

DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ
DERS NOTU

Prof.Dr.Serhat PABUCCUOĞLU

BİYOTEKNOLOJİ NEDİR?

Biyoteknolojinin genel olarak tanımı “Canlılar aracılığı ile ürün ve hizmet üretmektir” şeklinde yapılabilir.

Reprodüktif Biyoteknolojinin Amacı:

Genel anlamda canlılarda özellikle veteriner hekimlik ve hayvan yetiştiriciliği açısından bakıldığında *in vivo* ve *in vitro* koşullarda gen kaynaklarının uzun süreli korunması ve daha fazla sayıda yavru elde etmek temel amaçtır.

Beklenen Faydalar:

Reprodüktif biyoteknolojiden beklenen faydaları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- Yaşam içinde erkek ve dişi damızlıklardan daha fazla yavru elde edebilme
- Zorunlu kesime giden dişi damızlıklardan kesim sonrası damızlık olarak faydalanabilme
- Gen transferi ile biyoreaktör üretimi, klonlama gibi BİYOTEKNOLOJİK yöntemleri uygulayabilme

Reprodüktif Biyoteknolojinin Konuları:

Reprodüktif biyoteknoloji konuları erkek ve dişi bireyler ayrı ayrı ele alındığında farklılıklar gösterir. Bu anlamda dişilerde yapılacak biyoteknolojik çalışmalar embriyo ile ilgili konular ve hormonal mekanizmanın kontrol altına alınması olarak ikiye ayrılabilir. Erkek bireylerde yapılan çalışmalar ise temel olarak sperma ile ilgili konular ve suni tohumlamadır.

SPERMA ÜRETİMİ VE SUNİ TOHURLAMA FAALİYETLERİ

KRİYOBIYOLOJİ (DONMA BİLİMİ)

Genel Tanım: Spermatozoon, oosit gibi gametlerin ve embriyonun özel medyumları içerisinde, bir dizi soğutma aşamalarından sonra dondurulması ve -196°C gibi derin ısılarda depolanmasıdır. Kriyobiyoloji kavramının içerisinde; medyumlar, sulandırma, soğutma, dondurma ve depolama tekniklerinin yanı sıra eritme teknikleri de yer alır.

Biyolojik materyallerin dondurulmasında koruyucu olarak kullanılan malzemeler:

Biyolojik materyallerin dondurulmasında donma işleminin oluşturacağı olumsuz etkileri ortadan kaldırmak veya oluşacak hasarı en aza indirebilmek amacıyla hücrelerin bulunduğu ortama bir takım koruyucu maddeler ilave edilir. Bu maddelere genel olarak *KRİYOPROTEKTAN* adı verilir. Sperma, embvriyo, oosit ve vücut hücrelerinin dondurulmasında en yaygın olarak kullanılan kriyoprotektanlar aşağıda sıralanmıştır.

Gliserin(gliserol)

DMSO(dimetilsulfoksit)

Etilen glikol

Propilen glikol

Koruyucu özelliğe sahip glikoproteinler, lipoproteinler, albuminler, sukroz gibi polisakkaritler ve benzeri makromoleküler yapıdaki maddeler dondurulacak olan biyolojik materyallerin korunmasında kullanılmaktadır.

SPERMANIN DONDURULMASI:

Tanımı: Spermanın kazanılması, potansiyel fertilitésinin belirlenmesi, özel medyumlarda sulandırılması, soğutulması, dondurulması, derin ısılarda depolanması ve eritilmesi tekniklerini içeren bilim alanıdır.

Spermanın Kazanılması: Isı kayganlık, basınç vb. doğal ortama yakın koşulları sağlayan **sun'i vagen**'in yanısıra, ampulla ductus deferensin masajı, elektrik uyarımları vb. tekniklerle spermanın erkek hayvanlardan alınmasıdır.

Spermanın Potansiyel Fertilitésinin Belirlenmesi: Özel bir dizi testlerin yardımı ve spermanın özelliklerinin saptanmasıyla tohumlama öncesi fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesidir.

Spermatolojik Özelliklerin Belirlenmesi: Spermatozoon hareketi, canlılığı ve morfolojisinin incelenerek, fertilizasyon yeteneği olan spermatozoonların oran ve sayılarının saptanmasıdır.

Hamster Testi: İn vitro koşullarda, kapasite olmuş spermatozoonun, zonasız hamster oositine penetrasyon yeteneğinin belirlenmesidir.

Hipo-Osmatik Test: 37°C'lik Hipoosmatik medyumda 30-60 dakika inkübasyon sonrası, canlı spermatozoonların şişmesine dayanan testtir.

Dayanıklılık Testleri: Spermanın 40-42°C gibi yüksek veya 5°C düşük ısılarda canlı kalabilme süresine dayalı testtir.

