

# Plazmid DNA'sı ile Bakteriyel Transformasyon

## GİRİŞ

Transformasyon, egzojen DNA'nın hücre tarafından içeri alınması ve genoma entegre edilmesi olayıdır. Transformasyon sonucunda alınan DNA ile birlikte hücrenin fenotipi de değişir. İzole edilmiş DNA'nın hücreye aktarılması moleküler genetik ve rekombinant DNA çalışmalarında çok büyük önem taşır.

Serbest DNA'yı içine alabilen bakterilere kompetant bakteri adı verilir. Bazı bakteriler normal büyüme koşullarında oldukça kompetantlar; fakat bazılarının kompetant özellik kazanması için kimyasal veya fiziksel yöntemlerle muamele edilmeleri gerekir.

Gram-pozitif bakterilerde transformasyon süreci şu aşamalara bölünür:

1. Kompetans faktör adı verilen küçük bir proteinin salgılanması ile kompetans geliştirilmesi
2. Çift zincirli DNA'nın bakteriye bağlanması
3. Tek zincirli DNA'nın hücreye alınması
4. Tek zincirli DNA'nın nükleaz degradasyonundan korunması için özel proteinlerle sarılması (eklips kompleks oluşumu)
5. Rekombinasyonla DNA zincirinin alıcı kromozoma entegrasyonu
6. Entegre olmuş DNA parçasının replikasyonu ve yeni fenotipin diğer nesillere aktarılması

Gram-negatif bakterilerde kompetans faktörü yoktur ve DNA'ya bağlanma ve DNA'nın içeri alınma aşamaları Gram-pozitiflerden farklıdır. Bu yüzden, sadece homolog DNA özgün bir şekilde bağlanır ve dupleks molekül olarak hücre içine alınır.

*Escherichia coli* bakterisi özel deneysel prosedürler uygulanmadan kompetant özellik kazanamaz.

Hücre duvarı ayrılabilir ya da alternatif olarak  $Ca^{++}$  iyonlarıyla muamele edilerek ve ısı şoku uygulanarak DNA'ya geçirgen hale getirilebilir. Bahsedilen kalsiyum iyonlu metot *E. coli* hücrelerinin plazmid DNA'sı ile transformasyonu için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Fakat, 30kb'den büyük plazmidlerin transformasyonunda pek verimli değildir. Ayrıca, kromozomal

DNA'nin içeri alınması için rekombinasyon sistemi mutasyona uğratılmış ve lineer DNA'yı degrade eden ekzonükleaz V enziminden yoksun suşlara ihtiyaç vardır.

## **PROSEDÜR**

### **Kompetant Hücre Hazırlanması**

1. 37°C'de gece boyu büyütülmüş kültürden tek koloni seçilir.
2. 1L'lik erlenmeyer şişesinin içine 100ml LB besiyeri aktarılır.
3. 37°C'de 3 saat çalkalayıcı inkübatörde hücreler büyütülür.
4. Kültürün büyümesi her 20 dakikada bir 600nm'de absorbansı ölçülerek kontrol edilir.
5. Hücreler, steril ve soğuk propilen tüplere aktarılır ve 10 dakika boyunca buzda bekletilir.
6. 4000rpm'de, 10 dakika boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüjlenir. Süpernatant dökülür.
7. Her pelet, 2ml buz soğukluğunda 0.1M CaCl<sub>2</sub> içinde çözülür ve bir tüpte toplanır. Buz içinde bekletilir.
8. 4000rpm'de, 10 dakika boyunca 4°C sıcaklıkta santrifüjlenir. Süpernatant dökülür.
9. Peletler, 10ml'lik her kültür için 1,2ml olacak şekilde buz soğukluğunda 0.1M CaCl<sub>2</sub> + %15 gliserolde çözülür.
10. Elde edilen bakteri süspansiyonu 100µl lik alikotlar halinde eppendorf tüplere aktarılır.
11. Bu tüpler -80°C'lik dondurucuda saklanır.

### **Transformasyon**

1. Daha önceden CaCl<sub>2</sub> yöntemiyle kompetan hale getirilmiş ve -80°C'de saklanan 100µL bakteri stoğu 10 dakika buzda bekletilir.
2. 10 dakika sonunda buzda erimiş olan kompetan bakterilerin üzerine 1ng plasmid DNA'sı eklenir ve 30 dakika daha buzda bekletilir.
3. Bakteriler buzdan alınıp 90 saniye boyunca sıcaklığı 42°C'de sabitlenmiş ısı bloğunda ya da su banyosunda inkübe edilir.
4. 42°C'den alınan bakteriler 5 dakika buzda bekletilir.
5. Daha sonra bakterilerin üzerine 900µL önceden 37°C'de inkübe edilmiş LB (ya da SOC) sıvı besiyeri eklenir ve nazikçe pipetleme yapılarak bakterilerin sıvı besiyerinde dağılmaları sağlanır.
6. Hücreler 37°C'de 1 saat inkübe edilir.
7. İnkübatörden alınan hücreler 14000rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek çöktürülür.

8. Çökmüş hücrelerin üzerinden 900µL süpernatant mikropipetle çekilip atılır. Pelet olarak çökmüş hücreler, tüpün içinde kalan 100µL besiyerinde resüspanse edilir.
9. Bakteriler, plazmidin dirençlilik genini taşıdığı antibiyotiği içeren LB agar plaklara ekilir ve 37°C'de gece boyu inkübe edilir.
10. Bir sonraki gün, transforme olmuş bakteri hücreleri plazmiddeki antibiyotiğe dirençlilik genini taşıdıkları için antibiyotikli agar plakta koloni oluşturabileceklerdir. Dolayısıyla agarda büyümüş koloniler başarıyla transforme edilebilen bakterilerdir.