

DİZİ ANALİZİ (SEKANS) TEKNİKLERİ

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında bir çok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak DNA dizi analizi yöntemleri de gelişme göstermiştir. 1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar başlıca şu şekilde gelişmiştir (Zülal, 2001).

1965 yılında Robert HOLLEY tarafından 74 nükleotidlik bir tRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır. 1977 yılında Allan MAXAM- Walter GILBERT ve Frederick SANGER tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur. 1982 yılında Akiyoshi WADA DNA dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiştir ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır. 1986 yılında California Teknoloji Enstitüsünden (Caltech) Leroy HOOD ve Llyod SMITH tarafından DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine bulunmuştur. 1990 yılında Edward UBERBACHER tarafından bir gen bulma programı olan GRAIL kullanılmaya başlanmıştır. 1992 yılında 21. kromozomun DNA Dizisi Analizi tamamlanmıştır. 1995 yılında Craig VENTER, Claire FRASER ve Hamilton SMITH tarafından *Haemophilus influenzae*' ya ait ilk DNA dizisi yayınlanmıştır. 1996 yılında ulusal bir konsorsiyum tarafından bir ekmek mayası olan *S.cerevisiae*'nin DNA dizisi yayınlanmıştır. 1998 yılında Sanger Center ve Washington Üniversitesi bilim adamları tarafından *Caenorhabditis elegans*' in DNA dizisi açıklanmıştır. 1999 yılında İngiltere, Japonya ve ABD'den bilim adamları tarafından insanın 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır. 2000 yılında Celera ve işbirliği içinde olduğu üniversiteler tarafından *Drosophila melanogaster*' in DNA dizisi açıklanmıştır. 2000 yılı Haziran ayı içinde İnsan Genom Projesi katılımcıları ve Celera' nın insan gen haritası taslağını tamamladığı açıklanmıştır. *Arabidopsis thaliana* 2000 yılında DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur. 2003 yılında Whitehead Enstitüsünde görevli David PAGE ve arkadaşları Y kromozomunun dizi analizini tamamlamışlardır.

DNA Dizi Analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem;

- 1- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam et al.,1977).
- 2- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi. (Sanger et al.,1977).

Bu iki yöntemden, Sanger – Coulson’un yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Allan MAXAM ve Walter GİLBERT ‘in geliştirdikleri yöntemin prensibi hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit ‘in, DNA’ da bulunan bazları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır (Sambrook, et al., 1989). Bu yöntemde, nükleotit dizisi saptanacak olan DNA önce 5’- ucundan ³²P ile ya da floresan bir boya ile işaretlenir. DNA’ nın iki iplikçiği birbirinden ayrılarak ya da DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA’ nın yalnızca bir ucundan işaretlenmesi sağlanır. İkinci adımda ise DNA molekülleri dört tüpe ayrılarak A, C, G ya da T nükleotitlerini değiştirmek ve kırmak için gerekli tepkimeler gerçekleştirilir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpde farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış DNA parçaları elde edilir. Sonuçta kırılmanın olduğu pozisyona göre hepsi 5’- pozisyonlarından işaretli ancak boyları birbirinden farklı bir dizi DNA fragmenti elde edilmiş olur. Elde edilen boyları gittikçe kısalan DNA dizileri, jel elektroforezi ile birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi uygulanarak bantlar görüntülenir (Klug et al., 2000).

Maxam ve Gilbert Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Maxam ve Gilbert yönteminde özgül bazlar ile zincirlerin kırılmasında kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir (Sambrook et al., 1989).

Kimyasal kırılma yönteminde kullanılan kimyasallar.