Sperma Sulandırıcıları (medyum): Spermatozoa ani ısı değişimlerine karşı hassastır ve böyle ortamlarda hareketi, canlılığı ve morfolojisi zarar görür. Bu nedenle spermaya; soğutma, dondurma ve eritme aşamalarındaki ani ısı değişimlerinden

koruyan sulandırıcılar ilave edilir. Sulandırıcılar içinde bulunan ve spermayı ısı değişiklerinden koruyan maddelere **kriyoprotektif maddeler** adı verilir. En önemli kriyoprotektif maddeler gliserol ve glikoprotein yapıdaki makromoleküllerdir.

Soğutma Teknikleri: Her ne kadar kriyoprotektif madde iğerse de sulandırılmış sperma ani ısı değişimlerine karşı hassastır. Bu nedenle sulandırılmış sperma 5°C'ye, kademeli bir şekilde 45-120 dakikada yavaşça soğutulur. Spermatozoon hareketi 5°C'de oldukça azdır ve enerjisini uzun süre koruyabilir. Oda ısısında bir kaç saat sürede fertilizasyon yeteneğini koruyabilen sperma, sulandırılırsa ve 5°C'de saklanırsa bu yeteneğini bir kaç gün sürdürebilir. 5°C gibi düşük ısılarda spermatozoon metabolizmasının yavaşlatılarak yaşam süresinin ve buna bağlı olarak fertilizasyon yeteneğinin uzatılmasına **anabiose** adı verilir. Aynı şekilde spermanın dondurularak metabolizmasının durma noktasına yaklaştırılmasına ve böylece canlılığını yıllarca koruyabilmesine de anabiose adı verilir.

Donma Teknikleri: Spermanın dondurulmasında kullanılan tekniklerde kristalizasyonun ayrı bir önemi vardır. Özellikle ilk oluşan kristaller donmanın başarısını belirler. Kristallerin mümkün olduğunca küçük hacimde ve fazla sayıda olmaları amaçlanır. Burada kriyoprotektif maddeler ve donma hızı etkilidir.

Spermanın dondurulmasında kullanılan üç farklı yöntem bulunmaktadır.

Ampul Yöntemi: Bu yöntemde 1 ml ampullere doldurulan sperma alkol banyosunda 5°C'den -20°C'ye dakikada 1-2 °C hızla dondurulur ve bu ısıdan sonra hızla -79°C'ye soğutulularak bu ısıda depolanır

Pellet yöntemi: Bu yöntemde ise sperma 5°C ısıya soğutulduktan ve iğine gereken kriyoprotektan maddenin ilave edilmesinden sonra 0.2 ml hacimlerde -79°C'deki kuru buz üzerinde (katı CO₂) açılan oyuklarda hızla dondurulur ve donma aşaması tamamlandıktan sonra sıvı azot içerisinde (-196°C) depolanır.

Payet yöntemi: Günümüzde kullanılan en yaygın ve en başarı metot **payet yöntemidir**. 0,5 veya 0,25 ml'lik özel plastik çubuklara doldurulan sperma 5°C'den -110°C'ye 7 dakikada soğutulur. Sıvı azot buharında gerçekleştirilen bu işlem sonrasında dondurulan sperma sıvı azot içinde -196°C'de depolanır.

Eritme Teknikleri: Dondurulmuş sperma bir çok yöntemle eritse de temel prensip spermanın mümkün olduğu kadar kısa sürede eritilmesidir. Günümüzde kullanılan en yaygın ve en güvenilir yöntem spermanın 37°C'lik su banyosunda 12-30 saniyede eritme tekniğidir.

SPERMADA CİNSİYET TAYİNİ

Spermatozoada Cinsiyet Tayini: Erkek gametler (spermatozoon) X veya Y seks kromozomunu taşıyan haploid hücrelerdir. Diploid olan somatik hücreler ise dişilerde XX, erkeklerde XY seks kromozomu iğerirler. Oosit sadece X kromozomuna

sahiptir. Spermatozoon X ya da Y kromozomlarının birini taşır. Örneğin boğalarda ejakulasyon sonrası dişi genital kanallara bırakılan 6 milyar spermatozoonun yarısı X, yarısı Y seks kromozomu taşır. Sonuç olarak cinsiyet, oviduct'ta fertilizasyon anında belirlenir.

Günümüzde yapılan araştırmalarda, sun'i tohumlama uygulamaları öncesi X ve Y kromozumlu spermatozoonların labotatuvar koşullarında seperasyonu amaçlanmaktadır. Bu çalışmalarda X ve Y kromozumlu spermatozoonlar arasındaki morfolojik, fizyolojik, biyofiziksel ve immunolojik farklılıklardan yararlanılmaktadır. Örneğin; X kromozumlu spermatozoonlar daha geniştir ve uygun ortamlarda katoda doğru hareket ederler. Y kromozumlu spermatozoonlar ise daha hızlı hareket ederler. Araştırmalarda sedimentasyon, santrifüj ve elektroforetik seperasyon gibi tekniklerle X ve Y seks kromozumlu spermatozoonlar ayrıştırılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu temellere dayanan seks ayırımında maalesef istenilen başarı elde edilememiştir.

