

DNA Dizi Analiz Yöntemleri

DNA dizi analizleri yada sekanslama DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif yada radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. Sıklıkla gen mutasyonları (delesyon, insersiyon vb.) tespiti yada rekombinant Dna oluşum yapılarının tayininde kullanılır. Ayrıca gen regülasyonunda yer alan genetik kontrol bölgeleri, konsensus dizileri, epistatik genler ve etkileri belirlenebilmektedir. Preimplantasyon tanısı, kalıtsal hastalık tayininde oldukça kullanılır. Kalıtsal hastalık taşıyan çiftlerde tüp bebek embriyolarından alınan Dna'lar bu yöntemle analiz edilerek taşıyıcı embriyolar elenip genetik hastalık taşımayanların doğması sağlanmaktadır. Yine aynı şekilde doku uygunluğu saptanmış embriyolardan sağlıklı doğacaklardan elde edilen kordon kanı ve kemik iliği hasta kardeşlerin tedavisinde kullanılmaktadır.

İki dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitik tRNA'larla başlanmıştır. İlk olarak maya alanin tRNA dizi analiz teknikleride gelişmektedir. Nükleotit dizilein belirlenmesinde iki temel teknik kullanılmaktadır.

- Sanger dideoksi yöntemi
- Maxam-Gillbert kimyasal degradasyon yöntemi

Her iki teknik de üç temel basamaktan oluşmaktadır.

- DNA'nın hazırlanması
- Reaksiyonlar
- Yüksek voltajlı jel elektroforezi

Her iki analiz sırasında da tek iplikçikli DNA parçaları hazırlanıp DNA dizi analiz yöntemi srasundaki temel fark DNA fragmentlerinin üretilme biçiminden kaynaklanır. Jel elektroforezi yüksek çözünürlükteki DNA moleküllerini ayırttığı için her iki metotta da kullanılır.

Sanger Dizi Analiz Yöntemi

Dideoksi yada zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine tercih edilir. Bu yöntem için:

- Tek iplikçi kalıp DNA'ya
- dNTP'lere
- ddNTP
- DNA polimeraz
- Serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır

ddNTP'ler dideoksinükleosittrifosfatlardır. OH grubu taşımayan modifiyenükleotit substratlardır. Bunlar riboz şekerinin ikinci karbon atomuna ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi halde olduğundan fosfodiester bağının oluşumu engellenir yeni nükleotitler yapıya katılmaz. DNA zincir uzaması sonlanır. Bu Sanger yönteminin en can akıcı noktasıdır.

İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetric amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. Bu amaçla dizi analizinin yapılacağı kolun primer derişimi komplementer kolunkinden daha yüksek tutulur. Döngü ilerlediğinde sınırlayıcı primerin bittiği anda yalnızca uzama kolu çoğalır. Amplifikasyon bitiminde ürün ortamdaki maddelerden arındırılır. Artık tek zincirli kalıp DNA olarak kullanılmaya hazırdır.

İlk olarak reaksiyon sonunda oluşacak ürünlerin rahat görüntülenebilmesi için DNA molekülü işaretlenir. İşaretleme işlemi için genelde S^{35} , P^{33} yada P^{32} kullanılır. İşaretleme ya gama pozisyonuna yapısında bulunduran nükleotitleri kullanarak yada alfa pozisyonunda işaretli dNTP'leri kullanarak yapılır. DNA polimeraz, primer kalıp DNA ve dNTP'ler ortama konulup işaretli nükleotitin yapıya

katılması sağlanır. Kullanılan ddNTP'lerin konsantrasyonu diğer maddelerden daha düşük olmalıdır. İşaretleme primere de yapılabilir. İşaretleme sonra zincir sonlanması reaksiyonlara seçilir. Karışım dört kısma ayrılarak dört tüpe konulur. Her tüpe gerekli enzim faktörleriyle birlikte düşük derişimli farklı ddNTP'ler konulur ve inkübe edilir. ddNTP'ler ve dNTP'ler aynı karışıma konduğunda aralarında bir yarışma olur. substrat olarak dNTP'ler kullanıldığı aürece uzama devam eder. Sentezin herhangi bir noktasında yapıya dideoksi girdiğinde reaksiyon dur. Her tüpte aynı anada birbirinden bağımsız birçok reaksiyon olmuştur. Sonuçta primer sonundan başlayıp pramtüre sonlanmaların olduğu bölgelere kadar çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşur.

Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için yüksek rezölasyonlu denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Elektroforez sonunda jel kurutularak otoradyografi ile fotoğrafı çekilir. Otoradyogramdan elde edilen basamak şeklindeki bantlar radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA moleküllerine aittir. Birbirine en yakın iki bant arasında tek bir nükleotitlik fark vardır. Elektroforezde mobilitesi en hızlı olan bant primere en yakındır yani radyoaktif elemente en yakın bant en küçük DNA fragmentidir. Bu fragmen hangi ddNTP ile oluşturulmuş ise işareten sonra gelen ilk bazdır. İlk bantta en yakın ikinci bazı verir. Böylece aşağıdan yukarı doğru çıktıkça hareketi azalan bantların hangi ddNTP ile oluşturulduğu belirtilir. Sonuçta otoradyogramda ki bu bant verilerden yararlanılarak 53 yönüne doğru olan baz dizilimi saptanmış olur.

DNA Dizi Analizinde Dikkat Edilmesi Gereken Husular

- 1-Asimetrik DNA amplifikasyonunda sınırlayıcı primer 1-2 pmol'dan (10^{-6}) fazla olmamalıdır,
- 2-Amplifikasyon ürünleri temizlenmeden kullanılmamalıdır,
- 3-Kalıp DNA ile primerin birbirine oranı 1 olmalıdır,
- 4-Guanin ve isitozince zengin bölgeler sekanslanırken
Yüksek annealing sıcaklığı seçilmeli
DNA ve primer birleşmesi oda sıcaklığında en az 20 dakika olmalı
Sequeans yerine tag polimeraz kullanılmalıdır (tag polimeraz 72 derecede polimerizasyon kullanılmalıdır)
- 5-Jelde saf ve kaliteli kimyasallar kullanılmalıdır,
- 6-Eğer radyoaktif işaretleme yapacaksa S^{35} tercih edilmelidir (yarıkanma ömründen dolayı)

Maxam –Gilbert Kimyasal Degredasyon Yöntemi

Çok yönlü sekans olarak da bilinen bu yöntem de bazı kimyasallarla DNA özgül baz dizilerinden kesilerek değişik uzunlukta fragmentler elde edilir. Bu metotta bir sekans jelinden kırk klon analizi yapılabilmektedir. Yine de çok fazla tercih edilmeyen metottur. Ana mantık DNA'daki bazların tahrip edilip hasar görmüş bölgelerden piperidin ile fosfodiester bağlarının kırılmasıdır.

İlk olarak DNA parçası bir ucundan işaretlenir. İşaretleme sonrası DNA dört parçaya ayrılır. Her bir örneğe bazlardan birini tahrip edilebilecek kimyasallar eklenir. Genelde ilk pürin ve pürimidinlerin ayrımı ardında bazların ayrımı şeklinde olur. Dimetilsülfat ile müdahale pürünlerin hidrozin ile müdahale de pürimidinlerin arasındaki glikozit bağlarının kırılması sağlanır. Piperidin de fosfodiester bağlarının kırınımını katalizler.

- Dimetilsülfat, piperidine guanini bağlarken
- Dimetil sülfat, piperidine formikasıit guainin ve adenini bağlıyor
- Hidrozin ve piperidin birlikte timin ve sitozini bağlarken
- Hidrozin piperidin ve 1.5 M'lık NaCl yalnızca sitozini bağlar.

Yukarıdaki kimyasalların uygulanmasıyla oluşan çeşitli uzunluktaki fragmentler yüksek voltajlı elektroforez sonunda X-ray duyarlı film ile k kaplanarak otoradyograma alınır. otoradyografik bantlar 5>3 yönünde en alttan en üste doğru okunduğunda bize 5>3 yönündeki baz dizilimini verir.

Dna Dizi Analizinde Kullanılan Enzimler

DNA dizi analizinde çeşitli polimerazlar kullanılabilmektedir:

- Klenow Fragment/E.Coli DNA polimeraz
- Reverse Transkriptaz
- Bakteriofaj T7 DNA polimeraz
- Taq DNA polimeraz
- Sequenazlar

Klenow Fragment/E.Coli DNA polimeraz ık kullanılmasına rağmen bazı dezavantajları vardır;

Bu enzim standart olarak 250-300 nükleotitik bir dizi analizi edebilir çok zincirlerde etkisini gösteremez,

Homopolimerik bölgeleri etkin olarak çoğaltamaz (Homopolimer DNA segmentlerinin uçlarına ilave edilen poli A, poli T'lerden)

İkincil yapının olması durumunda da etkili değildir (Dyad simetri)

Reverse Transkriptaz enzimi de çok fazla kullanılmamakta dizi homopolimerik bölgeler (A/T veya G/T) bakımından zenginse tercih edilmektedir.

