

Laboratuvar Teknikleri

Sekans Tekniği

DNA, yaşayan organizmalarda genetik bilginin ana taşıyıcısıdır. DNA molekülünün çift zincirli yapısı; her biri şeker, fosfat ve dört bazın birinden oluşan (A: Adenin, C: Sitozin, G: Guanin ve T: Timin) ve nükleotid olarak adlandırılan yapısal birimlerin fosfodiester bağı ile bağlanmasıyla meydana gelir. Zincirler birbirine zıt, fakat birbirinin eşleniğidir. İki zinciri birarada tutan kuvvet, bazlar arasındaki hidrojen bağıdır. A-T nükleotidleri arasında çift bağ, G-C nükleotidleri arasında ise üçlü hidrojen bağı vardır.

1953 yılında DNA molekülünün çift sarmal yapısı James D. Watson ve Francis Crick tarafından bulunmuştur. Bu buluş onlara Nobel Ödülü'nü getirmiştir. DNA'nın çift zincir yapısının bulunmasıyla birlikte, DNA üzerine yapılan çalışmalar hızlanmıştır.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan sekanslama tekniği enzimatik yöntem olarak da adlandırılan, F. Sanger tarafından geliştirilmiş olan zincir sonlandırma tekniğidir. Diğer bir yöntem ise kimyasal yöntem olarak adlandırılan ve çoğunlukla Maxam ve Gilbert metodu olarak bilinen DNA'nın spesifik kimyasal parçalanmasına dayanan yöntemdir. Kimyasal yöntem dezavantajları nedeniyle tercih edilmemiştir ve günümüzde yaygın olarak Sanger'in geliştirdiği metod kullanılmaktadır.

Sanger'in bulduğu yöntem zaman içerisinde teknolojiye gelişmelerle paralel olarak çok daha hızlı ve verimli bir hale gelmiştir. Bugün

yaygın olarak kullanılan iki yöntemi inceleyeceğiz.

MANÜEL (OTOMATİK OLMAYAN) SEKANS YÖNTEMİ

Sanger'in zincir sonlandırma metodunun temelinde, kalıp [polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılan, sekansı yapılacak bölge], sekansı yapılacak bölgeye spesifik primer dNTP (deoksiniükleotid trifosfat)'ler, radyoaktif madde (32-fosfor, 35-sülfür veya 33-fosfor kullanılabilir), DNA polimeraz enzimi ve dört farklı dideoksiniükleotid (A, T, C ve G) gereklidir. Dideoksiniükleotidlerin diğer nükleotidlerden farkı, 3' uçlarında bir hidroksil grubunun eksik olmasıdır. Polimeraz enzimi zincire son olarak takılmış olan nükleotidin 3' hidroksil grubu ile yeni katılacak olan nükleotidin 5' fosfat grubu arasında fosfodiester bağı oluşumunu katalizler. Polimeraz enzimi bu dideoksiniükleotidi yeni sentezlenen zincire taktığında; 3' hidroksil grubunun olmamasından dolayı yeni bir nükleotid zincire takılamaz ve zincir bu noktada sonlanır. Sekans reaksiyonu sonrasında örnekler sekans jeline (üreli poliakrilamid jel) yüklenerek elektroforez yapılır. Jel önce "whatman" kağıdı üzerine alınır ve burada kurutulur, daha sonra radyoaktif ışımaya duyarlı film üzerine kapatılarak ışık almadan muhafaza edilir (otoradyogram). Film banyo edilerek film üzerinde reaksiyon okunur. Manüel sekans yönteminde yaygın olarak kullanılan iki farklı yaklaşım;

Yazışma Adresi: Dr. E. BİRBEN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi, ANKARA
e-posta: esrabirben@yahoo.com

1. Çift Zincir Sekanslama

Klasik Sanger yönteminde tek zincir kalıp olarak kullanılmasına karşın, bu yöntemde çift zincir DNA kalıp olarak kullanılır.

Sekans reaksiyonu ana hatlarıyla dört basamaktan ibarettir:

- DNA'nın denatürasyonu,
- Primerlerin kalıba yapışma (annealing),
- İşaretleme (radyoaktif madde ile) ve
- Sonlandırma

basamaklarından oluşmaktadır.

