

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY

Tülay KOÇOĐLU*, Tülay YALÇINKAYA *

zet: Rekombinant DNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan ve arzu edilen herhangi bir gen ya da ürününün çoğaltılmasını mümkün kılan bir yöntemdir. oğaltılması istenen gen önce orijinal kromozomdan restriksiyon endonükleaz enzimi yardımıyla kesilerek alınır ve plazmid ya da faj gibi bir vektöre integre edilir. Sonra bu vektör transformasyon yoluyla bir bakteri ya da maya içine sokulur ve daha sonra bu mikroorganizmaların kültürü yapılarak istenen gen veya protein arzu edilen miktarlarda elde edilir.

Summary: Recombinant DNA technology is a method depending on realization of genetic recombination events artificially. It became possible to obtain any ordered gene or its product with this method. Before production step, ordered gene is derived from original chromosome by endonuclease enzyme and integrated to a vector as a plasmid or a phage. After that this vector is transformed into a bacterium or a yeast. Then ordered gene or protein is produced in desired amounts by culturing these microorganisms.

Terminoloji

rDNA: Recombinant DNA

cDNA: Complementer DNA

Restriksiyon endonükleaz enzimi: DNA'yı özgül bölgelerden kesen enzim. Bunlar içinde en çok kullanılanlardan biri E. coli'den elde edilen EcoRI'dir.

Kimerik plazmid: Yapısına yabancı plazmid sokulmuş plazmid, hibrid plazmid. Chimera, mitolojide insan başlı, aslan, geyik ya da yılan vücutlu yaratıklara verilen isimdir.

Vektör: rDNA'nın bir bakteri ya da maya hücresine (E. coli, B. subtilis, S. cerevisia gibi) sokulmasında kullanılan plazmid, faj ve başka viruslar. En çok kullanılan vektör pBR322 plazmididir.

* Anadolu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dah.

Gen klonlanması: rDNA teknolojisiyle elde edilen bir genin bir konak hücrede çoğaltılması.

Gen kitaplığı veya bankası: Bir organizmin tüm genomu birbirinden bağımsız DNA parçaları halinde konak hücrelerde klonlanabilir, işte bu konak hücre klonlarının tümüne gen kitaplığı adı verilir. Eğer insan kromozomunun tüm genleri bir kitaplıkta toplanmak istense, bir genin uzunluğu 20 kb kabul edildiğinde yaklaşık 700.000 klonluk bir kitaplık oluşacağı hesaplanmıştır (1-3).

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİNİN GELİŞİMİNDE BAZI KİLOMETRE TAŞLARI

- 1967 DNA zincirlerini birbirine bağlayan DNA ligaz enzimi izole edildi.
- 1970 DNA'yı özgül bölgelerden kesen ilk restriksiyon endonükleaz enzimi izole edildi.
- 1972 DNA ligaz enzimi, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilen DNA parçalarını birleştirmede kullanıldı. İlk rDNA molekülü Stanford Üniversitesinde üretildi.
- 1973 Yabancı DNA parçaları plazmid DNA'sı içine sokularak "kimerik plazmid" elde edildi. Bunun E. coli içine konulduğunda işlevini koruduğu gösterildi. Herhangi bir genin bakterilerde klonlanabileceği anlaşıldı.
- Rekombinant DNA çalışmalarının potansiyel tehlike taşıyan yeni mikroorganizmaların ortaya çıkmasına yol açabileceği konusunda kamuoyunda ilk endişeler belirmeye başladı.
- 1974 Belli konulardaki rDNA denemeleri için dünya çapında bir moratoryum (resmi geciktirme) ilanı için çağrı yapıldı.
- 1975 İngiltere'de hükümet özel laboratuvarlarda rDNA çalışmalarında önlemler konusunda bir rapor hazırladı.
- Asilomar'da (California) bir uluslararası toplantı yapılarak rDNA denemelerini düzenleyen bir tüzüğün kabul edilmesi önerildi. Laboratuvar dışında üreyemeyecek güvenli bakteri ve plazmidlerin geliştirilmesi çağrısı yapıldı.
- 1976 A.B.D'de Ulusal Sağlık Enstitüsü, rDNA denemelerini birçok kategoride sınırlayan ilk tüzüğü yayımladı. Kamuoyunda bu tüzüğün etkili olamayabileceği konusunda endişeler ortaya çıktı. New York Times Magazine'de yayımlanan bir makalede rDNA araştırmalarına Nobel verilmesinin yasaklanması önerisi ortaya atıldı. İngiltere'de Genetik Çalışmalar Danışma Grubu kuruldu.