Tag polimeraz Klenow'un yapamadığı tüm işlevleri yapabilmektedir ve özellikle G/C bakımından zengin bölgelerde daha etkindir.

Sequenazlar Bakteriofaj T7 DNA plimerazın bir formu olup 3→5 ekzonükleaz aktivitesi kısıtlanmış bir enzimdir. Bu özelliği ddNTP'lerin bağlanmasını kolaylaştırdığından çoklukla tercih edilmektedir. Bu enzimin tamamiyle modifiye bir formu olan Sequenaz ver 2'de üç kat daha fazla aktivitesi olan bir enzimdir. Plimerizasyon oranı 300 dür. Bir reaksiyonda yaklaşık 3000 nükleotit sentezi yapılabilir. Burada sınırlayıcılar poliakrilamid jelleridir. Bu avantajlardan yararlanabilmek için iki kademeli dizilenme reaksiyonu yapılır.

Non Radyoaktif İşaretleme İle DNA Dizi Analizi

Radyoaktivitenin pahalı ve zararlı olması gibi dezavantajları olduğundan nonradyoaktif yöntemler kullanılarak DNA dizi analizi yapılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler:

- Gümüş boyama tekniğiyle
- Biotinlenmiş primer kullanılarak
- Floresans işaretleme tekniğiyle
- Magnetik parçacıklar kullanılarak
- DNA bağlayan proteinlerle
- Digoxigeninle DNA dizi analizi

Elektroforez

DNA molekülleri fosfat grubu taşıdıkları için eksi (-) yüklüdür ve anoda doğru (+kutba) hareket eder. Bu hareket DNA' nın yapısına ve uzunluğuna bağlıdır. Jel boyunca kısa DNA fragmentleri daha hızlı yol alırken uzunluk arttıkça DNA' nın hızı azalır. Her iki dizi analizi yöntemi ile elde edilen farklı uzunluklardaki fragmentlerin birbirlerinden ayrılması ve tanımlanmasında DNA'nın bu özelliği kullanılır. Birbirlerinden farklı sonlanmalara sahip reaksiyon ürünleri dört ayrı kulvarda söz konusu jel matrikse yüklenir. DNA fragmentleri oluşturulacak elektriksel alanda

uzunluklarına göre sıralanırlar ve DNA dizisi jelden okunur. Poliakrilamid jeller her iki teknik için de kullanılır ve yüksek ayırım gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller uygun süre ve uygun voltajda tek bir nükleotit farkını bile

ayırabilir. DNA dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen fragmentler jel üzerinde gümüş boyama, radyoaktif veya floresan boyalarla işaretlenerek tespit edilebilir. Otomatik DNA cihazlarının gelişmesi ile poliakrilamid jellerin yerini polikarbon bileşikler olan polimerler

almıştır. Bu polimerler yoğunluklarına göre farklı ayırım gücüne sahiptirler. Kullanılan polimer otomatik cihazlarda çapları milimetreden küçük olan cam kapilerler içine yüklenirler. Böylece poliakrilamid jellerde meydana gelen problemler en aza indirilmiş olur (Sambrook et al., 1989).

Otomatik DNA Dizi Analizi

İnsan Genom Projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizde de Sanger' in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA' nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA' ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook et al., 1989).

ABI Prism 310 Genetik Analizatörü

Kendinden önceki sistemlerden farklı olarak ABI Prism 310 Genetik Analizatörü poliakrilamid jelmatriks sistemi yerine kapiler sistem içine doldurulan polimer jelmatriks sistemi içerir. Bu polimer jelmatriks çapı nanometre ölçütlerinde olan cam borular içerisine doldurulur.

Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır. (Perkin Elmer, 2000).

Kontrol Sistemi

Tipik bir masa üstü bilgisayar sistemidir. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir. ABI Prism 310 Genetik Analizatöründe "DATA CollectionTM" programı birinci tip bilgisayar programına örnektir. "Sequance AnalyseTM" programı ise cihazın ikinci tip programıdır.

Elektroforez Ünitesi

Bu kısım hazırlanan örneğin yüklendiği ve elektroforezin gerçekleştiği kısımdır ve üç üniteden oluşur .

- 1-Örnek yükleme ünitesi.
- 2-Detektör ünitesi.
- 3-Jel blok ünitesi.