Özgül Baz	Baza özgül kimyasal	Baz ayırmada kullanılan kimyasal	Zincir kırmada kullanılan kimyasal
G	Dimetil sülfat	Piperidin	Piperidin
A+G	Asit	Asit	Piperidin
C+T	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
C	Hidrazin+Baz	Piperidin	Piperidin
A>C	Baz	Piperidin	Piperidin

Pürinlerin kırılmasında dimetil sülfat kullanılır. Dimetil sülfat ile N₇ no’ lu pozisyonundan metillenen DNA’ ya bazik ortamda piperidin uygulanırsa DNA guanin bazından kırılır. Bazik ortam yerine asidik ortam tercih edilirse bu sefer DNA guanin yerine adenin

bazından kırılır. Pirimidin bazlarının kırılması ise hidrazin ile yapılır. Hidrazin DNA' yı hem sitozin hem de timin bazından kırar. Bu iki reaksiyonu ayırmak için ise yüksek tuz derişimi (2M NaCl) ve bazik ortam kullanılır. Yüksek tuz derişimi ile bazik ortamda DNA sitozin bazından kırılır. Dört farklı bazı ayırmada kullanılan reaksiyonlardan elde edilen parçacıklara elektroforez uygulanarak jel üzerinde yan yana yürütölmeleri sağlanır. Uygulanan elektrirksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere yol alırlar. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde saptanan parçacıklar kırılma pozisyonlarına göre okunurlar (Klug et al., 2000).

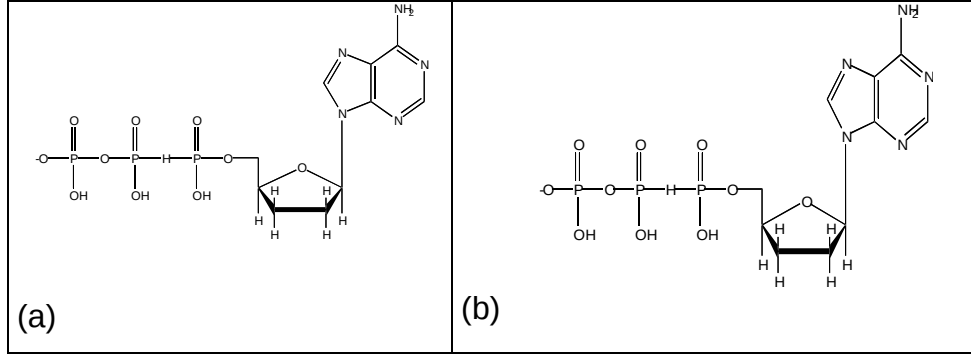
G>A	A>G	C	T
—			—
		—	
—			
—			
—			

Kimyasal kırılma yöntemi ile yapılan reaksiyonların elektroforez sonrası görüntüsü ve okuma sonucu; GGGCTG

Sanger-Coulson Zincir Sonlanma Yöntemi

DNA dizi analizinde kullanılan diğér bir yöntem de Fred SANGER ve arkadaşlarının geliştirdiğı yöntem olan zincir sonlanma yöntemidir (Sanger et al., 1977). Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve günümüzün en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniğidir. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliğı yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP' lerin (deoksiribonökleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP' leri de (dideoksiribonökleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır (Şekil 2.2). Sentezlenen DNA' ya bir ddNTP' nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP' lerin dördü ve az miktarda ddNTP' lerden birini içerir. Özgöl zincir

sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir (Klug et al., 2000).



(a) dATP (b) ddATP molekülleri.

Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektrikselsel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısıası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP' nin tipine göre okunur (Klug et al., 2000).

ddGTP	ddATP	ddCTP	ddTTP
—			—
		—	
—			
—			
—			

Enzimatik zincir sonlanma yöntemi ile yapılan reaksiyonların elektroforez sonrası görüntüsü ve okuma sonucu; GGGCTG

Sanger-Coulson Zincir Sonlanma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Primerler

