

5 Rekombinant DNA Teknolojisinde Konak Sistemleri

Yabani tip veya rekombinant vektörlerin replikasyonu özel hücreler içinde gerçekleştirilir, bu sayede vektörler uzun korunabilir ve hücrenin replikasyon enzimleriyle sayıları artırılır. Vektörlerin ve rekombinant vektörlerin çoğalmasını ve taşıdıkları genlerin ekspresyonunu sağlayan kullanışlı hücrelere **konak hücre** denir. Rekombinant DNA işlemlerinde bazı istisnalar dışında kullanılan en yaygın konak hücreler *E. coli* hücreleridir. Kolay ve hızlı üretilmesi, genetik yapısının iyi bilinmesi ve patojen olmamaları gibi genel özelliklerinin dışında konak hücreler bazı özelliklere sahip olmalıdır.

1. **Etkili bir şekilde transforme edilebilmelidir.** Transformasyonun etkinliği iki özelliğe bağlıdır. Bu özelliklerden biri DNA'yı hücre içine etkili bir şekilde alabilme özelliğidir. Bu mekanizma tam olarak açıklanabilmiş değildir. Transformasyonun etkinliğini belirleyen ana özellik içsel bir DNA-yıkım sisteminin varlığı veya yokluğudur. Klonlamada kullanılan konakların çoğunun köken aldığı *E. coli* K suşudur ve *hsdRMS* lokusu tarafından kodlanan bir restriksiyon modifikasyon sistemi taşır. *hsdR* geni bir endonükleaz kodlar ve bu hücredeki metillenmemiş DNA'yı keser. Bu gen bakımından mutant hücreler ise metillenmemiş DNA'yı yıkmayacak ve transformasyon etkinliğini artıracaktır.
2. **Plazmitleri kararlı bir şekilde muhafaza etmelidir.** Bir rekombinant plazmit hücrenin içine girdiğinde (içsel restriksiyon enzimlerinden kaçabildiyse) uygun bir replikasyon orijininne sahip olsa bile replikasyon ile çoğalması ve hücre içinde stabil kalması garanti değildir. Transforme edilmiş plazmitler arasındaki kısa rekombinasyonlar sonucunda moleküllerin büyüklüklerinin değişmesi ve bazı dizilerin ters dönmesi plazmit stabilitesini bozmaktadır. Bu problem genellikle hücre rekombinasyon mekanizması genlerinden *recA* geninin mutasyonu ile aşılabilmektedir. *recA* mutant konak sistemlerinde rekombinasyon minimize olmaktadır.
3. ***lacZ'* geninin ve kullanımına izin vermelidir.** Rekombinant vektör taşıyan ve yabani tip vektör taşıyan konak hücrelerin ayrılmasında kullanışlı olan *lacZ'* geni ile sağlanan mavi-beyaz seçim sistemine izinvermesi gerekir. Bunun için genellikle kromozomal *lacZ'* dizisinin silinmiş olması bu sistemin çalışmasını sağlayacaktır.

Rekombinant DNA işlemlerinde farklı amaçlar için geliştirilmiş farklı *E. coli* konak sistemleri sağlayan suşlar oluşturulmuştur. Bunlar arasında HB101, JM109, BL21 ve DH5 α . DH5 α konak suşunun genotipleri şöyledir:

F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ^-

DH5alfa'nın diğer suşlardan ayırt edici genotipleri ve oluşturdukları fenotipler şöyledir:

***lacZ* Δ M15:** X-gal içeren petrilere kolonilerin mavi/beyaz görüntülemesine izin verir.

recA1: transfer edilmiş DNA'nın stabilitesini sağlar ve istenmeyen rekombinasyonları engeller.

endA1: miniprep metoduyla saflaştırılan plazmit DNA miktarını ve kalitesini iyileştirir.