

GEÇMİŞTEN GÜNÜMÜZE DNA İNCELEME TEKNİKLERİ VE PRENSİPLERİ

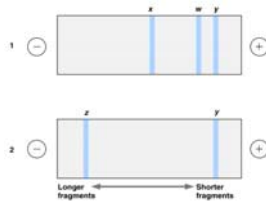
Prof.Dr.Behnan ALPER
Çukurova Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Adli Tıp Anabilim Dalı
Adana

DNA İnceleme Teknikleri

- DNA Jel Elektroforezi
- RFLP
- Restriksiyon endonükleazlar
- Southern blotlama
- Single-lokus RFLP
- Multi-lokus RFLP
- DNA parmakizi
- PCR
- PAGE-Gümüş boyama
- PAGE-Floresan işaretli primer
- Kapiller elektroferez- floresan işaretli primer
- Reverse dot blot
- Dizi analizi (radyoaktif ve floresan işaretli görüntüleme yöntemleri)
- Reverse transcriptase PCR
- Real-time PCR
- FISH
- Microarray teknolojisi

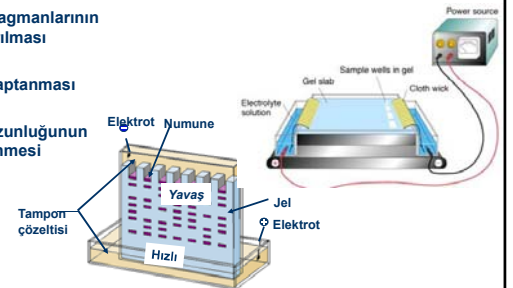
DNA Jel Elektroforezi

- DNA'nın tamamı negatif yüklüdür.
- Elektrik alanında DNA, pozitif kutba doğru hareket eder.
- Büyük DNA fragmanları daha yavaş hareket ederlerken, küçük DNA fragmanları daha hızlı hareket eder.
- Tüm jellerde, DNA'nın yanında bir **standard** da yürütülür.
 - DNA fragmanlarının gerçek uzunlukları belirlenir.



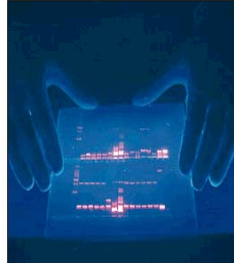
DNA Jel Elektrofrezin Aşamaları

- DNA fragmanlarının ayrıştırılması
- DNA saptanması
- DNA uzunluğunun belirlenmesi



DNA'nın Saptanması

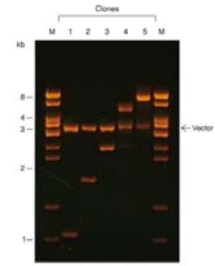
- DNA'nın görülebilir hale gelmesi için önce Ethidium Bromid (EtBr) ile işaretlenmesi gerekir.
- İşaretlenmiş DNA daha sonra UV-ışını (254 ve 365 nm) altında incelenir.



DNA uzunluğunun belirlenmesi

DNA fragmanlarının uzunlukları **standard'a** göre belirlenir.

Standard'daki DNA fragmanlarının uzunlukları daha önce firma veya araştırmacı tarafından belirlenmiştir.



RFLP

- Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kullanıldığı bu yöntemde, Restriksiyon endonükleazlar, restriksiyon bölgeleri olarak bilinen çift zincirli DNA'nın sadece spesifik baz dizilerini tanımakta ve diziyi bu bölgelerden kesmektedir.

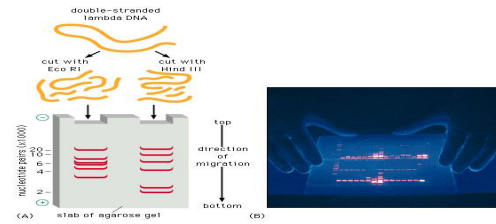
MICROORGANISM	ENZYME ABBREVIATION	SEQUENCE
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' ... G A A G A (N) ₆ ... 3' 3' ... C T T G T (N) ₆ ... 5'
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'
	<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'
<i>Providencia stuarti</i>	<i>PstI</i>	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'
<i>Micrococcus</i>	<i>MraI</i>	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G A N T C C ... 5'
<i>Nocardia otitidis-caviae</i>	<i>NaeI</i>	5' ... G C G G C C G ... 3' 3' ... C C G C G G C G ... 5'