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

- 1977 İlk genetik mühendisliği şirketi "Genentech" San Fransisco'da kuruldu. Kuruluş amacı, tıbbi önemi olan ilaçların rDNA teknikleri kullanılarak üretimiydi.
- Memeli DNA moleküllerini taşıyan ilk rDNA üretildi.
 - Uzun DNA bölümlerinin taban dizilerinin sıralanışını hızlı bir şekilde çözümlenecek sistemler geliştirildi.
- 1978 Hamilton O. Smith, Daniel Nathans ve Werner Arber, restriksiyon enzimlerinin keşfi ve kullanımını konusundaki başarılarından dolayı Nobel ile ödüllendirildiler.
- Somatostatin rDNA teknolojisi ile üretilen ilk insan hormonu oldu.
- 1979 Ulusal Sağlık Enstitüsü tüzüğündeki genel bir yumuşama rDNA çalışmalarında viral DNA'ların da kullanımına yol açtı.
- Malign hücrelerden elde edilen DNA, bir fare hücre kültürü süşunu transforme etmek için kullanıldı; böylece malign hücrelerdeki onkogenleri inceleme olanağı doğuyordu.
- 1980 Diamond V. Chakrabarty - A.B.D. Anayasa Mahkemesi, mevcut yasalar çerçevesinde rDNA teknolojisinde kullanılacak mikroorganizmalara patent verilebileceğini kararlaştırdı. Cohen/Boyer, rDNA yapımında kullanacakları teknoloji için patent aldılar.
- rDNA kullanarak insülin üretimini amaçlayan bir endüstri kurma çalışmaları başladı.
 - İlk rDNA molekülünün üretilmesi ve DNA taban dizilerinin incelenmesinde güçlü tekniklerin geliştirilmesi nedeniyle kimya dalında çift Nobel verildi (Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick Sanger).
- 1981 İlk otomatik gen sentezleyicisi pazarlandı.
- Yıl sonunda 80'den fazla yeni biyoteknoloji firması kuruldu (Cetus, Genex, Ely Lilly, Biogen ve diğerleri).
 - İlk rDNA şirketi olan Genentech piyasaya hisse senetleri sürdü. Senetler 20 dakika içinde 35 dolardan 89 dolara fırlayan değer artışına uğradı ki bu bir Wall Street rekoru idi.
 - rDNA moleküllerinin klonlanmasında E. coli ve mayaların laboratuvar süşlarının kullanımı Ulusal Sağlık Enstitüsünün tüzüğünden muaf kılındı.
 - Orak hücreli anemi, DNA'nın restriksiyon enzimleriyle analizleri yapılmak suretiyle doğum öncesi tanı konulabilen ilk genetik hastalık oldu.

- 1982 Ulusal Sağlık Enstitüsünün tüzüğünde daha ileri bir yumuşama oldu. Bu mutlak bir yetersizlikten çok gönüllü bir yumuşama idi.
- Normalin iki katı ağırlıkta süper fareler üretildi. Dölleniş fare ovumlarına sıçanların klonlanmış büyüme hormonu geni, indüklenbilir bir fare genine bağlanarak enjekte edildi. Sonra bu ovumlar başka farelere (kiralık anne) reimplante edildi.
 - rDNA ile üretilmiş olan insan insülininin kullanımı A.B.D. ve İngiltere’de kabul edilerek “Humulin” adıyla pazarlandı.
 - İlk rDNA hayvan aşısının (collibacillosis) Avrupa’da kullanımı kabul edildi.
 - Hücrelerine yabancı gen katılmış tütün bitkisinde yabancı genin, Mendel yasalarına uygun şekilde polen ve yumurtalara geçiş gösterdiği bulundu.
 - İnsan mesane kanser hücrelerinden bir kanser geni izole edildi ve E. coli’de klonlandı. Bu kanser geninin taban dizisinin orijinal karşılığında bir aminoasitte değişikliğe yol açacak kadar farklılık gösterdiği bulundu.
- 1985 rDNA ile üretilmiş insan growth hormonu lisans aldı.
- 1986 rDNA ile üretilmiş alfa interferon ve Hepatit B aşısı lisans aldı (1-4).