Araştırmacılar yaygın olarak T7-Polymerase kit ve Sequenase 2.0 USB-kitlerini tercih etmektedir.

2. Döngüsel Sekanslama (Cycle Sequencing)

Döngüsel sekanslama, geleneksel Sanger sekanslama metodunun bir modifikasyonudur. Deoksiniükleotidler kullanılarak 3' uçları dideoksiniükleotidle sonlanmış DNA fragmanları yapmak için polimerizasyon reaksiyonu kullanılır. Temel farklılık, döngüsel sekanslama kullanılan DNA polimerazın 95°C'de aktivitesini koruyuyor olmasıdır. Bu polimerazın kullanılmasının avantajı, DNA'nın denatürasyonu ve "annealing" basamaklarının ve zincir sentez basamağının aynı tüpte birçok defa tekrarlanması na izin vermesidir.

OTOMATİK SEKANS YÖNTEMİ

Otomatik sekans yöntemi, manüel sekanslama temelde iki büyük farka sahiptir. Birincisi, işaretleme basamağında radyoaktif madde yerine floresan boya kullanılması, ikincisi ise otoradyogram yerine lazer ve optik okuma sisteminin birarada çalıştığı, bilgilerin bilgisayar ortamına direkt taşındığı otomasyonun sağlanmasıdır.

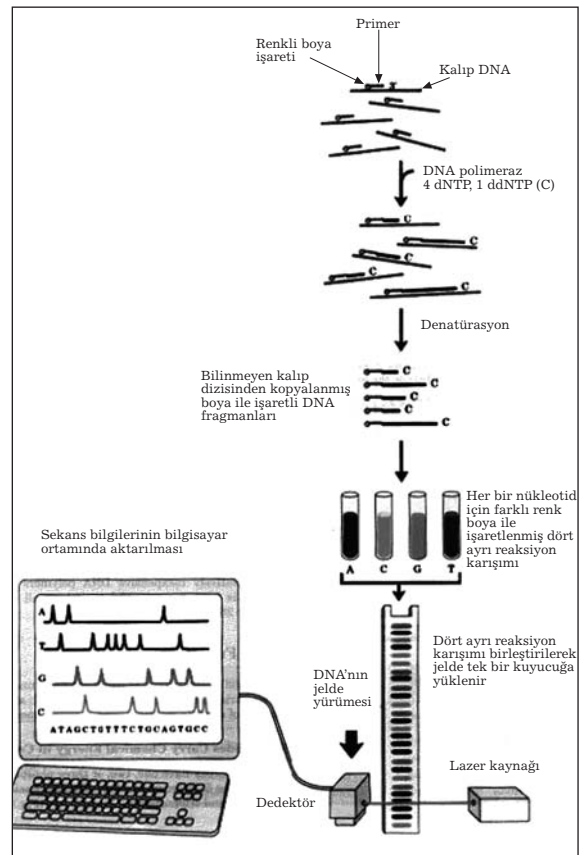
İlk otomatik sekans reaksiyonları, floresan işaretli primerler kullanılarak yapılmıştır. İlerleyen yıllarda, her bir primeri floresan işaretlemektense floresan işaretli dideoksiniükleotidler kullanılmaya başlanmıştır. Kapiller elektroforez sisteminin devreye girmesiyle birlikte, sistem daha hızlı ve etkin hale gelmiştir.

PCR ile çoğaltılan gen bölgesine ait ürün purifiye edildikten sonra floresan işaretli dideoksiniükleotidlerin kullanıldığı döngüsel sekanslama reaksiyonuna tabi tutulur. Purifikas-

yon sonrasında örnekler sekans cihazına yüklenir ve cihaz otomatik olarak örnekleri kapillere çeker, yürütür, lazer ışığı altında optik sensör tarafından okur ve okuduğu ham bilgileri bilgisayar programına aktarır (Şekil 1).

Günümüzde sekans cihazları; tek kapillerli sistemden 96 kapillerli sisteme kadar kullanıcının kullanım amacına göre geniş bir yelpazede kullanıcılara sunulmaktadır. Buna karşın kapiller sistem bireysel genom projeleri gibi büyük miktarda sekansın gerektiği projeler için yavaş ve pahalı kalmaktadır. Araştırmacılar daha hızlı ve daha ucuz sekans yapabilecekleri yeni teknolojilerin geliştirilmesi üzerinde durmaktadır.