* Notes:
 1. Enzyme produces blunt ends.
 2. The single strand is the 5' strand.
 3. The single strand is the 3' strand.
 4. The base pair N can be any purine or pyrimidine pair.
 5. The enzyme does not cut within the recognition sequence, but at whatever sequence lies eight nucleotides 3' to recognition site.
 6. *NaeI* has an eight-base recognition sequence and cuts mammalian DNA very infrequently.

RFLP'lerin saptanması

- Polimorfizmler çoğunlukla DNA'nın kodlamayan bölgelerinde görülürler.
- Bazen bir polimorfizm belirli bir RE'in kesim yerinde görülür ve RE'in tanıdığı palindromik diziyi bozar.
- Polimorfik bölge, palindromunu bozduğu RE tarafından kesilemeyeceğinden, RFLP tekniği ile ortaya konulabilir.

Uygun DNA Fragmanının seçimi



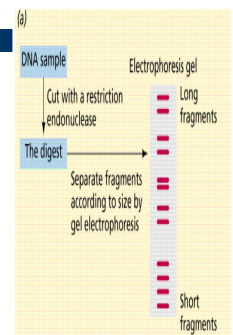
Uygun DNA Fragmanının seçimi için RE'lerle kesilmiş genomik DNA **agaroz jel** üzerinde yürütülür. Bu işleme **jel elektroforezi** denir ve DNA fragmanları büyüklüklerine göre ayrılır.

RFLP ile iki tip varyasyon tanımlanmaktadır

- Orijinal olarak spesifik bir restriksiyon enzim kesim bölgesinin varlığı veya yokluğunun ortaya çıkarılabilmesi ile popülasyonu ikiye bölen nokta mutasyonları
- Popülasyonda yüksek polimorfizm gösteren VNTR lokusları

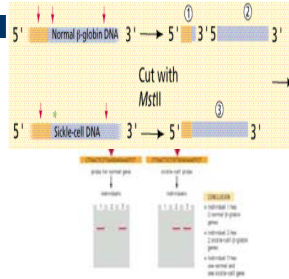
RFLP'nin aşamaları

- Biyolojik materyalden genomik DNA izole edilir, ve bunlar bir RE ile kesilirler,
- Kesilmiş DNA'lar elektroforeze tabi tutulurlar,
- Polimorfik bölge olup olmadığına bakılır (EtBr ile işaretlendikten sonra; gözle ayırt edilemiyorsa veya doğrulamak için Southern Blot'tan sonra)



RFLP- Nokta mutasyonu tayininde

- Orak hücreli anemiye yol açan nokta mutasyonu β globin geninin 6.kodunda bulunur (GAG \rightarrow GTG) ve glutamatik asit yerine valinin kodlanmasına neden olur
- Bu mutasyon aynı zamanda *MstII*'nin palindromik dizisini de bozar (*CC/TNAGG)



Southern Blot

RE ile kesilmiş ve jelde yürütülmüş olan DNA fragmanları nitrosellüloz filtreye geçirilir, DNA fragmanların filtre üzerindeki immobilizasyonu sağlandıktan sonra, filtre ^{32}P ile işaretlenmiş özgül prob ile inkübe edilir, Komplementer baz dizileri ile hibridize olmamış proplar ortamdan uzaklaştırılır, ve filtre otoradyografide kullanılan özel bir film ile inkübe edilir
Çıkan bantlar incelenir: Kaç band? Uzunlukları?

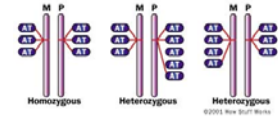


Görüntülemeye

- Radyoaktif işaretleme dışında,
- Chemiluminesance
- Veya diğer renklendirme metodları kullanılabilir.

Single-lokus RFLP

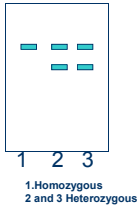
Her birey tek bir VNTR lokusu için, birini anneden diğerini babadan aldığı iki allele sahiptir.



