

## TRANSPOZAN TEKNİĞİ ve GEN İZOLASYONU

Cahid ÇAKIR<sup>(1)</sup>Münevver GÖÇMEN<sup>(2)</sup>Zübeyir DEVRAN<sup>(1)</sup>

## 1.GİRİŞ

Bitki biyolojisinin temel amacı, bitki gelişmesinin, farklılaşmasının, büyüme maddelerinin ve çevreye tepkisinin genetik kontrolünü anlamaktır. Bunu gerçekleştirmenin yolu ise; sistemde rol alan genlerin tanımlanmasına, izolasyonuna ve özelliklerinin bilinmesine bağlıdır. Sistemde rol alan genlerin tanımlanmasını ve izolasyonunu kolaylaştırmak için moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Recombinat DNA Teknolojisi, Restriction Fragment Length Polimorfizim (RFLP), Polymerase Chain Reaction (PCR), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Kromozom Üzerinde Yürüme , Gen Haritalama, Sekans Analizleri, mRNA dan yada protein saflaştırmadan hareket ederek gen klonlama vb. birçok moleküler yöntem bu gibi çalışmalarda amaca uygun olarak kullanılmaktadır. Bütün bu yöntemler geleneksel gen tanımlama yöntemlerine göre basit ve kısa, fakat oldukça pahalı yöntemlerdir.

Geleneksel gen tanımlama yöntemlerinden mutasyon, biyolojik çalışmalardan biridir. Kimyasal ya da fiziksel etkenler kullanılarak oluşturulan mutant bireylerde, bir çok önemli genin tanımlanması mümkün olmuştur. Bu tür mutasyonlarla direk geni tanımlamak mümkün olmasına rağmen, genin izolasyonunda bir çok zorluklarla karşılaşabilmektedir. Karşılaşılan zorluklar, mutant bireylerin oluşturulması aşamasında olabileceği gibi, gen izolasyonunun ileri aşamasında kullanılması düşünülen yöntemlerden ve tekniklerden de kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle mutasyon çalışmalarının her aşamasında ortaya çıkan zorlukları ortadan kaldırmak için, alternatif mutasyon kaynakları ve izolasyon teknikleri her geçen gün araştırılmaktadır. Son yıllarda popüler olan alternatif bir yöntem ise **insersiyon mutasyon**'dur. Diğer gen tanımlama ve izolasyon yöntemlerinde olduğu gibi gen ve gen ürünlerinin ön bilgi birikimine gerek kalmadan direk gen izolasyonunu mümkün kılan insersiyon mutasyon, canlı bir genoma yabancı bir DNA'nın (bitkilerde genellikle T-DNA ve transpozan elementi gibi) girdirilmesi olarak ifade edilebilir. Bu şekilde genoma yerleşen yabancı DNA bir genin arasına girdiğinde, o genin fonksiyonunu kaybettirerek mutasyon oluşturmakta ve bu sistem **gen mimleme** (tagging) olarak da bilinmektedir. Araya yerleşen bu yabancı DNA'nın sekans analizi bilindiğinden mutasyona uğratılan genin önce bir parçasının ve daha

1 Dr. ve Zir. Yük. Müh. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 07070 ANTALYA.

2 Zir. Yük. Müh. Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, ANTALYA.

sonrada genin tamamının kolay bir şekilde izolasyonunu mümkün kılmaktadır. Bitkilerde bize en uygun insersiyon elementini **Agrobacterium tumefaciens** vermiştir (HORSCH ve ark., 1995 ve TINLAND, 1996). **Agrobacterium** bitkileri infekte ettiğinde T-DNA'sını bitki genomuna yerleştirerek bitkide doğal olarak kalıcı mutasyonlara neden olmakta, yalnız T-DNA transfer olduğu bölgede sabit olarak kalmakta ve tekrar hareketli kılınamamaktadır. Ayrıca bir bölgede de birden fazla kopyasının bulunmasına yol açabilmektedir ( Bu durum genlerin ifade edilmesini kompleksleştirmektedir). Bununla birlikte, yapılan son çalışmalarda da T-DNA'nın rasgele olarak bitki genomuna girmediği ve akvitesi fazla olan bölgelere tercihli olarak yerleştiği belirtilmektedir (ALTMAN ve ark., 1992;). Bütün bunlar T-DNA'nın insersiyon mutasyon içerisinde kullanımı kısıtlamaktadır.

