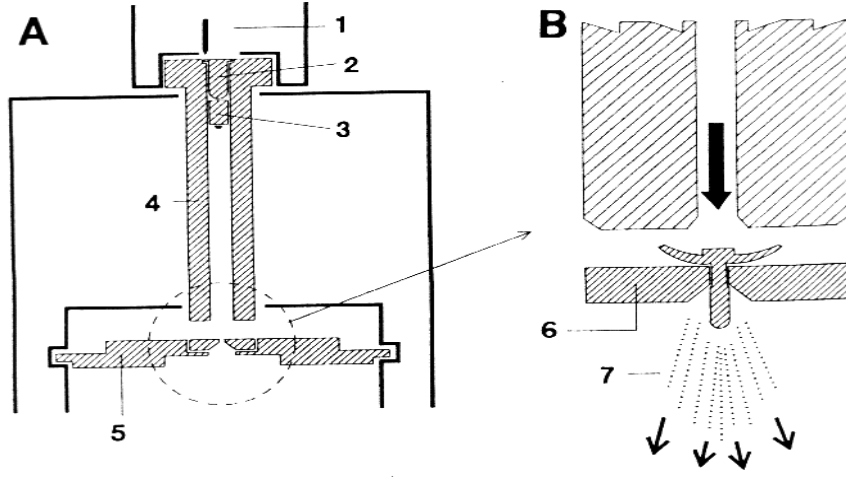


# Bitki Hücresinde Mikro Fırlatıcı Partikül Bombardımanı Tekniđi ile Gen Transferi (BİYOLİSTİK)

## Teori:

Yabancı genleri, hücre içine aktarma teknikleri, hem gen fonksiyonu araştırmaları, hemde transgenic organizmaların üretilmesi işlemleri için önem arz etmektedir. Bu tarz araştırmalar için, prokaryotik organizmalar için, bitki hücreleri ve hayvan hücreleri için çok çeşitli teknikler ve yaklaşımlar geliştirilmiştir. Özellikle bitki hücreleri için, gen transferi yöntemlerini üç ana altbaşlık altında incelemek mümkündür. Biyolojik yaklaşımlar -retrovirus veya bakteri vektörlerinin kullanılması-, kimyasal yaklaşımlar –liposomlar, kalsiyum fosfat çökeltmesi, polietilen kullanılması- ve son olarak fiziksel metotlar –microenjeksiyon, elektroporasyon.

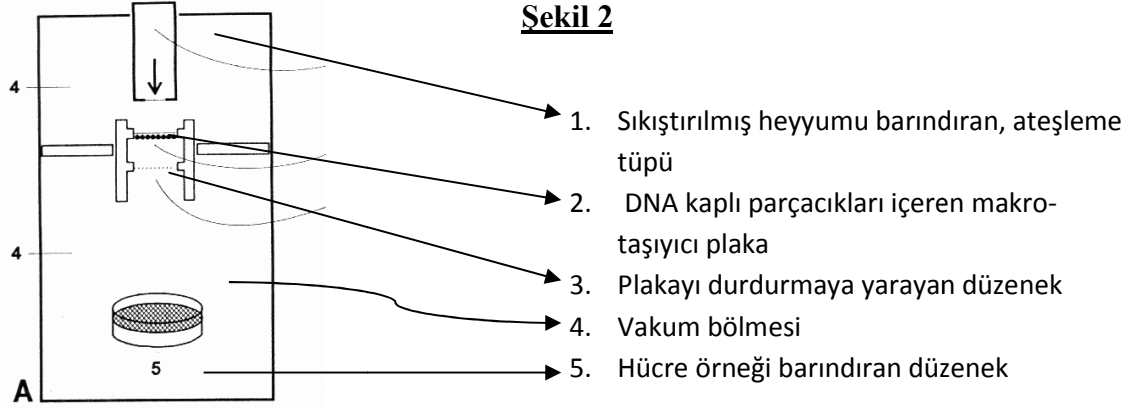
Biyolistik olarak da bilinen, parçacık bombardımanı tekniği, daha çok bitki hücreleri için kullanılan ve son yıllarda popülerlik kazanmış olan fiziksel gen transferi tekniğidir. Bu teknik, DNA ile kaplanmış olan parçacıkların (microprojectiles), direk olarak bitki hücrelerine aktarılmasını içerir. Bitki hücrelerinin sahip olduğu hücre duvarı, gen transferi işlemleri için bir engel niteliğindedir. Bu teknik ile hücre duvarını yok etmeden yabancı DNA'yı hücre içine aktarmak hedeflenmiştir. Canlı bitki hücreleri için, direk gen transferi metodu, bu hücrelerde daha çok gen ifadesi ve bu ifadelerin hangi şartlarda etkilendiği gibi bilimsel sorular için geliştirilmiştir, ancak direk gen transferinin uygulama alanları sadece bunlarla sınırlı değildir. Biyolistik yöntemi, bitkilere kloroplast transformasyonu işlemlerinde ve maya hücrelerine mitokondri transformasyonu işlemleri içinde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ayrıca, Biyolistik metodu, transgenik bitkilerin üretilmesi gibi amaçlar için de kullanılmaktadır. Bu yöntemin, olgunlaşmamış zigotik pirinç embriyolarına, mısır ve pamuk hücrelerine, buğdayın embriyonik kallus hücrelerine, başarılı bir şekilde uygulanabildiği gösterilmiştir. Bu yöntem, basit olarak, DNA ile kaplanmış olan parçacıkların, hızlandırılarak hücre içine aktarılmasını kapsamaktadır. Bu işlemlerde kullanılan parçacık türü genellikle, tungsten veya altındır.



