

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR

**SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER TEKNİKLERİN  
KLİNİKTE UYGULAMA ALANLARI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Cüneyt ÇİMEN**

EDİRNE – 2010

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Yrd.Doç.Dr. Hilmi TOZKIR

**SİTOGENETİK VE MOLEKÜLER TEKNİKLERİN  
KLİNİKTE UYGULAMA ALANLARI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Cüneyt ÇİMEN**

**Tez No:**

**EDİRNE – 2010**

## **TEŐEKKÜR**

Çalıőmamın her aşamasında bana verdikleri destekten ve gösterdikleri sabırdan dolayı değerli hocalarım; T.Ü.Tıp Fakóltesi Tıbbi Bioloji A.D. Baőkanı Prof. Dr. Çetin ALGÜNEŐ, danıőman hocam Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR'a, Yrd. Doç. Dr. Funda S. PALA ve Araç. Gör. Dr. Kıymet TABAKÇIOęLU'na ve değerli arkadaőlarım Bio. Mehtap TAŐ ve Bio. Tuęba GÜRSOY'a en içten teőekkürlerimi sunarım.

Bio. Cüneyt ÇİMEN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVAR TEKNİKLERİ.....	3
DNA ve RNA İzolasyonu.....	3
PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	15
Elektroforez Yöntemleri.....	34
SİTOGENETİK LABORATUVAR TEKNİKLERİ.....	69
Hücre Kültür Yöntemleri.....	72
Konvensiyonel Sitogenetik Teknikler.....	76
Moleküler Sitogenetik Teknikler.....	93
TÜRKÇE ÖZET.....	110
İNGİLİZCE ÖZET.....	111
KAYNAKLAR.....	112
RESİMLEMELER LİSTESİ.....	125
ÖZGEÇMİŞ.....	128

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>A</b>	: Adenin
<b>AS-PCR</b>	: Allele Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>BrdU</b>	: Bromo-deoksi-uridin
<b>C</b>	: Sitozin
<b>Cobra-FISH</b>	: Combined Binary Ratio Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>DAPI</b>	: 4,6-diamidino-2-phenylindole
<b>DEPC</b>	: Dietilpirokarbonat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksiribonükleotid tri fosfat
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>FISH</b>	: Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>G</b>	: Guanin
<b>ISH</b>	: In Situ Hibridizasyon
<b>M-FISH</b>	: Multiplex Floresan In Situ Hibridizasyon
<b>NOR</b>	: Nükleer Organizer Bölgeler
<b>PBS</b>	: Fosfat Tampon Solüsyonu
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PHA</b>	: Fitohematoglutinin
<b>RAPD PCR</b>	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA PCR
<b>RCF</b>	: Rölatif Santrifüj Kuvveti

<b>RE</b>	: Reskripsiyon enzimleri
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RNaz</b>	: Ribonükleaz
<b>rpm</b>	: Revolutions per minute
<b>RT-PCR</b>	: Reverse Transcriptase PCR
<b>SCE</b>	: Kardeş Kromatid Değişimi
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SKY</b>	: Spektral Karyotipleme
<b>SSC</b>	: Salin Sodyum Sitrat
<b>T</b>	: Timin
<b>U</b>	: Urasil

## GİRİŞ VE AMAÇ

Araştırmanın amacı tıbbi tanıda güncel olarak kullanılan moleküler genetik ve sitogenetik laboratuvar tekniklerinin tanıtılması ve bu tekniklerin metodolojileri, kullanım alanlarının sınırlarının ortaya konmasıdır.

Tıbbi tanıda kullanılan çok sayıda moleküler ve sitogenetik teknik bulunmaktadır. Bunların bazıları aynı amaçla kullanılabilirken, bazıları da birbirlerine alternatif oluşturmaktadır. Bu teknikler şöyledir:

Moleküler genetik teknikler:

Moleküler genetik tekniklerin temelini polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) oluşturmaktadır. PCR ile incelenecek olan bir Deoksiribonükleik asit (DNA) bölgesinin çok miktarda kopyası elde edilebilir. PCR ürünü olan bu kopyalar çeşitli elektroforez yöntemleri ile ve kimyasal uygulamalarla yapısal veya kantitatif olarak incelenebilmektedir. Farklı PCR teknikleri vardır örneğin; RT-PCR, Real-time PCR, AS-PCR, vs (1).

Sitogenetik teknikler:

- Konvansiyonel sitogenetik teknikler
- Moleküler sitogenetik teknikler

Konvansiyonel sitogenetik teknikler ile mikroskopik olarak her türlü kromozom aberasyonunun varlığı veya yokluğu metafazdaki hücrelerde farklı boyama teknikleri ile ortaya konabilmektedir. Örneğin; G bantlama, C bantlama, R bantlama, vs.

Moleküler sitogenetik tekniklerde ise floresan işaretli sentetik DNA dizileri aracılığı ile kromozomal aberasyonlar daha yüksek duyarlılıkta hem metafaz hem de interfaz

hücrelerinde tespit edilebilmektedir. Örneğin; Floresan in-situ hibridizasyon (FISH), Spektral karyotipleme (SKY), vs.

Sitogenetik teknikler hücrenin genetik materyalinin makro boyutta incelenmesine olanak sağlarken moleküler genetik tekniklerle DNA ya da Ribonükleik asit (RNA) üzerindeki tek bir nükleotid değişimini saptamak mümkün olmaktadır (2).

Tanıda kullanılacak tekniği hastalığa yol açan mutasyonun tipi belirlemektedir. Örneğin; kronik miyeloid lösemi (KML)'de gözlenen Philadelphia kromozomu [t(9:22)] makro boyutta bir aberasyon olduğundan dolayı DNA kullanılan PCR tabanlı bir teknik ile tespit edilmesi zordur. Beta talasemi gibi etiyolojisinde tek nokta mutasyonlarının hakim olduğu bir hastalıkta da sitogenetik teknikler tanıda kullanılamamaktadır (3).

Çeşitli moleküler ve sitogenetik tekniklerin tanıtıldığı kaynaklara rastlanılmakla birlikte, her gün gelişen teknoloji ile kullanım alanları çeşitlenen ve genişleyen moleküler ve sitogenetik yöntemler hakkındaki bilgilerin güncellenmesi amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Çalışma sonucunda, tıbbi tanı amacıyla bu yöntemleri kullanacak olan kişiler için, yukarıda bahsedilen teknikler hakkında temel bilgi ve uygulama süreçlerini içeren güncellenmiş bilgilerin bir arada bulunduğu bir kaynak oluşturulmuş olacaktır.



## **GENEL BİLGİLER**

### **MOLEKÜLER GENETİK LABORATUVAR TEKNİKLERİ**

Moleküler genetik laboratuvarında yapılan testlerde incelenen materyal DNA ya da RNA'dır. Yapılan incelemeler niteliksel ya da niceliksel özellikte olabilir. DNA ve RNA'yı inceleyebilmek için bu molekülleri hücrenin diğer bileşenlerinden ayırarak analize hazır hale getirmek gerekir. Bu hazırlık aşamaları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- 1.DNA ya da RNA İzolasyonu
- 2.PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
- 3.Elektroforez Yöntemleri

### **DNA ve RNA İzolasyonu**

İlk aşama incelenecek DNA ya da RNA molekülünün hücrenin diğer bileşenlerinden ayrıştırılarak saf bir halde elde edilmesidir. Her iki molekülün izolasyonunun da önkoşulu çalışılacak ortamda yabancı DNA veya RNA molekülünün bulunmamasıdır. Dikkat edilmesi gereken noktaları kısaca sıralayacak olursak:

1. Genel çalışma ortamının sterilizasyonu için UV kullanılmalıdır.
2. Çalışma yapılacak yüzeyler yabancı DNA ve/veya RNA'ları uzaklaştıracak bir solüsyon ile fiziksel olarak temizlenmelidir.
3. Çalışmada kullanılacak olan her türlü plastik ve diğer sarf malzemeler uygun bir yöntemle (Otoklav, kuru ısı,vs.) önceden steril edilmiş olmalıdır.
4. Çalışmada kullanılan pipet, santrifüj vb. aletler de uygun temizleme yöntemi ile DNA ve/veya RNA'dan arındırılmış olmalıdır.

5. Çalışma esnasında mutlaka steril eldiven giyilmelidir.
6. Çalışma esnasında çalışan kişi maske kullanmalıdır.

**DNA izolasyonu:** İnsan genomik DNA'sı  $3 \times 10^9$  nükleotid uzunluğundadır. Nükleusa sahip tüm hücreler genomik DNA içerir ve DNA analizi çalışmalarında kullanılabilir. Rutin çalışmalarda en sık kullanılan DNA kaynağı dolaşan kandaki çekirdekli lökositlerdir. Bunun dışında örneğin prenatal tanı için amniyon sıvısındaki fetal hücreler veya koryonik hücreler de DNA kaynağı olarak kullanılabilir. Daha nadir olmakla birlikte rutin çalışmalarda diğer çekirdekli vücut hücreleri de kullanılabilir. İnsana yönelik rutin çalışmaların bir kısmı da mikrobiyoloji çalışmalarıdır. Moleküler mikrobiyolojide DNA kaynağı bakteriler, DNA virüsleri ve diğer mikroorganizmalara ait tüm DNA içeren hücreler olabilir (4).

Bundan sonra rutin çalışmalarda en çok kullanıldığı için lökositler temel alınarak DNA'yı elde etme yöntemleri anlatılacaktır.

DNA izolasyonu yapılacak kan örneklerinin Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)'lı tüplere alınması gereklidir. Çünkü EDTA, DNA degradasyonu yapan enzim olan DNaz'ın yapısındaki  $Mg^{+2}$  ile şelasyon (kısaçılama) yaparak DNaz aktivitesini bozar. Bu nedenle DNA elde edilecek örnekler için tercih edilen bir antikoagülandır. Yaygın olarak kullanılan bir diğer antikoagülan olan heparin ise PCR'yi inhibe ettiği için moleküler genetik çalışmalarda tercih edilmez (5,6).

EDTA'lı tüp içine alınan 10 ml kadar kan yaklaşık  $10^8$  lökosit içerir. Laboratuvar çalışmalarında ortalama bir genetik incelemede başlangıç için 200 µl kan örneği yeterli olmaktadır (4). Çalışmalarda kullanılacak DNA, su veya Tris-EDTA(TE) tampon çözeltisi gibi bir sıvı ile çözülmelidir. Verimli bir sonuç alabilmek için kullanılan konsantrasyonlar genomik DNA miktarı için genelde 1-10 µg/ml arasında değişmektedir (7).

DNA izolasyonu hücre zarının sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi deterjanlarla zayıflatılıp parçalanması ile başlamaktadır. Ardından hücre zarının parçalanması ve sitoplazmanın uzaklaştırılması ile hücre çekirdeği açığa çıkmaktadır. DNA üzerindeki protein ve polisakkarit gibi ek yapıların fenol-kloroform gibi organik çözücüler kullanılarak ve RNA'nın da RNaz enzimi kullanılarak uzaklaştırılmaları sağlanmaktadır. Son olarak da DNA tuz ortamında alkol ile çöktürme basamaklarından geçirilir. Çalışılan organizmaya göre bazı küçük değişiklikler olsa da genel işleyiş bu şekilde olmaktadır (8).

DNA izolasyonu için birçok teknik vardır. Geleneksel izolasyon tekniklerinin yanı sıra artık pek çok ticari izolasyon kitleri de sıklıkla rutin çalışmalarda kullanılmaktadır (9).

Fenol-kloroform yöntemi ve tuzla çöktürme yöntemi en yaygın kullanılan geleneksel DNA izolasyon yöntemleridir (10). Aşağıda her iki yönteme de örnek birer protokol verilmiştir.

1) Fenol-kloroform yöntemi:

Gerekli malzemeler:

Distile su

Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi (10 mM Tris, 1mM EDTA)

Sodyum dodesil sülfat (SDS, sulu çözelti) %10'luk,

NaCl 1 M

Proteinaz K 10 µg/ml (Stabil bir duruma sahip olmadığından taze olarak hazırlanmalı ya da küçük hacimlerde -20°C'de saklanmalıdır.)

Fenol-kloroform (1:1) (v:v)

Saf etanol

Etanol %70'lik

Protokol:

1. EDTA'lı tüplere alınmış olan kan örneklerinden 500 µl'lik periferik kan örneği eppendorf tüpüne aktarılır.
2. Kan örneklerinin üzerine 500 µl TE (10 mM Tris, 1mM EDTA) tampon çözeltisi ilave edilir, kısaca vortekslenerek karıştırılır ve 16.060xg'de (13.000 rpm) 1 dakika santrifüj edilir.

Not: Revolutions per minute (rpm): rötorun dakikadaki dönme sayısı.

Gravite (g): yerçekiminin katı. Santrifüjlerdeki rpm ve g hesabı sayfa 12'de detaylı olarak aktarılmıştır.

3. Dipte 100 µl kalacak şekilde süpernatant atılır. Karışımın hacmi 1ml'ye tamamlanacak şekilde TE tampon çözeltisi eklenir ve 16.060xg'de 1 dakika santrifüjlenir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edilir.
4. Son yıkama işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılır ve pellet üzerine 80 µl %10'luk SDS, 90 µl 1 M NaCl ve 10 µg/ml Proteinaz-K ilave edilir. Son hacim 500 µl olacak şekilde TE tampon çözeltisi kullanılarak tamamlanır.
5. Hazırlanan karışım 56°C'de 90 dakika inkübe edilir.

6. İnkübasyon tamamlandıktan sonra tüplerin içine içindeki hacimle eşit oranda fenol-kloroform (250 µl fenol ve 250 µl kloroform) ilave edilir. Kısaca vortekslenerek karışması sağlanır.
7. Tüpler 3088xg'de (2500 rpm) 2 dakika santrifüjlenir.
8. Üstte kalan DNA içeren tabaka yeni ve temiz bir eppendorf tüpüne aktarılır.
9. Üzerine DNA'nın çökmesi için 50 µl saf etil alkol ilave edilir.
10. Santrifüj edilip DNA çöktürüldükten sonra üzerindeki alkol tamamen uzaklaştırılır ve bu kez %70'lik 50 µl etil alkol ilave edilir.
11. Santrifüj edilip DNA çöktürüldükten sonra DNA pelletinin büyüklüğüne göre 100-500 µl steril distile su veya TE tampon çözeltisi içinde çözdürülür (11).

Elde ettiğimiz DNA genetik çalışmalar için kullanılmaya hazırdır ya da daha sonra yapılacak çalışmalar için -20°C'de bekletilebilir (12).

DNA'da bozunma olmaması için defalarca dondurup çözme işleminden kaçınılmalıdır.

## 2) Tuzla çöktürme yöntemi

Gerekli malzemeler:

Solüsyonlar:

Eritrosit parçalama solüsyonu (hipotonik solüsyon):

20 x eritrosit lizis tamponu	3.1 M NH <sub>4</sub> Cl, 0,2 M KHCO <sub>3</sub>
20 mM EDTA	pH: 7.4

Nükleus lizis solüsyonu:

Tris EDTA	1 ml (pH: 8.0) (10 mM Tris, 1 mM EDTA)
NaCl	8 ml (5 M)
EDTA	0.4 ml (0.5 M)

Not: Steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Protokol:

1. EDTA'lı tüplere alınmış kan örneğinden 1 ml alınarak 8-12 ml eritrosit lizis solüsyonunun içine ilave edilir ve yavaşça vortekslenerek karıştırılır.
2. 3000-4500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

3. Süpernatant uzaklaştırılır ve üzerine 850 µl nükleus lizis solüsyonu ilave edilir. (Bunun yerine 10 µg/µl proteinaz K'da kullanılabilir)
4. 20 dakika süresince her 4 dakikada bir vortekslenir ya da buna alternatif olarak 10-15 dakika süreyle pipetaj yapılır veya 40-60°C'de inkübe edilebilir.
5. İşlem tamamlandıktan sonra karışımın üzerine 850 µl kloroform eklenir ve yavaşça vortekslenir.
6. Karışım 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldıktan sonra 12.000-13.000 rpm'de santrifüj edilir.
7. Süpernatant alınır ve çökelti üzerine 1 ml %100 etil alkol ilave edilir.
8. Ependorf tüpü ardı ardına alt üst edilerek DNA gözle görülür hale getirilir.
9. 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
10. Süpernatant uzaklaştırılır ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilerek ya da 37°C'de 30 dakika bekletilerek kurutulur.
11. Üzerine 200-300 µl steril distile su veya 10 mM TE tampon çözeltisi (Tris EDTA) eklenir.
12. Birkaç kez vortekslenir ve oda ısısında 1-2 saat inkübe edilir.
13. Tekrar vortekslenir ve kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilebilir (11).

### 3) Alternatif fenol –kloroform yöntemi:

Gerekli malzemeler:

20 X SSC (salin sodyum sitrat) tamponu, pH 7.0

NaCl 3M

Trisodyum sitrat 0.3 M

Sodyum asetat, 0.2 M, pH 5.2

SDS %10'luk

Proteinaz K 20 µg/ml

Fenol/kloroform/izoamil alkol 25/24/1 (v:v:v)

Soğuk saf etanol

TE tamponu pH, 8.0

Etanol %80'lik

Protokol:

1. EDTA'lı kan örneğinden 1 ml alınarak eppendorf tüpüne aktarılır.

2. Kanların üzerine 800 µl 1xSSC tampon çözeltisi eklenerek vorteksle iyice karıştırılır.
3. Mikrosantrifüjde 12.000 rpm hızda, 1 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant uzaklaştırılır. Çökelti üzerine 1 ml 1xSSC tamponu eklenerek karıştırılır.
5. Mikrosantrifüjle 12.000 rpm hızda, 1 dakika santrifüjlenir.
6. Çökelti üzerine 375 µl 0.2 M sodyum asetat eklenip karıştırıldıktan sonra 2 ml %10'luk SDS ve 5 µl Proteinaz K çözeltisi eklenir ve 55°C'de 1 saat bekletilir.
7. 1 saat bekledikten sonra 120 µl fenol/kloroform/izoamil alkol karışımı eklenir ve karıştırdıktan sonra mikrosantrifüjde 12.000 rpm hızda 2 dakika santrifüjlenir.
8. Süpernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır, 1 ml soğuk saf etanol eklenip karıştırıldıktan sonra -20°C'de 15 dakika bekletilir.
9. Mikrosantrifüjde 12.000 rpm hızda, 2 dakika santrifüjlenir. Süpernatant uzaklaştırılır, çökelti üzerine 180 µl TE tamponu eklenip karıştırıldıktan sonra 55°C'de 10 dakika bekletilir.
10. Önce 20 µl 2 M sodyum asetat eklenerek karıştırılır. Daha sonra 500 µl soğuk saf etanol eklenerek karıştırılır ve mikrosantrifüjde 12.000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlenir.
11. Üst sıvı uzaklaştırılır, çökelti 1 ml %80'lik alkol ile mikrosantrifüjde 12.000 rpm hızda 1 dakika santrifüjlenir.
12. Süpernatant uzaklaştırılır, çökelti vakumlu kurutucuda 10 dakika kadar kurutulur.
13. Çökelti 200 µl TE tamponu içerisinde belirli aralıklarla karıştırılarak çözündürülür ve 55°C'de bir gece bekletilir. Çözünen DNA -20°C'de saklanabilir (10).

#### 4) Ticari kit (EZNA) izolasyon protokolü:

##### Gerekli Malzemeler:

- Proteinaz K (20 mg/ml)
- Tampon çözeltisi (buffer) BL
- İzopropanol
- DNA yıkama tampon çözeltisi ya da steril distile su

##### Protokol:

1. Periferik kan örneğimizden 250 µl alınarak steril 1.5 ml'lik mikro tüpe aktarılır.
2. Tüp içindeki örneğin üzerine 25 µl Proteinaz K eklenerek 10 sn kadar vortekslenir.
3. Vortekleme işleminin ardından örneğe 250 µl BL tampon çözeltisi eklenip 15 sn vortekslenerek iyice karışması sağlanır.

4. 70°C’de 10 dakika inkübe edilir ve inkübasyon sırasında kısaca vortekslenir.
5. 260 µl izopropanol inkübe edilmiş lizata eklenip vorteklenerek karıştırılır.
6. Tüm örnek 2 ml’lik kolonlu tüplere aktarılır ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
7. Kolon yeni bir 2 ml’lik tüpe aktarılır ve üzerine 650 µl DNA yıkama tampon solüsyonu ilave edilerek 8000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenir.
8. Tüpün içinde kalan materyal tüm çalışmalar için uygun hale getirilmiş DNA’dır (13).

