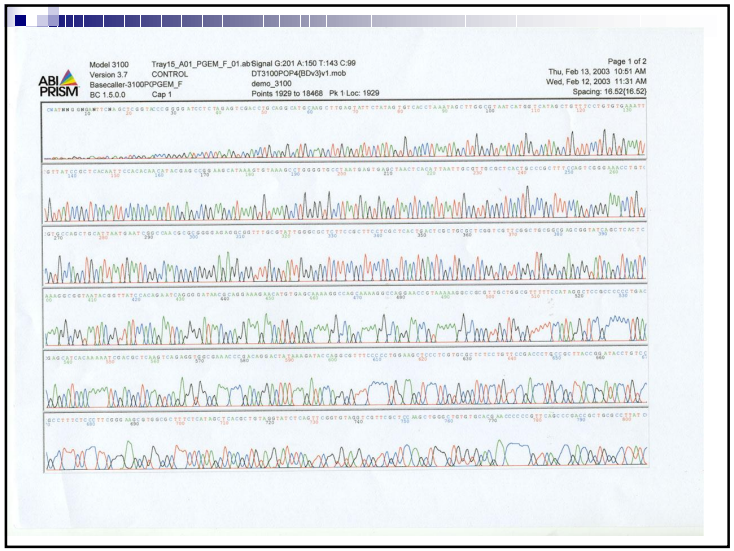
2) Uygun bir primer kopyaları

3) DNA polimeraz

4) Normal deoksinükleotitler (dATP, dTTP dGTP, dCTP)
5) Dideoksinükleotitler (İzotop veya Floresan eteiketli ddTTP, ddATP, ddCTP, ddGTP)







DNA-DNA HİBRİDİZASYONU (Southern blotting).

- Southern Blot Analizi Tekniği:
- Bir DNA havuzunda (örneğin samanlık saplar için bir populasyon) özel bir DNA parçasını (tek bir sap'ın) bulunmasında kullanılan hibritleme tabanlı güçlü ve önemli bir yöntemdir.
- Teknik birbirlerine komplimentar olan tek sarmallı DNA'larun uygun ortamlarda birbirleriyle baz çifti prensibine göre bağlanmaları prensibine dayanır.
- Bu teknikte prob yada problara ihtiyaç duyulur: Prob belirli bir yöntemle etiketlenmiş DNA parçasıdır (Southern Blot bir DNA analiz yöntemi olduğundan burada prob yine DNA parçasıdır. Diğer çalışmalarda örneğin Northern ve Western Blot yöntemlerinde prob DNA olmak zorunda değildir).

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DO□. DR. MEHMET KARACA

- Problar üzerinde çalışilan organizmanın DNA'sı, veya çok yakın bir organizmanın DNA parçasından yapılabildiği gibi sentetik olarakta yapılabilir. Problar genellikle 30-100 nükleotit uzunluğunda olup, bu DNA parçası floresan veya radyoaktif fosforla da etiketlenerek yapılır.
- Örneğin prob bir genin parçasıdır. Bu durumda bu gen parçası etiketlenir.
- Bu genin başka bir organizmada bulunup bulunmadığını tesbit etmek için Southern Blot Yöntemi nasıl uygulanır:

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA ÜRETİLİR DOÇ. DR. MEHMET KARACA

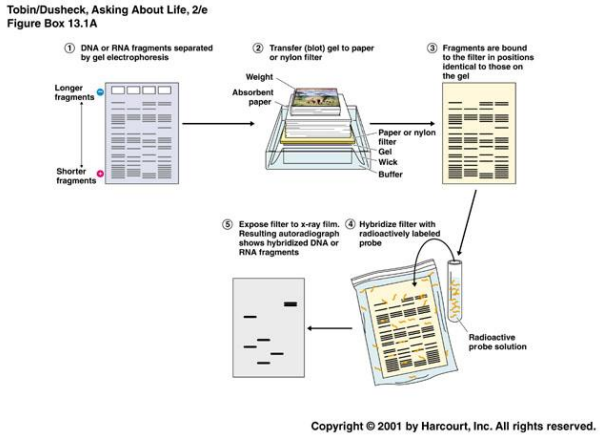
- 1-Üzerinde çalışılan organizmadan DNA ektraksyonu yapılır.
- 2- Bu genomik DNA küçük parçacıklara genellikle RE kullanılarak parçalanır. Bir veya bir grup RE kullanılabilir.
- 3-Kesilmiş parcacıklar AJE veya PJE yöntemiyle ayrıştırılır.
  - En iyi ayrışım jel üzerinde ayrılan DNA parçalarının büyüklüklerine göre ve herbir parcacıgın genomda belirli bölgeleri (genleri veya gen olmayan diğer kısımları) homojen olarak temsil eden ayrışımdır.
- 4- AJE veya PJE yötemiyle ayrıştırılan DNA jel büyüklüğü aynı olan naylan veya nitrozelüloz membrana ya elektroforez yöntemiyle yada dogal kapilary taşınma yötemiyle transfer edilir.
  - Transfer çözeltisine NaOH ilave edilerek jelde bulunan çift sarmallı DNA parçacıkları taşınma sırasında tek sarmallı duruma getirilerek transfer edilir.
  - Jel genellikle transfer çözeltisi içerisinde bulunan bir sunger üzerine yerleştirilir. Jel üzerindeki hava kabarcıkları uzaklaştırılır. Daha sonra jelle aynı büyüklükte kesilmiş olan naylon veya nitroselülaz membran yerleştirilir.

