

Gen Transfer Teknolojileri

Korhan ARSLAN¹, Bilal AKYÜZ²

¹ Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

² Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRK YE

Özet: Rekombinant DNA teknolojisindeki süratli gelişme gen aktiviteleri ile ilgili çalışmalar yapmak için yeni fırsatlar ortaya çıkarmı bu sebeple gen aktarım teknikleri gün geçtikçe daha büyük önem kazanmıştır. Gen transfer teknolojisi, çiftlik hayvanlarının üretiminde ve ıslahında doğal yöntemlerin dışında yeni genlerin hızlı bir şekilde aktarımının sağlanması yönü ile önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu derlemede gen aktarım teknikleri ile ilgili bilgi vermek amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gen transferi, rekombinant, teknoloji

Gene Transfer Technologies

Summary: Rapid developments in recombinant DNA technology have provided new opportunities for fresh studies in gene activities. Thus gene transfer techniques have gained greater importance day by day. Gene transfer technology offers advantages, in that it enables new genes' quick transfer in the production and breeding of farm animals, in addition to natural methods. This compilation aims to give information on gene transfer techniques.

Key Words: Gen transfer, recombinant, technology

Giri

Genler etkilerini, protein oluşumu ile sonuçlanan ve santral dogma olarak adlandırılan mekanizma ile gösterirler. Genetik mühendislik teknikleri kullanılarak genetik materyalin temeli olan deoksiribonükleik asidin (DNA) yapısına belirli uzunlukta özel gen dizilerinin aktarılması işlemine gen transferi denir (8). Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlar olarak tanımlanmaktadır (25). Yabancı bir genin, gen transfer teknikleri ile genomu sokulmasıyla transgenik hayvanlar elde edilmektedir.

Gen aktarımının yapılabileceğini gösteren ilk deneysel çalışma, 1928 yılında Griffith tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneysel çalışmada patojen olmayan pneumokok bakterilerinin, ısı etkisi ile öldürülmüş patojen pneumokoklar ile aynı ortama konduğunda patojenik özellik kazandı ve tesbit edilmiş ve genetik materyal transferinin mümkün olduğu fikri ilk kez ortaya konmuştur (26). Avery ve arkadaşları 1944 yılında yaptıkları çalışmada genetik materyal olan DNA'nın transforme edilebileceğini bir başka deyişle gen aktarımının mümkün olabileceğini belirlemişlerdir.

Rekombinant DNA teknolojisindeki süratli gelişme gen aktiviteleri ile ilgili çalışmalar yapmak için yeni fırsatlar ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte moleküler biyoloji ve genetik mühendislik alanında ya-

pılan çalışmalar malarda, gen aktarım teknolojilerinin önemi gün geçtikçe artmaktadır (5).

Çiftlik hayvanlarına gen transferi; elde edilen yavru sayısı, süt miktarı, yem miktarı ve kalitesi, yemden yararlanma kabiliyeti ve hastalıklara direncin yükseltilmesi amacı ile yapılmaktadır. Önemli bir diğer hedef ise transgenik hayvanların organ vericisi haline getirilmesidir (21).

Özellikle transfer edilen genin sentezlettiği proteinlerin elde edilmesi, yani transgenik hayvanlardan terapötik amaçlı ürün elde edilmesi hedeflendiğinde, bu alandaki çalışmalar da farklı bir boyut kazanmıştır (9). Bununla birlikte transgenik biyoreaktör hayvanlardan elde edilebilecek terapötik özellikli rekombinant proteinlerden sağlanacak faydaların son derece yüksek olduğu düşünülmektedir (10). Yapılan çalışmalar malarda, önemli olan bazı protein ve terapötik maddelerin üretiminden sorumlu genlerin transfer edilmesi yoluyla hayvanların kanından veya sütünden bu genlerin kodladıkları maddelerin elde edilmesi amaçlanmıştır (23, 28, 49).