Yukarıda bahsedilen klasik yöntemlerden ve ticari kitleri bulunan spin kolon gibi protokollerden başka otomatik sistemlerle yapılan manyetik boncuklu yöntem gibi DNA izolasyon teknikleri de vardır. Bu sistemlerin prensibi DNA’nın belli aşamalarda yüzeye bağlanıp sonra tekrar sökülerek artık maddelerden arındırılarak saf bir DNA eldesidir.

DNA degradasyona dayanıklı bir polimerdir. Uygun koşullarda saklanıldığında yıllarca tekrar tekrar genetik tahlillerde kullanılabilir. Bu nedenle elde edilen DNA’nın, RNA, protein ve polisakkarit gibi kirleticilerden iyice arındırılmış olması gerekmektedir (10).

DNA’nın temizliğini tayin etmek için spektrofotometrik ölçüm yapılmalıdır. Spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapılarak 260nm/280nm oranlaması ile DNA’nın saflığı tespit edilebilir. Bunun yanı sıra DNA içinde herhangi bir partikül bulunup bulunmadığını tespit etmek amacıyla 325 nm’de absorbans ölçümü yapılabilir.

DNA’ların konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanabilir:

$$\text{DNA (ng/ml)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/ml} \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

Temiz bir DNA’nın A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> oranı 1.75 – 2.0 aralığında olmalıdır (14).

Sorunlar ve çözümleri:

I. Yeterli miktarda DNA elde edilememesi

II. İstenilen kalitede DNA elde edilememesi

Çözümler I:

1. Başlangıç örneğinin miktarını arttırarak elde edilecek DNA miktarı arttırılabilir.
2. Başlangıç örneğinde kullanılacak hücre miktarının tayini yapılabilir.
3. Başlangıç örneği yoğunlaştırılarak (kan için santrifüjleme işlemi) kullanılabilir.

Çözümler II:

1. DNA izolasyonu yapılacak örneğin alım aşamasında yabancı DNA bulaşması olasılığını en aza indirmek gereklidir.
2. Mümkünse taze örneklerden DNA izole edilmelidir.

3. İzolasyonda kullanılacak tüm materyalin son kullanma tarihleri kontrol edilerek çalışılmalıdır.
4. İzolasyonda kullanılması gereken sarf malzemenin steril olmasına dikkat edilmelidir.
5. Çalışma esnasında tüm hijyen kurallarına uyulmalıdır.
6. İzolasyon öncesi bekletilmek durumunda kalan örnekler uygun şartlarda muhafaza edilmelidir (En az +4 °C).
7. -20 °C’de uzun süre saklanan DNA örnekleri defalarca dondurma ve çözme işlemine tabi tutulmamalıdır. Uzun süreli depolanacak örnekler 15-20 µl’lik hacimlere bölünerek ve düzgün etiketlenerek saklanmalıdır.

**RNA izolasyonu:** RNA, DNA gibi her hücrede benzer bir dağılım göstermemektedir. Bu nedenle ilgilendiğimiz RNA türünün hangi hücreye özgül olduğunun bilinmesi gerekir. Örneğin; bir epitel hücrelerine özgül bir proteinin RNA’sı normal şartlarda sadece o epitel dokusundan izole edilebilir. Fakat her hücrede meydana gelen krebs siklusuna ait RNA’lar her tip hücrede elde edilebilir (15).

Ökaryot hücrelerde total RNA oranının hücre ağırlığının %1 civarında olduğu bilinmektedir. Yani bir ökaryot hücre yaklaşık 10-15 µg toplam RNA içermektedir. Total RNA’ya oranla mRNA’nın hücre içinde dağılımı %5 civarında olduğundan saf olarak elde edilebilen mRNA 2-3 µg’dır.

RNA çalışmalarının hepsinde en önemli koşul hasar görmemiş ve en saf haliyle RNA’nın izolasyonudur. İzolasyon sırasında en sık karşılaşılan sorun aktivitesini uzun süre koruyan, ribonükleaz (RNaz) kontaminasyonudur. Çok az miktarda RNaz kontaminasyonu bile RNA’nın bütün olarak eldesini engelleyebilir. RNaz kontaminasyonunu engellemek için bütün çözelti ve sarf malzemeleri uygun şekilde steril edilmelidir. Çalışma RNaz kontaminasyonunu en aza indireyecek koşullarda başlatılmalıdır. RNA izolasyon çalışmalarında mutlaka steril eldiven kullanılmalı ve çalışma esnasında konuşmamaya özen gösterilerek maske takılmalıdır. Böylece kontaminasyon riski en aza indirgenmiş olmaktadır.

İzolasyonda kullanılacak çözeltiler RNaz’ın aktivitesini yok edecek dietilpirokarbonat (DEPC) ile hazırlanmalıdır. Bunun dışında Tris DEPC’yi inaktive ettiği için Tris içeren çözeltiler DEPC ile hazırlanmamalıdır (16).

Steril ve tek kullanımlık plastik eşyalar RNaz kontaminasyonu taşımadıklarından RNA izolasyonu ve saklanması aşamalarında herhangi bir hazırlık gerektirmeden



kullanılabilirler. Fakat bu malzemelerin kullanımı da eldiven ile olmalıdır. Elektroforez tankları da DEPC ile yıkanmalı ya da buna alternatif olarak %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile yaklaşık 30 saniye ve birçok kez saf su ile durulamadan sonra 6 saat 180°C'de tutmakta yeterlidir.

RNA izolasyonu protokollerinin tümünde ilk aşama ökaryot hücreler için hücre membranının parçalanmasıdır. Bunun ardından gerçekleşen hücre lizatinin santrifüjlenmesi işlemi ile RNA diğer hücrel makromoleküllerden ayrılır.

Klasik yöntemlerin yanı sıra son zamanlarda ticari RNA izolasyon kitleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (10).

Total RNA izolasyonu:

Gerekli malzemeler:

- Gerekli materyal: Ökaryot hücre içeren herhangi bir doku
- Parçalama tampon çözeltisi (pH 7.0)
- Guanidin tiyosülfat 4 M
- Sodyum sitrat (pH 7.0) 25 mM
- 2-Merkaptoetanol (2-ME) 0.1 M
- N-Laurilsarkosin (sarkosil, sulu çözelti) %0.05
- Hazırlanışı: 250 gr guanidin tiyosülfat 293 ml su içinde çözündürülür, 17.6 ml 0.75 M sodyum sitrat (pH:7.0) ve 26.4 ml %10 sarkosil eklenerek 60-65°C'de karıştırılır. Bu stok çözelti 3 ay kadar oda sıcaklığında tutulabilir. Deney sırasında 50 ml stok çözeltiye 0.35 ml 2-ME eklenir. Bu hazırlanan çözelti 1 ay kadar saklanabilir ve diğer çalışmalarda da kullanılabilir.
- Sodyum asetat pH 4.0 2 M
- Fenol (Su ile doyurulmuş, 4 mg/l) (133).
- Kloroform/izoamil alkol 49:1 (v:v)
- İzopropanol %100
- Etanol %75
- SDS %0.5

Protokol:

1. 100 mg doku üzerine 1 ml parçalama tampon çözeltisi eklenerek el veya otomatik olarak çalışan pistonlu homojenizatör ile parçalanır.
2. Elde edilen homojenat 5 ml falkon tüpe aktarılır ve 0.1 ml 2 M sodyum asetat eklenip vorteksenerek karıştırılır.
3. 1 ml fenol eklenip vorteksle karıştırılır ve 0.2 ml kloroform:izoamilalkol (49:1) eklenerek 15 dakika +4°C'de bekletilir.
4. 10.000 × g'de 20 dakika +4°C'de santrifüjleme yapılır.
5. Üst sıvı yeni bir tüpe alınır 1 ml izopropanol eklendikten sonra 30 dakika -20°C'de bekletilir.
6. 10 dakika 10.000 × g'de +4°C'de santrifüjlenerek RNA çöktürülür.
7. RNA 0.3 ml parçalama tamponu içerisinde çözdürüldükten sonra mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
8. Üzerine 0.3 ml izopropanol eklenip 30 dakika -20°C'de bekletildikten sonra 10 dakika 10.000 × g'de +4°C'de santrifüjlenerek RNA çöktürülür.
9. RNA %75'lik etanolde süspansiyon haline getirilir. Vortekslenir ve 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 10.000 × g'de 5 dakika +4°C'de santrifüjlenerek RNA çöktürülür.
10. RNA çökeltisi vakumda kurutulur. 100-200 µl DEPC'li suda çözündürüldükten sonra -70°C'de saklanır.

Ayrıca hazırlanan RNA %75'lik alkol içerisinde -20°C'de en az 1 yıl saklanabilir (10).

Sorunlar ve çözümler:

I: Yeterli miktarda RNA elde edilememesi

II: İstenilen kalitede RNA elde edilememesi

Çözüm I:

1. Başlangıçta kullanılan hücre miktarının arttırılmalıdır.
2. Reaksiyon tüpüne konulması gereken maddelerden birinin eksik ya da miktarının az olmasına dikkat edilmelidir.

Çözüm II:

1. İzolasyonda kullanılan başlangıç materyali uygun şartlarda saklanmalıdır.
  2. Solüsyonların hazırlama ve saklama koşulları kontrol edilmelidir.
- İzolasyonlar esnasında vorteks, termal blok, santrifüj gibi cihazlar kullanılır.

Vorteksler izolasyonda karıştırma işlemlerinde kullanılır. Cihaz üzerinde tüp içeriğinin karışmasını sağlayan dairesel olarak hareket eden ve hızı “revolutions per minute (rpm, dakikadaki dönme sayısı)” cinsinden ayarlanabilen mekanik bir parça bulunur.



Şekil 1. Vorteks (TTS 2)

Termal bloklar izolasyonda uygulanan ısı basamaklarını gerçekleştirmek için kullanılmaktadır. Bloğun üzerinde farklı hacimlerdeki izolasyonda kullanılan tüplerin yerleştirilebileceği, tüpü kapak hariç her yönden ısıtılabilen kuyucuklar vardır.



Şekil 2. Termal blok ( Eppendorf Thermomixer comfort)

Santrifüjler de izolasyon işlemi yapılırken farklı basamaklarda örnek materyal içindeki partikülleri çöktürmek için kullanılmaktadır. Santrifüj farklı moleküler ağırlığa sahip maddelerin yerçekimine bağlı olarak ayırımını hızlandıran bir araçtır. Tüm santrifüjler rotor, çevirme mili, motor ve bazı modellerinde soğutma ünitesinden oluşur. Üzerlerinde mutlaka bir kapak bulunur. Cihazın dışında bir açma-kapama tuşu, zaman ayarı, hız ayarı ve çok hızlandığında durdurmak için bir fren görevi gören tuşlara sahiptirler. Santrifüje yerleştirilen örnekler eş ağırlıkta ve simetrik olmalıdır.

Santrifüjleme işlemi başladığında tüpte bulunan partiküller, uygulanan santrifüj alanına (merkezkaç kuvvet), partikülün şekline, yoğunluğuna ve ortamın yoğunluğuna bağlı olarak değişen hızlarda çökerler (17,18).

Herhangi bir santrifüj cihazında iki fazın ayrılması için gerekli güç, rölatif santrifüj kuvveti (RCF) olarak tanımlanır. RCF, yerçekiminin (gravite:g) katı olarak 3000xg, 5000xg, 10000xg gibi ifade edilir (19).

Bir santrifüjün maksimum rölatif santrifüj gücü(RCF) şöyle hesaplanır:

$$RCF = 1,118 \times 10^{-5} \times r \times n^2 = RCF(g) = 0,00001118 \times r \times RPM^2$$

- RCF →yerçekiminin (g) katı olarak maksimum rölatif santrifüj gücü
- r →cm olarak dönme merkezinden tüpün dibine kadar olan horizontal mesafe (yarıçap)
- n →rotorun dakikadaki dönme sayısı (rpm)
- $1,118 \times 10^{-5}$  →deneylerle tes edilmiş sabit değer

Günümüzde pek çok santrifüj cihazının üzerindeki hız ayarı rpm cinsinden verilmektedir. Fakat rpm değeri rotor çapına göre farklılıklara gösterdiğinde aynı örnek farklı rotor çaplarına sahip santrifüjlerde farklı rpm değerinde santrifüjlenmektedir. RCF ve rpm arasındaki çevirimi gösteren bir formül bulunmaktadır. Bu formül sayesinde her cihaz için gerekli rpm ayarlanabilir.

$$RCF = r (2\pi N)^2 (g \text{ cinsinden})$$

$$RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times r_{cm} \times n^2 (rpm \text{ cinsinden})$$

Yukarıdaki formüllerle RCF g ya da rpm cinsinden hesaplanabilir. Her örnek grubu ve çalışma için farklı büyüklükte ve rotor çapında santrifüj cihazları bulunmaktadır. Genellikle bunlar rotor çapı ve hızlarına göre üç grupta incelenmektedir. DNA izolasyon çalışmalarında kullanılan santrifüj cihazları orta hızlı santrifüjler olarak tanımlanır. Bu cihazlarda hız 20000xg hıza kadar çıkabilmektedir (17,18).

Klinik laboratuvarlarda santrifügasyonun kullanım amaçları:

- Partikülleri süspansen oldukları solüsyondan ayırma
- Kandan hücreleri ayırma
- Biyolojik sıvıların hücresel elemanlarını ve diğer kısımlarını konsantre etme
- Numuneden proteinleri uzaklaştırma
- İmmünokimyasal ölçümlerde serbest ligantları ayırma
- Farklı yoğunluktaki iki likit fazı ayırma



Şekil 3. Normal santrifüj, soğutmalı santrifüj

### PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR; DNA veya RNA üzerinde seçilmiş, bir veya birden fazla bölgenin, invitro şartlarda ısısız döngüler ve enzimler kullanılarak çoğaltılması işlemidir (4).

PCR ilk defa Kary B. Mullis tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır. Aynı yıl R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya sokulmuştur (20).

PCR işlemiyle her iki ucundaki dizilimi bilinen hedef DNA bölgesi çoğaltılabilir. Isı yardımıyla kalıp DNA üzerinde iki oligonükleotidin ve dört deoksiribonükleotidin (dNTP) varlığında denatürasyon başlatılır. Denatürasyon gerçekleştikten sonra tepkimenin ısısı oligonükleotid primerlerin kalıp DNA' ya bağlanabilmesi için düşürülür. Primerlerin bağlanmasının ardından uygun bir ısıya çıkarılarak DNA polimeraz yardımıyla uzama işlemi başlar. DNA çift zincirinin ayrılması (Denatürasyon), primer yapışması (Anneling), ve zincir uzaması (Extension) döngüleri bu şekilde birçok kez tekrarlanır. Herbir döngü çoğaltılmakta olan DNA ürününün miktarını ikiye katlar (20,21,22).

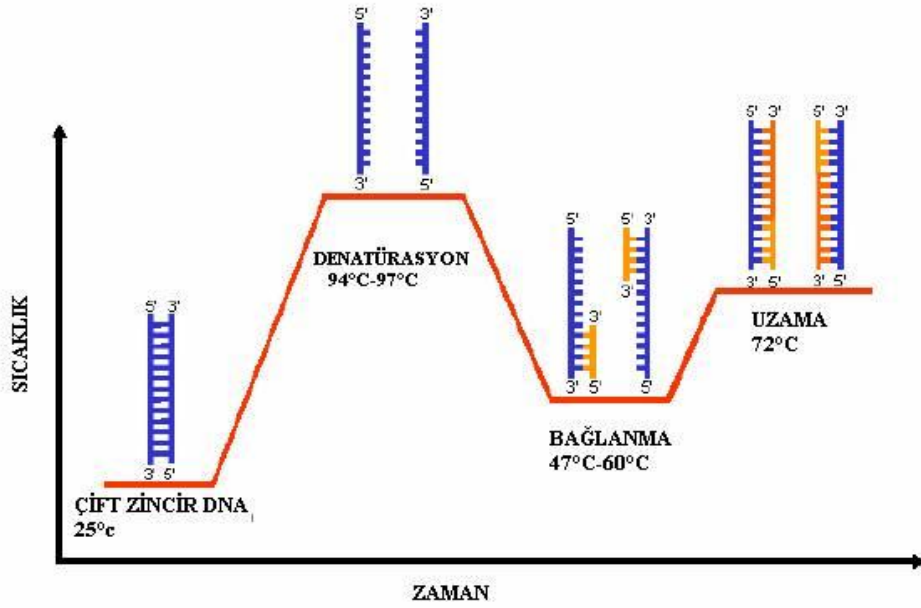


**Şekil 4. PCR cihazları (Gene Amp. PCR systems 9700, Corbett)**

Yukarıda kısaca anlatılan PCR işlemleri ve prensipleri detaylı olarak aşağıda anlatılmıştır.

**1) PCR işlemlerinin basamakları:** Polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü üç aşamadan meydana gelir.

- Denatürasyon
- Primer yapışması
- Zincirin uzaması



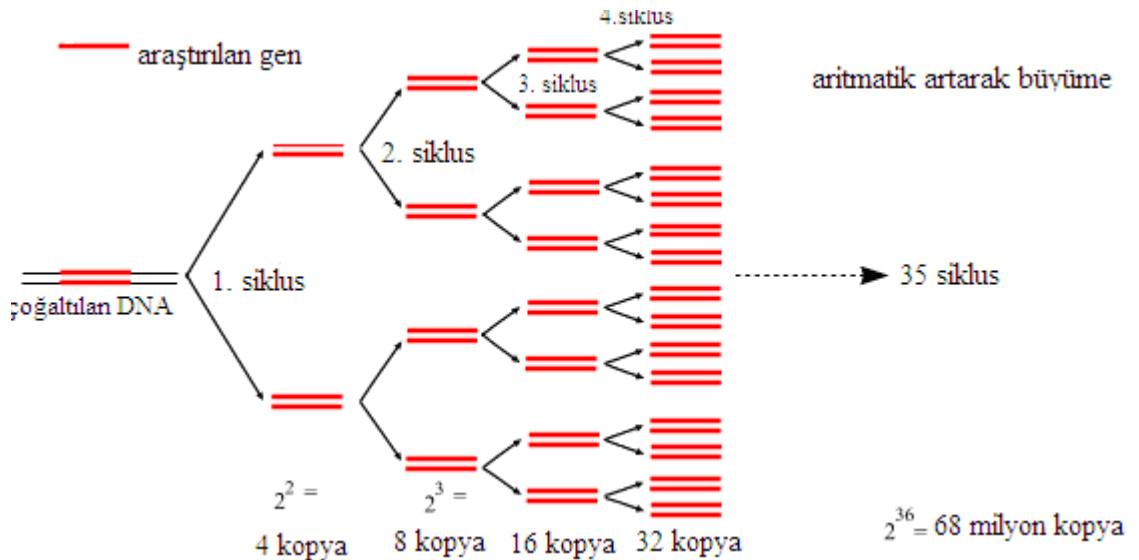
**Şekil 5. PCR ana işlem basamakları (23)**

a) Denatürasyon: Denatürasyon çift zincirli DNA moleküllerinin gerekli sıcaklığa ulaştıktan sonra açılmasıdır. DNA çift zinciri genellikle 94-97°C sıcaklık aralığında açılır. Burada meydana gelen kimyasal olay hidrojen bağlarının kırılmasıdır (21,24). Bir hidrojen bağı kırılmak için gerekli olan enerji 436 kJ/mol'dür (25). Guanin ve sitozinden (G+C) zengin diziler, sahip oldukları üçlü hidrojen bağları nedeniyle denatürasyon sıcaklığı artabilir. Denatürasyonun tam olmaması durumunda primer yapışması gerçekleşemeyeceğinden ya da primer yapışsa bile uzama istenildiği gibi olmayacağından PCR'nin gerçekleşmesi mümkün olmayabilir (21,24). Bu nedenle denatürasyon sıcaklığının dikkatli seçilmesi gerekir. Her PCR reaksiyonunda tüm genomik DNA'nın yeterince açılabilmesi için döngüsel basamaklardan önce 5-10 dakikalık ve tek adımlık bir denatürasyon basamağı uygulanmalıdır.

b) Primer yapışması (Annealing): Denatürasyon aşamasından sonra tek zincirli DNA dizisi elde edilir. Sıcaklığın 50-70°C'ye düşürülmesiyle ortama konulan ve çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki oligonükleotid primer tek zincirli DNA dizisine bağlanır. Primerin hedef diziyeye bağlanabilmesi için gerekli olan sürenin uzunluğu, uygulanacak olan ısı ve amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağlıdır (21,26).

c) Zincirin uzaması (Extension): Primer bağlanmasının devamında ortamdaki  $Mg^{+2}$  ve Taq Polimerazın yardımı ile dNTP'ler primerin ardına 5'-3' yönünde eklenirler. Yeni oluşan DNA zincirinin baz sırasını belirleyen, kalıp DNA'daki baz dizilimidir. Yeni sentezlenen DNA'nın uzama hızı 35-100 nükleotid/ saniyedir. Uzama zamanı hedef dizideki baz derişimi dizinin uzunluğu ve ısıya bağlıdır. Genellikle tercih edilen en uygun sıcaklık  $72^{\circ}C$ 'de 1 dakikadır. Döngüler genellikle 30-40 kez gerçekleştirilir. Bu kadar döngüden sonra ortamda reaksiyon bileşenlerinin miktarı azalacağından reaksiyona devam etmek gereksizdir. Sonuçta elde edilen PCR ürün miktarı başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA'nın konsantrasyonuna bağlıdır (20,21).

