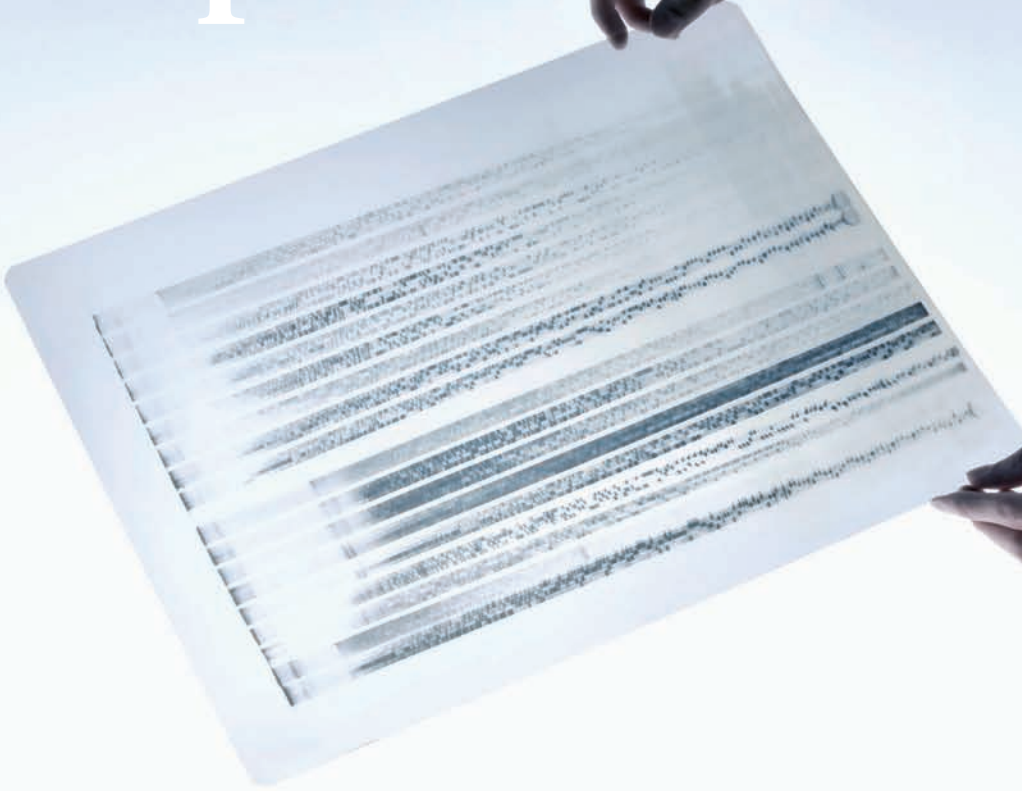


# DNA Dizi Analizi Nasıl Yapılır?



Son yıllarda kamuoyunda en çok ilgi çeken konulardan biri de genetik bilimindeki gelişmeler. Genetik bilimindeki hızlı ilerleme anahtar diyebileceğimiz kimi teknolojilerin geliştirilmesiyle mümkün oldu. DNA şifresinin çözülmesini sağlayan yöntemler bu teknolojilerin en önemlilerinden biri.

Peki, DNA şifresinin çözülmesi ne anlama geliyor? DNA aslında vücudumuzu oluşturan birçok organik molekülden biridir. Ancak onu ötekilerden daha önemli kılan, tüm biyolojik özelliklerimiz konusundaki belirleyici görevidir. DNA bu görevi, taşıdığı kalıtsal bilgi sayesinde gerçekleştirir. DNA'nın bilgi taşıyabilmesiyse özel kimyasal yapısı sağlar.

## DNA'nın Yapısı

DNA molekülü, vücudumuzdaki birçok organik molekül gibi polimer yapıdadır. Aynı ya da benzer yapıtaşı moleküllerin birbirine eklenmesiyle oluşan yapıya polimer denir. DNA'yı oluşturan yapıtaşı moleküllerin adı da nükleotiddir. DNA'yı birbirine benzer halkalardan oluşan bir zincire benzetebiliriz. Zaten DNA dizisine DNA zinciri de denir. DNA'yı oluşturan nükleotidler temelde benzer bir yapı taşımakla birlikte DNA, küçük kimyasal farkları bulunan dört tip nükleotidden, A (adenin), T (timin), G (guanin) ve C (sitozin) oluşur. Kolaylık sağlaması için nükleotidlere kısaca baz adı da verilir. DNA zincirindeki bazlar birbirine kimyasal bağlarla bağlanarak DNA zincirini oluşturur.