T-DNA'ya alternatif bir yöntem olarak, yine insersiyon mutasyon içerisinde yer alan transpozan elementinin kullanılması olmaktadır. Transpozan elementler genomda hareketli genler olup, bir gen arasına giriş yaptığında, o gen üzerinde kalıcı yada geçici (somatik) mutasyonlara neden olmaktadır. Transpozan elementlere Bakterilerde (Tn5), **Drosiphila melanogaster** (Meigen) (Pi), mısır (Ac/Ds, Es/Spm ve Mu), tütün (retrotranspozan benzeri bir yapı (Tnt1)) veya **Antirrhinum majus** (Tam) gibi, bir çok canlıda rastlanmıştır. Transpozan elementler özelliklerine göre çeşitli isimler altında tanımlanmış olup; jumping (sıçrayan) genler, hareketli genler, transpozan ve gen tagging (mimleme) gibi isimlerle yapılan literatür çalışmalarında karşılaşılmaktadır (AİTKEN ve ark., 1992 ve CARDON ve ark., 1993; KALOS V ZISSLER, 1990; STARICH ve ark., 1985 ve WALBOT, 1992). Transpozan elementlerinin orjinal konukçularından başka diğer canlılarda kullanma imkanlarının doğmasıyla, yapılan mutasyon çalışmaların da büyük artışlar olmuştur.

**Zea mays** veya **Antirrhinum majus** bitkilerindeki transpozan elementler daha iyi anlaşıldığından rutin olarak bu bitki genlerinin izolasyonunun da kullanılmaktadır. Bununla birlikte özellikle mısır transposable elementlerinden Activator (Ac) ve türevi olan Dissociation (Ds) en çok çalışılan transpozan elementleridir. Bunlardan Ac elementi transposase genini içermekte ve kendi kendine bir yerden diğer yere hareket edebilir. Ds ise transposase geni olmadığından kendi kendine hareket etme kabiliyetinde yoksundur ve hareketli olması için Ac elementine ihtiyaç duymaktadır. Aynı zamanda Ac/Ds transposable elementleri moleküller çalışmalarda en fazla çalışılanlar olup, sadece mısır bitkisinde değil diğer bitkilerde de (tütün, domates, patates, pirinç, havuç, Datura, legume ve **Arabidopsis** gibi) bir çok genin izole edilmesinde son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (CHARNG VE PFITZNER, 1994; THYKJAER ve ark., 1995; YODER, 1990). Bu sistem yardımıyla ilk gen izolasyonu petunya ve

**Arabidopsis** bitkilerinde yapılmıştır.

Bu derlemede genel anlamda transpozan tekniği ve özellikle de Activator (Ac) ve Dissociation (Ds) transpozan elementlerinin bitki ıslahında kullanımı hakkında bilgi verilmektedir.

## 2. TRANSPOZAN TEKNIĞİNİN SAĞLADIĞI KOLAYLIKLAR

Transposable elementlerinin kullanılmasındaki avantajları aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür;

- Mısır transposable elementlerinde Ac ve Ds mısır bitkisinden başka monikotiledon ve dikotiledon (domates, tütün, havuç ve **Arabidopsis**) bitkilerine de uygulamakta ve bir genden diğerine hareket ederek, yerleştiği yerdeki geni inaktive etmektedir. Sekans analizleri de bilindiğinden mutasyona uğrayan genlerin kolay bir şekilde izolasyonu ve tanımlanması mümkün olmaktadır.

- Transpozan mutasyonları stabil olmayıp, genellikle somatik ve çimlenme esnasında hareketli hale geçerek yeni mutasyonlara sebep olmaktadır. Örneğin Ac elementinin somatik çıkışları (hareketliliği) %50 den yüksek oranlarda olurken, F1 ve F2 nesillerinde görülen çimlenme çıkışları %1 veya daha düşük oranda olduğu bildirilmektedir. Bu yaklaşık 10.000 ya da 1.000.000 bitki arasından tek bir mutant bitkinin seçilmesi olarak ifade edilebilir (THYKJAER ve ark., 1995).

- Transpozan elementinin hareketliliği genellikle bağlı olduğu kromozomlarda daha fazla olmaktadır (BANCROFT ve ark., 1993 ve BURBIDGE ve ark., 1995 JONES ve ark., 1990). Bu özelliğinden hareket ederek transposable elementin bulunduğu bölgelerin detaylı şekilde haritalanmasında bize kolaylıklar sağlamaktadır.

- İki farklı transpozan elementi kullanıldığında, Ds elementi ve mutant fenotip arasında görülen bağlantı, Ds ve Ac elementini içeren hatların birbiriyle geriye melezlenerek Ds elementi tekrar hareketli kılınabilir. Mutant fenotipin tekrar eski özelliğini sergilemesi ise mutasyonun Ds elementi tarafından oluştuğuna delil olması açısından önemlidir.

- Transpozan elementlerle oluşan değişim genellikle kesin olmamakta ve deneysel olarak faydalı allelik çeşitliğe de yol açmaktadır.