PCR bir zincir reaksiyonudur ve oluşan her yeni DNA zincir sayısı her döngüde iki katına çıkar ve oluşan yeni zincirle beraber eski zincirler de kalıp olarak kullanılmaya devam eder. Ortalama 5 dakika kadar süren bir döngü birçok kez tekrar edilir ve yaklaşık 3 saatlik bir sürede 25-30 döngü sonunda DNA miktarı milyon katından daha fazla artar. Bu işlem ısı döngü cihazı denilen makinelerde önceden döngü sayısı ve sıcaklığı belirtilmiş programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Elde edilen PCR ürünleri klonlama, dizi analizi, enzim kesimi gibi bir sonraki aşamaya geçmeye artık hazır hale getirilmiş olur. Buraya kadar klasik uygulamasını anlattığımız PCR'nin pek çok modifiye türü de vardır. Bunlardan bazıları daha sonra uygulama alanları ile birlikte detaylı olarak anlatılacaktır (21,24,27).



**Şekil 6. PCR ürünlerinin aritmetik olarak kopyalanması (28)**



**2) PCR temel bileşenleri:** Yukarıda reaksiyon şartları anlatılan PCR'nin gerçekleşebilmesi için gerekli olan maddeler; kalıp genetik materyal (DNA ya da RNA), çoğaltılmak istenen bölgeye özgül bir oligonükleotid çifti, DNA polimeraz enzimi,  $Mg^{+2}$ , çeşitli elektrolitleri içeren PCR tampon çözeltisi ve sudur. Bahsedilen PCR bileşenlerinin genel özellikleri ve PCR reaksiyonu esnasındaki davranışları aşağıda detaylı olarak açıklanacaktır.

Kalıp genetik materyal (DNA ve RNA): Kalıp olarak kullanılacak DNA ve RNA iki farklı nükleik asit molekülüdür. Bu nükleik asitlerin temel yapılarını anlattıktan sonra PCR'de genetik materyal olarak kullanılan DNA'nın yapısından ve RT-PCR ile DNA'ya çevirilen RNA'nın yapısından kısaca bahsedebiliriz.

DNA (Deoksiribonükleik asit): DNA molekülü canlılar için esas kalıtım materyali olan ve genetik özelliklerin ebeveynden yavruya geçişini sağlayan moleküllerdir. İlk kez İsviçre'li bir bilim adamı olan Friederic Mischer tarafından, 1869 yılında tanımlanmıştır. Çalışmalarında iltihabi lökositlerde proteinlerin yapısından farklı olarak asit karakterde bazı maddelerin varlığını saptayan araştırmacı, bunlara nüklein ismini vermiştir (29). Friederic Mischer ile benzer konuda çalışmalarını sürdüren bilim adamı Richard Altman (1889), asit karakterleri nedeniyle nükleinleri "nükleik asit" olarak adlandırmıştır (30). 1920'de ise Alman Kimyacı Robert Feulgen, nükleik asitleri, kendi adı ile anılan spesifik bir boyama yöntemi ile boyamayı (Feulgen) başarmıştır (31). Ardı ardına gerçekleştirilen benzer çalışmalar neticesinde 1953 yılında Watson ve Crick DNA materyalinin çift sarmallı bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (32,33). Bu yapının keşfinden sonra yapılan araştırmalar sonucunda nükleik asitlerin yapısına ilişkin pek çok bilgiye ulaşılmıştır.

Watson ve Crick'in çalışmaları birçok bilim insanının çalışmalarına kaynaklık etmiş ve sonuçta kimyasal olarak birbirinden farklı iki değişik nükleik asit molekülü olduğu açıklanmıştır. Bunlar: Deoksiribonükleik asit (DNA) ve Ribonükleik asittir (RNA) (21,34).

DNA, ökaryotik hücrelerin çekirdeğinde, mitokondrilerinde ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Ayrıca prokaryot hücrelerin sitoplazmasında halkasal DNA olarak, kromozom yapısında olmayan "plazmid" adı verilen lineer parçalar şeklinde ve genetik materyali DNA olan virüslerde bulunur (35).

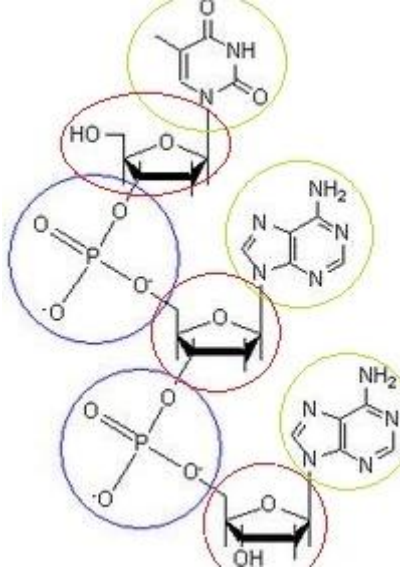
Çift dallı bir yapıya sahip olan DNA molekülünün üç temel yapıtaşı bulunmaktadır.

Bunlar;

Organik bazlar (pürin ve pirimidin bazları)

5 karbonlu pentoz şekeri

Fosforik asit molekülüdür (21,33).



**Şekil 7. Fosfat şeker ve organik bazlar (36)**

Organik bazlar: DNA'da iki çift organik baz bulunmaktadır. Bunlar azotlu bazlar olarak da bilinmektedir. Halkasal yapılarına ve içerdikleri atom sayılarına göre iki ayrı grupta incelenirler: Pürinler ve Pirimidinlerdir.

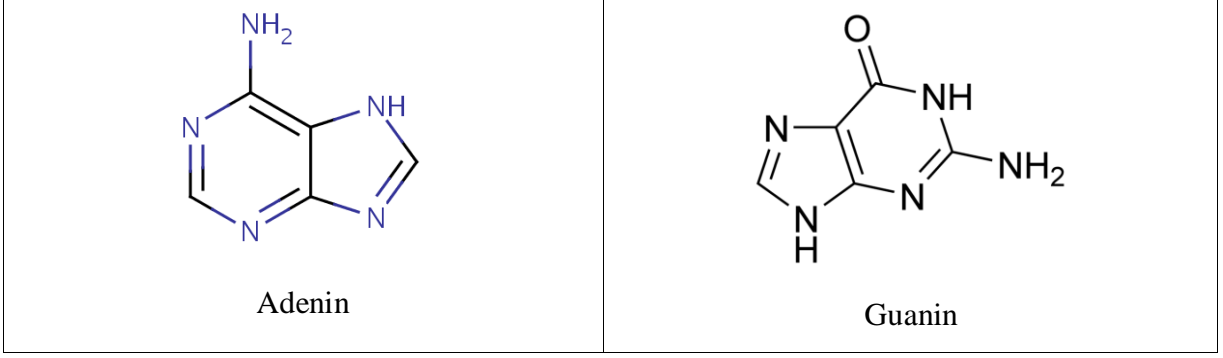
Pürin bazları: Pürinler biri 6 diğeri 5 atomdan oluşan iki halkasal yapının kaynaşmasından ortaya çıkmıştır. DNA'da iki tür pürin bazı vardır bunlardan biri adenin diğeri guanindir.

Adenin: 6-amino pürin

Guanin: 2-amino-6-oksi pürin (37).

Adenin ve guanin bazlarının moleküler ağırlıkları A=135.13 dalton, G=151.13 dalton'dur.

(1 dalton:  $1.67 \times 10^{-24}$  gr)



Şekil 8. Adenin bazının yapısı (38)

Şekil 9. Guanin bazının yapısı (39)

Pirimidin bazları: Pirimidinler 4 karbon ve 2 azottan oluşmuş tek halkasal yapıya sahiptirler. DNA'da iki tip pirimidin bazı vardır bunlardan biri sitozin diğeri timindir (37).

Urasil nükleik asitlerin yapısına katılan ancak sadece RNA'nın yapısında bulunan bir pirimidin bazıdır. Sitozin ve timin bazlarının moleküler ağırlıkları C=111.10 dalton, T=126.12 dalton'dur.

Pirimidinler:

Urasil: 2-4 dioksi pirimidin

Timin: 2-4-dioksi-5-metil pirimidin

Sitozin: 2-oksi-4-amino Pirimidin



Şekil 10. Timin, sitozin, urasil bazlarının yapısı (40)

DNA'nın yapısı hakkında en önemli ipucu Erwin Chargaff ve meslektaşlarının 1940 sonlarındaki çalışmalarında bulundu. Erwin Chargaff ve meslektaşları, DNA'daki dört nükleotid bazının, farklı organizmaların DNA'larında farklı oranlarda bulunduğunu ve bazı bazların miktarları arasında ilişkiler olduğunu buldular ki bu çalışmaların sonuçları, Chargaff kuralları diye bilinmektedir.

Bu kurallara göre;

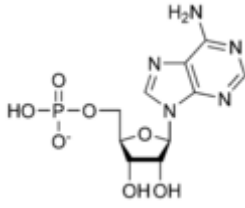
1. DNA'nın baz kompozisyonu genellikle türden türe değişir.

2. Aynı türlerin farklı dokularından izole edilen DNA örnekleri aynı baz kompozisyonuna sahiptirler.
3. Belli bir türdeki DNA'nın baz kompozisyonu yaş, beslenme durumu ve çevre değişimi ile değişmez.
4. Türler ne olursa olsun bütün DNA'larda adenin (A) bazlarının sayısı timin (T) bazlarının sayısına eşittir ve guanin (G) bazlarının sayısı sitozin (C) bazlarının sayısına eşittir ( $A = T$  ve  $G = C$ ). Buna göre pürin kalıntılarının toplamı pirimidin kalıntılarının toplamına eşittir ( $A+G = T+C$ ) (37).

Nükleozidler: Bir pürin ya da pirimidine riboz veya 2-deoksiriboz şekerlerinden biri eklenirse nükleozid adı verilen bileşikler meydana gelir. Nükleozitlerde şekerin 1. karbon atomu pürin bazlarının 9. azot atomuna ve pirimidin bazlarının 1. azot atomuna N-glikozitik bağ ile bağlıdır. Bağlanma sonucu oluşan nükleozid pürinlerde: pürin adına ilaveten –ozin (adenozin, guanozin), pirimidinlerde; pirimidin adına ilaveten –idin (timidin, sitidin) ekleri ile isimlendirilirler. Şekerin 2-deoksiriboz şekeri olduğu nükleozid isminden önce “d-“ şeklinde gösterilerek belirtilir. Eğer hiçbir şey yoksa bu riboz şekeri olarak kabul edilir (21).

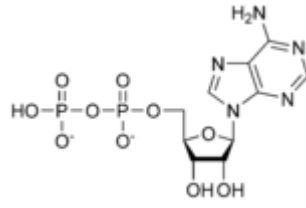
Nükleotidler: Nükleik asitlerin yapısında bulunan üçüncü yapıtaşı fosfat molekülü ( $H_3PO_4$ ) olup, hem DNA hem de RNA'da bulunmaktadır.

Nükleozidlerin riboz veya deoksiriboz gruplarına bir veya birden fazla fosfat grubunun bağlanmasıyla nükleotidler meydana gelir. Genellikle fosfat grubu şekerin 5' karbonuna ester bağı ile bağlıdır. Eğer birden fazla fosfat grubu bulunursa bunlar birbirlerine yüksek enerjili asit anhidrit bağı ile bağlanırlar (21).



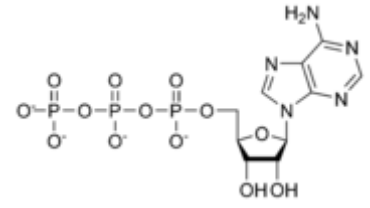
adenozin monofosfat

AMP



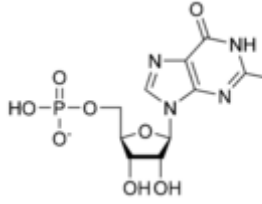
adenozin difosfat

ADP



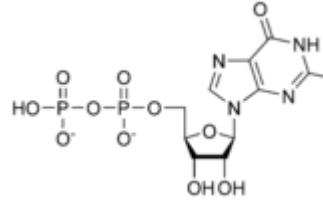
adenozin trifosfat

ATP



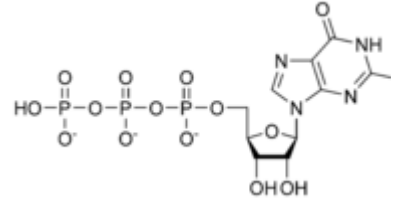
guanozin monofosfat

GMP



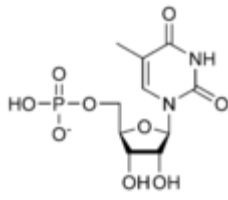
guanozin difosfat

GDP



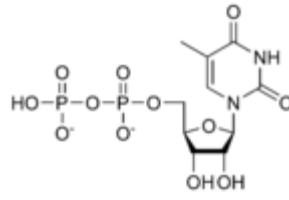
guanozin trifosfat

GTP



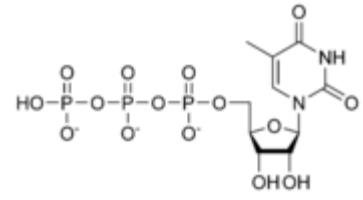
timidin monofosfat

TMP



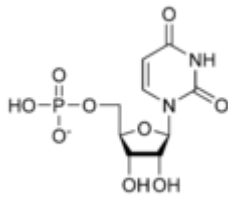
timidin difosfat

TDP



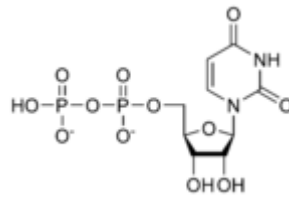
timidin trifosfat

TTP



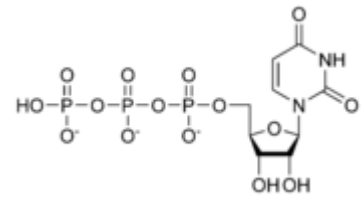
uridin monofosfat

UMP



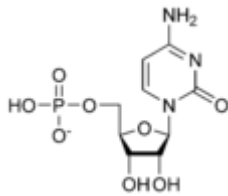
uridin difosfat

UDP



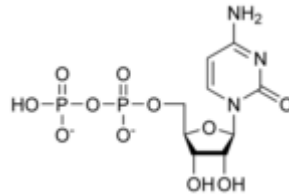
uridin trifosfat

UTP



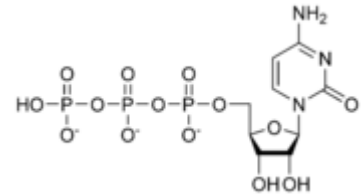
sitidin monofosfat

CMP



sitidin difosfat

CDP

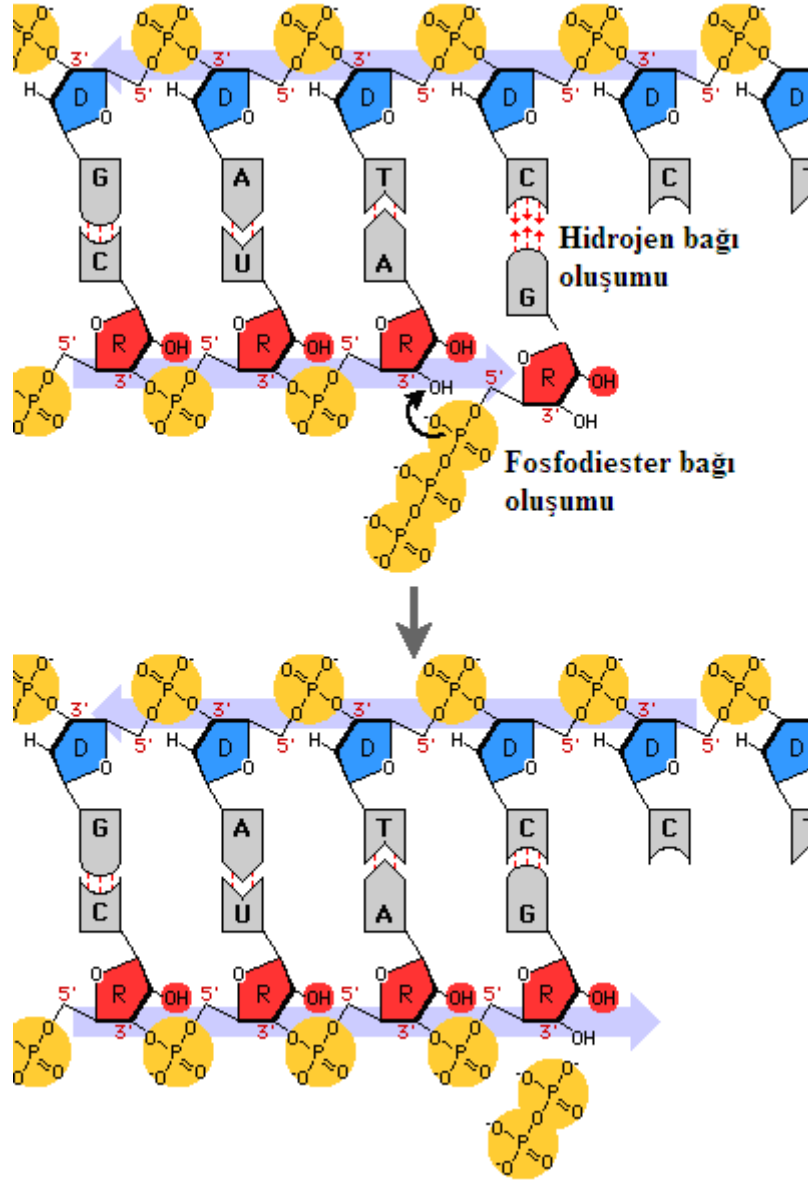


sitidin trifosfat

CTP

Şekil 11. Nükleozid oluşum şeması (41)

Polinükleotidler: Nükleotidler 3'-5' fosfodiester bağları ile polimerize olarak polinükleotidleri oluştururlar. Ribonükleotidlerin polimerizasyonu RNA oluşumuna yol açarken, deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonu ile DNA oluşur (21,34). DNA ve RNA arasındaki temel farkları tablo halinde inceleyecek olursak aralarındaki farkları görebiliriz.



Şekil 12. Hidrojen bağlarının ve fosfodiester bağlarının oluşumu (42)

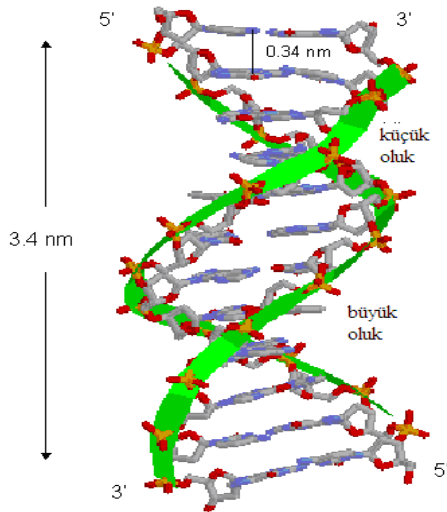
**Tablo 1. DNA ve RNA temel farkları**

	DNA	RNA
İçerdiği şeker grubu	Deoksiriboz	Riboz
Azotlu bazlar	Adenin,Guanin,Sitozin,Timin	Adenin,Guanin,Sitozin,Urasil
Sarmal yapı	Çift zincir	Tek zincir
Türler	Nükleer, Mitokondrial, Plazmid DNA'lar	tRNA, mRNA, rRNA,vs.