Gen Transfer Teknikleri

1- Pronükleer mikroenjeksiyon yöntemi: Yöntem yabancı genetik materyalin bir hücreli amaçdaki embriyoların pronükleuslarına direkt olarak aktarılması olarak tanımlanmaktadır. Pronükleer mikroenjeksiyonla genin aktarımında, genler genomu birkaç ile yüzlerce kopya arasında değişen sayıda rastgele bölgelerden entegre olmaktadır (29, 31, 40). Aktarılmış olan gen anneden yavruya

aktarılarak jenerasyonlar arası geçi özelliği gösterilmektedir (42). Yöntem ilk kez fareler üzerinde çalışılmıştır (25). Alınan başarıları sonuçlar sonrasında koyun, sığırtı gibi çiftlik hayvanlarının kullanıldığı çalışmaları yapıldığı bildirilmiştir (33).

Mikroenjeksiyon yönteminde transfer edilecek genin iki temel bölgeden oluşacak şekilde hazırlanması gerektiği bildirilmektedir (27). İlk bölge protein kodlayan diziler olan exon ve protein kodlamayan diziler olan intronlardan oluşur ve transkripsiyonel ünite olarak adlandırılır (6).

İkinci bölge promotör, enhancer, reporter olarak adlandırılan genin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici elementlerin bulunduğu bölgedir (6). Promotör bölgeler transgenin ekspresyon göstereceği bölgeleri ve zamanı belirleyen düzenleyici diziler olarak tanımlanmaktadır. Enhancer bölgeler bulunduğu genin transkripsiyonunu arttıran dizilerdir. Protein kodlayan diziler reporter olarak adlandırılır ve transkripsiyon başlama kodunu, transgen sonlandırma kodunu ile kozak dizisi olarak adlandırılan özel dizilerden oluşurlar (5).

Mikroenjeksiyon zamanının ve uygulanacak bölgenin seçiminin önemi vurgulanmaktadır (29). Mikroenjeksiyon aşamasında dişi ve erkek pronükleus görünür halde olan bir hücreli aşamadaki embriyolar seçilmektedir (31).

Mikroenjeksiyonun dişiye göre ortalama iki kat büyüklükteki erkek pronükleusa 1-2 pikolitre olacak şekilde yapıldığı ve pronükleusun iki katı büyüklüğe ulaşmasının mikroenjeksiyonun başarıları bir şekilde gerçekleştirildiği yönünde en önemli gösterge olduğu bildirilmektedir (28). Aktarım başarısını etkileyen önemli dişi parametrenin mikroenjeksiyon edilen genin konsantrasyonu olduğu ve yüksek konsantrasyondaki genetik materyalin embriyoların ölümüne sebep olduğu vurgulanmaktadır (11). Ortam ısısının da dişilerin başarısını etkileyen önemli bir dişi parametre olduğu bildirilmektedir (28). Pronüklear mikroenjeksiyon yönteminin başarısında uygulamayı yapan araştırmacının deneyimli olmasının da önemli etkisinin olduğu bildirilmektedir (28). Mikroenjeksiyon başarıları kadar, mikroenjeksiyon embriyoların taşıyıcı dişilere aktarımının da yöntemin başarısı üzerinde önemli etkisi vardır (11).

Pronüklear mikroenjeksiyon teknolojisinin, hayvan uygulamalarındaki başarısı yöntemin insan embriyolarına gen aktarımı içinde uygulanabilir bir yöntem olduğu yönündeki düşünceleri kuvvetlendirmiştir (29, 50).

2- Viral vektörlerle gen transferi tekniği: Hayvanlarda embriyonal dönemde, ökaryotik viral vek-

törler aracılığı ile gen transferi uygulamalarının yapılabilmesi ve aktarılan genlerin genomik yapıya katılarak ekspresyonlarının sağlandığı bildirilmektedir (43). DNA ve RNA karakterinde genetik materyal taşıyan virüsler içerisinde en çok tercih edilen viral vektör RNA karakterli bir virüs olan retrovirüstür (50).