Rekombinasyon (yenibileşim), farklı iki atasal bireyden gelen DNA segmentlerinden bir yenibileşen (rekombinant) kromozom oluşması işlemi olarak tanımlanabilir. Bu işlem sonunda her iki atasal kromozom üzerinde yerleşmiş bulunan genlerin yeni bir yapı üzerinde bir araya gelmeleri ve yeni bazı özelliklere sahip olan bireylerin oluşması sözkonusudur. Bu olay doğal olarak ökaryot ve prokaryotlarda zaman zaman olabilmektedir (3).

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan ve bugün dev adımlarla ilerlemekte olan bir gen mühendisliği konusudur. Bu teknoloji ile çeşitli amaçlar için adeta ismarlama genler ve proteinlerin üretimi mümkün olmaktadır. Bu iş için istenen gen orijinal kromozomundan restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilip alınmakta ve sonra bir vektöre takılıp konak hücre içine sokularak çoğaltılmaktadır. Yerine göre ya doğrudan çoğaltılmış olan bu genler kullanılmakta ya da bunların ekspresyonu ile elde edilen proteinler kullanılmaktadır. Bu teknolojiye izlenen deney basamakları şu şekildedir (1, 2, 5):

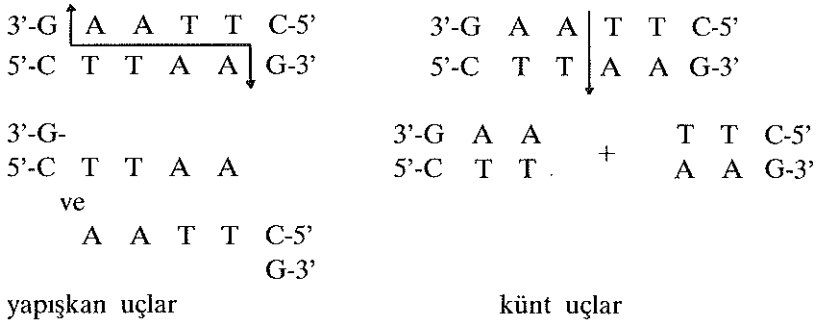
1. Çoğaltılması İstenen Genin Elde Edilmesi

Bu amaçla birkaç yöntem kullanılabilir.

A) İstenen genin yer aldığı kromozom uygun bir restriksiyon endonükleaz enzimiyle parçalanır ve ileride anlatılacağı biçimde ilgilenilen gen seçilir. Çeşitli mikroorganizmalardan çok sayı ve özgülükte endonükleaz enzimi elde edilmiştir (300'den fazla). Endonükleaz enzimleri DNA'yı, 6-8 taban çiftinden oluşan ve "palindrom" adı verilen özgül bölgelerden keser. Palindrom, DNA ipliğinin 3' ucundan itibaren okunduğunda aynı nükleotidlerin yer aldığı DNA dizileridir. Aşağıda EcoRI'in palindromu ve kesi yerleri gösterilmektedir.



Endonükleaz enzimleri DNA üzerinde iki türlü kesi yaparlar. Birincisi rDNA teknolojisinde en elverişli olanı, yapışkan uçlar oluşturacak şekilde olan kesilerdir. Bu uçlar DNA ligaz enzimiyle kolayca birbirine eklenir. İkincisi palindromların tam ortasından yapılan ve kör ya da künt uçlar oluşturan kesilerdir. Bu şekilde elde edilen DNA parçalarının birbirine eklenmesi daha doğrusu vektöre eklenmesi için önce bazı işlemlerle yapışkan uçların oluşturulması gerekir. Aşağıda yapışkan ve künt uçlar gösterilmiştir.