İşte, DNA'nın şifresini çözmek, bir DNA molekülünü oluşturan bazların (A, T, C, G) tipini ve sırasını doğru şekilde saptamak anlamına geliyor. Bunun nasıl yapılabildiğini anlamak için DNA'nın yapısını biraz daha incelememiz gerekiyor.

DNA molekülü, bazların dizilmesiyle oluşan iki zincirin birbirine sarılmasıyla oluşur. Yani DNA, çift zincirli bir yapıdır ve bu yapı "ikili sarmal" olarak da adlandırılır. Bu iki zincir, bazlar arasındaki etkileşim sayesinde bir arada durur ve böylece iki zincir üzerindeki bazlar karşılıklı konumlanmış olur. Ancak bazların DNA çift sarmalındaki bu karşılıklı konumlanması rastgele değildir. "A" tipi bir baz her zaman "T" tipi bir bazla, "C" tipi bir baz da her zaman "G" tipi bir bazla karşı karşıya gelir. Yani ikili sarmalı oluşturan iki DNA zinciri birbirini tamamlayan dizilere sahiptir.

## PCR Yöntemi

PCR (polimeraz zincir tepkimesi), DNA moleküllerini hücre dışında çoğaltmaya yarayan bir yöntemdir. Normalde hücrelerimizdeki DNA molekülleri, yani kromozomlarımız hücre bölünmesinden hemen önce eşlenir. Yani her kromozomun aynısından birer kopya sentezlenir. Bu da bölünme sonrasında oluşan her yavru hücreye eşit miktarda DNA aktarılmasını sağlar. Bilim insanları, çeşitli amaçlarla DNA molekülünün kopyalanmasını hücre dışında, deney tüpü içinde gerçekleştirmek için PCR yöntemini geliştirmiştir. Bu yöntem, doğal sürece benzer şekilde tasarlanmıştır.

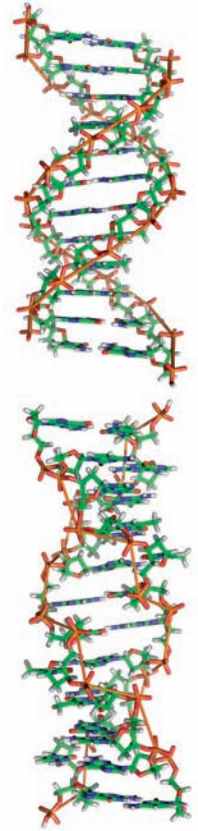
Hücre içindeki DNA eşleme sürecinde birçok protein ve enzim görev alsa da DNA sentezini asıl

## Zincir Sonlandırma Yöntemi

DNA şifresinin yani baz diziliminin çözülebilmesi, 1953'te Watson ve Crick'in DNA'nın moleküler yapısını keşfetmesinden ancak 44 yıl sonra gerçekleşebildi. 1977'de DNA dizi analizi için iki farklı yöntem geliştirildi. Bunlar ABD'li moleküler biyologlar Allan M. Maxam ve Walter Gilbert'in geliştirdiği kimyasal parçalama yöntemiyle İngiliz biyokimyacı Frederick Sanger'ın geliştirdiği zincir sonlandırma yöntemi. Başlangıçta iki yöntem de yaygın olarak kullanılıyordu. Ancak birçok nedenden dolayı günümüzde yaygın olarak kullanılan yöntem, zincir sonlandırma yöntemi oldu. Zincir sonlandırma yöntemi, daha önce geliştirilmiş olan DNA'yı hücre dışında çoğaltmayı sağlayan polimeraz zincir tepkimesi (PCR) yöntemiyle, DNA'yı dolaylı olarak görmemizi sağlayan jel analizi yöntemlerine dayanır.