Son zamanlarda X ve Y korozomu taşıyan spermatozoonların DNA içeriklerinin miktar olarak farklı olmasından (y kromozomu x kromozomuna göre çok küçüktür) yararlanılarak vital DNA boyalarının uygulanması sonucu floresan ışığa karşı yaptıkları parıldamaların farklı olması nedeni ile bu hücrelerin ayrıştırılması yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöneme "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS) yöntemi denilmektedir. Bu yöntemle yapılan ayrıştırma sonucu yapılan tohumlamalardan%95 istenilen cinsiyette yavru elde edebilme başarısı yakalanmıştır. Piyasada bu şekilde üretilmiş dondurulmuş boğa spermaları ticari olarak satışa sunulmuş ve spermalardan yapılacak tohumlamalardan dişi yavru doğması beklenilmektedir.

Embriyolarla İlgili Reprodüktif Biyoteknoloji Konuları:

Embriyolarla ilgili yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- ✓ Embriyo transferi
- ✓ Embriyoların Dondurulması
- ✓ Kimerismus
- ✓ İdentik İkizlik
- ✓ Embriyoların İn Vitro Üretimi
- ✓ Cinsiyet Tayini
- ✓ Gen Transferi
- ✓ Klonlama

Sığırlarda Emriyo Transferi

Sığırlarda Embriyo Transferi Ne Amaçla Yapılır?

- Kıymetli damızlıklardan daha fazla yavru elde edebilmek
- Eldeki sürünün ıslahında ve safkan damızlıklara dönüştürülmesinde yararlanmak
- Hayvan ıslahı çalışmalarına hız kazandırmak

- Cinsiyeti önceden belirlenmiş embriyoların transferi ile doğrudan damızlık olarak kullanılacak dişi yavru elde etmek

Yukarıda da belirtildiği gibi embriyo transferi kıymetli damızlıklardan daha fazla yararlanmak amacıyla yapılmaktadır. Ayrıca hayvan ıslahı çalışmalarına hız kazandırmak amacıyla embriyo transferi tekniği çok yararlı bir tekniktir. Burada elimizde var olan bir sürüyü suni tohumlama uygulamaları ile 3-4 generasyonda saf ırka yaklaştırabilirken embriyo transferi kullanılarak %100 saf ırk kaliteli damızlıklardan elde edilecek olan embriyoların eldeki kötü kalitedeki sağlıklı damızlıklara transfer edilmesi ile doğacak yavrular %100 saf ırk olacağı için bir generasyonda eldeki sürünün dönüştürülmesi, iyileştirilmesi söz konusudur.

Sığırlarda Embriyo Transferi Uygulamasının Aşamaları:

- Verici (Donor) ve Alıcı (Recipient) hayvanların seçimi
- Alıcı ve Verici ineklerin östrus senkronizasyonu
- Vericilerde süperovulasyon [multiple ovulasyon (MOET)]
- Vericilerde uterus yıkaması ile embriyoların elde edilmesi
- Elde edilmiş embriyolardan sağlıklı, transfer edilebilir olanların seçilmesi ve transfer için hazırlanması
- Embriyoların alıcı hayvanların uteruslarına transfer edilmesi

Süperovulasyon Amacıyla Kullanılan Hormonlar

Normal bir östrus siklusunda inekler bir follikülden bir oosit ovule ederek bir tek embriyonun gelişmesi sağlanır. Embriyo transferi tekniğinde yavru sayısını artırmak amacıyla verici dişilere bir siklusda daha fazla follikül gelişimini sağlayabilmek için follikül gelişimini artırıcı hormonların dışarıdan verilmesi gerekir. Bu hormonlar aşağıda belirtilmiştir.

FSH: hipofiz bezinden elde edilen veya rekombinant teknoloji ile üretilmiş olan follikül stimulan hormondur.

PMSG (ECG): Gebe kısırakların kanından elde edilen, ağırlıklı olarak FSH ve kısmen de LH etkiye sahip bir hormondur.

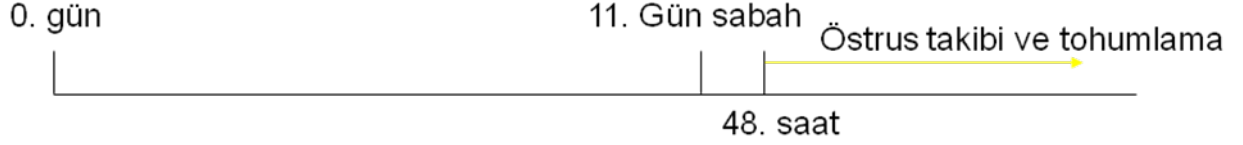
HMG: Menapoz dönemi kadınlardan elde edilen ;FSH ve LH hormonu içeren bir preparattır.