Aynı restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmiş olan farklı kökenli DNA parçaları DNA ligaz ile birbirine kolayca eklenir.

Endonükleaz enzimleri, kendi konak hücre palindromlarını kesmezler; korunma bu bölgelerin metilasyonu ile sağlanır.

B) İstenen genler orijinal kromozomdan mekanik yolla örneğin sonikasyonla elde edilebilir.

C) Sentetik olarak elde edilebilir. Bir genin kodlamış olduğu proteinin aminoasit dizisi biliniyorsa o proteinin geni bugün geliştirilmiş olan otomatik gen sentezleyicilerde sentezlenebilir. Ancak dejenere kodonlar nedeniyle olabilecek değişiklikler dikkate alınmalıdır.

D) İstenen gene ait mRNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA (komplementer DNA) elde edilebilir. Çoğaltılması istenen gene ait mRNA'nın bol bulunduğu hücrelerden mRNA elde edilip bu iş gerçekleştirilir. Örneğin, hemoglobin geni için eritrositlerden elde edilen mRNA kullanılır. Çünkü bu hücredeki mRNA'nın % 90'ı hemoglobine aittir.

2. Elde Edilen Genin Bir Vektörle Birleştirilmesi

Bu iş için daha önce de belirttiğimiz gibi plazmid ya da viruslar kullanılır. Vektör olacak plazmidin bakteriden soyutlanabilmesi için hücreler sodyum dodesil sülfat ya da bir başka deterjanla muamele edilir ve patlatılır. Bazı bakterilerde plazmid replikasyonu sayısı/kromozom replikasyonu oranı 1'e eşittir. Bazılarında ise bu oran çok yüksektir. Bakteri hücreleri kloramfenikol ile muamele edilirse kromozom replikasyonu selektif olarak durur ve çok sayıda plazmid elde edilebilir. Vektör olarak kullanılacak plazmidin onun daha sonra tanınmasını sağlayacak bir işaretleyiciye (marker) sahip olması istenir. Bunun için R plazmidleri kullanılır. Bugün en çok kullanılan plazmid olan pBR322, E. coli'ye ait olan bir R plazmididir. Bu plazmid ampisilin ve tetrasikline direnç genlerini taşır.

Plazmide eklenecek olan gen ve plazmid aynı restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilip DNA ligaz ile birbirine eklenir (Şekil 1).

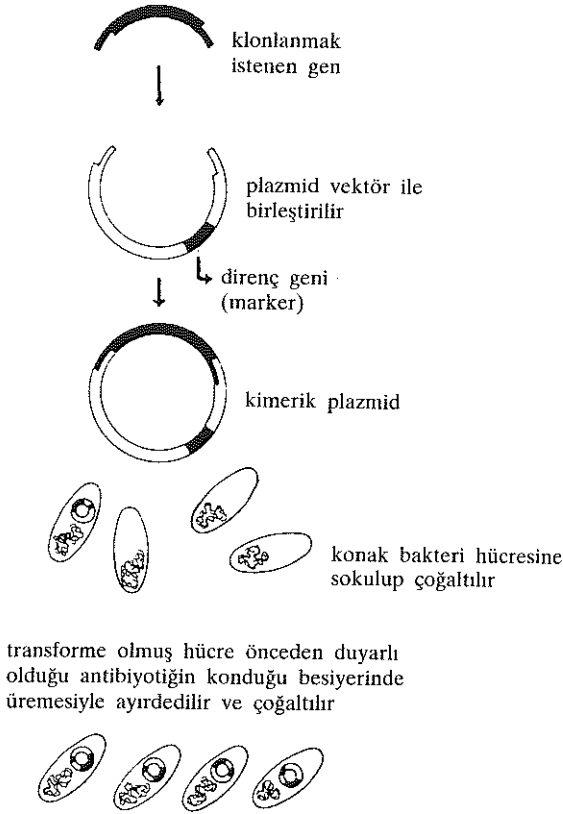
Vektör olarak kullanılan viruslara lambda fajını örnek olarak verebiliriz. Burada klonlanacak yabancı DNA'ya yer açmak için önce delesyon yapılır.