Sanger-Coulson zincir sonlanma yönteminde istenilen DNA kalıbının çoğaltılması ve dizi analizinin yapılabilmesi için özgül oligonükleotitlere yani primerlere ihtiyaç vardır. Primer çiftleri kullanılacak kalıp DNA'nın genomik DNA'dan eldesinde, çoğaltılmasında kullanılır. Ayrıca primerler yöntemin son aşaması olan sonlanma reaksiyonunda polimeraz enzimi için uygun 3' ucu sağlar. Her iki reaksiyondaki primer çifti aynı olabileceği gibi farklı primerler de kullanılabilir. Gen bölgesinin elde edilmesinde kullanılan primer çifti dizi analizi yapılacak bölgenin daha dışından seçilip dizi analizi reaksiyonunda kullanılan primer ise bu primerlerin arasında ve dizinin analizi yapılacak bölgesine daha yakın olmalıdır. Sekanslama reaksiyonunda tek bir primer kullanılır ve böylece reaksiyon yönü tayin edilmiş olur (Sambrook et al., 1989).

Kalıp DNA

Sanger-Coulson zincir sonlanma yönteminde hem çift, hem de tek zincirli DNA kullanılabilir. Yöntemin birinci aşamasında polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) tekniği ile elde edilen ve çoğaltılan DNA parçası kalıp DNA olarak adlandırılır. PCR ürünü kalıp DNA, önce reaksiyon artıklarından arındırılmalıdır. Bu çok özen gösterilmesi gereken bir aşamadır. Eğer kalıp DNA yeterince temizlenemezse bir sonraki sonlanma reaksiyonuna aktarılabilecek olan kimyasallar ile primer artıkları reaksiyonun hassasiyetini bozacaktır (Sambrook et al., 1989).

Enzimler

Sanger-Coulson zincir sonlanma yönteminde bir çok tipde DNA polimeraz enzimi kullanılabilir. Bu enzimlerin ortak özellikleri özgül ve hassas olmalarıdır. Aşağıda kullanılan enzimlere örnekler verilmiştir (Sambrook et al., 1989).

E.coli Klenow Fragmenti DNA Polimeraz I

İlk geliştirilen yöntemde kullanılan bu enzimin iki büyük dezavantajı vardır. Birincisi enzimin kontrolsüz olarak çoğaltma reaksiyonlarını yarıda kesmesidir. Özellikle uzun okumalarda bu problem iyice belirginleşmektedir. İkincisi enzimin homopolimerik bölgeler ile ikincil yapısı kuvvetli olan bölgelerde istenilen verimde çalışmamasıdır (Sambrook et al., 1989).

Ters Transkriptaz

Ters transkriptaz (Reverse transcriptase) enziminin her ne kadar çok yaygın bir kullanım alanı olmasa da özellikle homopolimerik bölgelerde etkin çözüm verir. Enzim özellikle bu tip bölgelerde Klenow fragmentinden daha etkin ve kullanışlıdır (Sambrook et al., 1989).

Sekuenaz Enzimleri

Sekuenaz (SequensesTM) enzimleri T7 bakteriofajın'dan elde edilirler. Enzimin 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi inhibe edilmiştir. İnhibe edilen bu özelliği sayesinde enzim tek yönlü ve hızlı çalışır. Kalıp DNA' nın uzun olduğu deneylerde yüksek özgül aktivitesi ve dayanıklılığı ile tercih edilir (Sambrook et al., 1989).

Taq DNA Polimeraz

Özellikle tek zincirli DNA dizisinin saptanmasında tercih edilir. Sıcağa dayanıklı olduğu için yaygın kullanılan enzim türüdür. Özellikle 95 °C' da aktif olması nedeni ile homopolimerik bölgelerde bile çok etkindir (Sambrook et al., 1989).

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 kapillerler 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 jelmatiks 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 jelmatiks sistemi yerine kapiler sistem içine doldurulan polimer jelmatiks sistemi içerir. Bu polimer jelmatiks 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 Collection™” programı birinci tip bilgisayar programına örnektir. “Sequance Analyse™” programı ise cihazın ikinci tip programıdır.

Elektroforez Ünitesi

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

1-Örnek yükleme ünitesi.

2-Dedektör 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 içerisindedir (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 °C' 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 tepsisi 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 tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır.

7-Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsisi 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 ayıran 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 de 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 °C 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.

ddNTP	Florasın Boya	Renk
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., Gibert, 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

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