AT - VNTR sequence
M - Maternal chromosome copy
P - Paternal chromosome copy

Single-lokus RFLP

Bu iki allel jel üzerinde her ikisi aynı uzunlukta (homozigot allele sahip kişilerde) tek bant veya farklı uzunlukta (heterozigot allele sahip kişilerde) iki bant oluşturmaktadır. Tek VNTR lokusu için oluşturulan RFLP polimorfizmi single-lokus RFLP adını alır.

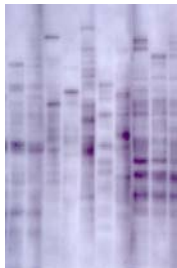


Multi-lokus RFLP

Çeşitli kromozomlardaki birden fazla lokusta bulunan tekrar dizilerin allelik varyasyonlarının her birinin aynı anda tanımlanması multi-lokus RFLP olarak tanımlanmaktadır.

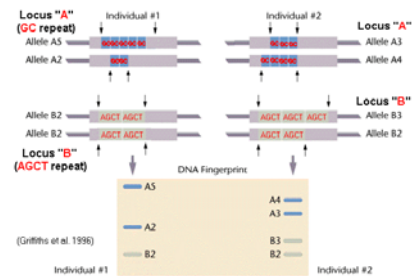
DNA fingerprinting (DNA Parmak izi)

- Multi-lokus DNA problemleri ile yapılan RFLP analizi, birey spesifik bant paterninin oluştuğu kompleks bir parça uzunluk polimorfizmi ortaya çıkarmaktadır. Tanımlanan multi-lokus polimorfizm parmakizi gibi bireye özgü olduğundan, DNA Parmak izi adı ile de anılmaktadır. (Dr.Alec Jeffreys ve arkadaşları 1985)



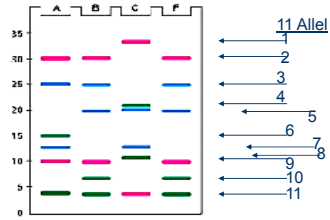
Science & Society
Picture Library
The first DNA fingerprint.

DNA parmak izi

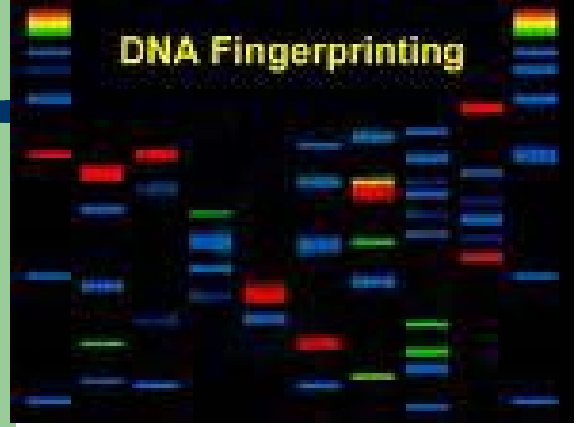


DNA Parmak izi

- F: forensic sample
- A:suspect individual 1
- B:suspect individual 2
- C:suspect individual 3
- Correspondance B=F

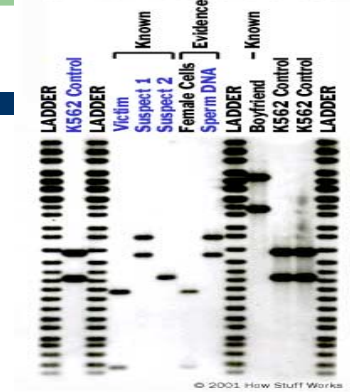


DNA Fingerprinting



- İlk kez yargıda delil olarak kullanımı İngiltere'de 1986 yılında bir seksüel saldırı ve cinayet olgusudur.
- Ardından ABD'de FBI 1988 sonbaharında rutin vaka çalışmalarında DNA parmak izi tekniğinin kullanımına başlamış ve sonrasında gelişmiş ülke laboratuvarlarına hızla girmiştir.