3. Vektörün Konak Hücreye Sokulması ve Klonlanması

Kimerik plazmidin konak hücreye sokulması transformasyon yoluyla olmaktadır. Örneğin, konak hücre olarak E. coli kullanılacaksa bakteriler önce CaCl_2 ile muamele edilip permeabl hale getirilir, sonra plazmidle karıştırılır. Hücreler 37°C 'de 5' tutularak vektör plazmidini inkorpore etmeye bırakılır. Bundan sonra buyyona aktarılan hücreler kısa bir süre içinde yeni kazanmış oldukları kimerik plazmidin kodladığı ürünleri ekspresyona hazır hale gelirler. Hibrid plazmidleri taşıyan bakteriler özel tarama yöntemleriyle seçilirler (Şekil 1).

Vektör olarak eğer faj kullanılıyorsa bunların hücreye sokulmaları transdüksiyon ve transformasyon olaylarının bir karışımı olan transfeksiyon yoluyla olur.

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ



Şekil 1

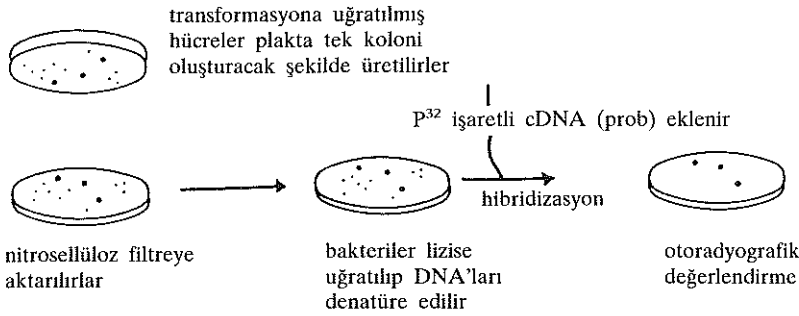
Klonlanmak istenen genin plazmid vektöre integre edilmesi ve konak hücrede çoğaltılması (1 no'lu kaynaktan alınmıştır).

4. Klonlanmış Olan Genin İstenen Gen Olup Olmadığının Araştırılması

Bu teknolojidaki son aşama istenen genin ya da diğer deyişle klonlanmış olan genin gerçekten o gen olup olmadığının belirlenmesidir. Bunun için birçok tarama yöntemi geliştirilmiştir. Bunlar:

A) Hibridizasyon: Transforme edilmiş bakteriler petride tek koloni oluşturacak şekilde üretilir. Sonra koloniler bir nitrosellüloz filtreye transfer edilir, lizise uğrattılır, açığa çıkan çift iplikli DNA ısı ile (80-100°C) denatüre edilmek suretiyle tek iplikli hale getirilir. Daha sonra bunun üzerine elde etmeyi ümit ettiğimiz gene komplementer, radyoizotop (genellikle P³²) ile işaretli, pürifiye ve tek iplik haline getirilmiş olan probe DNA (kalıp DNA) eklenir. Bu DNA'lar karışımı renatürasyon koşulları sağlanarak hibridizasyona bırakılır. Bundan sonra filtreler otoradyografik yöntemle incelenerek

hibridizasyon olup olmadığı belirlenir. Eğer hibridizasyon olmuşsa yani istenilen genin klonlanması başarılıysa transformant bakterilerden oluşan kolonilerin filtreye değdirildikleri yerlerde siyah lekeler oluşur. Diğer bir deyişle otoradyografi sonunda filtre üzerinde siyah lekelerin olduğu kısımlara karşılık gelen kolonilerdeki bakterilerde transformasyon başarılı olmuş ve bunlar bünyelerine vektör plazmid almışlardır. Artık bundan sonra iş bu transforme olmuş bakterilerin istenildiği kadar çoğaltılmasına gelmiştir. Konak hücrede çoğaltılan vektör plazmidlerden daha sonra klonlanmış olan gen tekrar aynı restriksiyon endonükleaz enzimleriyle koparılır ve kullanıma hazır hale getirilir. Ya da genin ürünü kültür ve pürifikasyon işlemleriyle elde edilir (Şekil 2).