2.1- Retroviral gen aktarımı: Retroviral gen aktarımı, erken gelişim dönemindeki embriyoların (8-16 hücre), aktarımı yapılmak istenen gen bölgesini taşıyan rekombinant retroviral vektörlerle enfekte edilmesi prensibine dayalı bir gen transfer yöntemidir (30, 34, 53).

Retrovirüsler, yüksek entegrasyon kapasiteleri ve taşıyıcıları genetik materyalin hedef genomu tek kopya olarak entegrasyon başarısının yüksek olması özellikleriyle nedeniyle ideal taşıyıcılarıdır (19). Aktarımlar sırasında tek kopyanın genomu entegrasyonunun mozaik görülmeye olası olarak ortaya çıkardığı bildirilmektedir (16).

Retroviral gen transferi yöntemi kullanılarak, sığırtı, koyun, tavuk, balık ve laboratuvar hayvanlarında başarıları gen transferi çalışmaları yapıldığı bildirilmiştir (17, 18, 37, 44). Genetik materyal olarak RNA taşıyan rekombinant retrovirüslerin hedefe aktarımı ile virüsün yapısında bulunan viral ters transkriptaz enziminin aktifliği ve RNA formundaki genetik materyalin DNA'ya çevrilerek genomu entegrasyonunun gerçekleştirildiği bildirilmektedir (47).

Retroviral gen aktarım metodunda kullanılan en büyük problem virüsün fiziksel hacminin getirdiği fiziksel kısıtlama sebebiyle yalnızca sınırlı büyüklükteki genetik materyalin aktarılabilmesidir (48, 51). Transgenin büyüklüğünün 7 kb ile sınırlı olması nedeni ile bu aktarım yöntemi ile ancak küçük gen konstraktlarının aktarımının gerçekleştirilebileceği bildirilmektedir (41).

Transfer edilmesi istenen geni taşıyan retrovirüslerin hazırlanmasının teknolojik laboratuvar gerektirmesi ve yöntemin maliyetinin yüksek olması yöntemin kullanımını kısıtlayan dezavantajlardır (20). Bildirilen bütün dezavantajlarına rağmen retroviral gen aktarım teknolojisi ile farklı türler arasındaki genetik materyalin aktarımı çalışmaları elde edilen başarıları sonuçları, yöntemin ne kadar önemli olduğu ortaya koymaktadır (45).

3- Embriyonik kök hücre yöntemi: Embriyonik kök hücreler blastosist aşamasındaki embriyoların iç hücre kitlesindeki hücrelerden köken alan hücrelerdir (14). İç hücre kitlesi hücreleri pluripotent özellik gösteren üç germ yaprağı olan endoderm, mezoderm ve ektodermden köken alan çoklu hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip hücre-

lerdir. Ancak plasenta ve destekleyici dokuları olu turma yetenekleri yoktur (16). Bir ba ka deyi - le ekstra embriyonik yapıları olu turamazlar. Bu nedenle pluripotent özellikteki bir embriyonik kök hücre birçok vücut hücresine (yakla ık 220 çe it vücut hücresi) dönü ebilme yetene ine sahip olmasına ra men tam bir organizma olu umu gerçekte tiremez (16).

Embriyonik kök hücreler, ilk kez Evans ve Kaufman adlı ara tırcılar tarafından 1981 yılında fare embriyolarından elde edilmi tir (22). Fare embriyonik kök hücrelerinin elde edilmelerini takip eden yıllarda embriyo kaynaklı kök hücre terimi kullanılmaya ba lanmı ancak bu terim zamanla embriyonik kök hücre olarak de i mi ve yerle - mi tir (16). Embriyonik kök hücre yolu ile gen aktarımı; elektroporasyon veya transfeksiyon yolu ile gen aktarımı yapılmı kök hücrelerin morula ya da blastula a amasındaki bir ba ka embriyoya aktarılması olarak tanımlanmaktadır (1).

Do acak yavruların iki farklı embriyodan köken aldıkları için kimerik oldukları bildirilmi tir (54). Her iki hücre grubunun oranı kimeralar arasında veya bir kimeranın dokuları arasında farklılık göstermektedir (2).