Alıcı Ve Verici Hayvanlardaki Östrus Senkronizasyonu:

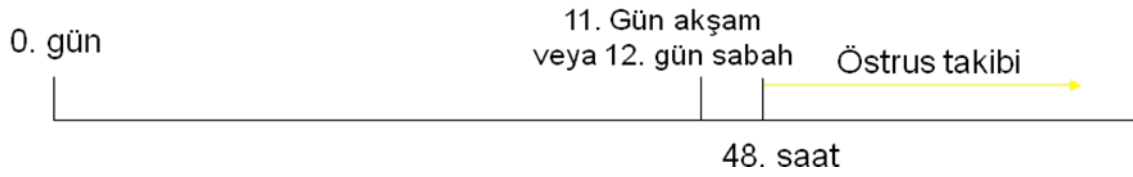
Verici annelerde gelişen embriyoların taşıyıcı annelerde gelişimlerine devam edebilmeleri için taşıyıcı ve verici annelerin sikluslarının birbirlerine denk bir hale getirilmesi gerekir. Yani her iki canlının da aynı dönemde östrus göstermeleri ve aynı dönemde ovulasyon göstermeleri gerekir. Östrus sikluslarının denk bir hale getirilmesi

için prostaglandin F2 alfa hormonundan yararlanılır. Aşağıdaki şemada bu hormonun uygulanışı ve tohumlama programları belirtilmiştir.

VERİCİLERDEKİ PROSTAGLANDİN ENJEKSİYON GÜNLERİ



ALICILARDAKİ PROSTAGLANDİN ENJEKSİYON GÜNLERİ



Verici hayvanların tohumlamaları yapılırken taşıyıcı hayvanlarda sadece östrus takipleri yapılır. Çünkü bu hayvanların yapacakları ovulasyonlarında atılan oositin döllenenmesi istenmez, bu hayvanların görevi sadece dışarıdan verilecek olan embriyoya taşıyıcılık yapmaktır.

Bu şekilde siklusları ayarlandığında vericilerin tohumlamaları gerçekleştirilir ve bütün ovule edilen oositlerin döllenenmesi sağlanır. Östrus semptomlarının görülmesinden 7 gün sonra taşıyıcı annelerin uterusları uygun tampon çözeltiler kullanılarak içinde bulunan embriyoların dışarıya alınabilmesi için yıkanır. Alınan yıkantıda embriyolar bulunur ve sağlıklı olanları seçilerek uygun alıcıların uteruslarına transfer edilir. Böylece bir uygulamada bir vericiden ortalama olarak 9 yavru elde edilebilir. Bu uygulama bir içinde en fazla 4 kez tekrarlanabileceği göz önüne alındığında bir inekten bir yıl içinde yaklaşık 36 yavru elde edebilmek mümkün olmaktadır. Oysa ki bir inek doğal yaşamı içinde ilk yavrusunu 3 yaşında dünyaya getirdiği, ekonomik ömürlerini yaklaşık 8 yaşında tamamladıkları ve her yıl bir yavru doğurdukları göz önüne alındığında toplam 5 yavru doğurabilir. Bu sayılar göz önünde tutulduğunda embriyo transferinin bize kazandıracakları açıkça görülecektir.

Embriyoda Cinsiyet Tayini:

Embriyo transferinin hayvan ıslahı ve yetiştiriciye kazandıracakları avantajların artırılması amacıyla doğacak yavruların dişi olması ve doğrudan damızlık olarak kullanılabilmesi için transfer edilecek olan embriyolarda cinsiyet tayinin yapılması büyük avantajlar kazandıracaktır. Bu amaçla embriyolarda cinsiyet tayini yöntemleri aşağıda belirtildiği tekniklerle yapılmaktadır.

- Biyopsi İle Materyal Alınması
 - Alınan Materyalde Karyotayping

- PSR Teknoloji İle Erkek (Y) Kromozomu Taraması
- FISH Tekniği İle Y Kromozomu Belirteçlerinin Kullanılması
- HY Antijen Tayini İle Erkek Embriyoların Belirlenmesi

KLONLAMA

Tanımı:

Klonlama yaşayan bir canlının somatik hücrelerinin kullanılarak genetik kopyasının oluşturulmasıdır.

Amaç:

Klonlamanın aşağıda belirtildiği gibi pek çok amacı bulunmaktadır.

1. Çok yüksek verimli damızlıklardan kopyalarını oluşturarak daha fazla yararlanma
2. Çok yüksek maliyetli Gen Transferi teknolojisinde elde edilmiş transgenik bireylerin daha düşük maliyetli klonlama ile sayısının artırılması
3. İlaç sanayinde birbirinin aynı olan bireylerden oluşan toplulukların oluşturulması ilaç etkilerinin belirlenmesi amaçlı
4. Soyu tehlike altında olan bireylerin sayısının artırılması
5. Soyu tükenmiş olan canlıların iyi korunmuş bedenlerinden DNA elde edilerek bunun türler arası aktarımlarla yeniden canlandırmak (Örn: mamut)
6. Tedavi amaçlı yaşayan bir birey için embryonik kök hücre elde edilmesi
7. Bilimsel çalışmalar

Yöntem:

Klonlama çalışmasının aşağıda sıralanan aşamaları bulunmaktadır.

