**KLONLAMADA KULLANILAN ENZİMLER**

1. Restriksiyon enzimleri : RE
2. DNA’da ve RNA’da değişikliğe sebep olan enzimler
3. **Restriksiyon enzimleri : RE**

DNA üzerinde spesifik bir baz dizisine bağlanıp fosfodiester bağından kesen enzimler.

5’ AGCT 3’ Alu I AG CT Kör uç kesim

3’ TCGA 5’ TC GA

5’ CCGG 3’ Hpa II C CGG Yapışkan uç kesim

3’ GGCC 5’ GGC C

5’ CCCGGG 3’ Sma I CCC GGG

3’ GGGCCC 5’ GGG CCC

5’ GCCCGGGC 3’ Srf I GCCC GGGC

3’ CGGGCCCG 5’ CGGG CCCG

5’ TTCGAA 3’ BsiC I TT CGAA

3’ AAGCTT 5’ AAGC TT

5’ GAATTC 3’ EcoR I G AATTC

3’ CTTAAG 5’ CTTAA G

5’ CTGCAG 3’ Pst I CTGCA G

3’ GACGTC 5’ G ACGTC

5’ GCGGCCGC 3’ Not I GC GGCCGC

3’ CGCCGGCG 5’ CGCCGG CG

1. **DNA’da ve RNA’da değişikliğe sebep olan enzimler**
2. **DNA Polimerazlar :**

**DNA Polimeraz I :** Monomer yapıda olup üzerinde 3 farklı aktivite vardır.

5’ 3’ polimeraz aktivitesi

5’ OH 3’ dNTP 5’ 3’

3’ 5’ 3’ 5’

3’ 5’ ekzonükleaz aktivitesi

5’ CC 3’ dNTP 5’ CT 3’

3’ GATCTA 5’ 3’ GATCTA 5’

5’ 3’ ekzonükleaz aktivitesi

5’CTAG 3’ 5’ 3’

3’ TC 5’ 3’ TC 5’

Yarıklı durumda da keser. Özellikle replikasyonda Okazaki parçalarındaki RNA primerlerini keser.

5’ 3’ 5’ 3’

3’ 5’ 3’ 5’

**Klenow Polimeraz :** DNA Pol I’in 5’ 3’ ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan kısmıdır.

**T4 DNA Polimeraz :** Klenow polimeraz ile aynı özelliklere sahip olup 3’ 5’ ekzonükleaz aktivitesi Klenow polimerazdan 200 kat fazladır.

**T7 DNA Polimeraz :** Klenow polimeraz ile aynı özelliklere sahip olup 3’ 5’ ekzonükleaz aktivitesi Klenow polimerazdan 1000 kat fazladır.

**Sequenaz :** T7 DNA polimerazın 3’ 5’ ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan kısmıdır. Bu genetik mühendisliği ile yapılmıştır. Sadece 5’ 3’ polimeraz aktivitesine sahiptir. DNA baz dizi analizinde kullanılır.

**Taq DNA Polimeraz :** Sıcaklığa dayanıklıdır. 95oC’de kararlı ve 72oC’de fonksiyoneldir. Sadece 5’ 3’ polimeraz aktivitesine sahiptir. PCR’da kullanılır.

**Reverse Transkriptaz (RT) :** Sadece 5’ 3’ polimeraz aktivitesine sahiptir. mRNA’dan 1.cDNA sentezinde kullanılır.

1. **RNA Polimerazlar :**

Sadece 5’ 3’ RNA polimeraz aktivitesine sahiptir.

Gen

Promoter

**SP6 RNA Polimeraz**

**T3 RNA Polimeraz** NTP

**T7 RNA Polimeraz**

Vektör

mRNA

1. **Nükleazlar :**

**Bal 31 Nükleaz :** Farklı şartlardafarklı aktiviteleri olabiliyor. 3’ 5’ Ekzonükleaz ve endonükleaz aktiviteleri beraber her iki uçtan kısaltır.

5’ 3’

3’ 5’

 5’ 3’

 3’ 5’

 5’ 3’

 3’ 5’

** Ekzonükleaz :** 5’ 3’ ekzonükleaz aktivitesi ile her iki uçtan kısaltır.

 5’ 3’ Yapışkan uçlu olmalı

 3’ 5’

**Ekzonükleaz III :** 3’ 5’ ekzonükleaz aktivitesi ile her iki uçtan kısaltır. Kör uçlu veya 3’ ucunun komplementeri varsa ( ekzonükleazdaki örnek )kısaltır.

**S1 Nükleaz, Mung Bean Nükleaz :** Tek kalıplı DNA’yı endonükleaz olarak keser.

5’ 3’

 3’ 5’

 5’ 3’

 3’ 5’

Yarıklı çift zinciri de endonükleaz olarak keser.

 5’ 3’

 3’ 5’

 5’ 3’

 3’ 5’

**RNase H :** Endonükleaz aktivitesi ile RNA’yı parçalara ayırarak 5’ 3’ ekzonükleaz aktivitesi ile kısaltır. 1. cDNA’ya komplementer olan mRNA’nın parçalara ayrılmasında kullanılır.

**DNase I :** Endonükleaz aktivitesi ile tek kalıp üzerinde yarık açar.

Mg++ Mn++

1. **Ligazlar :** 5’ ucundaki fosfat ve 3’ ucundaki OH gruplarını fosfodiester bağıyla birleştirirler.

**T4 DNA Ligaz**

**E.coli DNA Ligaz**

Yarıklı5’ OH P 3’ Her iki enzimde

 3’ 5’ birleştirir.

Yapışkan uçlu 5’ OH P 3’ [ATP] yüksek

 3’ P HO 5’ olacak.

Kör uçlu 5’ OH P 3’ Sadece T4 birleştirir.

 3’ P HO 5’ [ATP] düşük olacak.

**T4 RNA Ligaz :** DNA veya RNA’yı tek kalıplı olarak birleştirir.

1. **Uç Değiştirici Enzimler :**

**Alkalin Fosfataz :** 5’ ucundaki fosfatı uzaklaştırır.

5’ P 3’

 3’ P 5’

5’ HO 3’

 3’ OH 5’

Daha sonra radyoaktif fosfat takmak için bu işlem yapılır.

**T4 Polinükleotid Kinaz (PNK) :**

5’ ucuna radyoaktif fosfat grubu bağlar. Değiştirme reaksiyonu yapar.

5’ HO OH 3’ 5’ P OH 3’

3’ HO OH 5’ 3’HO P 5’

 32 ATP

 5’ 32P OH 3’

 3’ HO 32P 5’

**Terminal Transferaz :** 3’ ucuna nükleotidleri ekler.

5’ 3’

3’ 5’

 dGTP

5’ GGGGG 3’

 3’ GGGGG 5’

cDNA sentezinde bir yöntem olarak kullanılır.