Şekil 2

Klonlanmış olan genin istenen gen olup olmadığının araştırılması (1 no'lu kaynaktan alınmıştır).

B) Antibiyotik direnç genlerinin araştırılması: Bu yolla seçim yapılacaksa kullanılacak konak hücrenin, vektör plazmidin taşıdığı direnç geninden yoksun olması gerekir. Eğer transformasyon gerçekleşmişse bakteriler daha önceden duyarlı oldukları antibiyotiği içeren besiyerlerine ekildiklerinde burada üreyebileceklerdir. Dirençli koloniler aranan kolonilerdir.

C) İmmünolojik yöntemler: İstenen protein ürünlerin sentezlendiği dolayısıyla istenen genle transforme olmuş hücrelerin seçiminde kullanılır. Burada istenen genin kodladığı protein ürüne karşı hazırlanmış ve radyoizotopla işaretlenmiş antikorlar kullanılır. Yukarıdaki örneklerde olduğu şekilde transforme olmuş kolonilerin olduğu yerlerde otoradyografik yöntemle siyah bölgeler görülür.

D) Restriksiyon endonükleaz analizleri: Burada klonlanmış olan DNA molekülleri restriksiyon endonükleazları ile kesilip elektroforetik olarak bir agarozda ayrıştırılır. Sonra istenen DNA molekülü ile büyüklük bakımından karşılaştırılır.

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİNİN UYGULAMA ALANLARI

1. Endüstriyel Amaçlı Kullanımı

Diğer yöntemlerle elde edilmesi zor ya da pahalı olan çeşitli tıbbi ürünlerin sentezi amacıyla bu teknoloji kullanılmaktadır. Somatostatin (insan büyüme hormonu inhibitörü), büyüme hormonu, insülin, faktör VIII ve IX, interferon, hepatit B aşısı gibi ürünler bu teknolojinin yarattığı harikalardır. E. coli'nin bir litrelik besiyerindeki kültüründen miligram düzeyinde insülin elde edilebilmektedir (5).

Ökaryot genlerinin klonlanmasında bazı güçlükler olmaktadır. Bunlardan biri de prokaryot kromozomlarında bulunmayan, genler içine yerleşmiş, protein sentezine gitmeyen anlamsız taban dizileridir. Bunlara "intron" adı verilir. mRNA, DNA'nın kopyasını çıkarırken bu bölgeleri de transkripte eder. Sonra, daha çekirdek içindeyken RNA processing denen bir işlemle bu kısımlar RNA'nın bünyesinden çıkarılır. Prokaryotlarda böyle bir mekanizma bulunmadığı için intron bulunduran genlerin klonlanması sonucu istenen ürünlerin elde edilmesinde güçlükler ortaya çıkmaktadır. Her ökaryot geninde intron bulunmamakla birlikte birçoğunda vardır ve değişen sayılardadır. Örneğin, insan alfa ve beta interferonunda hiç intron bulunmazken gama interferonda üç intron bulunmaktadır. Buradaki güçlükler, süreç geçirmiş yani intronlarından arınmış ökaryot mRNA'sını sitoplazmadan elde edip revers transkriptaz enzimiyle cDNA elde edilerek aşılmıştır (1, 2).