Sexual Assault Case

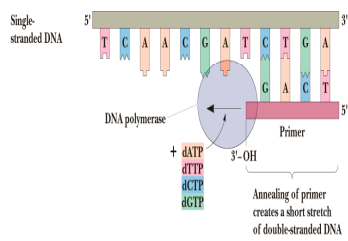


- RFLP az miktarda ama kısmen yüksek moleküler ağırlıklı DNA'ya ihtiyaç duyar. (Ortalama 20-25 kb) DNA degradasyonu fazla ise orijinali iki bantlı bir paternin tek paterninin kaybı mümkün (Bu da yanlış değerlendirmeye yol açar.)
- İşaretleme metoduna göre değişkenlik gösterse de 10-50 ng DNA'ya ihtiyaç duyulur.
- Analiz süresi PCR'a göre daha uzundur.

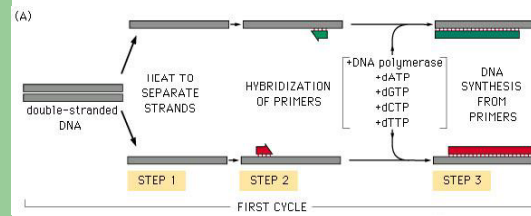
PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması veya in vitro DNA replikasyonu olarak tanımlanabilir.
- PCR ile hedef DNA dizisinin milyonlarca kopyası yapılabildiğinden, adli amaçlı kimliklendirme ve paternite tayininde özel bir yere sahiptir.

DNA Replikasyonu



DNA Replikasyonu



PCR için gerekli olanlar: Hedef DNA, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, dNTP'ler, 2 primer (forward/reverse), MgCl₂ ve tampon çözeltisi

PCR Reaksiyonu

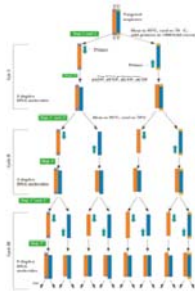
Denatürasyon; DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (95°C) ,

Annealing (yapışma); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (65°C),

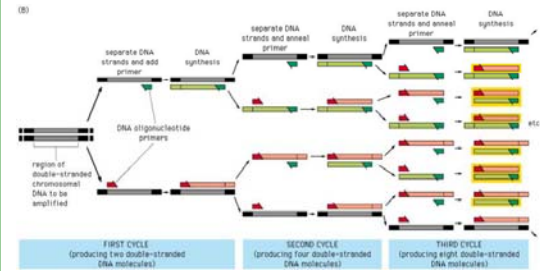
Elongasyon(uzama); zincirin uzaması ve çift iplikçikli DNA'nın sentezi (72°C)

aşamalarının belirli sayıda tekrarına dayanır.

Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur.



PCR Döngüleri

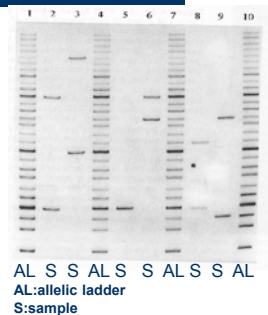


PCR'a Dayalı Polimorfizmlerin Tanımlanması

- Amplifiye parça uzunluk polimorfizmi (Amplification Fragment Length Polymorphism-AMP-FLP, STR)
- Reverse dot-blot analizi
- Dizi analizi (mitokondriyal DNA)

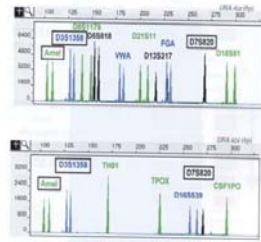
PAGE-Gümüş boyama

- PCR ile çoğaltılan STR lokusları **poliakrilamid jelde** yürütülmektedir.
- Jelde yürüyen alleller **gümüş boya** ile boyanarak tanımlanmaktadır.