- Transpozan elementler, bir sistemde yer alan genlerin tüm fonksiyonlarının belirlenmesinde de kullanılabilir.

- Bazı mutant bitkiler homozigot yada haploid devrede öldürücü olduğundan, genin ifadesi canlı heterozigotlarda bu sistem yardımıyla gözlenebilir.

- Transpozan elementler belirli markör genleri ve promotörlerin kontrolü altında kullanılmasıyla, hem mutant bitkiler kolaylıkla seçilebilmekte hem de transpose olması spesifik promotörlardan dolayı istenilen zamanda gerçekleştirmek mümkün olmaktadır.

### 3. TRANSPOZAN TEKNİĞİNİN KULLANILMASINDAKİ SINIRLAMALAR

Transpozan elementlerinin kullanılmasındaki sınırlamaları kısaca aşağıdaki başlıklar altında toplanabilir.

- Transpozan elementlerinin kullanımı her şeyden önce ***Agrobacterium tumefaciens***'un enfeksiyon spektrumu ile kısıtlı olmaktadır.

- Mutasyonları oluşturmak oldukça düşük oranlarda olup, transjenik bitkilerin seçimi zorlaşmaktadır.

- Birçok markör gen aynı zamanda mutant transjenik bitkileri seçmek için kullanılması zorunlu olmaktadır. Böyle bir yapının oluşturulması ek harcamalara ve zaman kaybına neden olmaktadır.

- Transpozan elementlerini stabil etmek her zaman mümkün olmamaktadır. Bu daha önceki mutanların korunamaması anlamına da gelebilir. Bu durum özellikle çimlenme ya da somatik gelişmeden sonra belli olduğundan ekstra harcamalara yol açmaktadır.

- Transpozan elementlerin sayısındaki artışlar çıkışları ve yeniden entegrasyonları etkileyerek olumsuz etki gözterebilir.

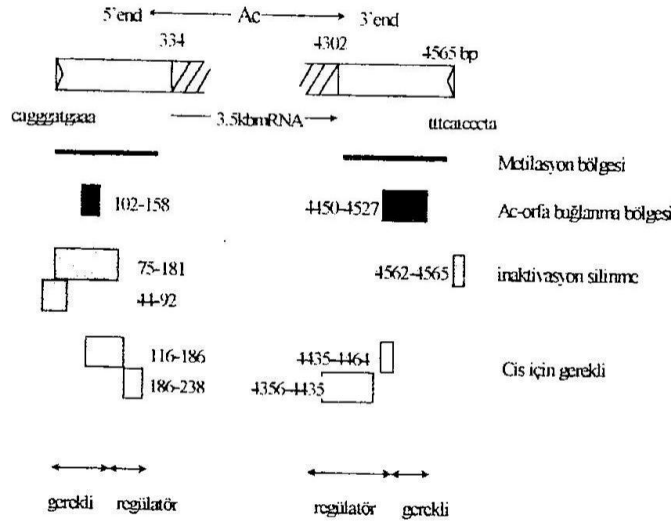
- T-DNA da olduğu gibi transpozan elementlerde daha çok bağlı olduğu bölgelere transpose ihtimali yüksek olup, aslında buda yeni ve bağımsız mutasyonların oluşumu için olumsuz bir etki olarak göz önüne alınabilir.

### 4. AC VE DS TRANSPOSOBLE ELEMENTLERİNİN BİTKİLERE UYGULAMA YÖNTEMLERİ

McClintock tarafından ilk olarak incelemeye alınan ve mısır transpozan elementlerinden **Ac** yukarıda ifade edildiği gibi iki ayrı tipde bulunmakta olup, bunlar Activator (aktif (**Ac**)) ve Dissociation (ayrışma (**Ds**)) dir. Ac transpozan elementi transposase genini içermekte ve bu enzim yardımı ile bulunduğu bölgeden ayrılarak genomdatesadüfü olarak farklı bir yere entegre olmaktadır. Transpozan elementler yaklaşık 4-6 kilo baz (kb) büyüklüğünde bir DNA parçası olup, uçları diğer transpozan elementlerinde de ortak özellik olan benzer tekrarlı baz dizilimine sahiptirler. Ds ise Ac nin farklı bir türevi olup, transposase enzimini içermediğinden transpose olabilmesi için Ac'ye ihtiyaç duymaktadır. HARING ve ark., (1991) tarafından Ac üzerinde yapılan mutasyon çalışmasında ise elementin hareket kabiliyetinden sorumlu transpozan geni ve diğer gerekli bölgeleri aşağıdaki şekil 1 de özetlenmektedir.