**DNA:** Deoksiribonükleozidtrifosfat; **RNA:** Ribonükleozidtrifosfat

DNA genel olarak çift sarmal bir yapıya sahip olmasına karşın birkaç virüs tek zincirli bir DNA yapısı gösterirler. Sarmal yapıyı oluşturan iki zincir ortak bir nokta etrafında dönerek çift heliks yapısını oluşturur. Çift heliks yapıda zincirler birbirlerine anti paralel uzanırlar. DNA heliksin en sık rastlanan şekli B-DNA modelidir. B-DNA şeklinde hidrofilik deoksiriboz fosfatlar ana yapının dış kısmında yer alırken hidrofobik bazlar ana eksenin iç kısmına konumlanmıştır (35). Heliks yapıdaki bu yerleşim zincirde major ve minör olukların oluşmasına yol açar (35,43).

Çift zincirli DNA molekülü, pürin ve pirimidin bazlarının birbirleri ile H bağları oluşturması sonucu meydana gelmektedir. Pürin ve pirimidin bazları arasındaki eşleşmeler son derece spesifiktir bunun nedeni moleküler büyüklükleridir. Bu diziliş A karşısına T; G karşısına C olacak şekilde düzenlenmiştir. Böylece tek bir zincire ait baz dizilimi bilindiğinde DNA molekülünün diğer zincirindeki baz dizilimi de saptanır (35).

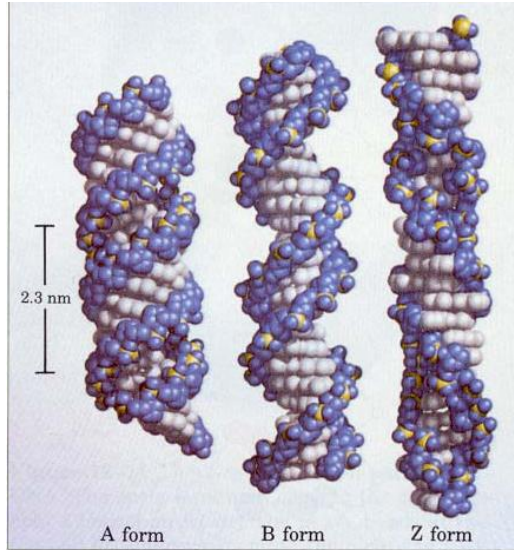


**Şekil 13. DNA'nın çift sarmal yapısı (44)**

DNA'nın içinde bulunduğu ortamın ısı arttırılır ya da pH değiştirilirse çift zincirli DNA molekülünün yapısında bozulmalar meydana gelmeye başlar. Bunun nedenin bazların arasında bulunan hidrojen bağlarının ısı ve pH değişimlerinden çabuk etkilenmeleridir. Şeker ve fosfat grupları aralarında bulunan fosfodiester bağları bu değişimlerden çok kolay etkilenmezler. Bu şekilde bir değişimle DNA çift zincirinin birbirinden ayrılarak heliks yapısının yarısının açıldığı ısıya, DNA'nın erime derecesi (melting temperature,  $T_m$ ) denir. DNA'nın çift sarmal yapısının bozularak tek zincir haline dönüşmesi olayına denatürasyon denir.

A ve T bazları arasında ikili hidrojen bağı; G ve C bazları arasında üçlü hidrojen bağı bulunduğundan G ve C arasındaki bağı A ve T arasındaki bağlara göre daha yüksek sıcaklık ve konsantrasyonda çözülebilir. Böylece G ve C'ce zengin DNA molekülünün denatürasyonu daha zordur. Sıcaklık ve pH değişimleri ile birbirinden ayrılan DNA molekülü ortam koşulları normale döndüğünde tekrar eski halini alır. Bu olaya renatürasyon adı verilir.

DNA molekülü başlıca üç farklı şekil görülür. B-form DNA olarak tanımlanan yapı (Watson-Crick tarafından tanımlanan yapı), fizyolojik şartlar altında DNA molekülü için en stabil yapıdır ve bu nedenle DNA'nın özelliklerinin herhangi birinin incelenmesi için standart referans noktasıdır. B-form DNA'dan başka A- ve Z-form DNA'lar da vardır (21,35).



**Şekil 14. DNA çeşitleri (45)**

A-form DNA, nispeten susuz birçok çözeltilerde saptanır; belli bir DNA molekülü için B-form DNA'dan daha kısa ve daha geniştir.



Z-form DNA, B-form DNA'dan daha farklıdır; en belirgin farklılık, sola dönen helezon şekli ve iskeletinin zikzak görünümüdür.

**Tablo 2. DNA çeşitleri ve özellikleri**

DNA tipleri	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Şekil	En geniş	Orta	En uzun
Baz uzaklığı	2.3 A°	3.4 A°	3.8 A°
Heliks çapı	25.5 A°	23.7 A°	18.4 A°
Dönüş yönü	Sağ	Sağ	Sol
Glikozid bağ	Anti	Anti	Anti:C T syn:G
Bir heliks dönüşü baz çifti	11	10.4	12
Büyük oluk	Dar, derin	Geniş, derin	Düz
Küçük oluk	Çok geniş, yayvan	Dar, derin	Çok dar, derin

Bazı DNA'lar olağan dışı yapılar gösterirler. Olağan dışı bir DNA yapısı H-DNA olarak bilinir ki bunun alışılmamış özelliği, bir üçlü heliks oluşturmak için DNA'nın üç kolunun eşleşmesi ve birbirine dolaşmasıdır. H-DNA üçlü heliksinin üç kolundan ikisi pirimidin içerir; üçüncüsü pürin içerir (21,34).

RNA yapı ve özellikleri: RNA'lar ribonükleotidlerin bir araya gelmesiyle oluşan tek zincirli nükleik asitleridir. DNA'daki genetik bilginin fonksiyonel bir proteine dönüşümünde rol alan nükleik asit molekülüdür.

RNA, bazı özellikleri bakımından DNA'dan farklıdır:

- RNA'nın molekül ağırlığı, DNA molekül ağırlığından çok daha küçüktür. RNA, DNA ile kıyaslandığında çok kısa bir polimerdir. DNA molekülü çok uzun iplik şeklinde olduğu halde RNA'nın molekülü yumak şeklindedir.
- RNA molekülündeki pentoz 2-deoksiriboz değil, ribozdur.
- RNA molekülü timin (T) içermez; timin yerine urasil (U) içerir.
- RNA molekülünde guanin (G) sayısı sitozin (C) sayısına eşit olmayabilir; aynı şekilde adenin (A) sayısı urasil (U) sayısına eşit olmayabilir.
- RNA tek zinciri bazen firkete modeli gibi çeşitli modeller oluşturabilir. Firkete yapıdaki RNA'larda molekülün komplementer baz içeren bölgelerinde çift sarmal

yapıya rastlanabilmektedir. RNA'nın çoğu sitoplazmada, DNA ise nükleusta yer almaktadır (35).

- Sadece DNA feulgen reaktifi ile boyanabilirken RNA boyanamamaktadır (35,46).

DNA'da olduğu gibi RNA'nın da çeşitleri vardır. Hücre içinde rol aldıkları görevlere göre incelenmiştir.

**Haberci RNA (mRNA):** Protein sentezinde görev alır. Her mRNA bir polipeptit zincirine karşılık gelir fakat prokaryotlarda bir polipeptit zincirine birden fazla RNA karşılık gelebilir. Bunun sonucu olarak RNA'lar hücre de farklı boyutlarda bulunabilir. Bir hücredeki RNA'ların %5'ini mRNA'lar teşkil eder (43). DNA'dan RNA sentezinin ilk basamağında yer alır ve DNA'daki T bazına karşılık A; C bazına karşılık gelen G'dir. DNA'dan farklı olarak A bazına mRNA'da karşılık gelen U bazıdır. Nükleus ve sitoplazmada yer alır (47,48).

**Transfer RNA (tRNA):** Amino asitleri ribozoma taşımakla görevlidir. 20 farklı amino asidi taşıyan en az bir tane tRNA vardır. tRNA'lar 75-95 arası baza sahip olduklarından en küçük RNA'lardır. Yaklaşık olarak hücredeki RNA'ların %15'ini oluştururlar (35). Hücrede sentezlenerek aktif hale getirilen amino asit molekülleri kendilerine spesifik tRNA moleküllerince aranıp bulunur ve tRNA moleküllerinin serbest ucu özgül aminoasitlerle birleşir. tRNA molekülleri kendilerine bağlı olan aminoasitleri ribozom mRNA kompleksine bırakarak görevini tamamlamış olur. Sitoplazmada yer alır (47).

**Ribozomal RNA (rRNA):** Ribozomların bir parçasıdır. Diğer RNA tipleri gibi özgül değildir doğrudan doğruya DNA'dan sentezlenir. 13, 14, 15, 21 ve 22. kromozomların kısa kollarında DNA bölgesi rRNA kodlayan genlerin kopyalarını sentezletir. Bir kısmı nükleusta diğer bir kısmı ise nükleolusta yer alır (47). Hücre içinde yaklaşık %80 oranında bulunarak RNA tipleri arasında en çok olanıdır. Prokaryotik ve ökaryotik hücre ribozomlarında farklı tipleri bulunur. Prokaryotlarda, 5S, 16S ve 23S ökaryotlarda ise 5S, 5.8S, 18S ve 28S'lik RNA tipleri vardır (35,48).

**Heterojen nükleer RNA (hnRNA):** Nükleusta bulunur. Yüksek moleküler ağırlığa sahip olan öncü mRNA'lardır. Hücrelerdeki toplam RNA'nın yarısını oluştururlar (35,47).

Küçük nükleer RNA (snRNA): Altı tip snRNA vardır. Herbirinde 100-215 nükleotid bulunur ve RNA'da intronların kesilmesi işlemleri ile ilişkilidirler (47,48).

Küçük stoplazmik RNA (scRNA): Nükleusta bulunur. Transport fonksiyonlarında yer alan küçük RNA yapılarıdır (35,48).

PCR reaksiyonlarında RNA esas olarak Reverse Transkriptaz enzimi ile cDNA elde etmek üzere kalıp olarak kullanılır. Yapısal değişiklikler ve diğer özellikler cDNA üzerinde incelenmektedir.

PCR çalışmalarında klonlanmış bir DNA parçası için nanogram, genomik DNA için ise mikrogram düzeyinde miktarlar kullanılır.

Oligonükleotidler (Primerler): PCR ürününe özgül olan, daha önceden belirlenmiş uzunlukları 18-30 baz çifti arasında değişen dizileridir. Primer dizilimi yapılırken çoğaltılması istenen DNA dizisindeki iki ucu bilinen noktalar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır (4). Primer hazırlamak için bilgisayar programları yapılmış olmakla beraber genellikle araştırmacılar kendi primerlerini kendileri hazırlayabilirler. Dizilim yapılırken genellikle dört bazın eşit oranda kullanımına dikkat edilir. Primerler, aralarında tek bir nükleotid farkı olan hedef dizileri birbirinden ayıracak şekilde tasarlanır ve böylece genetik testler için allele spesifik problar hazırlanabilir (21). En önemli nokta kullanılacak primerin amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmasıdır. Konsantrasyonları 0,1 ve 0,5  $\mu$ M arası değişir. Primer tasarımı yapılırken dikkat edilmesi gereken önemli noktalar:

- Genellikle en fazla 30 baz çifti uzunluğunda olmalıdır.
- Özellikle G-C oranının %50'nin altında kalmasına özen gösterilmelidir.
- $T_m$  sıcaklığı birbirine yakın primer çiftlerinin seçilmesine dikkat edilmelidir.
- Seçilen primerin genomda başka bir bölgeye komplementer olup olmadığının NCBI, VEGA, ENSEMBL vb. genom veri bankalarından kontrolü yapılmalıdır.
- Seçilen primer çiftlerinin primer-dimer yapma olasılıklarının olmamasına dikkat edilmelidir.

Birçok araştırmacının  $T_m$  sıcaklığının belirlenmesi üzerine yapmış oldukları çalışmalar neticesinde primerin sahip olduğu her çift bazın  $T_m$  sıcaklığını ortalama 6 °C arttırdığı tespit edilmiştir.

Primer dizayn edilirken erime sıcaklığının hesaplanmasında komşu bazların ne olduklarına dikkat edilmelidir. Bu aşağıdaki formül ile hesaplanabilir.

$$T_m^{\text{primer}} = \Delta H [\Delta S + R \ln (c/4)] - 273.15^\circ\text{C} + 16.6 \log_{10} [K^+]$$

H: Entalpy

S: Entropy

R: Molar gaz sabiti

c: Primer konsantrasyonu

Primer uzunluğu 18-30 baz arasında seçilmelidir. Genetik çalışmalarda sadece baz sayıları dikkate alınarak  $T_m$  sıcaklığını hesaplamanın basit bir formülü de bulunmaktadır.

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$$

Tabloda sıklıkla kullanılan primer uzunlukları ve bunların  $T_m$  değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 3. %50 GC oranına göre primer uzunluk hesaplanması**

Primer uzunluğu	$T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$	Primer uzunluğu	$T_m = 2(A+T) + 4(G+C).$
4	12°C	16	48°C
6	18°C	18	54°C
8	24°C	20	60°C
10	30°C	22	66°C
12	36°C	24	72°C
14	42°C	26	78°C

$T_m$  hesaplamasına alternatif diğer bir formül ise;

$$T_m = 81.5 + 16.6 (\log_{10}[K^+] + 0.41 (\%G+C) - 675 / \text{Primer uzunluğu}.$$

Aşağıda verilen formülde ise 50 mM KCL, PCR için sabitlenerek hesap yapılmıştır.

$$T_m = 59.9 + 0.41 (\%G+C) - 675 / \text{Primer uzunluğu} (49).$$

DNA polimeraz enzimi: DNA polimeraz enzimleri kalıp ipliği tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek için orijinal kalıp iplikteki baz dizisini kullanarak, 4 çeşit deoksirbonükleozid trifosfatı ucuca ekleyerek uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) ihtiyaç duyarlar. Ortamdaki dNTP'lerin 5' ucundaki fosfatın primerin serbest 3' hidroksil ucuna nükleofilik etki yapmalarıyla fosfodiester bağları oluşarak yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Bu nedenle sentez daima 5' uçtan 3' uca doğru yapılır (50).

İlk zamanlarda kullanılanların aksine şuan kullanılmakta olan DNA polimeraz enzimleri ısıya daha dayanıklıdır. Daha önceleri kullanılan Escheria coli DNA polimeraz I enziminin Klenow fragmenti sıcaklığa dayanıklı olmadığından dolayı her PCR döngüsünün denatürasyon basamağından sonra yeniden enzim eklenmesi gerekmektedir. Fakat günümüzde kullandığımız termostabil DNA polimerazlar bu zorunluluğu ortadan kaldırmaktadır. Termostabil olma özelliği enzimin ısı döngüleri sırasında aktivitesini kaybetmeden tüm basamakların aynı kalitede gerçekleşmesini sağlamaktadır. Daha da geliştirilmiş hot-start DNA polimerazlar diziye özgül sıcaklıklarda çalışmasını kolaylaştırarak PCR kalitesini yükseltmiştir. Reaksiyon başına eklenmesi gereken enzim miktarı 50 µl'lik reaksiyon hacmi için ortalama 1-5 ünite arasında değişmektedir (27). Ticari olarak temin edilebilen pek çok DNA Polimeraz çeşidi olmakla birlikte thermus aquaticus isimli sıcak su kaynaklarında bulunan bir bakteriden elde edilen taq polimerazlar pratikte sıklıkla tercih edilen DNA polimerazlardır.

dNTP karışımı: Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da karışım halinde ticari olarak sağlanabilir. Stok konsantrasyonu genellikle 100 mM civarındadır. Kullanım aşamasında 100 mM'lık stoktan 2mM'lık daha seyreltik çözeltiler hazırlanarak kullanılmalıdır. Çözeltilerin seyreltilip stoklanması diğer bir nedeni ise kontaminasyon olmasını engellemektir (51).

$M1.V1=M2.V2$  formülü kullanılarak seyreltme işlemi yapılabilir.

Örnek problem: 100 mM'lık bir stok çözeltiden 2mM'lık 500 µl yeni bir çözelti hazırlayabilmek için stok çözeltiden ne kadar kullanmak gerekir?

$$M1.V1=M2.V2 \dots\dots\dots 100.V1=2.500\dots\dots\dots$$

$$V1=1000/100=10 \mu\text{l} \text{ stok çözelti } 490 \mu\text{l} \text{ distile su ile } 500 \mu\text{l}'\text{ye tamamlanır.}$$

Yapılacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonunun belirlenmesi 5 faktöre bağlıdır

- Magnezyum Klorür ( $MgCl_2$ ) konsantrasyonu
- Reaksiyon koşulları
- Primer konsantrasyonu
- Çoğaltılan ürünün boyu
- PCR döngü sayısı

PCR işlemine başlamadan önce en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir.

Mg<sup>+2</sup> iyonu: Mg<sup>+2</sup> iyonlarının esas işlevi DNA polimerazın aktivitesini başlatmak ve primer-kalıp DNA hibridizasyonunu sağlamaktır. Ayrıca çift iplikli DNA'nın erime noktası (T<sub>m</sub>) değerini arttırmalarıdır. PCR ortamına MgCl<sub>2</sub> tuz çözeltisi şeklinde eklenen Mg<sup>+2</sup> iyonunun reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu farklı PCR uygulamalarında değişiklik gösterebilir. Genellikle 0,5-5,0 mM'lık değerler arası tercih edilmekle birlikte her PCR uygulaması için optimizasyon çalışması yapmak gerekebilir. Düşük Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonu ise istenmeyen ürün birikimine ve kirliliğe yol açar (4).

PCR tamponu: PCR tampon çözeltisinin karışımı beraber kullanıldığı enzime ve PCR şartlarına göre değişiklik gösterebilir. Tris-HCl, Tris-Asetat, Taps tampon çözeltilerinde en sık kullanılan kimyasallardır. PCR tamponu olarak, Taq DNA polimeraza özgü olduğundan en çok tercih edilen, kullanım dozu 10-50 mM arası değişen Tris-HCl'dir. Tamponun pH'sı 8,3-8,8 arası değişiklik gösterebilir. Bu tampona 50 mM kadar KCl çözeltisinin eklenmesi primer bağlanmasını kolaylaştırır. Fakat 50 mM üzerinde KCl veya NaCl çözeltilerinin eklenmesi Taq DNA polimeraz aktivitesini düşürür (52).

Trakya Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında rutin çalışmalarda uygulanan PCR protokolü (3100 Avant-ABI, Roche):

#### **FMF Ekson 10 için PCR ile laboratuvar çalışma protokolü**

**Tablo 4. PCR karışım protokolü**

<b>PCR İçeriği</b>	<b>Miktar (µl)</b>
Steril distile su	22.75 µl
10 x PCR Buffer	5 µl
dNTP	4 µl
Forward Primer	5 µl
Reverse Primer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	3 µl
Taq Polimeraz	0.25 µl
Genomik DNA	5 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>50 µl</b>

## PCR programı

**Tablo 5. Ekson 10 PCR standartları**

PCR Isısı (°C)	Süre
94 °C ( 1 döngü)	10 dk
94 °C 58 °C 72 °C } (40 döngü)	30 sn 30 sn 1 dk
4 °C ( 1 döngü)	∞

PCR aşamasını da geçen ürünler dizileme işlemleri yapılmadan önce yapılmış olunan ilk PCR işleminin başarılı olup olmadığını saptanması amacıyla bir elektroforez işlemine tabi tutulmalıdır. Ardında sağlıklı bantlar elde edilen ürünlere ikinci bir PCR işlemi uygulanabilir.