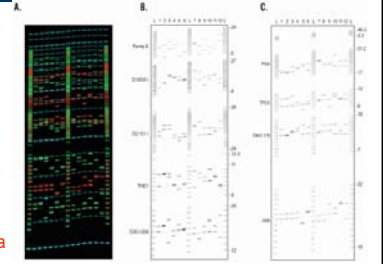
Kapiller elektroforez

- STR lokusu allelleri **floresan işaretli primerler** ile çoğaltılır (PCR).
- Farklı floresan boya ile işaretli ürünler **kapiller elektroforezde** yürütülür.
- Jelde ilerlerken **lazer ışık** kaynağı ile karşılaşır. Lazer etkisi ile **floresan boyanın yaptığı ışımaya** bir detektör aracılığı ile ölçülür.



PAGE (floresan işaretli primer kullanımı)

- **Floresan işaretli primerlerle** çoğaltılan alleller PAGE'te yürütülür.
- Üst üste gelecek alleller farklı renkte boyalarla işaretlenerek örneklerin karışması engellenir.
- Floresan imaging sistemle **boyalara uygun dalga boylarında** taranır ve bantların ayrımı yapılır.

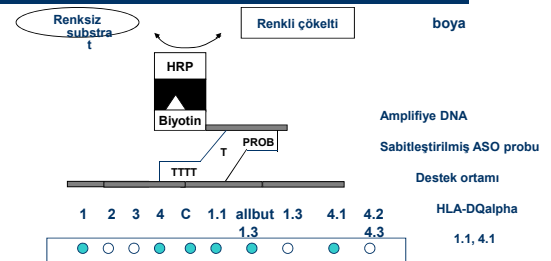


Panel A: Floresan işaretli lokusları 3 ayrı renkte gösterir (Yeşil : Penta E, D18S51, D21S11 TH01 D3S1358 Kırmızı: FGA, TPOX, D8S1179, vWA Mavi: size marker
Panel B: 505nm'de tarama (siyah-beyaz görüntü)
Panel C: 555 nm'de tarama)

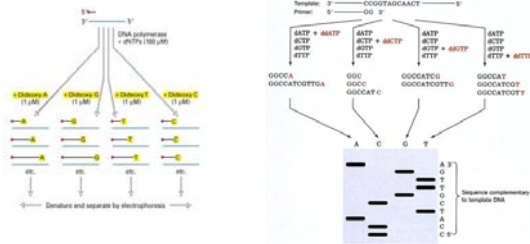
Reverse dot-blot analizi

- **Yöntem;**
- Test edilecek nükleer hücrelerden genomik DNA'nın ekstraksiyonu,
- Biyotin işaretli alel spesifik oligonükleotidlerle hedef DNA parçasının çoğaltılması,
- Amplifiye PCR ürünlerinin immobilize edilmiş problarla tam eşleşmesi,
- Streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatın biyotin işaretli PCR ürünlerine bağlanması,
- Oluşan renksiz kompleksin kromojenle mavi renge dönüştürülmesi aşamalarından oluşur.

Reverse dot-blot analizi



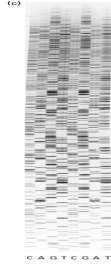
PCR – DNA Dizi Analizinde



PCR ile istenilen DNA bölgesi çoğaltılarak, dizi analizine tabi tutulabilir.

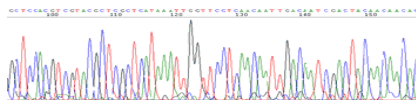
Çıkan Sonucun Değerlendirilmesi

- **Radyoaktif madde ile işaretli nukleotidlerin hangi sıraya göre dizildiklerini anlayabilmek için bunların okunmaları gerekir. Bu nedenle jel bir filme karşı tutulur ve film banyo edildikten sonra okunur**



Otomatik Dizi Analiz Cihazları

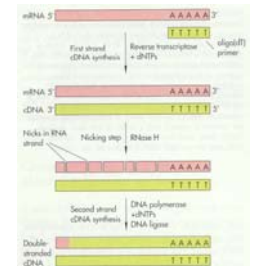
- Her baz için ayrı **fluoresans boya** ile işaretlenmiş olan ddNTP'ler kullanılır.



DNA parçacıkları jelde ilerlerken bir lazerin yanından geçerler. **Lazerle karşılaşan floresans boyanın yaptığı ışımaya** bir detektör aracılığı ile okunur.