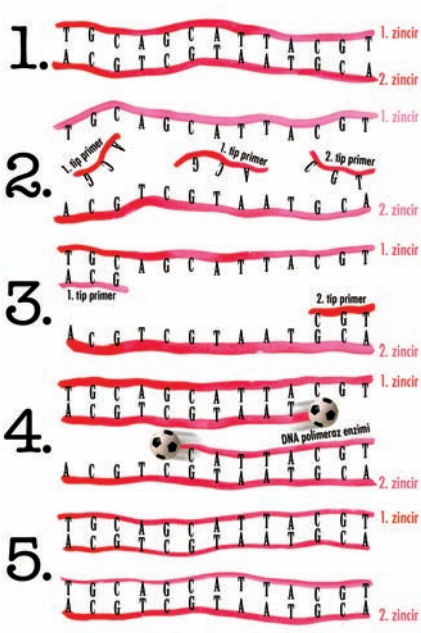
gerçekleştiren DNA polimeraz adlı bir enzimdir. Hücre içinde DNA eşlemesi kabaca şöyle gerçekleşir: Yeni DNA zincirinin sentezlenmeye başlaması için "primer" denen kısa, tek zincirli, öncül bir baz dizisi gereklidir. Normalde çift sarmal olan DNA dizisi, eşlemenin yapılacağı bölgede çeşitli enzimler yardımıyla açılarak zincirlere tek tek ulaşılabilmesi sağlanır. Primer dizisi kopyalanacak DNA molekülünün küçük bir bölümünü tamamlar niteliktedir. Böylece her bir primer dizisi kopyalanacak olan kalıp DNA'nın bir zincirine bağlanır. Yeni DNA zincirinin oluşması, DNA polimeraz enziminin primere yeni bazlar eklemesiyle gerçekleşir. Yeni DNA zincirleri, var olan zincirlerin her biri tek tek kalıp olarak kullanılarak sentezlenir. Yani yeni DNA zinciri, şablon zincirdeki bazlara karşılık gelecek biçimde yapılır. Örneğin, "A" tipi bir bazın karşısına "T" tipi bir baz, "C" tipi bir bazın karşısına da "G" tipi bir baz gelir. Sonunda sentezlenen yeni zincir, kalıp zincirle yeni bir ikili sarmal oluşturur.

PCR yönteminde de DNA'nın çoğaltılması yani kopyalarının yapılması, yine DNA polimeraz enzimi sayesinde olur. Deneysel çalışmalar için gerekli DNA polimeraz enzimleri, çeşitli mikroorganizmalardan elde edilir. PCR yönteminde öncül diziler yani primerler, çoğaltılacak DNA dizisine özgü olarak ve o dizinin küçük bir bölümünü tamamlar nitelikte önceden sentezlenir. Çoğaltılacak çift zincirli DNA'nın zincirleri, her bir zincirin kopyalarının yapılabilmesi için birbirinden ayrılmalıdır. Bu da sıcaklığın artırılmasıyla sağlanır. DNA zincirlerini bir arada tutan kuvvetler, bazlar arasındaki görece zayıf etkileşimlerden kaynaklandığı için ikili sarmal yüksek sıcaklığa karşı duyarlıdır. Yani yüksek sıcaklıklarda, ikili sarmalı oluşturan zincirler birbirinden ayrılır. Sıcaklık yeniden düşürüldüğündeyse birbirinin karşılığı olan DNA zincirleri tekrar ikili zincir oluşturur.



A	C	G	T	A	T	G	C	A	T	T	
G	C	A	C	T	G	C	A	T	T	T	
A	G	T	G	T	A	G	A	T	C	T	
T	T	G	T	T	T	T	C	A	G	A	
T	A	G	C	T	G	G	C	T	A	G	
T	C	T	A	T	A	G	T	A	T	A	
A	T	A	G	C	G	T	G	T	T	T	
G	C	C	G	T	C	A	T	T	G	A	
C	G	T	A	C	A	G	T	A	T	A	
T	T	A	G	T	A	G	T	A	T	A	
T	C	A	G	C	C	T	A	G	A	T	
T	C	A	G	T	A	G	T	A	T	A	
C	A	T	A	C	T	A	G	C	G	T	A
G	A	G	T	C	G	C	G	A	T	C	

DNA'nın şifresini çözmek, sadece dört harften oluşan bir bulmacayı çözmeye benziyor.