454 Sekanslama Stratejisi ve George Church Yöntemi bu amaçla geliştirilen yeni teknik ve cihazlardan ikisidir. 454 sekanslama tekniği, büyük ölçekte sentez ile paralel giden sekanslama sistemidir. Günümüzde kullanılan GS20 sekans cihazıyla 4.5 saatte 20 megabaz büyüklüğünde bir DNA fragmanının dizisi belirlenebilmektedir.



Şekil 1. Otomatik sekans tekniği.

SEKANS TEKNİĞİNİN GENEL KULLANIM ALANLARI ve AMAÇLARI

1. De Novo Genom Sekansının Belirlenmesi

Bu uygulamanın en güzel örneği "İnsan Genom Projesi"dir. Yirmi dört insan kromozomunun her birinin sekans dizisini belirlemek amacıyla başlanmıştır. Bugün şempanze, resus maymunu, köpek, fare, sıçan, tavuk, kurbağa, balon balığı ve birçok bakteri ve virüs türlerinin genom sekans çalışmaları devam etmektedir. İnsan genom projesinde kullanılan yeni teknoloji bugün devam etmekte olan pek çok diğer organizmanın genom projelerinde de kullanılmakta ve buradan elde edilen bilgiler, biyolojik sistemin işleyişini anlamada kullanılmaktadır.

2. Gen Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi

Belirli bir dokuda ifade olan genlerin belirlenmesinde de sekans tekniği kullanılır. İzole edilen RNA'dan, revers transkriptaz enzimi kullanılarak komplementer DNA sentezi (cDNA) yapılır ve bu komplementer DNA, sekansta kalıp olarak kullanılarak dokunun ekspresyon profili ortaya çıkarılır. Ancak bu yolla yapılacak bir profillemeye işlemine unutulmamalıdır ki, seçilen dokuda bazı genler yüksek seviyede ifade olurken bazıları ise çok düşük seviyelerde ifade olacaktır. Bu tip bir deney düzeninde düşük seviyede ifade olan genlerin tespit edilememesi riski vardır.

3. Sekans Varyasyonlarının Belirlenmesi

Referans sekansa göre sekansı yapılan örnek karşılaştırılarak değişikliklerin belirlenmesinde sekans tekniği kullanılır. Bu değişiklikler tek nükleotid değişiklikleri (SNP), insersiyon ya da delesyonlar, kopya sayısı değişiklikleri, inversiyon ya da translokasyonlar olabilir.

4. Çevresel Amaçlı Sekans

Bireylerden ziyade popülasyon düzeyinde meydana gelen değişikliklerin genetik temelinin anlamak için sekans teknolojisi kullanılır. Gen

sürüklenmesi, türleşme gibi çevresel konuları araştırmada yaygın bir kullanım alanı vardır.

Yukarıda verilen kullanım alanları çok dar kapsamlı olarak genel çizgileri ile verilmiştir. Elbetteki sekans teknolojisi DNA ve RNA yapılarının kullanıldığı birçok deney sisteminde günümüzde rutin olarak kullanılan teknolojilerin başında gelmektedir.

Gelecek yıllarda sekans teknolojisinde köklü değişikliklerin olacağı, şimdikinden çok daha hızlı ve çok daha düşük maliyetle sekans yapılabileceği öngörülebilmektedir. Bu da şu anda ütopyik olarak gözüken bireysel genom projeleri ya da kişiye özgü genom projeleri gibi projeleri hayata geçirecek gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463-7.
2. Margulies M, Egholm M, Altman WE ve ark. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 2005;437:326-7.
3. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB ve ark. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Science 2005;309:1728-32.
4. <http://www.time.com/time/time100/scientist/profile/watsoncrick01.html>
5. <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA>
6. http://en.wikipedia.org/wiki/454_Life_Sciences
7. <http://seqcore.brcf.med.umich.edu/doc/educ/dnapr/sequencing.html>

Ç. KARAASLAN*,
E. BİRBEN**,
C. SAÇKESEN**

* Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi,
Moleküler Biyoloji Bölümü,

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,
Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi, ANKARA