Embriyonik kök hücre ile gen aktarımının avantajlarından biri, genetik manipölasyon sonuçlarının hücreler embriyoya verilmeden önce in-vitro olarak, gerek farklıla mamı hücrelerde gerekse farklıla ma esnasında izlenebilmesidir (3). Önemli bir di er avantajı ise istenen genin hedeflenmesi ile homolog rekombinasyonun ekillendirilmesi, böylece hayvanın kendi geni ile onun homologu olan ba ka bir genin yer de i tirmesi sa lanarak genetik modifiye hayvanların geli tirilebilmesidir. Bu hayvan modelleri in-vivo olarak karı ık geli im sisteminde hedef genlerin fonksiyonlarının çalı lmasına imkân sa lar (3).

4- Spermatozoa hücreleri aracılı ı ile gen transferi: Spermatozoa hücreleri kullanılarak gen transferi yapılabilece ini bildirilen ilk çalı ma 1971 yılında Brackett ve ark. tarafından farelerde yapılmı tir (15). Sonraki yıllarda spermatozoa hücreleri ile gen aktarımı yöntemi sı ır, koyun, keçi, domuz gibi birçok çiftlik hayvanında uygulanmı ve ba arılı sonuçlar alınmı tir (24). Spermatozoaların yabancı bir geni yapısına katma yetene inin yüksek oldu u ancak bunun mekanizması ile ilgi kesin bir bilgi bulunmadı ı bildirilmektedir (38).

Yöntemin uygulanı nda transferi dü ülen gen spermatozoalar ile birlikte birkaç saat inkübe edilir. nkübasyon sonunda gen transferi gerçekte mi olan spermatozoalar ile in-vitro fertilizasyon i lemi

yapılarak transgenin yumurtanın içerisine girmesi sa lanır (13, 15, 35). Spermatozoa aracılı ıyla gen transferi, yöntemin do allı ı nedeniyle en olumlu gen transfer tekniklerinden biri oldu u dü ünülmektedir. Özellikle domuzlar kullanılarak yapılan çalı malarda oldukça yüksek bir ba arı elde edilmi ken aynı ba arıya sı ırlarda ula lamamı tir (13).

Bunun yanında kolay uygulanabilmesi ve ucuz olması yöntemin önemli avantajlarıdır (13). Ancak, üreme alanı dı nda bu hücrelerin varlı ını sürdürme süresinin çok kısa olması ise spermatozoa hücreleri ile gen transfer uygulamasının dezavantajı olarak bildirilmektedir (20).

5- Klonlama teknolojisi ile gen transferi: Klonlama teknolojisi ile gen transferinde kullanılan en temel teknik nükleer transferdir. Nükleer transfer, verici anneden alınan döllenmemi yumurtanın çekirde inin çıkarılması ve kopyalanmak istenen ba ka bir organizmadan alınan hücrenin çekirde i nin bu içi bo altılmı yumurtaya aktarılması yolu ile tüm organizmayı kopyalama prensibine dayalı bir tekniktir (21).

Nükleer transfer yapılan yumurtalar elektrofüzyon ve aktivasyon i lemlerinden sonra in-vitro kültür ortamlarında kültüre alınırlar (4, 11). Yöntemin uygulama anında hücrelerin hücre döngüsünün hangi evresinde bulundu unun nükleer transfer ba arısını etkileyen en önemli parametre oldu u bildirilmektedir (52).

6- Elektroporasyon: Hayvan hücrelerine yabancı DNA'nın transferinde kullanılan ve ba arılı oldu u bildirilen bir metodudur. Sözü edilen bu yöntemde hücre membranının geçirgen özelli inden yararlanılır. Döllenmi yumurtaya elektrik akımı verilerek membranda olu an geçici porlardan DNA' nın aktarımı sa lanmaktadır (20). Elektroporasyon yönteminin büyük tecrübeye ve manüplasyon becerisine sahip olmaksızın uygulanabilmesinin tekni in önemli avantajı oldu u bildirilmektedir (20).