2. Genetik Hastalıkların Tanısında Kullanımı

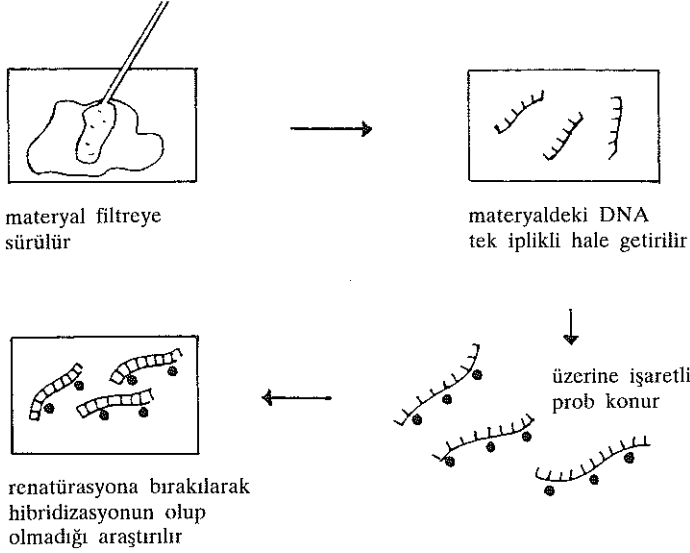
Hibridizasyon, restriksiyon analizi ve bunların bir karışımı olan Southern blot gibi teknikler kullanılmak suretiyle çeşitli genetik hastalıklar tanımlanabilmektedir (talasemi, orak hücreli anemi, fenilketonüri vd.). Genetik hastalıklarda prenatal tanı ya da taşıyıcılığın belirlenmesi çok önemlidir ve bu teknoloji bu konularda büyük kolaylıklar getirmiştir. Ayrıca gen tedavisi (eksik olan genin yerine konması) ile ilgili umutları artırmıştır (1, 5).

3. Mikrobiyolojide Tanı Yöntemi Olarak Kullanımı

A) Hibridizasyon Tekniği: Bu teknikle hastalardan alınan klinik örneklerde herhangi bir mikroorganizmanın varlığı araştırılabildiği gibi ayrıca bu yöntemle izole edilmiş bir mikroorganizmanın ona özgü bir gen lokusuna sahip olup olmadığı test edilerek tanımlanması da mümkündür. Bundan başka çeşitli bakteri cinslerinin birbirleriyle akrabalıkları da araştırılabilir.

Bu tekniği uygulayabilmek için önce araştırılacak mikroorganizmalardan prob DNA'lar elde edilir. Problar radyoizotop ya da biotin-avidin ile işaretlenir.

Hastadan alınan örnek bir solid matrikse, örneğin bir filtreye sürülür. Örnekte varolabileceği düşünülen mikroorganizmin DNA'sı, denatürasyon uygulanarak tek iplikli hale getirilir. Sonra aradığımız mikroorganizmanın işaretli ve tek iplikli probu filtre üzerine eklenir, renatürasyona (hibridizasyon) terk edilir. Eğer örnekte kuşku edilen mikroorganizma varsa ve prob, örneğin radyoizotop ile işaretlenmişse, deney sonunda yapılacak otoradyografide hibridizasyonun olduğu yerlerde filtre üzerinde siyah lekeler görülecektir (Şekil 3).



Şekil 3

Klinik materyallerde DNA hibridizasyonu ile etken mikroorganizmanın aranması (6 no'lu kaynaktan alınmıştır).

Eğer biotin-avidin işaretleme sistemi kullanılıyorsa burada testin okunmasında bazı seçenekler karşımıza çıkar. Biotin DNA ipliğine bağlandığında onun özelliklerini bozmadır. Avidin de biotine kuvvetle bağlanan bir maddedir. Avidin ayrıca radyoizotoplara, enzimlere (horse-radish peroksidaz, alkalin fosfataz gibi), florosein ve ferritin gibi elektron yoğun işaretleyicilere bağlanabilir. Biotin-avidin bağlanmış olan prob DNA yukarıdaki işaretleyicilerden biri ile işaretlenip deneye sokulur. Sonuçta hangi işaretleyicisi kullanılmışsa ona uygun bir şekilde otoradyografik, kolorimetrik, floreskopik vb. olarak değerlendirilir. Son zamanlarda bu yöntemi esas alan birkaç ticari sistem piyasaya sürülmüştür. Enzo Pathogem, Enzo Biochem gibi. Bu

sistemler HSV 1 ve 2, CMV, EBV, Hepatit B, adenovirus ve klamidy a türlerinin yol açtığı enfeksiyonların tanılarında kullanılmaktadır (6).