Mezbahada kesilen hayvanların ovaryumları 30-35 derecelik termos içinde laboratuara taşınır ve yüzeyinde bulunan folliküllerden primer oositler elde edilir

Elde edilen oositler laboratuvar ortamında sekonder oosite olgunlaştırılır.

Sekonder oositlerin genetik materyali (kromozom setleri ve polar cisimleri) tamamen çıkarılır bunun yerine açlığa bırakılarak G0 ve G1 fazında durdurulmuş somatik hücre perivitellin aralığa bırakılır.

Somatik hücre ve oositin membranının birleşmesi için elektrik akımı ile elektrofüzyon gerçekleştirilir.

Kaynaşan hücre ile oositin embriyonal gelişime geçmesi için kimyasal aktivasyon işlemine tabii tutulur.

Aktive edilmiş olan hücreler in vitro koşullarda kültüre edilerek embriyonik gelişimler takip edilir ve uygun gelişim seviyesine gelenler taşıyıcılara transfer edilerek gebelikler takip edilir ve doğumlar gerçekleştirilir.

Transgenik hayvan üretimi:

TARANSGENİK HAYVAN ÜRETİMİNİN AMACI:

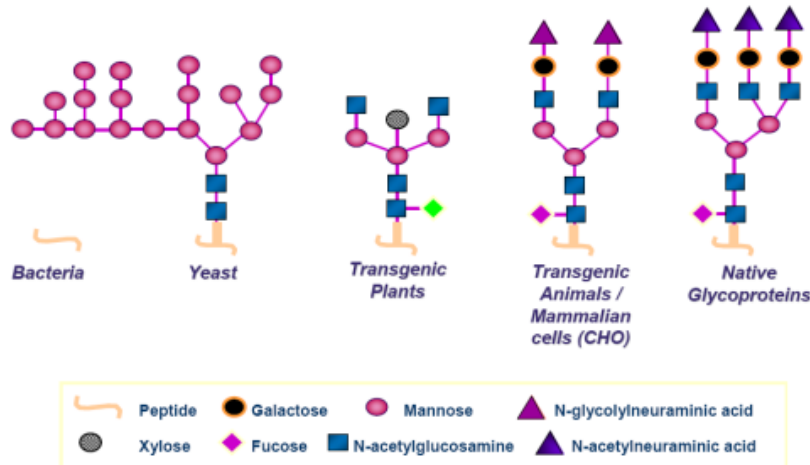
Günümüzde pek çok alanda transgenik teknolojiden yararlanılmaktadır. Çiftlik hayvanlarında bu teknolojinin amaçları aşağıdaki şekilde belirtilebilir.

- **Bioreaktör üretimi:** Terapötiklerin transgenik hayvanlardan üretilmesi (örnek: hormonlar, alfa-1-antitripsin enzime, interferon gamma gibi proteinler)
- **Xenotransplantation (türler arası organ transplantasyonu):** Çiftlik hayvanlarını organ depoları olarak kullanabilmek (örnek: Domuzlar kalp, Karaciğer vb.)
- **Model Hayvan Üretimi:** İnsanların genlerindeki mutasyonlara bağlı oluşan hastalıkları için, knock-out veya knock-in teknikleri kullanılarak model hayvanların üretilmesi (örnek: immunolojik hastalıklar, Arthritis, Multiple sclerosis vb.)
- **Hayvansal ürünlere yeni özellikler kazandırılması** (Laktaz)
- **Hastalıklara Dirençli Hayvan Üretimi** (örn: Viral hastalıklara doğuştan dirençli, mastitis vb..)

Neden Hayvanları Kullanmayı Tercih Ediyoruz?

Terapötik üretiminde çiftlik hayvanlarının bu alanda tercih edilmesinin nedenlerini şu şekilde sıralayabiliriz.