Sonuç

Genetik ve biyoteknoloji alanındaki çalı malar, rekombinant DNA teknolojisinin ke fine kadar organizmaların genetik yapıları hakkında önemli bilgiler sa lamı tir. Ancak rekombinant DNA teknolojisi genetik ve biyoteknoloji alanında edinilen sonuçların yaygın kullanımında bir dönüm noktası olmu tur. Bununla birlikte son yıllarda gen transfer teknolojisi büyük önem kazanarak biyomedikal, veteriner hekimli i ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaya ba lanmı tir.

Gen transfer teknolojisi, çiftlik hayvanlarının üretiminde ve ıslahında doğal yöntemlerin dışında yeni genlerin hızlı bir şekilde aktarımını sağlaması yönü ile önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca gen aktarımı teknolojileri endüstriyel alanda daha kaliteli ürünlerin daha kısa sürede elde edilmesi amacıyla yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Teknoloji kullanımı ile elde edilen zaman ve iş gücü tasarrufu ekonomik olarak önemli bir getiridir.

Son yıllarda gen aktarım teknolojilerinin süratle gelişmesi, insan yaşamını kolaylaştırmanın yanında artan dünya nüfusunun ihtiyaç duyduğu gıda ve biyolojik madde gereksinimlerini karşılamak anlamında da büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte bilimsel çalışmalar vazgeçilmez olan etik kaygılarda gündeme gelmektedir. Bu kaygıların gündeme getirilmesinin en önemli sebebi genetik değiştirilmiş hayvan ve bitkilerin gıda olarak kullanımında insan sağlığını tehdit eden bir etkinin görülebilmesi olasılığıdır. Ancak genetik değiştirilmiş canlılardan elde edilen ürünlerin insan sağlığını tehdit etmesine dair herhangi önemli bir veriye rastlanmamıştır.

Bu kaygılar, teknolojinin insan hayatını kolaylaştıracağı ve artan dünya nüfusunda ortaya çıkması muhtemel sorunlara önemli bir çözüm alternatifi olabileceği gerçeğini de gözden kaçırmamaktadır. Bununla birlikte ortaya çıkan endişeleri kaldırmak adına, yapılan uygulamalarda ve elde edilen ürünlerin kullanımında son derece titiz ve bilimsel ilkeler çerçevesinde hareket edilmesi gerekliliği göz ardı edilmemelidir.

Moleküler genetik alandaki ilerlemenin bugünkü gen transfer teknolojisine uygulanması, yeni teknolojilerin geliştirilerek transgenik çiftlik hayvanlarının ürünlerinden elde edilecek terapötik, farmasötik ve endüstriyel öneme sahip rekombinant proteinlerden yüksek fayda sağlanabileceği düşünülmektedir.

Arjantin, Meksika gibi Türkiye ile benzer bilimsel ve ekonomik gelişmişlik seviyesindeki ülkeler bile bu teknolojileri kullanarak ürün elde etmekte hatta tohum ihraç etmektedir. Türkiye'de konu ile ilgili teknolojik alt yapının gelişmesi ve uygulamaların artması ile ekonomik olarak kazanım sağlayacak sistemlerin oluşturulması hedeflenmelidir.