## PCR (dizileme) Protokolü

**Tablo 6. Dizileme için PCR işlem materyali**

PCR İçeriği	Miktar (µl)
Steril distile su	8 µl
Big Dye	2 µl
5 x Sequence buffer	3 µl
Forward-Reverse primerler ( Ayrı tüplere)	5 µl
Pürifiye 1. PCR ürünü	2 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>20 µl</b>

**Tablo 7. Dizileme (Sekans) için PCR programı**

PCR Isısı (°C)	Süre
94 °C ( 1 döngü)	2 dk
94 °C 50 °C 60 °C } (40 döngü)	10 sn 5 sn 2.5 dk
4 °C ( 1 döngü)	∞

**10 X buffer:** 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 olacak şekilde ve 25°C; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.01% gelatin karıştırılarak toplam stok 1.5 ml

**dNTP:** Herbirinden 0.5 ml içerir. 10 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP

**MgCl<sub>2</sub>:** 25 mM (± 1 mM) toplam hacim 1.5 ml (53).

PCR engelleyicileri ve arttırıcıları: Çeşitli maddelerin PCR basamaklarını engellemesi için tehlike oluşturması, PCR'de kullanılan biyolojik örneklerin çeşitliliğinden ve DNA izolasyonunda kullanılan yöntem ve maddelerden kaynaklanmaktadır. Çok çeşitli biyolojik materyal PCR'de DNA kaynağı olarak kullanılabilir. Örneğin insan DNA'sı periferal kan hücrelerinden, idrardan, feçesten, hücre döküntülerinden, saç kökünden, semenden, biyopsi materyalinden, amniyon sıvısı gibi değişik biyolojik kaynaklardan izole edilebilir.

Bu doğal kaynaklar çok çeşitli bilinmeyen engelleyiciler içerirler. Bunlara birkaç örnek vermek gerekirse:

- UV ışık; birbirine komşu pirimidin bazlar arasında verimli bir birleşme olmasına engel olur.
- Gamma radyasyon; deiyonize su içindeki serbest radikallere oluşumuna neden olduğu için verimi düşürür.
- Restriksiyon enzim; PCR ürünlerinin parçalanmasına neden olur.
- Hidroksilamin; sitozin nükleotidinin oksijen atomu ile birleşerek kovalent bağlı bir ek oluşturarak guanin bazı ile birleşmesini engeller (54).
- Guanin ve siztozince zengin bir primer tercih edildiğinde denatürasyon sıcaklığı artacağından DNA uzun süre yüksek sıcaklığa maruz kalır ve DNA polimerazın aktivitesi düşer (21).

Eğer PCR arttırıcıları birkaçını sıralayacak olursak:

- Gliserol; polimeraz enzimini stabilize ederek denatürasyonu düzenler.
- Formamid; denatürasyon sıcaklığını düşürerek denatürasyonu kolaylaştırır.
- Tween 20; iyonik deterjanların polimerizasyon sırasındaki olumsuz etkilerini inhibe eder.
- Gen 32 protein; polimeraz aktivitesini arttırır (52).

PCR ürünlerinin belirlenmesi ve analizi: PCR ürünleri boyları 100 ile 5000 baz çifti arasında değişen sentetik DNA parçalarıdır. Bu ürünlerin analiz edilebilmesi için çeşitli tekniklerle görüntülenmeleri gerekmektedir. Bu görüntüleme teknikleri ile PCR ürününün kalitatif ya da kantitatif değerlendirmesi yapılabilir (55).

Bu yöntemler arasında en basit ve en sık kullanılanı elektroforez yöntemleridir.

### **3) Elektroforez Yöntemleri**



- a) Agaroz jel elektroforez
- b) Poliakrilamid jel elektroforezi
- c) Kapiller elektroforez

Elektroforez ilk kez 1930 yılında, İsveçli kimyacı Tiselius tarafından keşfedilmiştir. Elektroforez, elektriksel yük taşıyan moleküllerin, bir elektrik alan içinde birbirinden ayrılmasını sağlayan bir analitik yöntemdir. Elektroforezin temel kuralı çalışılan maddelerin elektriksel olarak pozitif veya negatif yük taşımasıdır. DNA da elektriksel olarak negatif yüklü olduğundan elektrik alanlarında pozitif kutba doğru hareket eder. Bu özelliği nedeniyle elektroforeze tabi tutulabilir. Elektroforez esnasında moleküller büyüklüklerine ve yapılarına göre farklı şekillerde hareket edebilirler. Büyük moleküller küçük moleküllerden daha yavaş hareket etmektedir. Bu kural DNA için de geçerlidir ve uygun destek ortamlarında farklı boylarda DNA örneklerini boylarına göre ayırıştırıp incelemek mümkün olabilmektedir. DNA'daki yapısal farklılıklarda DNA'nın hareket hızını etkileyebilmektedir. Örneğin, halkasal bir DNA molekülü eşit kütledeki doğrusal bir DNA molekülünden daha yavaş ilerler (56).

Jel elektroforezinde destekleyici ortam, molekülleri büyüklüklerine ve yapısal özelliklerine göre ayırmak için kullanılır. Ayırımı yapılacak molekülün türüne göre destekleyici madde, poliakrilamid, agaroz, agaroz-akrilamid gibi karışımlardan yapılabilir.

Agaroz jel elektroforezi genellikle boyut olarak büyük olan DNA moleküllerinin ayırımı için tercih edilir. Poliakrilamid jel elektroforezi ise genellikle küçük DNA fragmentlerinin ve RNA moleküllerinin ayırımında kullanılır. Bu tür jellerin ayırım güçleri çok yüksek olduğundan genellikle birbirine çok yakın boyuttaki DNA moleküllerinin ayırımı için tercih edilebilirler (57). Kapiller elektroforez ise daha çok otomatik DNA cihazlarında kullanılır. Destek ortamı polikarbon bileşikler olan polimerlerdir. Bu polimerler yoğunluklarına göre farklı ayırım gücüne sahiptirler. Kullanılan polimer otomatik cihazlarda çapları milimetreden küçük olan cam kapillerler içine yüklenirler (24). Kapiller elektroforez (CE), elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayırımı ve moleküler boyuttaki farklılıklara göre elektrokinetik ayırım yapabilen bir tekniktir (58).

**a) Agaroz jel elektroforezi:** Agaroz kırmızı bir alg olan Agar agar'dan izole edilen doğrusal bir polisakarittir. Agaroz ısı ile muamele edildiğinde sıcak su içinde çözünen ve soğutulduğunda jelimsi bir şekil alan bir yapıya sahiptir. Soğutulurken polimerlerindeki hidrojen bağlarının oluşumu ile jel şeklini alır.

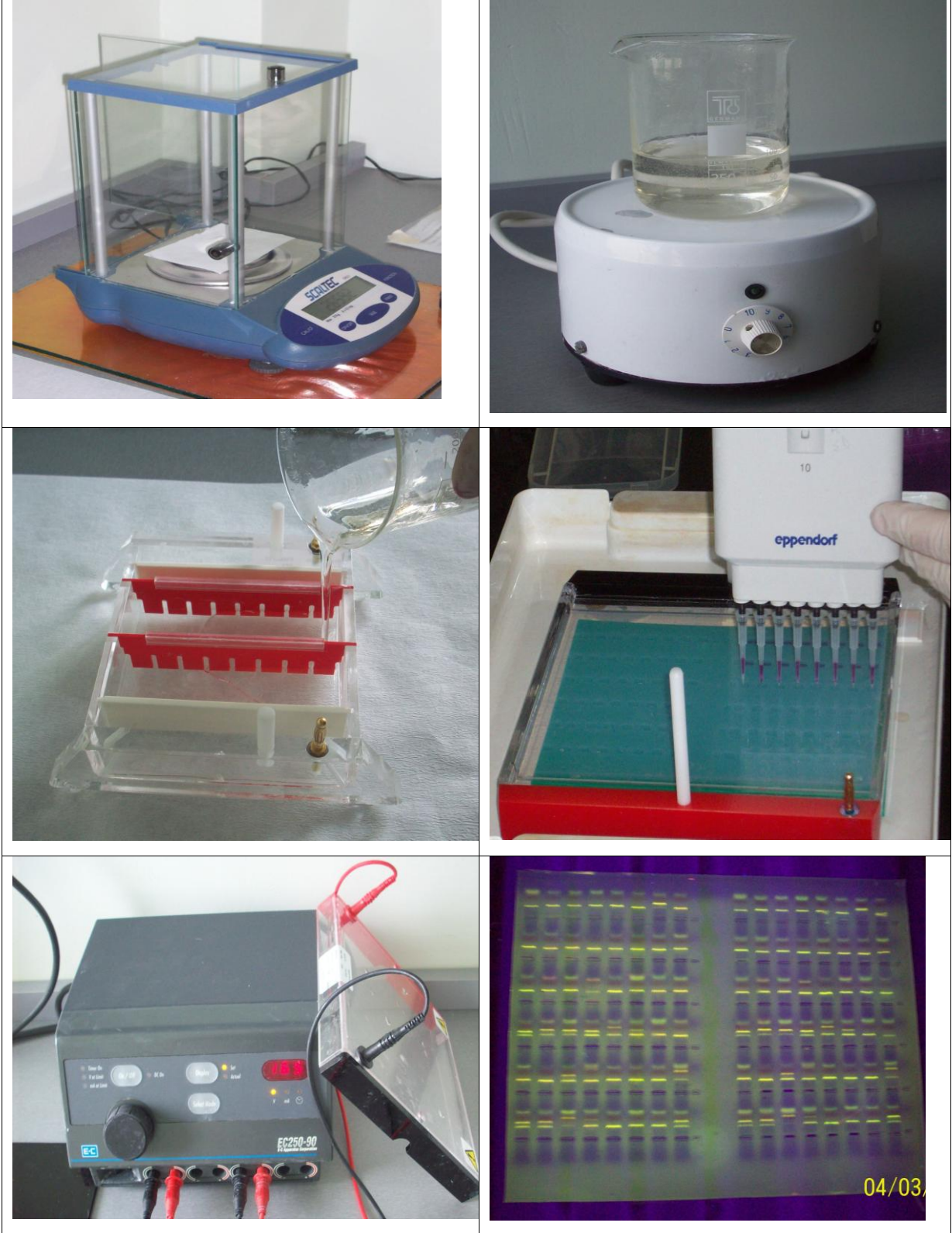
Ticari olarak hazırlandıklarından eridikleri sıcaklık dereceleri değişkenlik göstermektedir. Örneğin, DNA'nın jelden geri kazanılması için oda sıcaklığında eriyebilen jeller üretilmektedir. Daha düşük sıcaklıklarda eriyen agarozların hazırlanması da mümkün olup bu daha düşük konsantrasyonlardaki maddelerin ayırımını yapmaya olanak sağlamaktadır (56).

Agaroz jelin konsantrasyonu % 0.3-2.0 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece düşük DNA fragmentleri için yüksek, büyük DNA fragmentleri için düşük konsantrasyonlar hazırlanarak DNA'nın jelde en iyi şekilde taşınması sağlanabilir.

**Tablo 8. DNA molekülünün büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonunun ayarlanması (52)**

Agaroz konsantrasyonu % (ağırlık/hacim)	Doğrusal DNA molekülünün büyüklüğü (kbp)
0.3	5.0 - 60.0
0.6	1.0 - 20.0
0.8	0.7 – 10.0
1.0	0.5 – 7.0
1.2	0.4- 6.0
1.5	0.2 – 4.0
2.0	0.1 – 3.0

Klasik moleküler çalışmalar için jel hazırlanırken öncelikle kullanılacak agar agar ham maddesinden elde edilen agaroz hassas terazi ile tartılır. Daha sonra bu küçük bir beher içine konur ve üzerine gerekli miktarda TBE solüsyonu konularak mikro dalga fırında çözünmesi sağlanır. Kaynamış olan çözeltiliye uygun miktarda (5 µg/ml'lik stoktan 100 ml çözeltiliye 5-10µl) etidyum bromür eklenip iyice karıştırılır. Sıvı haldeki agaroz jel, içine kuyucuk oluşturmak üzere taraklar yerleştirilmiş tablaya dökülür. Jel katılaşına kadar (30 dakika - 1 saat arası) beklendikten sonra hazırlanmış olan jel elektroforez tankına yerleştirilip tankın içerisine tampon çözeltisi jelin üzerini 1-2 mm geçecek şekilde eklenir. İncelenecek olan PCR ürünü yükleme tamponu ile kuyucuklara yüklenir ve elektroforez başlatılır.



Şekil 15. Elektroforez işlem basamakları

- A) Agaroz tartılması
- B) Agarozun TBE solüsyonunda ısı ile çözdürülmesi
- C) Karışımın jel tepsisine dökülmesi

**D) DNA örneklerinin jele yüklenmesi**

**E) Elektroforez tankı**

**F) UV transiliminatör altında görüntüleme**

Agaroz jel elektroforezinde yürütme yapıldığı zaman iyi bir görüntü elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken birkaç kural vardır.

Bunlar:

- Yeterli konsantrasyonda DNA yüklenmesi (Maksimum: 50 ng/band.)
- Nükleazlarla kontamine olup degrade olmamış DNA kullanılması
- Jel konsantrasyonuna uygun voltaj ve zaman ayarı yapılması (Maksimum: 20 V/cm)
- Elektroforez tampon solüsyonunun pH ve ısısının uygun aralıklarda olması (ısı<30°C)
- Elektroforez tampon solüsyonunun yeterli miktarda olması (Elektroforez esnasında jelin üzerinde en az 1-2 mm yükseklikte tampon solüsyonu olmalıdır.)
- Görüntüleme için kullanılan floresan boyanın yeterli miktarda ve kalitede olması Örn: Etidyum konsantrasyonu 5 µg/ml (50 mg EtBr, 10 ml distile su) (59).

Yukarıda belirtilen tüm kurallara dikkat edildiğinde dahi jel görüntüsünde;

Sürüklenme izi, beklenenden fazla sayıda bant, zayıf bant ve bant görememe gibi durumlarla karşılaşılabilir. Jelin tamamına aynı güçte elektrik akımı verilemediği durumlarda da aynı miktar ve büyüklükte yüklediğimiz DNA örneklerini jelin farklı bölgelerinde değişik hızda göç etmelerine yol açarak yanlış değerlendirmeler yapılabilir. Hazırladığımız agaroz konsantrasyonundaki tuz miktarı DNA'nın jelde yürümesini etkilemektedir. İyonik yoğunluğun artması küçük moleküllerin hareketini yavaşlatmaktadır. Bunun nedeni ortamda bulunan ekstra iyonların DNA'nın parçalarını çevreleyerek elektriksel alanda hareketlerini kısıtlayarak engellemeleridir.

Jel üzerinde yürüterek DNA boyutunu belirleme çalışmalarında ortaya çıkan bazı aksaklıklara nedeniyle farklı sonuçlara elde edilebilir. Bunu çözümlmek için boyutu bilinen standart DNA molekülleri ile örnekler aynı tuz konsantrasyonlu jellerde yürütülmeli ve elde edilen bantlar kıyaslanarak sonuca varılmalıdır (60).

**Tablo 9. Elektroforezde rastlanabilecek olası problemler ve çözümleri**

Jel görüntüsü	Olası sorun	Çözüm
Sürüklenme izi	Yüklenen DNA ya da RNA örneğinin parçalanmış olması	PCR'de uygun koşullarda saklanıp bozulmamış DNA ya da RNA kullanılması
	Ortamda nükleazların varlığı	Çalışma ortamının nükleaz kontaminasyonundan arınmış olması
Beklenenden fazla sayıda bant	Primerlerin birden fazla bölgeyi tanıyarak çoğaltması	Primer dizilerinin gözden geçirilerek uygun hale getirilmesi
	Primer-dimer oluşumu	Primer-dimer yapmayan Primer çiftlerinin seçimi
Zayıf bant	Mg <sup>+2</sup> konsantrasyonunun uygun olmaması	Mg <sup>+2</sup> konsantrasyon optimizasyonu
Hiç bant görememe	PCR ortamında kullanılan malzeme birinin eksik ya da yetersiz olması	Kullanılan malzemenin kontrol edilip PCR tekrarının yapılması

Elektroforezde kullanılan kimyasallar:

TBE: 5 x TBE (TRIS+Borik Asit+EDTA) hazırlanışı:

54 gr TRIS,

27.5 gr Borik Asit

3.72 gr EDTA

Final pH 8.0

Hazırlanan karışımın üzerine 1 lt steril distile su eklenir. Karışımın içine konulan maddeler (su hariç) 2 katına çıkarılırsa karışımın oranı 10 x TBE olur. Genellikle hazırlanan jellerde % 0.5'lik TBE çözeltisi kullanıldığından hazırlanan 5 x TBE'lik stok solüsyondan 100 ml alınır üzerine 900 ml distile su eklenerek % 5'lik TBE solüsyonu hazırlanır.

TBE'nin özellikleri:

Küçük DNA fragmanlarının yüksek rezolüsyonda ayrımında kullanılır.

<1 kb DNA ayrıştırmada faydalıdır.

Tampon kapasitesi TAE'den yüksektir.

Uzun elektroforezler için uygundur.

Yüksek iyonik güç ister.

Tamponun tekrar sirkülasyonuna gerek yoktur.

1 x TAE Tamponu (Tris –Asetat-EDTA) :

242 g. Trizma-base

57,1 ml. Glasiyel asetik asit

100 ml. 0,5 M EDTA

Final pH 8.0

TAE'nin özellikleri:

DNA'nın jelden ayrıştırılmasında ve jel içi manipülasyonlarda uygundur.

Büyük DNA fragmanlarının daha iyi rezolüsyonunu verir.

>12 kb DNA ayrıştırılmasında uygundur.

Düşük tamponlama kapasitesine sahiptir.

Düşük iyonik güce sahiptir.

Tamponun tekrar sirkülasyonu gerekli olabilir.

**Tablo 10. Elektroforezde sıklıkla tercih edilen boyalar**

Gümüş Boyama	DNA
Syber safe	DNA
Syber gren	DNA
Radiant Red RNA	RNA
Ethidium Bromid	DNA
Gümüş Boyama	DNA
Amidoblack	Genel
Bromophenol Blue	İzleme Boyası
Xylene Cyanol FC	İzleme Boyası

**b) Poliakrilamid jel elektroforezi:** Genellikle daha küçük moleküler ağırlığa sahip ve boyları arasında çok küçük farkları olan DNA ürünlerinin ayırımında tercih edilen bir

sistemdir. Poliakrilamid jeller aralarında yapısal ya da sayısal tek baz çifti fark bulunan ürünleri birbirlerinden ayırabilme özelliğine sahiptirler.

Poliakrilamid jeller farklı şekillerde hazırlanabilirler. Jel kalınlığı 0.1 - 0.5 mm arası değişebilir. Poliakrilamid jeller yüksek ayırım gücüne sahiptir ve 1-500 bp arasındaki değişimleri saptayabilmektedir (61). Bu jeller elle DNA dizi analizini çıkarmak için ve sadece birkaç tekrarlı dizi bakımından farklı olan mikrosatellit DNA moleküllerini ayırmak için de kullanılırlar. Jeldeki gözenek büyüklükleri kullanılan monomerlerin derişimi ile ayarlanabilir. Çalışmanın amacına ve örneğin büyüklüğüne uygun bir tampon sistemi seçilebilmektedir.