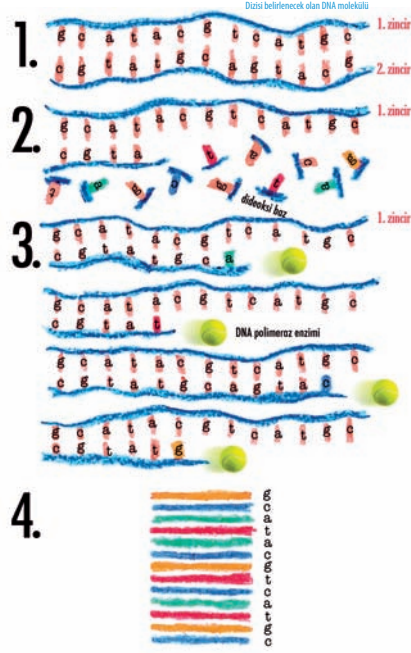


### Polimeraz Zincir Tepkimesi:

1. Sıcaklık yükseltilerek DNA çift zincirinin birbirinden ayrılması sağlanır.
2. Bu sırada ortamda serbest halde primer dizileri vardır. İki tip primer bulunur.
3. Sıcaklık tekrar düşürüldüğünde birbirini tamamlayan DNA zincirleri çift zincir oluşturur. Ortamda bol miktarda primer dizisi bulunduğu için pek çok DNA dizisi primer dizileriyle eşleşir.
4. DNA Polimeraz enzimi, kalıp DNA zincirleriyle eşleşen primer dizilerini kalıp DNA zincirine uygun şekilde bazlar ekleyerek tamamlar.
5. Yarısı kalıp zincirden, yarısı yeni sentezlenen zincirden oluşan DNA çift zincirleri oluşur.

PCR tepkimesinin gerçekleşeceği karışımda, kopyalanacak DNA, önceden sentezlenen kısa primer DNA dizileri, yeni zincire eklenecek bazlar (A, T, C, G), DNA polimeraz enzimi ve tepkimelerin gerçekleşmesini sağlayacak ortamı oluşturan özel bir çözelti bulunur. Her ne kadar DNA dendiğinde tek bir şeyden söz ediliyormuş gibi gelse de aslında karışımda bulunan DNA'ların, primerlerin, bazların ve enzimlerin çok sayıda -yüzbinlerce ya da milyonlarca olduğunu unutulmamalıdır. Bunların hepsi de çok küçük moleküller olduğu için bir tüpün içinde bunlara müdahale edebilmek, ancak bu moleküllerin çok sayıda bulunmasıyla olanaklı olur.

PCR yönteminde önce sıcaklık yükseltilip kopyalanacak DNA'nın zincirleri birbirinden ayrılır. Sıcaklık yeniden düşürüldüğünde birbirini tamamlayan nitelikteki DNA zincirleri bir araya gelir. Buradaki önemli nokta, bazı DNA



### DNA Dizi Analizi:

1. Sıcaklık yükseltilerek zincirler birbirinden ayrılır. Sıcaklık tekrar düşürülerek primerlerin bağlanması sağlanır.
2. Ortamda normal bazlar ile zincirin uzamasını sonlandıran farklı nitelikteki dideoksi bazlar bulunur. Her dideoksi baz tipi farklı renk bir floresan işaret taşıyıcıdır.
3. DNA polimeraz enzimi zincirleri çoğaltmaya başlar. Ancak her dideoksi baz eklenen zincirin uzaması durur. Böylece farklı uzunluklarda DNA zincirleri oluşur.
4. Bu işlemin sonunda elde edilen karışım özel jelin içinde yürütülerek incelenir. Lazer ışık altında inceleme yapıldığında farklı floresan renkler gözlemlenir. Farklı uzunluktaki DNA zincirleri jel içinde birbirinden ayrı konumlanır. Tek bir baz farkı bile gözlemlenebilir. Her zincirin sonunda o zincirin sentezini sonlandıran dideoksi baz olduğu için jelin içinde o dideoksi bazın içinde görünür. Böylece her konumda hangi tip baz olduğu ortaya çıkmış olur.