**Sekil 1-**(gen tabancasının çalışma mekanizması ve bileşenleri)

1. Başlatıcı kurulum, mıknatıslı bobin(solenoid) destekli ateşleme iğnesi.
2. Başlatıcı
3. Mikro-taşıyıcıları içeren makro-taşıyıcı
4. Hızlandırıcı düzenek
5. Durdurucu plaka
6. Parçacık mermisinin, durdurucu plaka ile durdurulması ve DNA yüklü parçacıkların saçılması
7. Saçılan mikro parçacıklar

Yukarıdaki örnek, ilk geliştirilen gen tabancasının çalışma prensibini ve kurulum bileşenlerini açıklamaktadır. Ancak gelişen teknoloji ve yöntemler ile gen tabancası uygulamaları da çeşitli değişikliklere uğramıştır. Yeni geliştirilen sistemlerde, mikro-parçacıkların hızlandırılması için farklı yöntemler izlenmektedir. Sıklıkla kullanılan bir yöntem olan helyum sıkıştırması (PDS –1000/He (Bio-Rad ) yöntemi, helyumun sıkıştırılması ve ani bir şekilde serbest bırakılmasıyla, bir çeşit şok dalgası oluşturmasını ve bu şok dalgası ile DNA ile yüklenmiş parçacıkların, hızlandırılarak hürelere aktarılması hedeflenmektedir. Bu şok dalgasıyla, düzeneğin önüne yerleştirilmiş ve içinde DNA ile kaplanmış parçacıklar bulunan plastik plaka hızlandırılır, belirli bir mesafeden sonra, plastik plakanın durması sağlanır ve parçacıklar, daha aşağıda bulunan hücre örneklerinin üzerine, hızlandırılmış bir biçimde saçılır(Şekil 2).



## Protokol

### Altın stok hazırlanması (60mg/ml)

1. 1.5 ml 'lik ependorf tüplerine, 30 mg altın (1.0 µg'lık) örnekleri, tartılarak eklenir
2. 1 ml etanol(%100'lük) ependorf tüplere eklenir
3. 3-5 dakika vortekslenir
4. 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir
5. Tüplerdeki altınlar santrifüj kullanılarak, ayrıştırılır
6. Tüplerde kalan sıvı kısım ayrıştırılır, ve geri kalan örnek steril su (ddH<sub>2</sub>O) ile 3 kere yıkanır
7. 1 dakika vortekslenir ve parçacıkların yerleşmesi için fazladan 1 dakika beklenir
8. Tüpler 5-10 saniye santrifüje maruz bırakılır ve sıvı kısım ayrıştırılır
9. 3. Yıkamadan sonra, 500 µl glycerol(1 ml dH<sub>2</sub>O) eklenir ve -20 derecede saklanır.

### Biolistik gen aktarma tabancasının sterilizasyonu (PDS 1000\ BioRad)

1. Makro-taşıyıcı düzeneği, Makro-taşıyıcılar, durdurucu plaka, (portatif bileşenler) otoklavlanır.
2. Laminar Flowda kurumaya bırakılır
3. Durdurma plakaları 100% 'lük etanole daldırılır ve kuruması için petride bekletilir.
4. Düzeneğin çevresi ve kullanılan mekan %70'lik etanol ile temizlenir ve kullanımdan önce kurumaya bırakılır
5. Her gen aktarma işleminden sonra, kirlenme(contamination) ihtimaline karşı aynı işlemler tekrarlanır

## **DNA ile kaplanmış parçacıkların hazırlanması**

1. 30 µl altın stoğu (1 µm'lık) ve 30 µl DNA karıştırılır ve 1 dakika vortekslenir
2. Sıra ile, 20 µl spermidine(0.1 M'lık) ve 50 µl CaCl<sub>2</sub> (2.5 M'lık) eklenir ve 1 dakika vortekslenir
3. Altın ile karışması ve yerleşmesi için santrifüje maruz bırakılır
4. Sıvı kısım ayrıştırılır, pellete dikkat edilerek, etanol(%100) ile yıkanır
5. Tekrar santrifüje maruz bırakılır ve sıvı kısım ayrıştırılır
6. Örnek 90 µl Ethanol(%100) ile yeniden süspanse edilir ve 2 saniye sonifikasyona maruz bırakılır.
7. Tüplere hafifçe vurarak ve ışık kaynağı altında, tüplerin içinde DNA kümelenmesi olmadığından emin olunur
8. Hazırlanan örnekten, bir atım için 5µl örnek kullanılması yeterlidir.

## **Biolistik Bombardmanı**

- Her 15-20 atımda, durdurma düzeneğinin değiştirilmesi önerilir
1. PDS-1000 parçacık aktarma sistemi ve vakum pompası çalıştırılır ve helyum basıncı 1100psi'ya çıkartılır
  2. Dikkatli bir şekilde ve steril ekipman ile makro-taşıyıcılar düzeneğe yerleştirilir.
  3. 5 µl'lik örnek makro-taşıyıcıların üzerine eşit bir şekilde aktarılır ve kurumaya bırakılır ( aynı anda 5'ten fazla makro-taşıyıcısı kullanılması önerilmez)
  4. Durdurucu plaka sıkı bir şekilde yerine yerleştirilir
  5. Makro-taşıyıcı düzeneği, ters çevrilerek, platformun en yüksek noktasına yerleştirilir
  6. Doku kültürü (hücre örneği) örneği makro-taşıyıcının 6 cm kadar altına yerleştirilir
  7. Vakum çalıştırılır ve atım yapılır
  8. Düzenek parçalara ayrılarak, sonraki atımlar için ayarlanır