1. Hayvanlarda Peptidlerin Glycosilation'unun uygunluğu



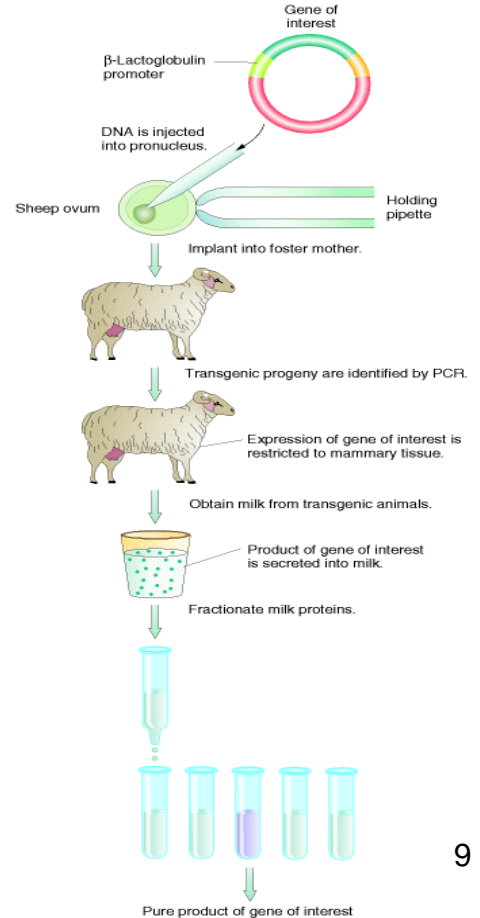
2. Fonksiyonel proteinler elde etmek için yeniden işlemler yapılmasına ihtiyaç yok!
Transgenik hayvanlarda doğrudan fonksiyonel protein sentezi gerçekleşir.
3. Süt üretiminin bolluğu ve hedeflenen fonksiyonel ürünün, basit ve kolay izolasyon teknikleri kullanılarak süttten bol miktarda elde edilmesi söz konusudur.

Kullanılan Yöntemler:

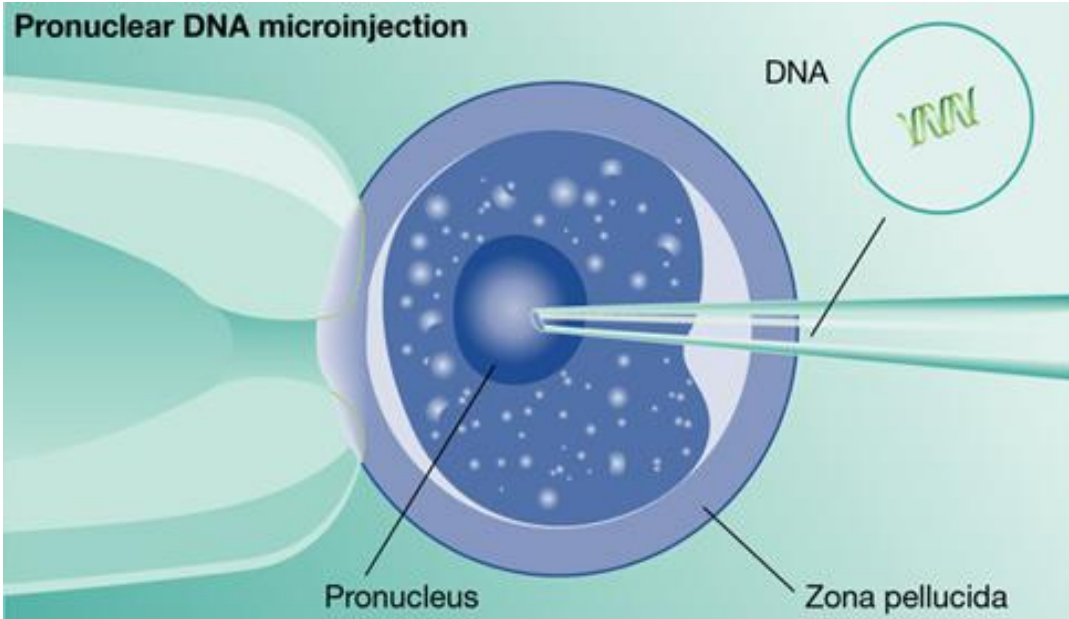
1. Pronükleer gen enjeksiyonu
2. Zigot veya embriyonun vektörler kullanılarak transfeksiyonu
 - a. Viral vektörler(retrovirus, adenovirus, lentivirus vb.)
3. Doku kültürü/Embriyonic Kök Hücre hatlarının in vitro kültür ortamında transfeksiyonu
 - a. Elektroporasyon
 - b. Viral vektörler (retrovirus, adenovirus, lentivirus ect.)
 - c. Kimyasal vektörler (kalsiyum fosfat presipitation yöntemi; Polikationik siklodekstrinler, lipit olmayan katyonik polimerler, DEAE-dekstran, vb.)
4. Spermaya genin tutturulması ile [Spermmediated gene transfer (SMGT)]gerçekleştirilen yöntem [yabancı geni üzerinde taşıyan spermatozoon ile normal oositin dölleni (ICSI)]
5. İn vivo doku transfeksiyonu (testis parankimine çeşitli vektörler kullanılarak gen enjeksiyonu ve buradan transgenik sperma üretiminin sağlanması)