zincirlerinin kendilerini tamamlayan bütün haldeki zincirlerle eşleşirken bazlarının kısa primer dizileriyle eşleşmesidir. Böylece ortamda orijinal DNA çift sarmalları ile bir orijinal DNA zinciri ve bir kısa primer dizisinden oluşan hibrit DNA molekülleri oluşur. DNA polimeraz enzimi, kısa primer dizisinin ucunu, orijinal DNA zincirindeki bazlara karşılık gelecek bazlar ekleyerek tamamlar. Böylece orijinal çift zincirli DNA molekülünün aynısı olan DNA molekülleri oluşmuş, yani DNA molekülü kopyalanmış olur.

### Zincir Sonlandırma Yöntemi

DNA moleküllerinin kopyalanarak çoğaltılmasını sağlayan PCR yöntemi genlerle ilgili birçok analiz yönteminin temeli olmuştur. Genetik çalışmalarda çığır açan

ve yaygın olarak kullanılan DNA dizi analizi yöntemlerinden "zincir sonlandırma yöntemi" de bu tekniğe dayanır.

Zincir sonlandırma yöntemiyle bir DNA molekülünün dizilimini anlayabilmek için aslında o DNA molekülü PCR yöntemiyle çoğaltılır. Fakat bu kez yapılan PCR uygulamasında, normal PCR'ye göre farklılıklar vardır; dizi analizini sağlayan da bu farklılıklardır.

DNA'nın PCR ile çoğaltılabilmesi için dört tip bazdan yeteri kadar sağlanır. Ancak bu kez normal bazlara ek olarak bir de "dideoksi" olarak nitelenen özel tip bazdan yine dört tip bulundurulur. Bu dideoksi bazlar da yine A, T, C ve G tiplerindedir. Ancak bunların ayrı bir özelliği vardır. DNA polimeraz enziminin uzattığı bir DNA zincirine, bu farklı tip bazlardan biri eklenecek olursa sentez devam edemez ve DNA zinciri daha çok uzayamaz. Oluşan DNA ikili zinciri, kalıp DNA'dan kısa olur. Bir karışımda normal bazlara göre çok daha az miktarda dideoksi baz bulunduğunu düşünürsek, büyümekte olan bir DNA zincirine bir dideoksi baz eklenmesi düşük bir olasılıktır. Fakat her deney tüpünde milyonlarca DNA molekülü sentezlendiğine göre, oluşan yeni DNA zincirinin her bir konumuna bu dideoksi bazlardan eklenme olasılığı vardır. Bu da farklı uzunluklarda sentezlenmiş bir DNA molekülleri serisi oluşması anlamına gelir. DNA zincirinin uzaması primer diziyeye bazlar eklenmesiyle başlayacağı için oluşan dizilerden en kısası primerin uzunluğundan bir baz fazla olacaktır.

Basit bir örnek düşünelim: Elimizde toplam 20 baz uzunluğunda bir DNA zinciri olsun. Kullandığımız primer dizisiyse 10 bazlık olsun ve bu primer dizisi çoğaltacağımız 20 bazlık DNA'nın bir ucundaki 10 baza karşılık gelsin. Bu durumda bu DNA, sözü geçen koşullarda çoğaltılırken şans eseri dideoksi bazların kullanıldığı pozisyonlara bağlı olarak elimizde 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 bazlık yarım kalmış kopyalar ile 20 bazlık tam kopyalar olacaktır. Peki, çeşitli uzunluklardaki bu DNA dizileri acaba DNA'nın baz dizilimini anlamamızı nasıl sağlıyor?