Tranpozan elementlerin bitkilere transferi genellikle bir vektör aracılığıyla, çoğunlukla ***Agrobacterium tumefaciens*** ile olmaktadır. ***Agrobacterium***'u transformasyonda kullanılan bütün teknikler de (infiltrasyon, injekte etme veya bulaştırma)

transpozan elementinin transferinde kullanılmaktadır. Bu sistemde transpozan elementler T-DNA'ya yerleştirilerek bitkilere transforme edilmektedir. BRUBIDGE ve ark., (1995) yaptıkları çalışmada Ac elementini spektinomisin dayanıklı geni ile onun promötörü olan 35S arasına yerleştirmiş ve oluşan yapı da T-DNA'nın BamH1 resriksiyon enziminin kesim bölgesine yerleştirilmiştir. Bu şekilde oluşturulan T-DNA bitkilere transforme edilmekte ve transforme olan bitkiler neomisin fosfotransfere II geni sayesinde kanamisine karşı dayanıklılık göstermektedir.

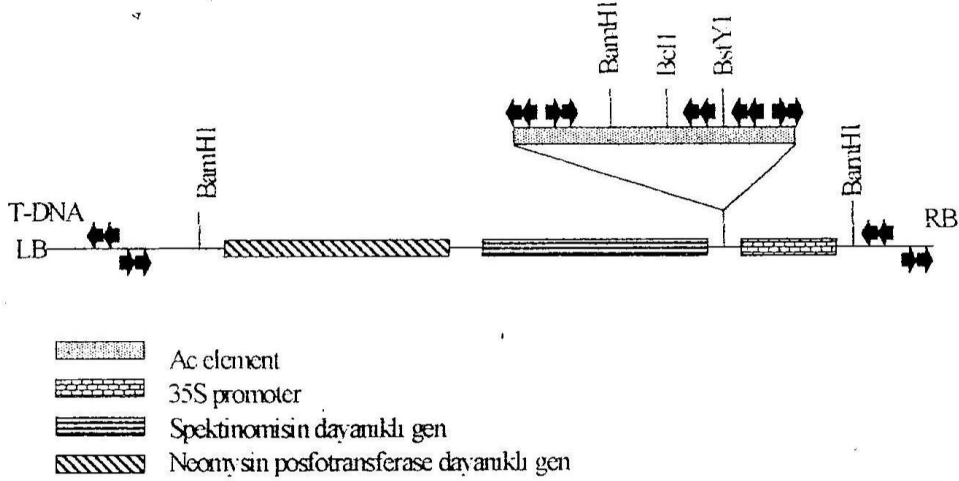


**Şekil 1.** Transpozan elementinin bazı özellikleri

Transformasyonda önemli olan transferi gerçekleştirecek olan yapının ilk önce oluşturulmasıdır. Genetik mühendisliği burada da bütün işlevlerini gösterecek ve bir çok markör gen ve spesifik promotörlerin kullanılması sayesinde, mutant bitkilerin seçimi ve transpozan elementi hareketli kılındıktan sonraki takibini kolaylaştıracak yönde olacaktır. Kullanılan markör genler, çoğunlukla antibiyotiğe ya da herbiside dayanıklı ve enzimatik özelliği olan genler (gus ve ateşböceği luciferase geni gibi)'dir (CHARNG ve PFITZNER, 1994; FEDOROFF ve SMITH 1993; FINNEGAN ve ark., 1989; LONG ve ark., 1993; THYKJAER ve ark., 1995). Bu genlerden bazıları transpozan elementin içerisine yerleştirilerek hem yeni mutasyonların seçimini kolaylaştırmakta hem de mutant fenotip ile markör genin birlikte açılımları gösterilerek elementin mutasyon tarafından oluşturduğu gösterilebilmektedir. Ayrıca T-DNA'daki markör gen Ac elementinin araya girmesiyle faaliyet göstermemekte, yalnız Ac elementinin ayrıldığında tekrar faaliyet gösterebilmektedir. Bu durum şekil 2'de açık olarak göstermiştir.

Transpozan elementlerinin kontrollü şekilde hareket etmesini sağlamak için yine son yıllarda doku spesifik promotörlerin kullanımı gündeme girmiştir. Tohumun