RT-PCR

- **RT-PCR (reverse transcriptase-PCR)** ile 3'-poly (A) kuyruğuna sahip mRNA'lar amplifiye edilirler.
- Oluşan ilk ürünler RNA-DNA hibridleridir.
- İkinci turda RNA degrade edilerek, yerine bir cDNA sentez edilir = çift sarmal cDNA elde edilmiş olunur.
- Bundan sonraki döngülerde yalnızca complementer DNA'lar amplifiye edilirler.



Real-time PCR (Kantitatif PCR)

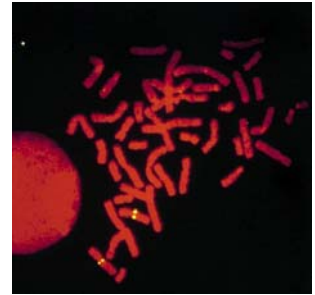
- **Real-time kantitatif PCR** gen ekspresyon seviyesini tanımlamada flourophorları kullanır.



- 1) İntact probiarda, reporter fluorescence durgundur.
- 2) Problar ve komplementer DNA zincirleri hibridize olduğunda da reporter fluorescence durgundur.
- 3) PCR esnasında, probe Taq polymerase ile degrade olur ve fluorescent reporter serbest kalır.

Fluoresans *in-situ* Hibridizasyon (FISH)

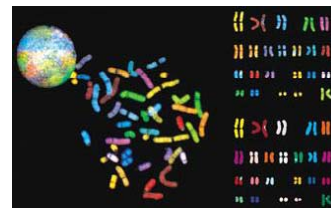
- Genleri hücre içinde incelemek için **fluoresans *in-situ* hibridizasyon (FISH)** yöntemi kullanılır. Burada **fluoresan** bir boya ile işaretlenmiş **prob**, geçirgen hale getirilmiş ve fikse edilmiş bir hücreye verilir. Hibridizasyon sonrası hücre, bir floresans mikroskobu altında incelenir.



FISH'in kullanım alanları

- Genetik hastalıkların teşhisinde
- Taşıyıcıların tanımlanmasında
- Prenatal tanı
- Preimplantasyon genetiğinde (PIG)
- Kanser tanı ve teşhisinde
- **Postcoital vajinal swab örneklerinde erkeğe ait hücrelerin işaretlenerek mikroskop altında ayıklanmasında**

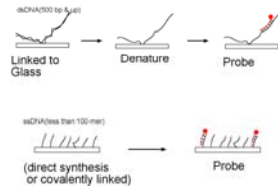
Multicolour FISH



Multicolour FISH ile birçok bölge aynı anda, farklı renklerdeki floresans boya ile işaretlendikten sonra, incelenebilir

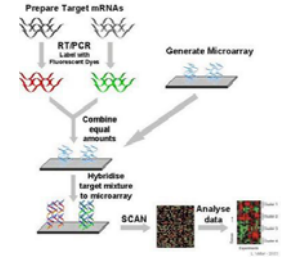
Microarray Teknolojisi

Mikroarray teknolojisi ile; yaklaşık 1.8*1.8 cm ebatlarındaki bir cam üzerinde (dizi veya array) **birden fazla DNA bölgesini** (neredeyse tüm bir genomunu) tek bir seferde yüksek hassasiyette incelemek mümkündür.



Microarray Teknolojisi

Mikroarray üzerinde aranan DNA bölgesi **floresan** veya **radyoaktif** işaretli problemlerle taranır.



Kullanım alanları

1. Hastalığa yatkınlığın önceden belirlenmesi
2. Kişiyeye özel ilaç tasarımlarının yapılabilmesi.
3. Gen tedavisi ve gene özgü ilaç üretimi
4. Yeni enerji kaynaklarının bulunması
5. **Adli tıp çalışmalarında kullanılması**
6. Genetik testlerde kullanılması
7. Tarımda sağlıklı ve çok daha verimli çiftlik hayvanlarının geliştirilmesi
8. Besin değeri yüksek ürünler geliştirilmesi
9. İslah çalışmalarında zaman kazanılması vb. birçok uygulama alanı vardır.