Örnek yükleme ünitesi

Yükleme ünitesinde örnek yükleme tepsisi ile tepside bağımsız 3 kuyucuk vardır. Bu üç kuyucuktan birincisine içinde yürütme tamponu bulunan tüp yerleştirilir. Bu çözelti elektroforez sırasında uygun akımın oluşmasını sağlar. İkinci ve üçüncü kuyucukta distile su bulunur. Bu kuyucuklarda kapiler sistemin örneklerle temas eden kısımlarının temizliği otomatik olarak yapılır.

Dedektör Ünitesi

Kapilerin (cam boru) bir ucu platin bir çubuğun yanındadır. Platin çubuk katot görevi görür. Platin çubuktan polimer bloğa kadar olan bölüm lazer ünitesi hariç, ısıtıcı ile sabit sıcaklıkta tutulan bir zemin üzerindedir (ısı ünitesi). Bundan sonra gelen lazer okuyucu ünitesi özel kapaklı bir kutucuk içerisinde (dedektör ünitesi). Bu ünite sonunda kapiler, polimer blok içerisinde sabitlenir.

Jel Blok Ünitesi

Jel blok ünitesi üzerinde şırınga takmak için uygun bir delik bulunur. Buraya takılan şırınga içinde kapilere doldurulacak olan stok polimer bulunur. Şırınga üzerinde bulunan bir piston ile kontrol edilir (şırınga pistonu). Polimer bloğun son kısmı ise bir kapakla yürütme çözeltisi ve anodun bulunduğu bölüme açılır.

ABI Prism 310 Genetik Analizatörü Çalışma Programı

Örnek hazırlandıktan sonra cihazda bulunan örnek tepsisine yerleştirilir ve cihaza başlama komutu verilir. Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır.(Perkin-Elmer, 2000).

1-Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 50 0C' ye çıkarır.

2-Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin platin çubuğa bağlı serbest ucu örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.

3- Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler ucu örnek tepsi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.

4-Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratılır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler ucu distile su içerisine döner.

5-Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.

6-Kapiler serbest ucu temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır.

7-Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V' ye varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest ucundan kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yaydıkları floresan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder.

ABI Prism Big Dye™ Terminatör Reaksiyon Kiti

“ABI Prism Big Dye™” terminatör reaksiyon kiti içerisinde AmpliTaq DNA polimeraz içeren bir PCR kitidir. Kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*‘ dan elde edilir. Bu enzimin 5’-3’ nükleaz aktivitesi ile fosfataz aktivitesi inhibe edilmiştir. Kiti diğer kitlerden ayrıran özellikler aşağıda sıralanmıştır (PE Applied Biosystems, 1998).

- 1-PCR aşamasında pipetlenecek tek bir karışım vardır. Bu karışıma primer ve DNA eklenir. Dolayısı ile kişisel hatalar en az seviyededir.
- 2-Çift zincirli DNA' nın denaturasyonu için bazik ortama gerek yoktur.
- 3-Tek zincirli ve çift zincirli DNA için aynı protokol uygulanır.
- 4-Az miktarda kalıp DNA' ya ihtiyaç vardır.
- 5-Daha çok tekrarlanabilir sonuç verir.

“ABI Prism Big Dye™” terminatör reaksiyon kiti içerisinde bulunan karışım içerisinde PCR için gerekli tüm kimyasallar yanında her bir bazın eşit miktarda ddNTP' leri bulunur. Bu ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir (Çizelge.2.2).Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir. Kit –15 ile –25 0C arasında saklanır. Kit tüm kalıp DNA' lar için ortak bir PCR protokolü içerir ve PCR süresi ortalama 2,5 saattir (PE Applied Biosystems, 1998).

“ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde ddNTP' lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler.

<u>ddNTP</u>	<u>Floresan Boya</u>	<u>Renk</u>
A	dR6G	Yeşil
T	dROX	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	dTAMRA	Siyah

KAYNAKLAR

- Klug, S.W., Cummings, W.R., 2000 Concept of Genetics, Prentice Hall, New Jersey 745 p..
- Maxam, A., Gilbert, W. 1977, A new method of sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74, 560-4
- PE Applied Biosystems, ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol, 1998
- xi
- Perkin Elmer, ABI 310 Genetic Analyzer Manuel, 2000.
- Sambrook, J. Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989 Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory Press New York.
- Sanger, f., Nicklen, S., Coulson, A.R., DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. 1977, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- Zülal, A., 2001, İnsan Genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, Tübitak Yayınları, Mart; 5-11