

SORULAR

1- Restriksiyon enzimleri moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. Aşağıda, bu enzimlerden iki tanesinin(BamHI ve BclI) tanıma bölgesi verilmiştir.

a) BamHI, ilk G bazından sonra keser. BamHI'in yaptığı kesim sonucu 5' ya da 3' yapışkan uç oluşur mu? Eğer oluşursa bu yapışkan ucun dizisi nedir?

5' GGATCC 3'
3' CCTAGG 5'

b) BclI, ilk T bazından sonra keser. BclI'nin yaptığı kesim sonucu 5' ya da 3' yapışkan uç oluşur mu? Eğer oluşursa bu yapışkan ucun dizisi nedir?

5'TGATCA 3'
3'ACTAGT 5'

c) Aşağıdaki DNA dizisine göre;

5' ATTGAGGATCCGTAATGTGTCCTGATCACGCTCCACG 3'
3' TAACTCCTAGGCATTACACAGGACTAGTGCGAGGTGC 5'

i) Eğer bu DNA'yı BamHI enzimi ile kesecek olursanız, kaç tane DNA parçası elde edersiniz? Elde ettiğiniz DNA parçalarının iki ipliğinin de dizisini yazınız.

ii) Eğer bu DNA'yı BclI enzimi ile kesecek olursanız, kaç tane DNA parçası elde edersiniz? Elde ettiğiniz DNA parçalarının iki ipliğinin de dizisini yazınız.

d) C şıkkının i seçeneğinde elde ettiğiniz küçük DNA parçası ile, c şıkkının ii seçeneğinde elde ettiğiniz küçük DNA parçasını ligasyon ile birleştiriniz ve elde ettiğiniz rekombinant DNA parçasını yazınız.

e) Elde ettiğiniz bu rekombinant DNA parçasını BamHI ya da BclI ile kesebilir misiniz, açıklayınız.

2- Pirinci temel besin maddesi olarak tüketen milyonlarca çocuk A vitamini eksikliği sebebiyle kör olmaktadır. İnsanlar A vitamini sentezleyememektedirler, bu sebeple A vitaminini ya da beta-karoten gibi A vitamini öncüsünü besinlerden almak zorundadır. Beta-karoten yolağına sahip bir maya suşu oluşturmak istiyorsunuz, böylece beta-karoten ve A vitamini sentezinin biyokimyasını kolayca inceleyebileceksiniz. Elinizde beta-karoten sentezinden görevli 7 enzimin 5 tanesini bulunduran bir maya suşu var. Eksik olan A ve B genlerini, A genini bakteriden B genini ise nergisten alarak, bu maya suşuna klonlamanız gerekiyor.

A genini mayaya klonlamak için;

1. Bakteriyal genomik DNA'yı kesmeyi,
2. Uygun bir ekspresyon vektörüne (vektör 1) klonlayıp bir genomik DNA kütüphanesi oluşturmayı,
3. Bu kütüphaneyi maya hücrelerine aktarmayı
4. Vektörü alan maya hücrelerini seçmeyi
5. Seçili kolonilerden A proteinini üretenleri antikor kullanarak seçmeyi planladınız.

- a) Bu deney için seçilen klonlama vektörü, lösin amino asidini sentezlemek için gerekli olan bir enzimi kodlayan ve seçilebilir bir işaretleyici olarak kullanılabilen leu1+ genine sahiptir. Yukarıdaki 4. adımı başarıyla tamamlamak için, maya suşunuz transformasyondan önce hangi genotip ve fenotipe sahip olmalıdır, açıklayınız.
- b) leu1 + genine ek olarak , transformasyonda başarılı olmak için vektörde olması gereken diğer özellikler nelerdir? Listelediğiniz bu özelliklerin hangi organizmadan geleceğini belirtin.

Aynı zamanda aşağıda B geninin dizisi verilmiştir. Beta-karoten sentezleyebilen maya suşu üretimini tamamlamak için, aşağıda gösterilen diziye dayanarak B genini Polimeraz Zincir Reaksiyonunu (PZR) kullanarak amplifiye etmeye karar verdiniz.

5' TCCGGCGGAATTCCAAGGCCT **B geni** CGTCGACTCCGGC 3'
 3' AGGCCGCCTTAAGGTTCCGGA GCAGCTGAGGCCG 5'

- c) Aşağıdakilerden B genini amplifiye etmek için kullanabileceğiniz primer setlerini seçiniz.

Set 1: 5' AGGCCG 3' 5' GCCGGA 3'

Set 2: 5' TCCGGC 3' 5' ACCGGG 3'

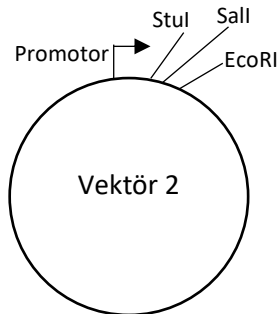
Set 3: 5' TCCGGC 3' 5' GCCGGA 3'

Başarılı bir şekilde B genini amplifiye ettiniz, bu PCR ürününü vektör 2'ye klonlamak istiyorsunuz. Vektörün klonlama bölgeleri aşağıda verilmiştir.

StuI: 5'-AGG|CCT-3'
 3'-TCC|GGA-5'

SaII cuts: 5'-G|TCGAC-3'
 3'-CAGCT|G-5'

EcoRI: 5'-G|AATTC-3'
 3'-CTTAA|G-5'



Start kodonu
 5' TCCGGCGGAATTCCAAGGCCT **B geni** CGTCGACTCCGGC 3'
 3' AGGCCGCCTTAAGGTTCCGGA GCAGCTGAGGCCG 5'

- d) Amplifiye olmuş B genini vektör 2'ye klonlarken kullanabileceğiniz 2 yol bulunmaktadır. Vektörü ve B genini kesebilecek restriksiyon enzimi/enzimlerini (RE) yazınız.

	Plazmiti kesecek RE	B genini kesecek RE
1. Opsiyon		
2. Opsiyon		

- e) Bu seçeneklerden hangisini mayada B ifade edebilecek bir rekombinant vektör oluşturmak için kullanırsınız, nedenini açıklayınız.

- 3- Yönlendirilmiş klonlamanın mantığını ve nasıl yapılacağını açıklayınız.