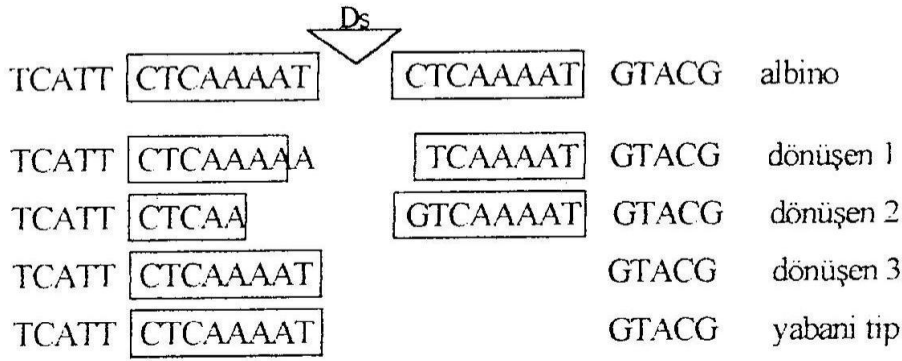
çimlenmeden başlayıp bitkinin gelişme esnasındaki herhangi bir devresinde hakim olan promotörlerin kullanılması ile gerçekleştirilebilir. Yapılan bir çalışmada da, Ds hareketini kontrol etmede ısı teşvikli bir promotör Ac



**Şekil 2.** Transpozan elementi ve kullanılan bazı markör genler

elementinin önüne yerleştirilmekte ve Ac elementinde ki transpozase geni sadece istenilen sıcaklıkta sağlandığında faaliyet göstermektedir. Transpozan elementin hareketliliği *Arabidopsis* de denenmiş ve hareketlilik bitkinin embriyo devresinde ve 42 °C de yüksek frekansda gerçekleştiği açıklanmıştır (BALCELLS ve ark., 1994).

Bir çok transpozan elementlerinde ortak özellik, buldukları bölgelerden çıktuktan sonra genomda giriş yaptığı yerde bir kaç baz çiftlik konukçu diplikasyonuna ya da bir takım silinmeler, kalıcı ve kontrolsüz mutasyonlara neden olmasıdır (Şekil 3). Ac elementinin konukçu genomuna girdiği yerde 8 baz çiftlik duplikasyon oluşturduğu belirlenmiştir. Özellikle transpozan elementlerinin kontrol edilmediğinde bu durum problem olarak karşımıza çıkabilmektedir. Transpozan element bulunduğu bölgeden ayrıldığında, duplikasyondan dolayı oluşan bir mutasyon bazen kalıcı olarak karşımıza çıkmakta ve aranılan gerçek mutasyon ile karışarak çalışmalarını zorlaştırabilmektedir. Özellikle duplikasyon problemi transpozanelementlerinin tekli bir sistemde kullandığında daha bariz olarak görülmektedir. Bu durum transpozan elementlerinin farklı promotörler aytaında problem olmaktan çıktığı bildirilmektedir.



Şekil 3. *Arabidopsis*'in albino mutasyonundaki Ds elementi yanında bulunan DNA dizilimi (Duplikasyon olayı çerçeve içerisine alınarak gösteriliyor).

Transpozan elementinin aktivitesi, transposase enzimi tarafından ayarlanmakta olup, enzimden sonumlu bölge bağlanma bölgesi de içermektedir. Bu bölge elementin ve konukçunun nükleotip dizilimi arasındaki noktayı açan enzimleri tanımakla birlikte, elementin uçlarındaki tekrarlı baz dizilimini de tanımlamaktadır. Elementin bulunduğu yerden ayrıldığında, o bölgedeki orijinal nükleotid diziliminin tekrar eski halini alması her zaman mümkün olmayabilmektedir. Çünkü silinme ve karşılığı olamayan baz ilavesi çift sarmal yapısı olan DNA da kırılmaya sebebiyet verebilmektedir. Ayrıca transpozan elementinin mutasyon etkinliği aktif fazı, sayısı, yeri ve hedef bölgenin duyarlılığına bağlı olmaktadır (THYKJEAR ve ark., 1995). Bitkilerde beklenen bu tür değişiklikler transpozan elementlerde de olması mümkündür. Bunlar baz silinmesi ya da eklenmesi gibi mutasyonlar transpozan elementinin çıkış zamanını veya çıkış frekanslarını kullandığı gibi bu elementlerin hareketsiz kalmasına da neden olmaktadır (WALBOT, 1992).

Ac elementi gen klonlamada tek başına kullanıldığı gibi, türevi olan Ds transpozan elementi ile de birlikte kullanılmaktadır. Transpozan elementlerinin gen klonlamada ilk deneysel yaklaşımı, kendi kendine transpose olan Ac elementinin gen tagging (mimleme) olarak tek başına kullanımı olmuştur. Böyle bir yapı ile ilk gen izolasyonu ise, petunya (çiçek renk oluşumunu etkileyen gen) ve *Arabidopsis* bitkisinden gelmiştir (SCHMITHZ ve THERES, 1994). Daha sonra bir çok bitkide farklı genlerin (tütün bitkisinde Tütün Mozaik Virüsüne dayanıklı gen gibi) izolasyonu için bu yöntem kullanılmıştır (DINESH-KUMAR ve ark., 1995; YODER, 1990). Ac elementi tek başına kullanıldığında, analiz edilen dikotiledon bitkilerde Ac elementi yüksek oranda transpose olmasına rağmen, diğer bir çok bitkilerde çalışmamakta ve kullanım alanının sınırlanmaktadır. Ayrıca transpozan elementi ile birlikte açılım gösteren diğer bir çok mutant bireylere de rastlanmakta olup, buna transposable elementi hareketli kılındıktan sonra, geride bıraktığı