**Şekil 16. Poliakrilamid jelde ürün yükleme (62)**

**Tablo 11. DNA molekülünün büyüklüğüne göre poliakrilamid konsantrasyonunun ayarlanması (52)**

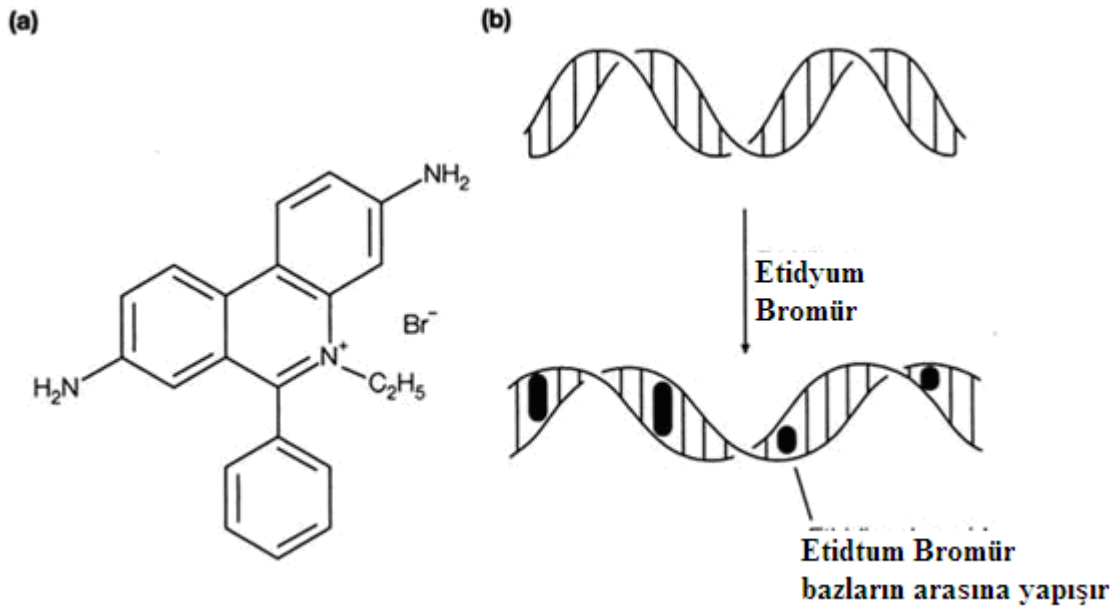
<b>Poliakrilamid konsantrasyonu (% w/v)</b>	<b>Doğrusal DNA molekülünün büyüklüğü (bp)</b>
20.0	5-100
15.0	20-150
12.0	40-200
10.0	50-300
8.0	60-400
6.0	70-500
4.0	500-1500
3.0	1000-2500

Standart poliakrilamid jellerde gümüş nitrat ve EtBr kullanılarak nükleik asitlerin görüntülenmesi sağlanır. Fakat her jel için DNA molekülünün 10 ng'dan az olduğu

durumlarda boyama görüntüleme için çok etkili olmayabilir. Bu durumda daha hassas olan otoradyografik teknikler kullanılarak elektroforez öncesi DNA molekülleri radyoaktif olarak işaretlenir (63).

Agaroz ya da poliakrilamid jellerde, bir floresan boya yardımıyla renklendirilmiş DNA iplikçikleri UV ışık altında gözlenebilir. Kanserojen potansiyeli çok yüksek bir madde olmasına rağmen tercih edilen floresan boya etidyum bromürdür (EtBr). Diğer bir alternatif boyama gümüş boyamadır. Gümüş boyamada UV transilüminatöre gerek kalmadan bantlar gözlenebilir (64).

EtBr DNA dizisindeki bazların arasına girip 302-546 nm arası ışığı absorblayarak floresan etki gösterebilir. Bu floresan ışımaya DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli ya da zayıf olabilir (63).



### Şekil 17. A) Etidyum Bromürün genel yapısı

### B) Etidyum bromürün DNA çift sarmalına bağlanması (65)

Nükleik asit / Protein boyaları:

Nükleik asit ve proteinleri direkt olarak göremediğimiz için DNA'yı görünür hale getiren bileşikler kullanılır:

1. Nükleik asitleri görüntülemeye sıklıkla kullanılan bir floresan boya Etidyum bromürdür. ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) MW. 394.32 0.5 mg/ml konsantrasyonda agaroz ve akrilamid jellerinde 312 nm dalga boyunda (UV ışığı) 10 ng nükleik asit



görüntülenebilir. Konsantrasyon arttırıldığında (0.5-1.0 mg/ml) sezyum klorürden (CsCl) DNA pürifikasyonunda kullanılabilir.

2. Sybr Green Nükleik Asit Boyaları: Etidyum bromürde kullanılan DNA miktarından 25 kat daha az DNA'nın görüntülenebilmesine olanak sağlar. Bu boya ve özel filtre ile 254 nm'de görüntüleme yapılabilir.

**c) Kapiller Jel Elektroforezi:** Bu konu hakkında DNA dizileme başlığı altında daha detaylı bilgi verilecektir.

## **PCR Temelli Laboratuvar Uygulamaları**

### **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**

DNA üzerinde ardarda gelen nükleotid monomerlerin 3' hidroksil grubu ile diğerinin 5' hidroksil grubunun fosfat köprüsü kurması ile fosfodiester bağları oluşur. Bu fosfodiester bağlar çeşitli kimyasal reaksiyonlarla koparılabilir. Bunlardan biri de enzimler yardımıyla bu bağların koparılmasıdır. Bu enzimler iki gruba ayrılır: endonükleazlar, ekzonükleazlar (18). Endonükleazlar DNA'yı iç kısımlarından keserken ekzonükleazlar 3' veya 5' uçlarından kesmektedirler. Restriksiyon enzimleri de endonükleazlar grubuna dahildirler.

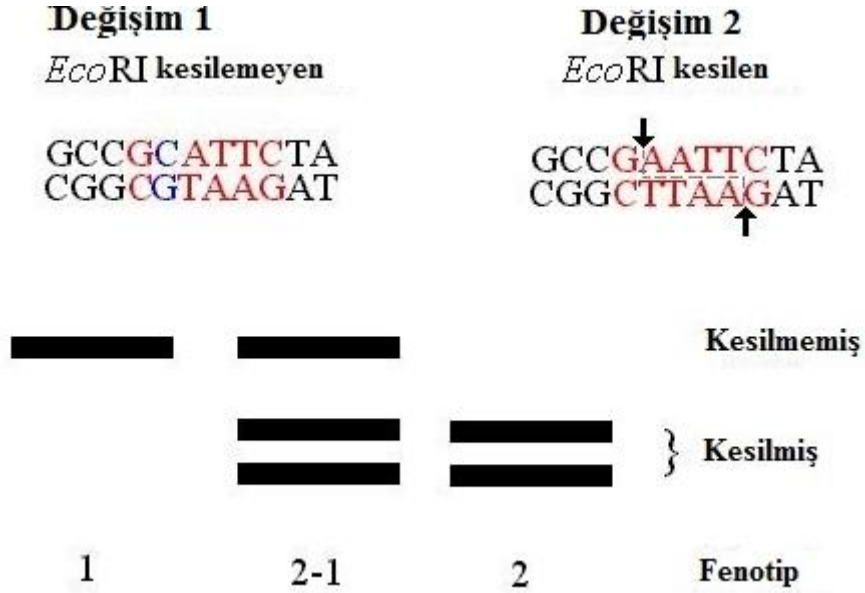
Reskriksiyon enzimleri (RE) DNA üzerindeki belirli noktalara spesifik olup bu bölgelerden DNA'yı keserek, genomik DNA'dan 1000-20000 baz çiftlik diziler veya PCR ürünlerinden ürünün özelliğine göre farklı boylarda diziler elde etmemizi sağlayan enzimlerdir. Çok sık kullanılan RE arasında EcoRI, ClaI, HintIII ve HinfI sayılabilir. Bu enzimler yardımıyla DNA'daki istenilen bölgelerin kesilerek ardından agaroz jel elektrofrezine tabi tutulması ve kesilen parçaların Etidyum Bromür gibi bir boya ile UV ışık altında görülür hale getirilmesi ve diğer parçalarla kıyas yapılarak incelenmesi işleme "restriction fragment length polymorphism (RFLP)" denir (58). Restriksiyon endonükleazın tanıma dizisinde meydana gelebilecek küçük delesyonlar-insersiyonlar veya tek nükleotid değişimleri sonucu ortaya çıkan herhangi bir mutasyon durumu, ilgilenilen baz dizisinin kesilmesini önler. Örneğin GAATTC, Eco R I tarafından kesilir. Ama GTATTC kesilmez.

RFLP analizi incelenecek DNA bölgesi ya da RNA'nın restriksiyon enzim profilinin ortaya çıkmasını sağlar. RFLP işlemi başlıca beş basamaktan meydana gelir. Bunlar;

1. DNA'nın izolasyonu
2. PCR ile istenilen gen bölgesinin çoğaltılması
3. Enzim kesimi

4. Jel elektroforezinde yürütme
5. Jel elektroforezi ile görüntüleme

Bu yöntem genomik DNA'ların enzim profillerinin tespit edilmesinde veya PCR ile çoğaltılmış DNA bölgelerinde aranan mutasyonların tespitinde kullanılabilir.



**Şekil 18. Restriksiyon enzim kesim şeması (66)**

Bu enzimlerle sıklıkla iki farklı şekilde kesim yapabilirler. En sık kullanılan endonükleazlardan EcoRI ile yapılan kesimde aşağıdaki şekildeki gibi olmaktadır. Böylece kesilen bölgeye daha sonra uygun bir DNA parçası bağlanabilmektedir.



Fakat SmaI enzimi ile yapılan kesimde aşağıda görüldüğü gibi küt bir kesim yapmakta ve buraya daha sonrada herhangi bir DNA parçası bağlanamamaktadır.



İlgilenilen herhangi bir dizinin restriksiyon enzim profilinin tespit edilmesi için bazı bilgisayar programları kullanılabilir. Bunlardan ücretsiz olarak faydalanılabilir. Örneğin; [http://www.biophp.org/minitools/restriction\\_digest/demo.php](http://www.biophp.org/minitools/restriction_digest/demo.php)

En sık kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve bunların kesim bölgeleri DNA'daki aktivitelere göre başlıca 4 kategoriye ayrılmaktadırlar:

1)Yapışkan uç oluşturanlar: DNA'da kesim yaptıkları bölge üzerinde yapışkan uçlar (komplementer uçlar) oluşturan enzimlerdir. 4-7 bazlık bir mesafeden asimetrik olarak sağdan sola veya soldan sağa doğru kesim etkinliğine sahiptirler.

Aşağıdaki tablo 12'de, DNA üzerinde özgül yerlerden kesim yapan bazı enzimler ile bunları sentezleyen mikroorganizmalar gösterilmiştir.

**Tablo 12. Yapışkan uç oluşturan enzimler etken maddeleri ve kesim bölgeleri**

<b>Etken</b>	<b>Enzim</b>	<b>Tanım ve Kesme</b>
<b>Haemophilus influenzae</b>	Hin PI	5'...G/CGC.....3'
<b>Haemophilus parainfluenzae</b>	Hpa II	5'...C/CGG.....3'
<b>Moraxella bovis</b>	Mbo I	5'.../GATC.....3'
<b>Anabaena variabilis</b>	Ava I	5'..G/GACC..... 3'
<b>Escherichia coli</b>	EcoRI	5'..//CC(AT)GG..3'
<b>Haemophilus influenzae</b>	Hinf I	5'...G/ANTC..... 3'
<b>Bacillus amyloliquefaciens</b>	Bam HI	5'...G/AATCC...3'
<b>Caryophanon latum</b>	Cla I	5'...AT/CGAT.... 3'
<b>E.coli</b>	EcoRI	5'...G/AATTC... 3'
<b>Haemophilus influenzae</b>	Hind III	5'...A/AGCTT.....3'
<b>Providencia stuartii</b>	Pst I	5'...CTGCA/G... 3'
<b>Streptomyces albus</b>	Sal I	5'...G/TCGAC.... 3'
<b>Xanthomas badrii</b>	Xba	5'...T/CTAG.....3'
<b>Bacillus stearothermophilus</b>	BstE II	5'...G/GTNACC..3'
<b>Staphylococcus aureus</b>	Sau I	5'.. CC/TNAGG..3'

Hazırlanan tabloda, enzimlerin kestikleri özgül bölgeler DNA parçasının 5'-3' yönünde işaretlenmiştir. Pst I enzimi 6 bazlık kesim bölgesine sahip olup, diğerlerine göre ters yönde (5'-3' yönde olmayan) bazları tanıyarak keser.

5'..... CTGCA<sup>-</sup> G .....3'

3'..... G \_ ACGTC.....5'

Meydana gelen kesim sonucu DNA segmentinin iki ucunda birbirleriyle veya uygun uçlara sahip başka DNA segmentleriyle birleşebilecek iki yapışkan uç meydana gelmektedir.

2)Küt uç oluşturanlar: Bazı enzimler ise DNA üzerinde kesim yaparak küt uçlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Yukarıda oluşumu anlatılan bu enzimleri sıralamak gerekirse;

**Tablo 13. Küt kesim oluşturan enzimler etken maddeleri ve kesim bölgeleri**

Etken	Enzim	Tanıma ve kesme
Acinetobacter calcoaceticus	Acc II	5'...CC/CG.....3'
Aerobacter luteus	Alu I	5'...AG/CT..... 3'
Haemophilus aegypticus	Hae III	5'...GG/CC.....3'
Rhodopseudomonas sphaeroides	Rsa I	5'...GT/AC..... 3'
Brevibacterium albidum	Bal I	5'...TGG/CCA..3'
Deinococcus radiophilus	Dra I	5'...GTT/AA.....3'
Haemophilus parainfluenzae	Hpa I	5'...GTT/AAC...3'
Proteus vulgaris	Pvu II	5'...CAG/CTG..3'

3)İzoşizomerler (isoschizomer): Bazı enzimler ise DNA üzerindeki aynı bölgeyi tanıyarak burada hem yapışkan uç hem de küt uçlar meydana getirebilirler. Bunlar;

**Tablo 14. İzoşizomer oluşturan enzimler etken maddeleri ve kesim şekilleri**

Enzim	Tanıma ve kesme	Kesim şekli
Bam HI	5'... G/GATCC ... 3'	Yapışkan uçlar (5' ucundan kesim)
Bst I	5'... G/GATCC ...3'	Yapışkan uçlar (5' ucundan kesim)
Pal I	5'... GG/CC ..... 3'	küt uçlar
Tha I	5'... GG/CC .....3'	küt uçlar
Pst I	5'... CTGCA/G ... 3'	Yapışkan uçlar (3'-ucundan kesim)
Xma II	5'... CTGCA/G .. 3'	Yapışkan uçlar (3'-ucundan kesim)

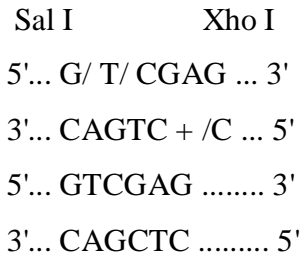
4)Değişik tanıma yapanlar: bazı restriksiyon endonükleazlar ise birden fazla tanıma ve kesme bölgesine sahiptirler. Bunlar;

**Tablo 15. Değişken tanıma bölgesine sahip enzimler ve tanıma bölgeleri**

Enzim	Tanıma ve kesme
Hind II	5'... GTC <sup>-</sup> AAC ...3' 5'... GTC <sup>-</sup> GAC ...3' 5'... GTT <sup>-</sup> AAC ... 3' 5'... GTT <sup>-</sup> GAC ...3'
Hea I	5'... AGG <sup>-</sup> CCA ...3' 5'... AGG <sup>-</sup> CCT ...3' 5'... TGG <sup>-</sup> CCA ...3' 5'... TGG <sup>-</sup> CCT ...3'

Herhangi bir RE tarafından kesilerek oluşturulan DNA parçaları diğer bir RE ile kesilmiş komplementer bir DNA parçası ile birleştirilirse, meydana gelen yeni hibrit molekül, hibritleşme öncesi kesimde rol oynayan RE tarafından tanınmaz ve kesilemez.

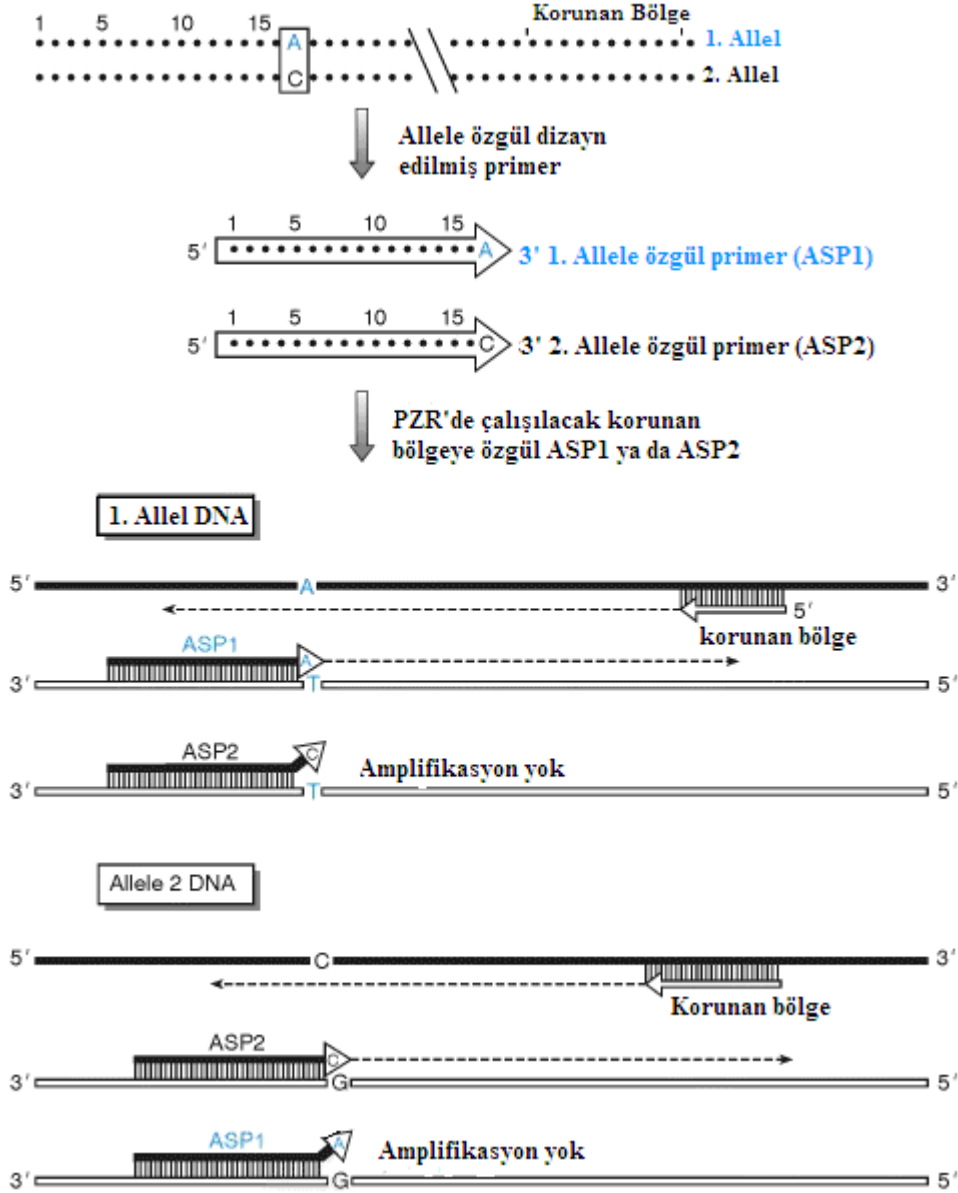
Buna örnek vermek gerekirse; Sal I enziminin kesimi sonucu ortaya çıkan yapışkan uç (5'... G/TCGAC ...3') ve Xho I enzimi ile kesim sonucu oluşan uç (5'... C/TCGAG ...3'). Bu iki parçanın hibrit oluşturması sonucu meydana gelen DNA segmentini Sal I ya da Xho-I tanıyamaz ve kesemez.



Klinikte kullanımı; tek nokta mutasyon tespitinde kullanılmaktadır (67).