1. Pronükleer Enjeksiyon ile Transgenik Hayvan Üretimi:

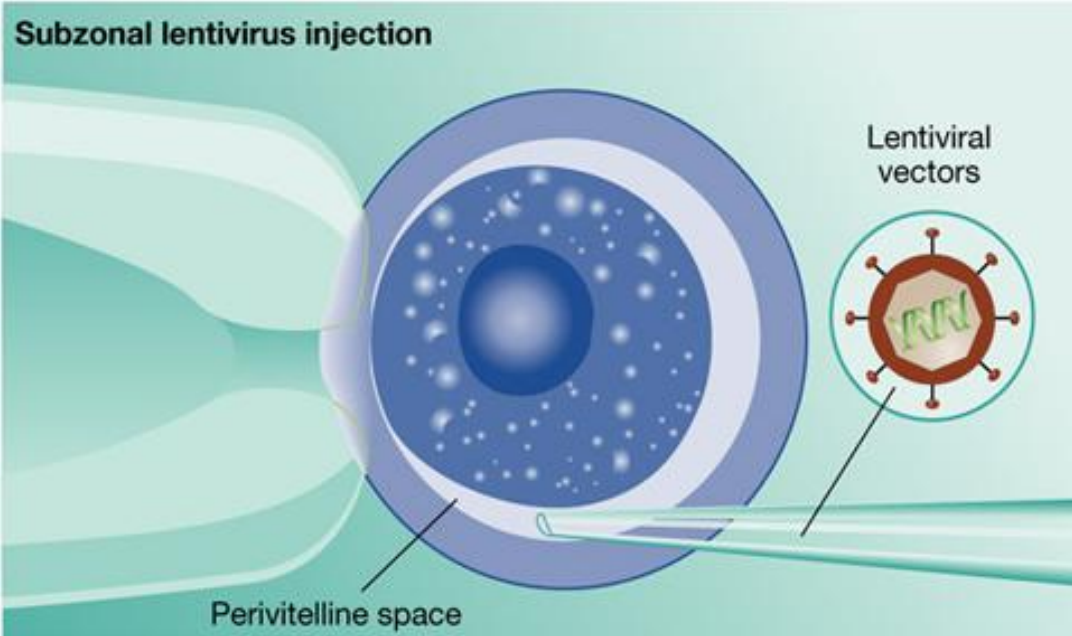
- Hedeflenen genin izolasyonu yapılır
- Bu gene β -Lactoglobulin promotorunun eklenmesi (genin meme bezinde aktif olması için) gerçekleştirilir.
- Gen konstantının pronükleusa enjeksiyonu gerçekleştirilir.
- In vitro embriyo kültürü yapılır ve uygun olan embriyolar taşıyıcı hayvanlara transfer edilir.
- Transfer edilen genin yeni doğanda taranması yapılır. Varsa transgenik olarak tanımlanır.
- Süttten transfer edilen gen ürününün izolasyonu yapılır.



Pronuclear Gen Enjeksiyonu



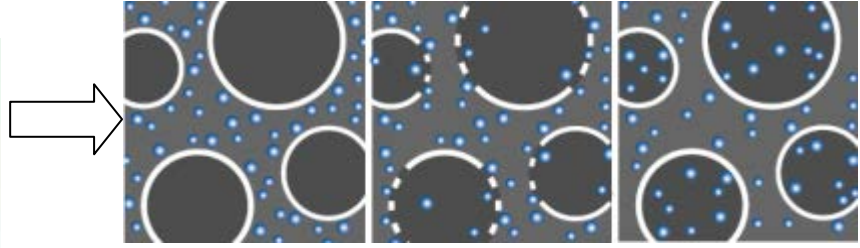
Viral Vektör Enjeksiyonu ile Zigot veya Embryo Transfeksiyonu



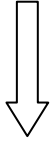
Elektroporasyon ile Transfekte Hücre Hatlarının Üretimi



Elektroporasyon küvetleri

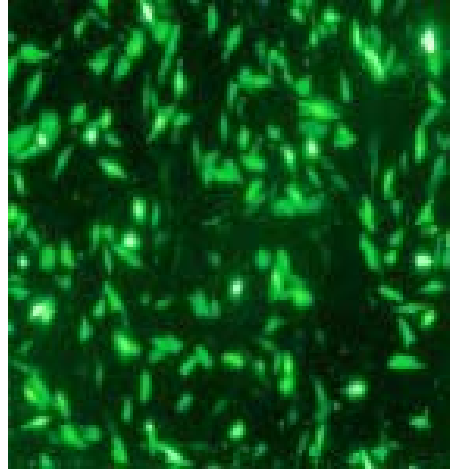


Elektroporasyon (EP) işlemi ile hücre ve çekirdek membranlarında por açılması sağlanır

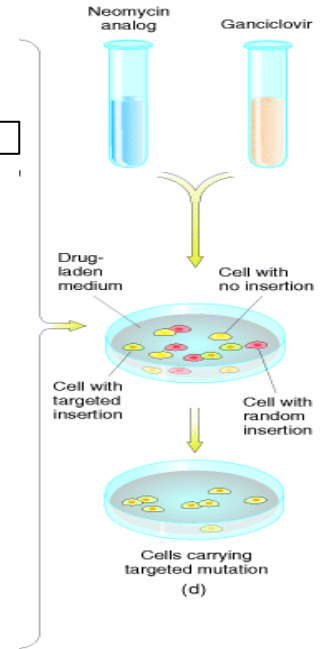


Açılan porlardan genlerin çekirdeğe ulaşması sonucu transfekte olan hücreler in vitro kültür ortamında üretilir ve seleksiyona alınır.