## DNA Dizi Analizi Ne İşe Yarar?

Bir DNA molekülünün baz dizilimini neden bilmek isteriz? DNA dizi analizi sonuçlarının belli başlı kullanım alanlarından biri canlıların sınıflandırılmasını konu alan taksonomi dalıdır. Günümüzde çeşitli canlıların birbiriyle akrabalıkları genetik bilgiye, yani DNA dizilimlerine göre belirlenir. Geçmişte anatomik ve fizyolojik özelliklere dayanılarak yapılan canlı sınıflandırmaları, genetik bilginin ulaşılabilir hale gelmesiyle büyük değişikliğe uğradı. Genetik bilgiye dayanılarak yapılan sınıflandırma daha güvenilirdir, çünkü anatomik ya da fizyolojik özellikler çevresel faktörlerin etkisiyle şekillenebilir. Bu durumda, örneğin aslında genetik açıdan birbiriyle büyük benzerlik gösteren iki canlı türü, anatomik açıdan çok farklı göründüğü için akrabalık ilişkileri sağlıklı olarak belirlenemeyebilir. Sonuç olarak günümüzde sınıflandırma çalışmaları büyük ölçüde DNA dizi analizine dayanıyor.

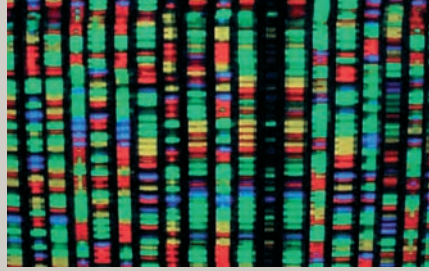
DNA dizi analizi, doğrudan sınıflandırma amaçlı olmayan tür belirleme çalışmalarında da kullanılır. Özellikle anatomik olarak ayırt edilmesi çok da kolay olmayan mikroorganizmaların türlerinin belirlenmesinde DNA dizi analizine sıkça başvurulur. Kimi mikrobik hastalıklarda hatta salgın durumlarında bu belirleme hayat kurtarıcı olabilir. Ayrıca saha çalışması yapan biyologlar da ilgilendikleri canlıların türünü kesin olarak belirlemek için DNA dizi analizinden yararlanabilir.

DNA dizi analizi yalnızca biyoloji çalışmalarında değil, örneğin sosyal bilimlerde antropoloji alanında, insan topluluklarının dağılımları ve dünya üzerindeki hareketleriyle ilgili araştırmalarda, adli tıp alanında suçlunun belirlenmesine yönelik çalışmalarda da kullanılır.

DNA dizi analizinin bir başka önemli kullanım alanı da belli özelliklerle ilişkili genlerin ya da gen parçalarının belirlenmesine yönelik çalışmalardır. Bu çalışmalarda daha çok hastalıklarda etkili olan genleri ve bu genler üzerindeki mu-

tasyonları bulmayı amaçlanır. Bir canlının DNA dizisindeki bazlarda çeşitli nedenlerle oluşan değişikliklere mutasyon denir. Bu değişiklikler, tek bir bazın yerine başka bir baz gelmesi (nokta mutasyonu) şeklinde olabildiği gibi bir ya da daha çok bazın silinmesi ya da eklenmesi şeklinde de olabilir. Bugün birçok hastalığın toplumda yaygın olarak görülen belli mutasyonlardan kaynaklandığı biliniyor. Bazı mutasyonlara bir hastalığa doğrudan neden olmayıp yalnızca hastalığa yatkınlığı artırır. Hastalıklarla ilgili genlerin ve mutasyonların belirlenmesi, hem hastalığın tanısının konabilmesi hem de hastalığın mekanizmasının anlaşılması ve tedavi yöntemleri geliştirilmesi konusunda yol gösterici olabilir.

Daha hızlı ve ucuz DNA dizi analizi yöntemlerinin geliştirilmesi, birçok canlı türünün tüm genomunun (bütün genetik malzemesinin) dizilimini ortaya çıkarmaya yönelik projelerin gerçekleşmesini sağlamıştır. Bunlardan en önemlisi 1990'da başlayıp 2003'te tamamlanan İnsan Genomu Projesi'dir. Genom projeleri, elde edilen dizilimler üzerinde yapılan çalışmalarla canlıların taşıdığı genlerin belirlenmesini sağlar. İnsan Genomu Projesi, şimdiden birçok genin, çeşitli mutasyonların ve bunların pek çok hastalıkla ilişkisinin anlaşılmasını sağladı.