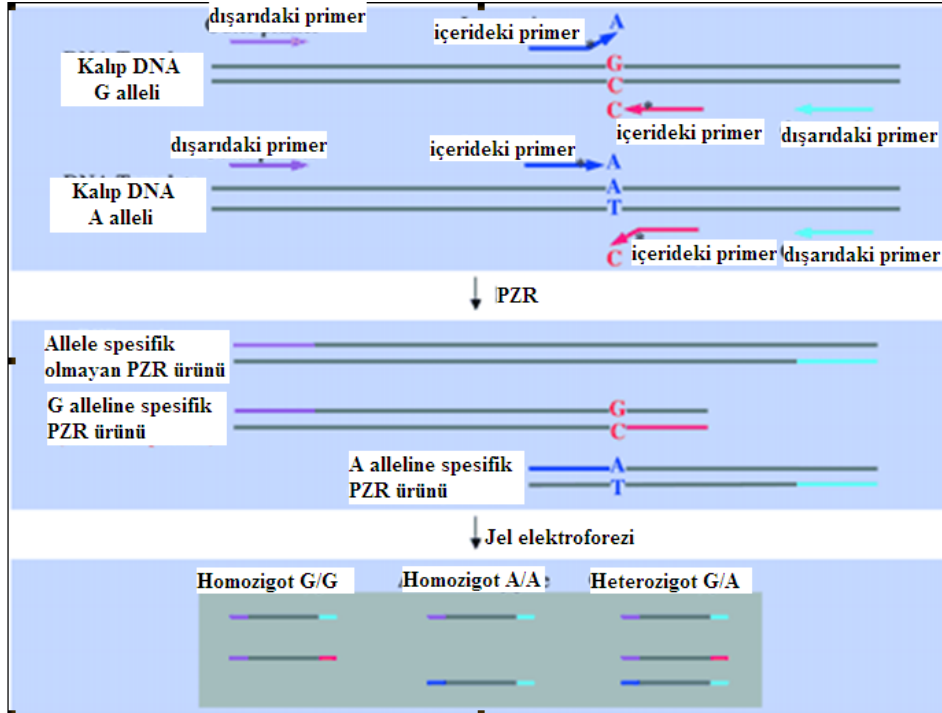
### PCR Çesitleri

**1) AS-PCR (Allele spesifik PCR):** Allel spesifik PCR'in klasik PCR uygulamasından farkı, reaksiyon ortamına konan oligonükleotid primerlerin farklı dizayn edilmesidir. Bu reaksiyonda 2 ayrı primer seti kullanılır. Birinci primer setinde öncül primerin 3' ucunda araştırılan SNP'ye komplementer nükleotid bulunur. İkinci sette ise 3'uçta mutant allele komplementer nükleotid bulunmaktadır. Primerler eğer kalıp DNA dizisi ile eşleşiyorsa primer bağlanması gerçekleşmekte ve PCR çalışmaktadır. Mutasyonun varlığı bu şekilde tespit edilmektedir. AS- PCR şekil-x' şematik olarak açıklanmıştır (68).



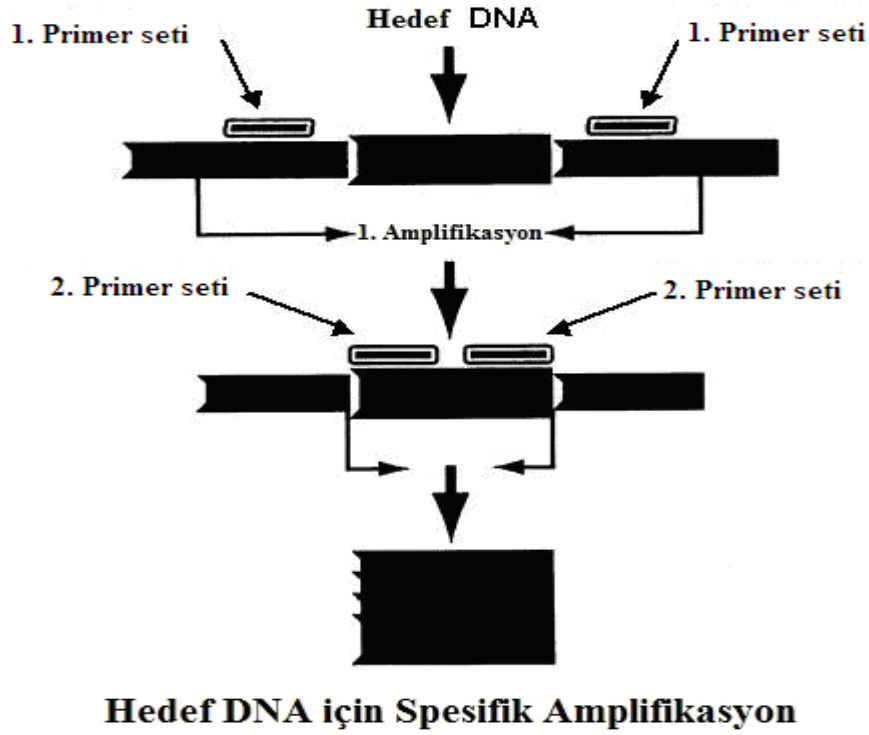
Şekil 19. AS-PCR işlem mekanizması (Kaynak 68)

2) **ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System):** Allel Spesifik PCR'nin özelleşmiş bir şeklidir. İlgilenilen bölgeyi çoğaltan 2 takım primer bulunur. İç kısımda yer alan primerleri 3' ucu aranılan SNP'ye komplementer olarak dizayn edilir. Dış kısımda bulunan primerler uzun bir bant oluşturur. İç kısımdaki primerler ise taşıyan allele göre farklı boylarda bant oluşumuna sebep olurlar. Allelik ayırım bu farklı boylardaki bantların varlığına göre yapılır (69).



Şekil 20. ARMS-PCR işlem mekanizması (Kaynak 69)

**3) Yuvalanmış (Nested) PCR:** Yuvalanmış (Nested) PCR özgün olmayan ürünlerin oluşumunu engelleyen bir PCR yöntemidir. Bu yöntemde klasik PCR'den farklı olarak ardı ardına iki PCR yapılır. İlk amplifikasyondan elde edilen ürün ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır. Kullanılan ikinci primer takımı ilk primerlerden dah iç kısımda yer alır ve istenilen hedef bölge daha özgün bir şekilde elde edilir (70). Bu yöntemin kullanılmasındaki temel amaç tüm özgün olmayan bölgelerden kurtularak hedef DNA bölgelerinin çoğaltılmasıdır (71). Bazı mikrobiyal popülasyonların klasik PCR'le amplifikasyonunun olamadığı durumlarda sıklıkla tercih edilir (72).



**Şekil 21. Nested-PCR işlem mekanizması (Kaynak 73)**

**4) Asimetrik PCR:** Bu yöntemde iki çeşit primer vardır fakat biri miktar olarak diğerinden daha fazla kullanılır. Buna bağlı olarak simetrik PCR sonucunda oluşan DNA ipliklerinden biri diğerine göre daha fazla miktarda çoğaltılır. Bu yöntem daha fazla çoğaltılan tek iplikli ürünün dizilenmesi için kullanılır (74).

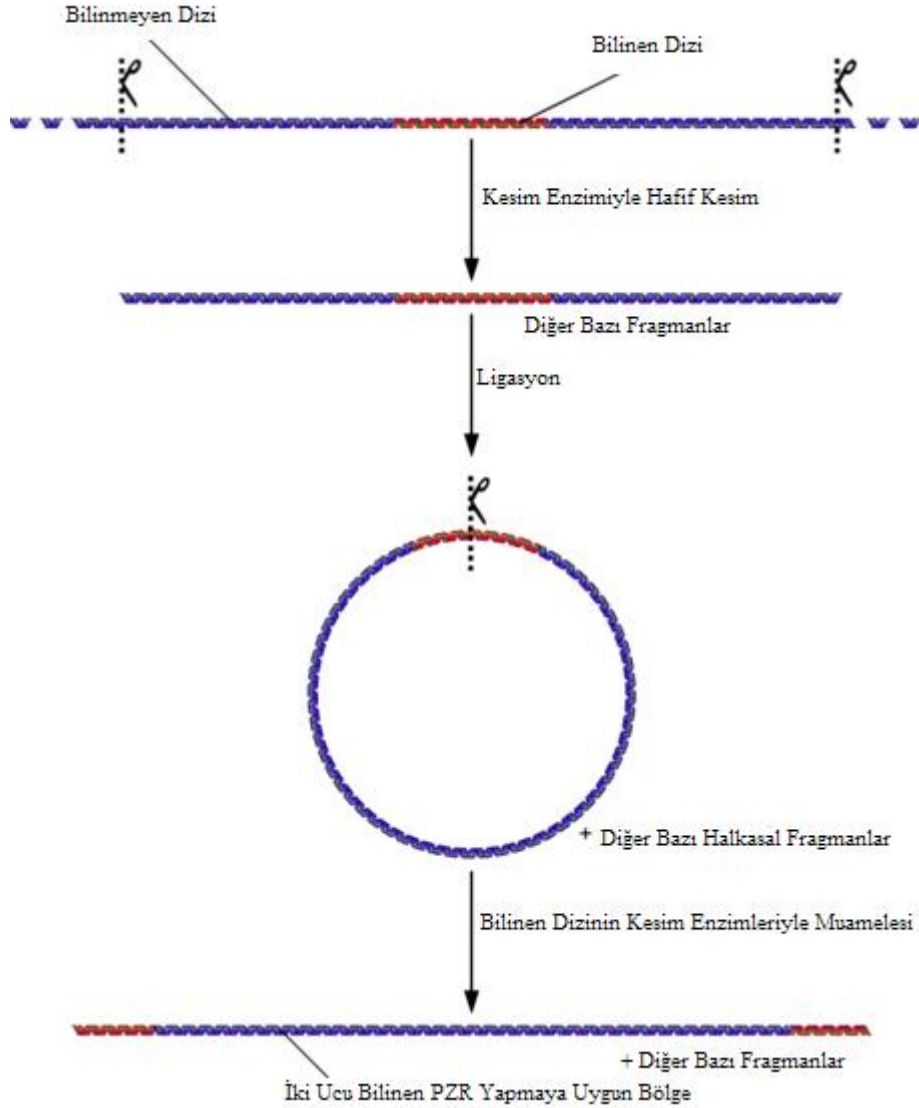
**5) Hot-Start PCR:** Hot-Start PCR, başlangıç aşamasında özgül olmayan PCR ürünlerinin oluşmasını azaltan bir methodur. Primer bağlanma ısısından daha yüksek sıcaklıklarda amplifikasyon reaksiyonunun başlatılmasını esas alır.

Bu işlem için, düşük sıcaklıklarda primerin kalıp DNA ile hibridize olmasını ve polimerizasyonu engelleyen, aktivitesi yüksek sıcaklıklarda başlayan Taq polimerazlar kullanılır (52).

**6) Ters (Inverse) PCR:** Ters PCR bilinen bir DNA dizisinden faydalamlarak bilinmeyen bir dizinin çoğaltılması için kullanılan bir tekniktir. Bilinen diziyi içeren DNA önce restriksiyon enzimi ile kesilip doğrusal hale getirilir. Ardından bilinmeyen DNA dizisini içerecek şekilde halkasal hale getirilir. Halkasal yapıyı elde ettikten sonra tekrar bir restriksiyon enzim kesimi uygulanır ve doğrusal bir DNA dizisi elde edilir. DNA molekülü



bilinen dizilere uygun olarak tasarlanmış primerler ile çoğaltılır. Böylece dizisi bilinmeyen DNA bölgeleri de çoğaltılmış olur (75). Yeni çoğaltılan bölgeye DNA dizileme yapılarak bilinmeyen DNA parçasının nükleotid dizilimi tespit edilebilir.

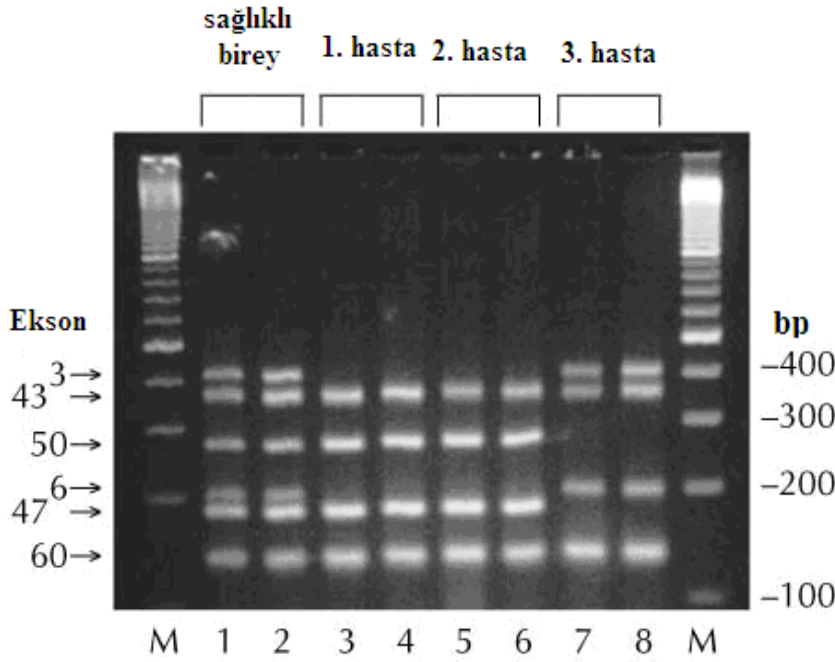


Şekil 22. Ters (Inverse) PCR işlem mekanizması (Kaynak 76)

**7) İn situ PCR:** Lam üzerindeki hücre içindeki DNA'nın çoğaltılması işlemidir. Hücre membranları yarı geçirgen hale getirildikten sonra hücre içine PCR bileşenlerinin girişine izin verilmiş hücre veya dokulara in situ PCR yapılır.

Viral DNA'nın tek kopyalı genlerinin saptanmasında veya RT-PCR ile birlikte RNA belirlenmesinde kullanılır (77).

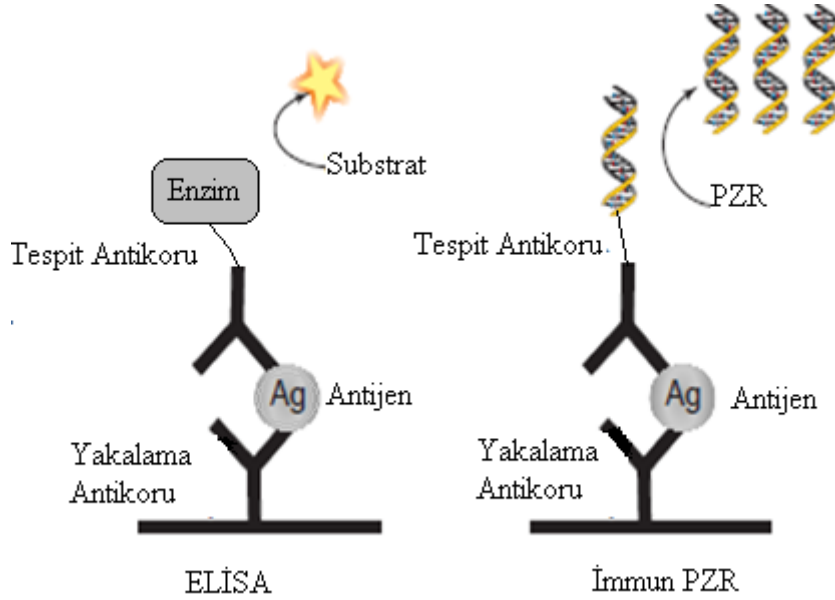
**8) Multiplex PCR:** Bu yöntemle bir PCR ile birden fazla hedef bölgenin çoğaltılabilmesi mümkündür. Multiplex PCR'da birden fazla primer seti bir arada kullanılır. Bu primer setlerinin bir arada kullanılabilmesi birtakım kurallara bağlıdır. Örneğin; bütün primerlerin bağlanma sıcaklığının birbirine yakın olması, benzer PCR koşullarında çoğalabiliyor olması, agaroz jelde tanımlayabilmek için ampliconların farklı boylarda olması gerekmektedir. Bu PCR, SNP tespitinde, delesyonların haritalanmasında küçük delesyonların ve çerçeve kayması gibi mutasyonların saptanmasında tercih edilen bir tekniktir (70).



**Şekil 23. Duchenne Muscular Distofisi (DMD) için Distrofin geninde yapılmış bir Multiplex PCR örneği. (Soldan) 1.ve 2. kuyucuk sağlıklı birey, 3.ve 4. kuyucuklar 1. hasta, 5.ve 6. kuyucuklar 2. hasta, 7.ve 8. kuyucuklar 3. hasta (1. ve 2. hastada 3. ve 6. eksonda delesyon, 3. Hastada 47. Ve 50. eksonda delesyon görülmektedir) (Kaynak 78)**

**9) İmmuno PCR:** İmmuno PCR bir antijen saptama yöntemidir. Spesifik olarak bir antijen-antikor kompleksine bağlanmış bir işaretleyici DNA parçasının çoğaltılması için kullanılır. İmmuno PCR'da hem antijene hem de antikora kolayca bağlanabilen primerler kullanılır. Bağlayıcı molekül aracılığı ile antijen-antikor kompleksine bağlanmış olan DNA uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Özgün PCR ürününün çoğaltılmış olması antijen varlığını ispat eder.

İmmuno PCR, ELISA gibi klasik antijen belirleme yöntemlerinden çok daha yüksek duyarlılıkta antijen saptanmasını sağlar. Klinikte tanı ve adli tıpta genetik tiplendirme amacıyla kullanılmaktadır (79).



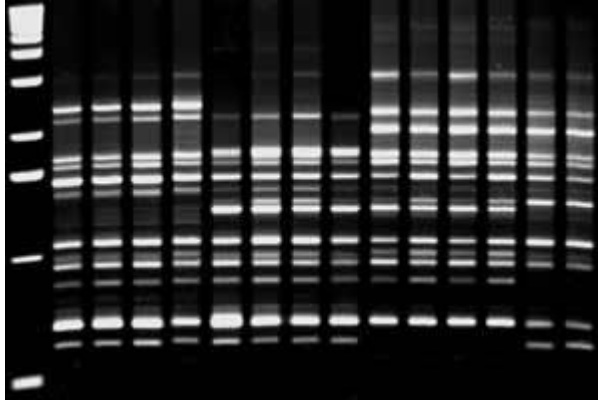
Şekil 24. İmmuno PCR işlem mekanizması (Kaynak 80)

**10) Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) PCR:** RAPD nükleotid dizisi rastgele yapılmış primerler kullanılarak yapılan bir PCR'dir. Nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar.

Polimorfizmlerin belirlenmesinde genetik işaretçilerin elde edilmesinde ve genetik haritalama da kullanılır. RAPD yaklaşık on nükleotid uzunluğunda ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primer hazırlanarak yapılır. Genellikle primer hazırlanırken GC/AT oranının %50 olmasına özen gösterilir. Çoğaltılacak olan DNA'da primerlerin kendilerine özgü olan bölgelere bağlanabilmeleri için sıcaklığın düşürülmesi de önemlidir.

En basit organizasyona sahip canlı olan bakterilerden insana kadar hemen hemen bütün organizmaların genomları 10 nükleotidlik kısa rastgele primerler için yeterli düzeyde birbirine ters konumlu bağlanma yerleri taşırlar. Bu şekilde primerlerin birbirlerine birkaç bin baz çifti uzaklıkta farklı yerlere, birbirlerine ters konumlu bağlanmalarıyla iki bağlanma noktaları arasındaki bölge çoğaltılmış olur. Her bireyin kendine ait bir nükleotid dizimi olduğundan, bireylerden birinde bir primer bağlanma yerinin kaybı ya da değişmesi çoğalan PCR ürünleri arasında özgün bant veya bantların kaybolmasına yol açar. PCR ile elde edilen ürünlerin elektroforez ile analizi sonucu jeldeki bantlardaki benzerlik ya da benzemezlik

dereceleri belirlenerek polimorfizmler hakkında fikir sahibi olunabilir. Bu yöntem adli tıpta da kullanılarak DNA parmak izi olarak adlandırılabilir. Ayrıca kalıtsal hastalıklarla infeksiyon hastalıklarının tanısında, tarımda tohum saflığının ve seçilmiş genotiplerin belirlenmesinde tür tanısında, evrim ve arkeoloji gibi çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (81).