Hibridizasyon tekniği ayrıca klinik örneklerde rotavirus, papillomavirus, mikoplazma ve mikobakterilerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (7, 8).

Ayrıca bu teknik, tanı güçlüğü olmamakla birlikte geniş kitle taramalarında aynı anda birçok örneğ in deneye sokulabilmesi bakımından uygulama alanı bulmuştur. *P. falciparum* ve *N. gonorrhoeae* bu tür epidemiyolojik çalışmalara konu olmuştur. Üretral eksudalarda prob kullanarak gonokokkal kriptik plazmid araştırılmış ve bulguların standart kültür yöntemiyle yüksek oranda paralellik gösterdiği bildirilmiştir. Bundan başka ETEC, toksin geni probu kullanılarak dışkı örneklerinde direkt olarak araştırıldığı gibi izole edilen suşlarının identifikasyonunda da bu teknikten yararlanılmıştır (7).

B) DNA Profillerinin Çıkarılması: Son yıllara kadar toplumsal ve nozokomiyal epidemilerde sorumlu bakterinin identifikasyonunda, biyokimyasal incelemeler, serotiplendirme, faj tiplendirmesi, antibiyotik duyarlılık profillerinin çıkarılması gibi yöntemlere başvuruluyordu. rDNA teknikleri, salgınlarda izole edilen suşların benzerliklerinin araştırılması ve kaynak taranmasında restriksiyon analizi adı verilen yeni bir seçenek sunmuştur. Bu yöntemde, izole edilen bakteri suşlarının plazmid ya da kromozomal DNA'ları, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilip parçalanmakta ve agarozda elektroforetik olarak ayrıştırılmaktadır. Suşların oluşturdukları elektroforetik patern (ya da bantlar) çeşitli yöntemlerle görünür hale getirildikten sonra birbirlerine benzerlik yönünden karşılaştırılmaktadır. Bu şekilde adeta bakterilerin parmak izleri (fingerprint) alınmaktadır (9). Bu yöntem *V. cholera*, ETEC, EHEC, *S. münchen*, *S. typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas türleri*, *L. pneumophila* gibi bakterilerin neden olduğu toplumsal ve nozokomiyal salgınl arın epidemiyolojik incelemelerinde kullanılmıştır (9, 10).

KAYNAKLAR

1. Watson JD, Tooze J, Kurtz DT (eds): Recombinant DNA, A Short Course. p. 58-90, 231-247, Scientific American Books, 1983 W.H. Freeman and Company, New York.
2. Smith JE: Aspects of Microbiology 11, Biotechnology Principles. p. 24-38, American Society for Microbiology, 1985.
3. Akman M: Bakteri Genetiđi. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını, No: 8, Sivas. s. 1-12, 337-371, 1983.
4. Hepatit B ile Savaşta Yeni Ufuklar. Smith Kline Biologicals. Abfar İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., Büyükdere Cad. 205, Levent, İstanbul.

5. Emery AEH, Mueller RF (eds): Elements of Medical Genetics. p. 33-53, 1988, 7th ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York.
6. Finegold SM, Baron EJ (eds): Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. p. 126-140, 1986, The C.V. Mosby Company, St Louis, Toronto, Princeton.
7. Eisenstein BI, Engleberg NC: Applied molecular genetics: New tools for microbiologist and clinicians. *J Infect Dis*, 153: 416-29, 1986.
8. Baas JB, Farer LS, Hopewell PC, Jacobs RF, Snider DE: Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*, 142: 725-735, 1990.
9. Wachsmuth K: Molecular epidemiology of bacterial infections: Examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev Infect Dis*, 8: 682-92, 1986.
10. John JF, Twitty JA: Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial Gram negative bacilli: Experience at a university and review of the literature. *Rev Infect Dis*, 8: 693-704, 1986.