Kaynaklar

1. Arat S, 1997. Production of chimeric mouse by injection of embryonic stem (ES) cells to morula from an outbred mouse strain. *Turk J Biol*, 21: 431-439.
2. Arat S, 2000. Transmission of the embryonic stem cell genome to offspring and sexual development in chimeric mice from a male embryonic stem cell line. *Turk J Biol*, 24: 707-715.
3. Arat S, Rzucidlo SJ, Gibbons J, Miyoshi K, Stice SL, 2001. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev*, 60: 20-26.
4. Arat S, Gibbons J, Rzucidlo SJ, Respass DS, Tumlin M, Stice SL, 2002. In-vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod*, 66: 1768-1774.
5. Arslan K. 2009. Farklı Genin (Güçlendirilmiş Yeşil Floresan Protein Geni, İnsan Gamma İnterferon Geni) Ayrı Ayrı Veya Birlikte Mikroenjeksiyonunun Transgenik Fare Eldesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. Erciyes Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Programı. Kayseri.
6. Auerbach AB, 2004. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim Pol*, 51: 9-31.
7. Avery OT, Macleod CM, McCarty M, 1979. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*, 149: 297-326.
8. Babaoğlu, M. 1999. Bitkilerde gen transferi teknikleri. *Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi*, 322: 24-26.
9. Bağcı H, 2002. Transgenik biyoreaktörlerde rekombinant proteinlerin üretimi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 1: 113-123.
10. Bağcı H, Aktopraklıgil D, Gunes Ç, Akkoc T, Kankavi O, Cetinkaya G, Taşkın AC, Arslan K, Arat S, Tsoncheva VL, Ivanov IG, 2008. Expression of human gamma interferon (hIFN- γ) in the milk of transgenic mice. *Second Mediterranean Clinical Immunology Meeting*. October, 4-7, Antalya-Turkey.
11. Bağcı H, Sağırkaya H, 2001. Klonlama. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 20: 187-198.
12. Bağcı H, Keskintepe L, 2001. Application of green fluorescent protein as a marker for

- selection of transgenic mouse embryos before implantation. *Turk J Biol*, 25: 123-131.
13. Behringer RR, Ryan TM, Reilly MP, Asakura T, Palmiter RD, Brinster RL, Townes TM, 1989. Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. *Science*, 245: 971-973.
 14. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E, 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309: 255-256.
 15. Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H, 1971. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci*, 68: 353-357.
 16. Brenin DR, Talamonti MS, Iannaccone PM, 1997. Transgenic technology: an overview of approaches useful in surgical research. *Surg Oncol*, 6: 99-110.
 17. Briskin MJ, Hsu RY, Boggs T, Schultz JA, Rishell W, Bosselman RA, 1991. Heritable retroviral transgenes are highly expressed in chickens. *Proc Natl Acad Sci*, 88: 1736-1740.
 18. Chan AW, Homan EJ, Ballou LU, Burns JC, Bremel RD, 1998. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 14028-14033.
 19. Chen TT, Lin CM, Lu JK, Shablott M, Kight K, 1993. Transgenic fish: a new emerging technology for fish production. Yalpani M. eds. *In Science For The Food Industry Of The 21st Century, Biotechnology, Supercritical Fluids, Membranes And Other Advanced Technologies For Low Calorie, Healthy Food Alternatives*. Winrock-Oxford: ATL Press, pp. 145-159.
 20. Ekici A, Timur M, Ba ı H, 2006. Transgenik canlılar ve akuakültürdeki önemi. *E Ü Su Ürünleri Dergisi*, 23: 211-214.
 21. Ekinci MS, Akyol , Karaman M, Özköse E, 2005. Hayvansal biyoteknoloji uygulamalarında güncel geli meler. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8: 89-95.
 22. Evans MJ, Kaufman MH, 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.
 23. Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vanderzwaag DF, Ferre LB, 2003. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, 59: 125-138.
 24. Gandolfi F, 2000. Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology*, 53: 127-137.
 25. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH, 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 77: 7380-7384.
 26. Griffith F, 1928. The significance of pneumococcal types. *J Hyg*, 27: 113-159.
 27. Hofker M, Deursen JV, eds., 2002. *Transgenic Mouse Methods And Protocols*. New Jersey: Humana Press, p. 51-56.
 28. Houdebine LM, 2002. Transgenes and their medical applications. *Pathol Biol*, 50: 380-387.
 29. Houdebine LM, 2002. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol*, 98: 145-160.
 30. Iannaccone PM, Zhou X, Khokha M, Boucher D, Kuehn MR, 1992. Insertional mutation of a gene involved in growth regulation of the early mouse embryo. *Dev Dyn*, 194: 198-208.
 31. Keefer CL, 2004. Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim Reprod Sci*, 82-83: 5-12.
 32. Ko JH, Lee CS, Kim KH, Pang MG, Koo JS, Fang N, Koo DB, Oh KB, Youn WS, Zheng GD, Park JS, Kim SJ, Han YM, Choi IY, Lim J, Shin ST, Jin SW, Lee KK, Yoo OJ, 2000. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Res*, 9: 215-222.
 33. Krimpenfort P, Rademakers A, Eyestone W, Vanderschans A, Vandenbroek S, Kooiman P, Kootwijk E, Platenburg G, Pieper F, Strijker R, Deboer H, 1991. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology*, 9: 844-847.
 34. Kuehn MR, Stoye JP, 1992. Insertional mutagenesis and mouse development. Russo VEA, Brody S, Cove D, Ottolenghi S. eds. *Development-The Molecular Genetic Approach*. Berlin: Springer, p. 420-439.

35. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C, 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57: 717-723.
36. Lin S, Yang S, Hopkins N, 1994. LacZ expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev Biol*, 161: 77-83.
37. Lu JK, Chen TT, Chrisman CL, Andrisani OM, Dixon JE, 1992. Integration, expression and germ-line transmission of foreign growth hormone genes in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1: 366-375.
38. McCarthy S, Ward WS, 2000. Interaction of exogenous DNA with the nuclear matrix of live spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 56: 235-237.
39. McMahon AP, Flytzanis CN, Houghevans BR, Katula KS, Britten RJ, Davidson EH, 1985. Introduction of cloned DNA into sea urchin egg cytoplasm: replication and persistence during embryogenesis. *Dev Biol*, 108: 420-430.
40. Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL, 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell*, 29: 701-710.
41. Rüllicke T, 1996. Transgenic technology: an introduction. *Int J Exp Pathol*, 77: 243-245.
42. Rusconi S, Schaffner W, 1981. Transformation of frog embryos with a rabbit beta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci*, 78: 5051-5055.
43. Rzucidlo SJ, Bagis H, McGraw RA, Brackett BG, 1997. Production and identification of transgenic mice for cytomegalovirus controlled expression of glutathione synthetase. *Southeastern Chapter of the Society of Toxicology Annual Meeting (SESOT)*. October, 2-3, Athens- GA.
44. Sambrook J, Russell DW, eds., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 161-162.
45. Sarmasik A, Chun CZ, Jang IK, Lu JK, Chen, TT, 2001. Production of transgenic live-bearing fish and crustaceans with replication-defective pantropic retroviral vectors. *Mar Biotechnol*, 3: 177-184.
46. Sarma İK, A. 2003. Application of gene transfer technology for genetic improvement of fish. *Turk J Zool*, 27: 1-6.
47. Schmotzer CA, Dunlap MEB, Butler SP, Velandier WH, Gwazdauskas FC, 2003. Development of murine embryos following elektroporation. *J Assist Reprod Genet*, 20: 148-152.
48. Soriano P, Cone RD, Mulligan RC, Jaenisch R, 1986. Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses. *Science*, 234: 1409- 1413.
49. Wall RJ, 2002. New gene transfer methods. *Theriogenology*, 57: 189-201.
50. Wall RJ, 1996. Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology*, 45: 57-68.
51. Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KH, 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813.
52. Wheeler MB, Walters EM, Clark SG, 2003. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Anim Reprod Sci*, 79: 265-289.
53. Putten HV, Botteri FM, Miller AD, Rosenfeld MG, Fan H, Evans RM, Verma IM, 1985. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 6148-6152.
54. Zhang PJ, Hayat M, Joyce C, Gonzalez LIV, Lin CM, Dunham RA, Chen TT, Powers DA, 1990. Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, *Cyprinus carpio* (*Linnaeus*). *Mol Reprod Dev*, 25: 3-13.

Yazı ma Adresi :

Ara . Gör. Dr. Korhan ARSLAN
 Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik ABD
 Bari Manço C. Sümer M.38090
 Kocasinan, Kayseri,
 Tel: 0-352-3380006/179
 Fax: 0-352-3372740
 E-Mail: korhanarslan@erciyes.edu.tr