**İnsan Genomu Projesi'ndeki bir DNA dizi analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü.**

Bütün bunların dışında DNA dizi analizi, moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarındaki özel yöntemlerin çeşitli aşamalarında bir araç olarak da sık sık kullanılır.

Genetik bilgiyle yapılabileceklerin sınırı genişledikçe bu bilgiye ulaşmayı sağlayan teknolojiler daha da önem kazanıyor. İleride kişisel DNA dizilimi bilgilerinin hastaların tıbbi kayıtlarının bir parçası haline gelebileceği öngörülüyor. Var olan teknolojiyle şimdiden insan dahil birçok canlının genomunun DNA dizilimi belirlenmiş olsa da gelecekte çok daha hızlı ve ucuz teknolojilere gerek duyulacağı ortada.

İşte, bu noktada başka bir analiz yöntemi devreye giriyor. Bu da DNA'nın özel jeller yardımıyla görülebilmesini sağlayan jel analizi yöntemi. Bu yöntemde çeşitli maddelerden katı kıvamda, polimer yapıda jeller oluşturulur. Bunları pasta jölelerine benzetebiliriz. Jellerin homojen yapısında por adı verilen boşluklar vardır. Jel analizinde DNA molekülleri, genellikle dikdörtgen şekilde oluşturulan jelin içerisinde bir uçtan ötekine hareket eder. Bu hareket jelin içinde bulunduğu çözeltiye elektrik akımını verilmesiyle gerçekleşir. DNA molekülleri eksi yüklü oldukları için eksi kutuptan artı kutba doğru hareket eder. Ancak tüm DNA molekülleri aynı hızda ilerlemez. Büyük moleküller porlardan daha zor geçeceği için daha yavaş hareket ederken küçük moleküller daha hızlıdır. Sonuçta belli bir süre sonra farklı uzunluktaki DNA'lar jelin için-

de farklı konumlar alır. Uygun özellikte jeller kullanılırsa, yalnızca bir bazlık uzunluk farkı taşıyan DNA molekülleri bile birbirinden ayırt edilebilecek kadar farklı konum alırlar. DNA örneklerinin bu jeller içinde hareket ettirilmesi işlemine jelde yürütme denir. Jelin içindeki DNA molekülleri ayrıştıktan sonra normal ışıktaki gözle görülmez. Jelin içine konan özel bir kimyasal madde DNA ile etkileşerek DNA moleküllerinin morötesi ışık altında görünmesini sağlar. Böylece jel içindeki tüm DNA'lar morötesi ışık altında bantlar, yani kısa çizgiler halinde görünür.

DNA dizi analizindeki PCR işlemi sonucunda oluşan çeşitli uzunluklardaki DNA molekülleri de bu şekilde jeller kullanılarak uzunluklarına göre jel içinde ayrıştırılır. Fakat bu kez jel içindeki DNA'lar morötesi ışık yardımıyla değil, dideoksi bazların üzerindeki floresan

özellikteki işaretler yardımıyla görülür. Bu işaretler her bir tipteki (A, T, C, G) dideoksi baz için farklı renktedir. Sonuçta farklı uzunluktaki her DNA dizisi dört dideoksi baz tipinden (A, T, C, G) biriyile biteceği için, jel üzerinde o dideoksi bazın işaretlendiği renkte görünecektir. Dolayısıyla DNA dizi analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü dört farklı renkte çizgilerden oluşan bir diyagram şeklindedir. Her rengin temsil ettiği baz tipi (A, T, C, G) belli olduğu için renklerin sıralanması DNA'yı oluşturan bazların dizilimini gösterir. Böylece DNA molekülünün dizilimi bulunmuş olur. Yöntemin çeşitli laboratuvarlardaki uygulamalarında, ayrıntılarda küçük farklar olabilirse de genel işleyişi bu şekildedir.

### Kaynaklar

Klug W. S., Cummings M. R., Concepts of Genetics (6th Edition), Prentice Hall, 1999  
Lewin B., Genes VII, Oxford University Press, 1999