  - Varsa hava kabarcıkları uzaklaştırılır. Transfer tamponu süngerden geçerek jele ve jelde çsDNA'nın tsDNA kısmına membrana transfer eder.
  - Tranfer yani DNA'nın jelden membrana taşınma amaçları:
  - a)-Jel üzerinde bulunan DNA parçacıklarının daglım şemasını aynı tutarak uzun süre saklamak (Jeli uzun süre saklayamazsınız).
  - b- Sadece tek sarmallı DNA'yı taşımak (hibridizasyon için).
  - c)-Hibridizasyon sonucunda oluşan yapının analizi (otoradiografi).
- 5) Transfer tamamlandıktan sonra membran jelden soyularak uzaklaştırılır ve daha sonra ya UV altında yada 80^{o}C sıcaklıkta tutulalarak tsDNA'nın membrana tamamen yapışması sağlanır.

- 6) Bu aşamadan önce membran üzerinde bulunan boş alanlar kaplama (Blocking solution) solisyonuyla kapatılır. Membran agızı kapatılabilen plastik bir torbaya yerleştirilir ve membranın butün yüzeyini kaplayacak miktarda prob solisyonu eklenir. Solisyonda bulunan ve radyoaktif veya floresans olarak etiketlenen tsDNA membranda bulunan komplementari DNA'sıyla birleşir.
- 7)-Membran plastik torbadan çıkartıldıktan sonra yıkanarak tam anlamıyla baglanmayan -bağlanamayan prob moleküllerinin uzaklaşması sağlanır.
- 9 Otoradiografi işleminden sonra sadece prob moleküllerinin baglanmış oldugu DNA'lar belirlenir.

- Southern blot analizi DNA-DNA hibridizasyon tekniği olup, RNA-RNA hibridizasyon tekniği Northern blot, protein-protein hibridizasyonu ise Western blot analizi olarak isimlendirilir. Eğer DNA-RNA hibridizasyonuysa bu bazın Southern-Northern, DNA-Protein ve RNA-protein analizleri ise Southern-Western, Northern-Western olarak ta isimlendirilebilir.

BİLGİ PAYLAŞTIKÇA DEĞERLİDİR! DOÇ. DR. MEHMET KARACA



- **Heterodupleks Analizi (Heteroduplex analysis, HA)**
- Homodupleks DNA her iki sarmalın tam olarak birbirleriyle baz çifti oluşturmasıyla oluşurlar.
- Heterodupleks: İki sarmallı DNA'nın sarmalları arasında tam olarak baz çifti oluşturamayan DNA'ya heterodupleks DNA adı verilir.
- Çift sarmallı herhangi bir DNA ısıtılırsa (Denatürasyon) çifte sarmallar ayrışır ve renaturasyon veya annealing de tek sarmallar birleşerek çift sarmalı oluşturur (renatürasyon) yani homodupleks oluşur.
- Ancak sarmalların birinde mutasyon (ekleme, kaybolma, degişim=insertion, deletion, substitution) bu durumda heterodupleks oluşur.
- Eğer homodupleks DNA ve heterodupleks DNA (aynı büyüklükte) PAJ sistemiyle ayrıştırılırsa, heterodupleks DNA homoduplekten daha yavaş ilerler.

- Bu teknikle 200 bp altındaki DNA parcacıklarındaki ekleme, kaybolma ve değişim belirlenebilmektedir.

- Metodoloji:
- PCR'la çogaltılan ve biri mutant diğeri normal bireyden elde edilen iki amplikon önce tsDNA haline çevrilir ve bu amplikonlardaki tsDNA karıştırılırsa ve elektroforesiz tekniğiyle ayrıştırılırsa (non-denatüasyon jeli) mutasyon belirlenebilir.
- Eger elinizde 1 kb veya daha uzun DNA varsa bu yötemle elektron mikroskobuylada belirlenebilmektedir.