konukçu sekans dublikasyonun sebep olacağı gibi, mutant fenotipler yakın olarak birbirine bağlı iki Ac elementi tarafından teşvik edilen kromozom kırılmasına da yol açabilmektedir. Ac'nin bu şekilde tek başına kullanımı bize bazı genlerin izole edilmesine imkan sağlaması ile birlikte, beraberinde bir takım problemleri de beraberinde getireceği gayet açıktır. Bu yüzden Ac'nin alternatif kullanım imkanları her geçen gün araştırılmakta ve yapılan son çalışmalarda ta Ac ve türevi olan Ds elementlerinin birlikte kullanımı gündeme girmiştir (BANCROFT ve ark., 1993).

Ac ve Ds elementlerinin beraber kullanılmasındaki asıl amaç, transpozan elementlerini kontrollü olarak takip etmek ve stabil kılmaktır. İkili sistemde cis- ve trans- işlevinde rol alan elementler birbirinden ayrılmakta ve her bir element birbirinden bağımsız olarak bitkilere transforme edilmektedir (ALTMAN ve ark., 1992). Ayrılma işlemi Ac elementinin tekrarlı diziliminin bir ucundaki 11 baz çifti (bp) uzaklaştırılarak gerçekleştirilebilir ve kendi kendini transpose edebilme yeteneğinden yoksun bırakılır. Değiştirilmiş Ac elementi ataç (ciliated) Ac elementi ( $Ac_{cl}$ ) olarak da adlandırılmaktadır. Bu element birçok bitkiye transforme edilmekte ve yüksek oranda transposase aktivitesi gösteren bir hat seçilir. Ds elementi ise transpose enziminden yoksun olacak, fakat Ac elementi tarafından transpose olacak özelliğe sahip olmalıdır. Ayrıca seleksiyon işlevi ve mutant takibi Ds elementi ile olacağından elementin ayrılışını izleyeceğimiz bir indikatör geni arasına yerleştirilmelidir. Ayrıca hareketinden sonra takibini kolaylaştıracak bir diğer markör gende içermelidir. Ac elementi bitkinin ilk jenerasyonunda Ds elementinin ayrılmasına yardımcı olmakta ve sonraki jenerasyonlarda ise açılım sayesinde birbirinden ayrılmaktadır. Seleksiyon sonucu Ds elementi sonraki jenerasyonlarda (T2 bitkilerinde) stabil bırakılmaktadır.  $Ac_{cl}$  ve Ds aynı anda ya da ayrı olarak bitkilere ***Agrobacterium*** aracılığı ile transforme edilebilir. Ayrı olarak transforme edilen bitkiler ya birbirleriyle melezlenir ya da  $Ac_{cl}$  ile transforme olan hatlar tekrar Ds elementi ile de transforme edilir. Bu ikili sistemde Ac elementinin Ds elementini yeniden transpose etmesi için genoma integrasyon yeri ve kopya sayısı da önemli bir rol alabilir (ALTMAN ve ark., 1992). Örneğin artan kopya sayısının çıkışları ve entegrasyonu etkilediği bildirilmektedir (WALBOT, 1992).

Transpozan elementi tarafından gerçekleştirildiği sanılan mutant bitki bulunduktan sonra, buntardan mutasyona uğrayan genin transpozan tarafından gerçekleştirildiğini moleküler olarak tanımlamak için bitkilerden DNA'lar elde edilir ve DNA uygun bir enzim ile kesildikten (transpozan elementini kesmeyecek şekilde) sonra southern blot ile naylon membranlara aktarılır. Bunu takiben membranlar transpozanın uygun bir fragmenti (probe) ile hibridize edilerek mutant fenotip ile transpozanın birlikte açılımı ispatlanır. İstenilen özellikteki mutantlardan genin izolasyonu ise inverse PCR (iPCR)