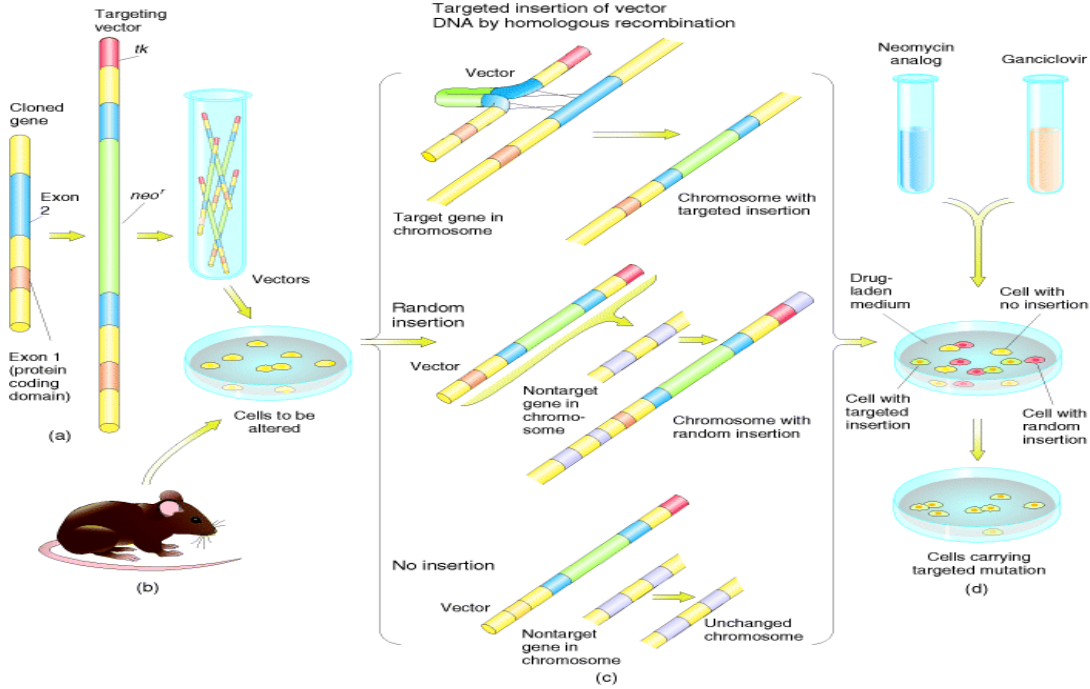
KLONLAMA
Transgenik olduğu belirlenen hücreler kullanılarak klonlama yapılır böylece doğacak olan canlıların başlangıçtan transgenik olması sağlanmış olur.



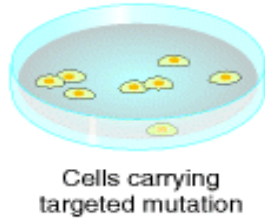
EP takiben transfekte memeli hücrelerinde GFP (Gren Floresan Protein) Ekspresyonu



Viral Vektörler Kullanılarak Transfekte Hücre hatlarının üretimi

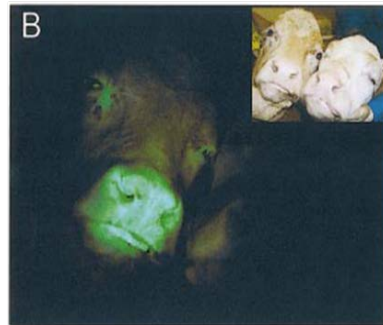


Transfekte Hücre Kullanarak Transgenik Hayvan Üretimi:



Klonlama ile transgenik embriyo üretimi

Transgenik Embriyoların Taşıyıcılara Transferi



Transgenik Yavruların Doğumu

Transfekte Embriyonik Kök Hücrelerden Transgenik Hayvan retimi

Diğer doku kültüründe yapıldığı gibi embriyonik kök hücrelerinde benzer yöntemlerle transfekte olamsı sağlandıktan sonra bu hücrelerden aŗađıda belirtilen yöntemler kullanılarak transgenik canlılar elde edilebilir.

- Agregasyon tekniği kullanılarak chimerik embriyo retimi
 - Morula agregasyonu
 - Blastosist enjeksiyonu
- Klonlama tekniği kullanılarak