tekniki ya da plasmid kurtarma tekniği kullanılarak gerçekleştirilir. İPCR için mutant bitkilerin DNA'ları alınır ve uygun restriksiyon enzimi ile kesilir (transpozan elementi kesilmeyecek şekilde) ve kesilen DNA fragmentlerin ligaze enzimi ile ligasyonu sağlanır. Ligasyon DNA kullanılarak inverse PCR yapılır ve transpozan elementi dışında kalan ve faaliyeti bozulan genin bir fragmenti İPCR yardımı ile çoğaltılır. Plasmid kurtama tekniğinde ise transpozan elementi içerisinde bir başka plasmid bulunduğundan mutant bitkilerden elde edilen DNA lar bir enzim ile kesilir, ligasyon edililerek ve uygun bir *Esheria coli* içerisine transforme edilir. Burada kullanılan enzim transpozan elementinin dışındaki yabancı DNA'yı da içerdiğinden transforme edilen bakteride yabancı bitkideki DNA parçası da oğaltılmış ve direk olarak istenilen genin bir parçası klonlanmış olacaktır. Her iki teknikle çoğaltılan yabancı bitki DNA sı bir enzim kullanılarak transpozan elementinden alınarak işaretlenmiş prob olarak hazırlanır. Yabancı bitki genomunda oluşan genom ya da cDNA kütüphaneleri hazırlanan prob ile hibridize edilir ve gen klonlanır. Daha sonraki çalışmalarda genin faaliyetlerinin belirlenmesi ve ispatlanması yönünde olup, normal genizole edildiğinde uygulanması gereken tüm protokoller burada da takip edilir.

## 5. SONUÇ

İnsersiyon mutasyon içersinde yer alan T-DNA ve transposonlar son yıllarda bazı avantajlı özelliklerinden dolayı gen kollamada yaygın olarak kullanılmaktadır. T-DNA mutasyonlardaki yukarıda ifade edilen bazı dezavantajlar ve transpozan elementinin diğer bitkilere uygulanma imkanlarından dolayı transpozanlar gen klonlamada daha sık şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Transpozan elementi diğer gen izolasyon yöntemlerine göre de oldukça kolay ve ucuz olarak bize gen klonlamada karşımıza çıkmaktadır. Bazı özelliklerini tekrar sıralıyacak olursak; direk gen izolasyonu, mutant özelliğe sahip bitkinin kullanılan markör genleri ile kolay olarak seçimi, mutasyonların kontrolü, kutant bitkinin tekrar eski özelliğinin iyileşmesi, gen haritalamada kullanılabilmesi, markör olarak kullanılabilme özelliği sayılabilir. Geleneksel gen klonlama metodlarında olduğu gibi transpozan elementi genin özelliklerini tanımlamakla kalmamakta, direk olarak genin izole edilebilmesini sağlamaktadır.

## ÖZET

İstenilen gen izolasyonu ve tanımlama yöntemlerine yeni ve kolay bir alternatif yöntem olarak insersiyon mutasyon burada incelenmeye alınmıştır. İnsersiyon mutasyon içersinde yer alan T-DNA ve transpozan tekniklerinin bitkilerde kullanılabilirliği ve çalışma sistemleri ele alınmıştır. Her iki yöntemde de yabancı bir DNA'nın genomda bir gen

arasına yerleşmesi ve genin işlevini kaybetmesi, sonuçta da fenotipik özelliklerinin gözlenmesidir. Burada ayrıca transpozan elementlerinden Ac ve Ds transpozan elementler incelemeye alınmış ve diğer bazı yöntemlere kıyaslanmıştır.

## Trasposable Elements and Gene Isolation

### SUMMARY

The insertion mutation as new and easy alternative methods to the gene isolation and identification was looked over in here. The usage of T-DNA and the transposon elements taken part in the insertion mutation and their work system in the plants were investigated. In both methods, a wild DNA were firstly inserted into the genome and the wild DNA-inserted gene properties known were lost, as results of this, the phenotype of its properties were observed. After that, the processes of the gene isolation were carried out. In here, some properties of Ac and Ds from insertion mutation elements were tried to give and compared to the other gene isolation methods.

### KAYNAKLAR

- AITKEN, E.A.B., CALLOW, J.A., and NEWBURRY, H.J., 1992. Mutagenesis of a Race specific Rust Resistance gene in **Antirrhinum majus** Using a Transposon-Tagging Protocol. *The Plant Journal*. 2(5),775-782.
- ALTMAN, T., SCHMIDT, R., and WILMITZER, L., 1992. Establishment of a Gene Tagging System in **Arabidopsis thaliana** Based on the maize Transposable Element Ac. *theoretical and Applied Genetics*. 84:371-383.
- BALCELLS, L., SUNDBERK, E., and COUPLAND, G., 1994. A Heat-shock Promoter Fusion to the Ac Transposase Gene Drives Inducible Transposition of a Ds Element during *Arabidopsis* Embryo Development. *The Plant Journal*. 5(5),755-764.
- BANCROFT, I., JONES, D.G. and DEAN, C., 1993. Heterologous Transposon Tagging of the DRL1 Locus in **arabidopsis**, *The PLANT CELL*, VOL:5, 631-638.
- BURBIDGE, A., GRIEVE, T.M., and WOODMAN, K.J., 1995. Strategies for Targeted Transposon tagging of ABA Biosynthetic Mutants in Tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 91:1022-1031.
- CARDON, G.H., FREY, M., SADLER, H., and GIERL, A., 1993. Mobility of the Transposable Element En/Spm in **arabidopsis thaliana**. *The Plant Journal*. 3(6),773-784.
- CHARNG, Y., PFITZNER, U.M., and PFITZNER, A.J.P., 1995. Fusion of the Inducible Promoter of the PR-1a Gene to the Activator Transposase gene. *Transactive*

- excision of a Non-autonomous Element by External and by Internal Stimuli. *Plant Science*. 106,141-155.
- DINESH-KUMAR, S. WHITEMAN, S., CHOI, D., HEHL, R., and CORR, C., 1995, Transposon Tagging of Tobacco Mosaic Virus Resistance gene N: Its possible Role in the TMV-N-mediated Signal Transduction Pathway. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol:92, 4175-4180.
- FEDOROFF, N.V. and SMITH, D.L. 1993. A Versatile System for Detecting Transposition in **Arabidopsis**, *The Plant Journal*. 3(2), 273-289
- FINNEGAN E.J., TAYLOR, B.H., CRAIG, S., and DENNIS, E., 1989 Transposable Elements Can Be Used to Study Cell Lineages in Transgenic Plants. *The Plant Cell*. vol:1, 757-764.
- HARING, M.A., ROMMENTS, C.M.T., NIJIKAMP, H.J.J., and HILLE, J., 1991. The use of Transgenic Plants to Understand Transposition Mechanisms and to Develop Transposon Tagging Strategies. *Plant Molecular Biology*. vol:16, 449-461.
- HONMA, M.A., BAKER, B.J., and WADDELL, C.S., 1993. High frequency germinal transposition of Ds in *Arabidopsis*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* vol:90, 6242-6246.
- HORSCH, R.B., FRY, J.E., HOFFMAN, N.L., EICHHOLTZ, D., ROGERS, S.G., and FRAYEL, R.T., 1985. A Simple and General Intro into Plants. *Science*. 227, 1299-1231.
- JONES, J.D., CARLAND, F., LIM, E., RALSTON, E., and DOONER, H.K., 1990. Preferential transposition of the maize element activator to linked chromosomal location in tobacco. *The Plant Cell*, vol:2, 701-707.
- KOES R., SOUER, and et al., 1995. Targeted gene inactivation in petunia by PCR-based selection of transposon insertion mutants. *Proc. Nat. Acad. Sci.* vol:92, 8149-8153.
- KALOS, M., AND ZISSLER, J., 1990. Transposon Tagging of Genes for Cell-cell Interactions in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* vol:87, 8136-8320.
- LONG, D., MARTIN, M., SUNDBERG, E., SWINBURNE, J., PUNGSOMLEE, P. and COPLAND, G., 1993. The maize transposable element system Ac/Ds a mutagen in **Arabidopsis**: Identification of an albino mutation induced by Ds insertion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* vol:90, pp. 10370-10374
- SCHMITZ, G., AND THERES, K., 1994. A Self-stabilizing Ac Derivative and its potential for transposon tagging. *The Plant Journal*. 6(5), 781-786. **Springer P.S., and at ., 1995. Gene Trap Tagging of Prolifera, an Essential MCM2-3-5-LIKE GENE**

---

**ARABIDOPSIS.** Science, vol. 268, pp. 877-880.

STARICH, T., CORDES, P., and ZISSLER, J., 1985. Transposon tagging to Detect a Latent Virus in **Myxococcus xanthus**. Science. vol:230, 541-54

THYKJAER, T., STILLER, J., HANDBERG, K., JONES, J., and STOGARD, j., 1995. The Maize transposable element Ac is mobile in the legume **Lotus japonicu** Plant Molecular Biology, 27:981-993.

TINLAND, B., 1996. The integration of T-DNA into Plant Genomes. Tens in Plant Science. 1(6), 178-184.

WALBOT, B., 1992. Strategies for Mutagenesis and Gene Cloning Using Transposon Tagging and T-DNA Mutagenesis. Annu. Rev. Plant Phsiol. Plant Mol. Biol. 43:49-82.

YODER, J.I., 1990. Rapid Proliferation of the Maize Transposable Element Activator in Transgenic Tomato. The Plant Cell. vol:2, 723-730