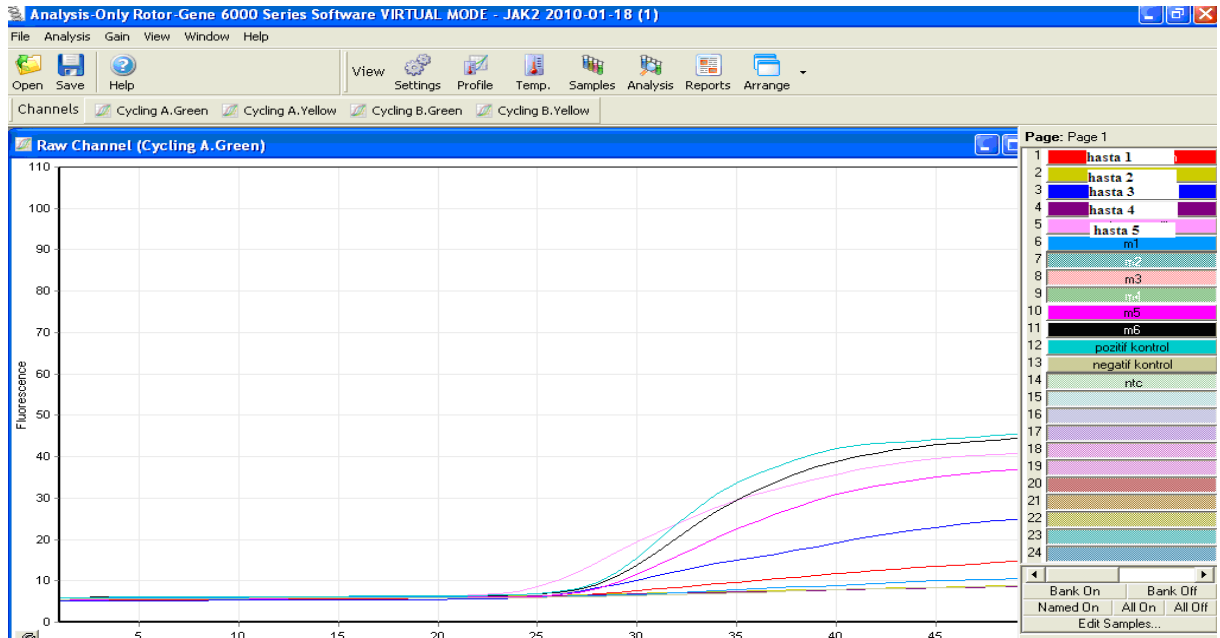


**Şekil 25. RAPD-PCR jel görüntüsü (Kaynak 82)**

**11) Real-Time PCR:** Sayımsal RT-PCR (Q-PCR) bilinen PCR teknolojisinin daha geliştirilmiş şeklidir. Geliştirilen bu teknolojiyle gen kopya ürünlerinin düzeyleri sayısal değerlere dönüştürmekte mümkün hale gelmiştir. Bunun dışında devam etmekte olan PCR işlemini ekranda izleyerek reaksiyon devam ederken işlem yapılabilmesi, döngü sayısının veya sıcaklığın değiştirilebilmesi sistemin daha çok tercih edilir hale gelmesini sağlamıştır. Genel olarak real-time yöntemler amplifikasyon ve tayin işlemlerinin aynı reaksiyon tüpünde yer aldığı ve sıklıkla aynı anda yapılan homojen yöntemlerdir. Bu yöntem sayesinde amplifikasyonda el ile yapılması gereken işlemler tamamen azaltılmış böylece kontaminasyon riski daha aza indirgenmiştir. Bu yöntem tipik olarak floresan ışımaya değişiminin ölçülmesi esasına dayanır. DNA boyaları ya da diziye özgül proplardan elde edilen floresans değişimi PCR'nin her döngüsünde izlenebilir.

Real-time PCR'de kullanılan ilk boya etidyum bromür olmasına karşın günümüzde SYBR Green I sıklıkla kullanılmaktadır. Hem etidyum bromür hem de SYBR Green I çift zincirli DNA'ya özgül boyalar olup floresans bakımından aynı eksitasyon ve emisyon spektrumuna sahiplerdir. Etidyum bromür çift sarmalın arasına girerken, SYBR Green I küçük oluk bağlanıcısıdır. PCR işlemi süresince SYBR Green I, etidyum bromür göre çift sarmalı tek zincirden daha iyi ayırt edebilir (83).

PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edilmelidir. Erime ısısı ( $T_m$ ), bir amplifikasyon ürünü olan genin %50’sinin denatüre olduğu sıcaklıktır. Denatürasyon sıcaklığı gen dizisindeki GC baz çiftlerinin yüzde oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi ile bu özellikten yararlanarak, PCR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü, primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığı belirlenir (84). Tek bir baza kadar dizilim değişimleri saptanabilir (85). Real Time PCR genellikle; gen ekspresyonunun kantitasyonu, DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi) tespiti, metilasyon tespiti, KİT (Kemik İliği Transplantasyonu) sonrası kimerizmin izlenmesi, KİT sonrası MRD (Minimal Rezidüel Hastalık) izlenmesi, genotipleme -melting-curve analizi gibi alanlarda kullanılabilir (86).



**Şekil 26. A) JAK-2 mutasyonunun Real-Time PCR değerlendirilmesi için Rotor-Gene 6000 ekran görüntüsü**

	A	B	C	D	E	F	G
2		Örnek	Green	Yellow	Green/Yellow		Örnek değeri (%)
3	1	hasta 1	15,06914244	76,86786777	0,20		%5-%12,5
4	2	hasta 2	8,971541924	80,98291576	0,11		negatif
5	3	hasta 3	25,65509524	64,91178378	0,40		%31-%50
6	4	hasta 4	8,689377178	78,77666242	0,11		negatif
7	5	hasta 5	41,9277231	60,53628526	0,69		%50-%78
8	21	M1 - %2	10,75740698	77,21264621	0,14		
9	22	M2 - %5	14,63045919	80,96164536	0,18		
10	23	M3- %12,5	19,64612941	80,33591647	0,24		
11	24	M4 - %31	28,02049404	71,50495038	0,39		
12	25	M5- %50	38,16319524	66,65771471	0,57		
13	26	M6-%78	45,53037817	43,75804278	1,04		
14	27	pozitif kontrol	46,48344941	19,68625103	2,36		
15	28	negatif kontrol	8,921950103	79,05476228	0,11		
16	29	NTC	5,68195112	9,808851406	0,58		

## B) Sonuçların % olarak değerlendirilmesi

Konvansiyonel PCR ile Real Time PCR arasındaki farklar:

- Konvansiyonel PCR “plato fazında” yani son noktada değerlendirilebilir, real-time PCR esnasında ”ekponansiyel büyüme fazında” data gözlemlenebilir.
- Floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır.
- Konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az RNA ile çalışılabilir.
- PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
- İki kat artmış (küçük değişimleri) değişimi belirleyebilme hassasiyetindedir.

**12) RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR):** RNA hedeflerini çoğaltmak için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde önce RNA hedef dizileri reverse transkriptazlar yardımıyla cDNA'ya çevrilir ardından PCR ile amplifiye edilir. RNA konvansiyonel PCR'deki yüksek ısıları tolere edemez, bu da primer bağlanmasının özgüllüğünü sınırlandırabilir. *Thermus thermophilus* ve bunun gibi diğer organizmalardan elde edilen ısıya dayanıklı DNA Polimerazlar aynı zamanda etkin reverse transkripsiyon aktivitesine de sahiptirler. Bu enzimler sayesinde ayrı bir RT basamağına ihtiyaç duyulmayarak zaman alıcı ve kontaminasyona açık olan işlemlerden kaçınılmış olur. Böylelikle RT-PCR tek aşamalı bir reaksiyonla da yapılabilir. DNA polimeraz gibi bazı polimerazlar mangan varlığında

DNA'nın yanı sıra RNA ipliklerini de kalıp olarak kullanabildiğinden tüm işlem aynı tüp içinde tek aşamada gerçekleştirilebilir.

RT-PCR mRNA miktarlarının belirlenmesi ile RNA düzeyindeki gen anlatımı çalışmalarında tercih edilen bir yöntemdir. Bu yöntemle çok az sayıdaki hücreden aynı anda çok fazla miktarda RNA analizini olası kılar. Özellikle gen ekspresyon çalışmalarında ve mikrobiyolojik tiplendirme ve tespit çalışmalarının önemli rol oynar (87,88).

PCR kullanım alanları:

- Polimorfizm araştırmaları
- DNA haritalama
- Adli tıp (DNA parmak izi analizi, kriminoloji)
- Doku tipinin belirlenmesinde
- Tarımda (Tohum saflığının belirlenmesi)
- Sistemik ve evrim çalışmalarında (Doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde)
- Tıbbi tanı (Prenatal, postnatal sendromik tanıda ve mutasyon nedenli tabanlı hastalıkların tanısı, mikrobiyolojik tanı)
- Çevre kirliliği araştırmalarında özellikle su kirliliğine neden olan mikrobiyal etkenlerin tanısının konulmasında (89).

**DNA dizileme:** DNA dizisindeki nükleotidlerin tam sıralamasının belirlendiği bir tekniktir. İlk olarak 1940'larda DNA baz kompozisyonu saptama yöntemleri bulunmuş fakat DNA'daki nükleotid dizilişlerinin kimyasal yöntemlerle analizi 1960'larda geliştirilip kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, 1965'te Robert Holley, 75 nükleotidlik bir tRNA molekülünün dizisini bir yıllık bir çalışma sonucu saptayabilmiştir (21).

1970'lerde daha kesin sonuçlar veren ve doğrudan nükleotid dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlara rekombinant DNA teknikleri adı verilmiş ve bu tekniklerle herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmanları elde edilmiştir. Bu analizi yaparken iki temel yöntem esas alınmıştır (90).

Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır.

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde dideoksinükleotit yöntemi de denilmektedir (91).

Her iki teknikte üç temel basamaktan oluşmaktadır.

DNA'nın hazırlanması

Reaksiyonlar

Yüksek voltajlı jel elektroforezi

Her iki teknikte de analiz sırasında tek zincirli DNA parçaları elde edilmeye çalışılmıştır. Temel fark ise DNA fragmanlarının üretilme biçimidir (21).

Alan Maxam-Walter Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi:

Bu yöntemde bazı kimyasallarla DNA hedef baz dizilerinden kesilerek değişik uzunluktaki fragmentler elde edilmiştir. Bu teknikte yaklaşık 500 baz çifti işaretlenip ayırımı yapılabilmektedir. Dizisi saptanacak DNA parçasının komplementer zincirleri ayrılıp, 5'-ucundan, polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif <sup>32</sup>P ile işaretlenir (92). Bu işaret, elektroforez sonrası belirli bir DNA parçasının tanınmasını sağlamaktadır. İkinci adımda ise, dört ayrı tüpteki DNA örneğine, zinciri belirli nükleotidlerden kıran dört ayrı kimyasal reaksiyon uygulanır. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış DNA dizileri elde edilir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5'-ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçası elde edilir (91,92).

**Tablo 16. Maxam Gilbert kimyasal degradasyon yönteminde kullanılan kimyasallar ve hedef bölgeleri**

Özgün hedef bölgeleri	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 metillenen DNA bazık ortamda piperidin ile muamele edilirse DNA guanin bazından kırılır. Aynı işlem bazık ortamda gerçekleştirilirse bu kez DNA adenin bazından kırılır.



Pirimidin bazlarının kırılması hidrazin ile yapılır. Hidrazin DNA'yı sitozin ve timin bazlarından kırar. Bu iki bazıda birbirinden ayırmak için işlemi bazik ortamda (NaOH) ile gerçekleştirdiğimizde DNA sitozin bazından kırılır.

**Tablo 17. Kimyasal kırılma yöntemi ile yapılan reaksiyonların elektroforez sonrası görüntüsü ve okuma sonucu; 3'-GCAGTACGAT-5'-<sup>32</sup>P (24)**

G	G+A	T	T+C	Dizi
■	■			G
			■	C
	■			A
■	■			G
		■	■	T
	■			A
			■	C
■	■			G
	■			A
		■	■	T

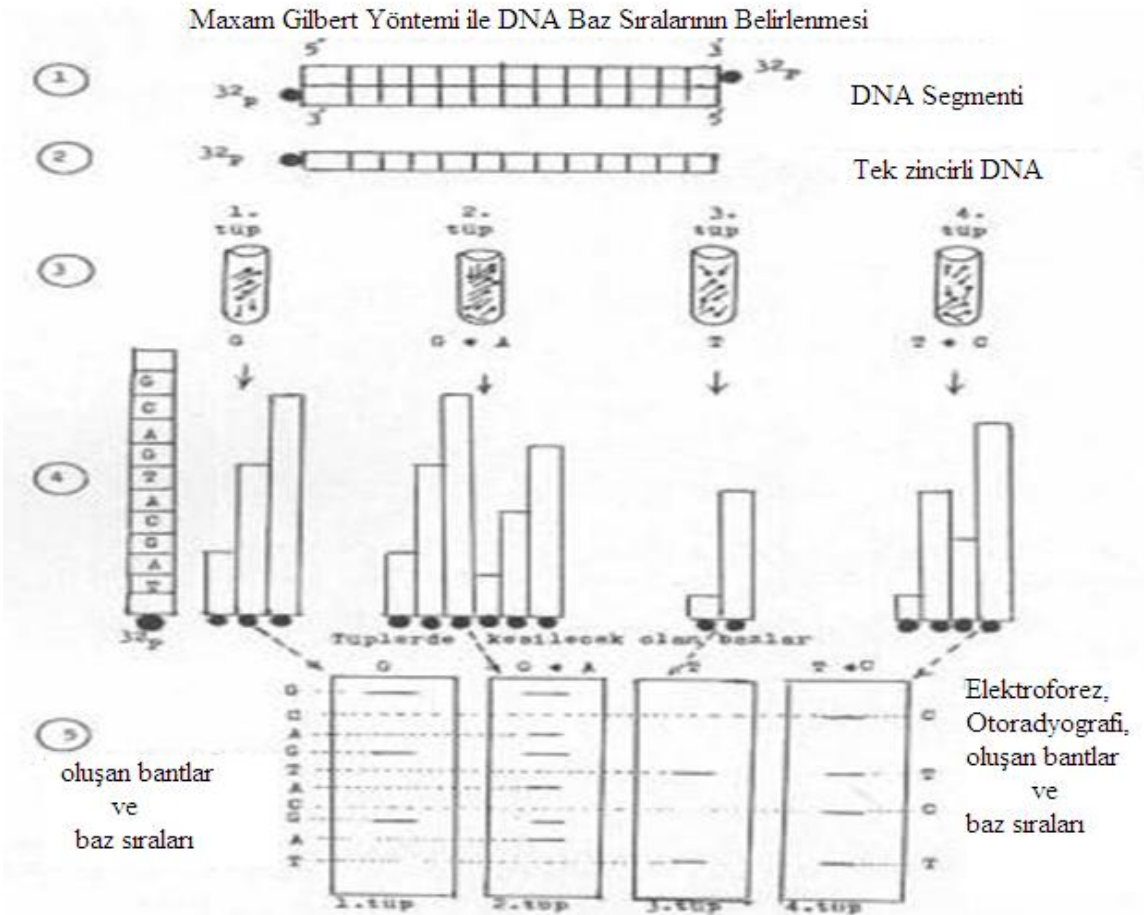
Bazları birbirinden ayırmak için uygulanan reaksiyonlar sonrası elde edilen parçacıklar elektroforez uygulanarak jel üzerinde yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile en kısa DNA parçacıkları en önde olacak şekilde konumlanırlar (24).

Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yönteminin prensipleri:

1. Baz sıraları saptanması istenen DNA, spesifik bir restriksiyon endonukleaz (Örn. EcoRI) ile kesilerek değişik boylarda çift iplikçikli DNA fragmentleri elde edilir.
2. Bu DNA segmentleri, 3' uçlarından radyoaktif bir madde olan <sup>32</sup>P ile işaretlenirler.
3. Radyoaktif fosforla işaretli olan bu çift iplikçikler çeşitli yöntemlerle (ısı, NaOH, vs.) denatüre edilerek tek iplikçikli hale getirilirler.
4. Bu denatüre süspansiyon, 4 eşit kısma ayrılarak tüplere taksim edilirler.
5. Tüplerin her birine, çok kontrollü miktar ve süre de spesifik bazları parçalayan bazı kimyasal maddeler (dimetil sulfat, hidrazin, formik asit, piperidin, vs.) katılarak etkilemeleri sağlanır. Bu maddeler, bir DNA segmentinde sadece bir tür baza etkileyecek tarzda ayarlanmışlardır.

- Birinci tüpteki işaretli ve tek iplikçik DNA fragment süspansiyonuna guanini (G) etkileyen dimetil sülfat (DMS) katılır bu madde bir segmentte bulunan guaninleri etkileyecek diğerleri ise sağlam kalacaktır.
- İkinci tüpe hem guanin ve hem de adenini (A) etkileyen kimyasal maddeler katılır ve reaksiyonunun gerçekleşmesi beklenir. Reaksiyonun sonunda DNA segmentlerindeki hem guanin ve hem de adenin bazları parçalanır.
- Üçüncü tüpe sadece timine (T) etkileyen madde katılır. Bu baz parçalanır.
- Dördüncü tüpe ise hem timin ve hem de sitozine (C) etkileyen maddeler katılarak reaksiyona bırakılır. Bu tüpte timin ile sitozin bazları parçalanır (93).

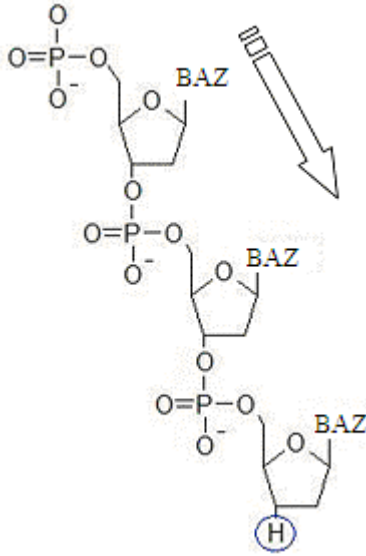
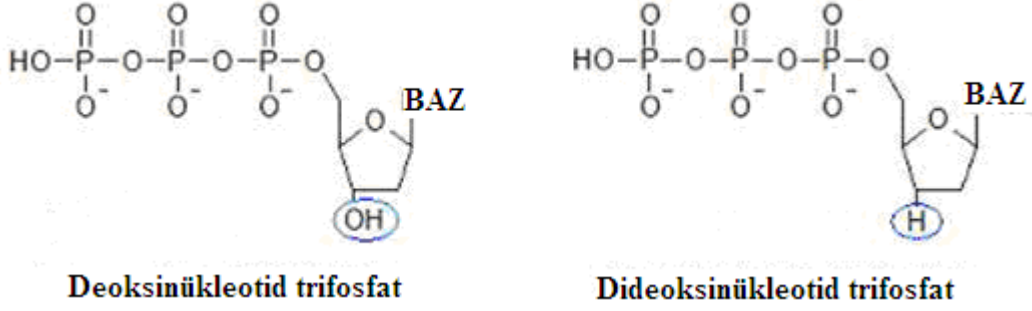
Tüplerde ayrı ayrı noktalardan kırılan DNA parçaları jel ortamına yüklendiğinde guanin bazında bir kırılma meydana gelmiş ise tek başına guanini kıran kimyasalın eklendiği tüpün sırasında ve hem adenini hem guanini kıran kimyasalın olduğu tüpün sırasında bant gözlenecektir.



**Şekil 27. Maxam gilbert degradasyon yönteminin şematik açıklaması (94)**

Sanger DNA dizi analiz yöntemi (1975):

Sanger metodunun esasını spesifik zincir terminatörleri olan 4 tür 2-3 dideoksinükleotidlerin (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) kullanılması oluşturmaktadır. Bu maddelerin yapılarında bulunan deoksiribozlarda 2. ve 3. pozisyonlardaki OH moleküllerindeki oksijenleri yoktur sentez sırasında bu maddelerin yan yana gelmesiyle fosfodiester bağları oluşamayacağından polimerizasyon durur (95).



**Şekil 28. Sanger kimyasal degradasyon yönteminde eksik olan O gruplarına fosfat moleküllerinin bağlanarak işaretlenmesi (96)**

Bu yöntemde laboratuvar ortamında:

Kalıp DNA

4 tür ddNTP

4 tür dNTP

DNA Polimeraz I

Primer gereklidir (91).

Sanger dideoksi metodunun prensipleri:

Baz sırası saptanacak olan DNA, özgül restriksiyon endonükleazlardan biri ile (örn.,EcoRI) kesilerek değişik boylarda DNA segmentleri elde edilir.

Bu segmentler ısı (veya 0.5 N NaOH) ile denatüre edilerek tek iplikçikli hale getirilir.

Denatüre edilen segmentler 4 eşit kısma ayrılarak tüplere taksim edilirler.

Kısa DNA primerleri (5'-uçlarından <sup>32</sup>P ile işaretlenmiş) test ortamına ilave edilir. Bu primerler, baz sırası tayini yapılacak olan DNA segmentlerinin 3'-uçlarındaki 4 bazın komplementeri olduklarından bunlarla çok çabuk birleşirler.

Tüplerin her birine, primerlerin yanı sıra, yeterli miktarda ve polimerizasyonda kullanılacak olan 4 tür (normal) deoksinükleotid trifosfat, polimeraz I enzimi (klenow fragmenti) ile her tüpe ayrı tür ddNTP konur.

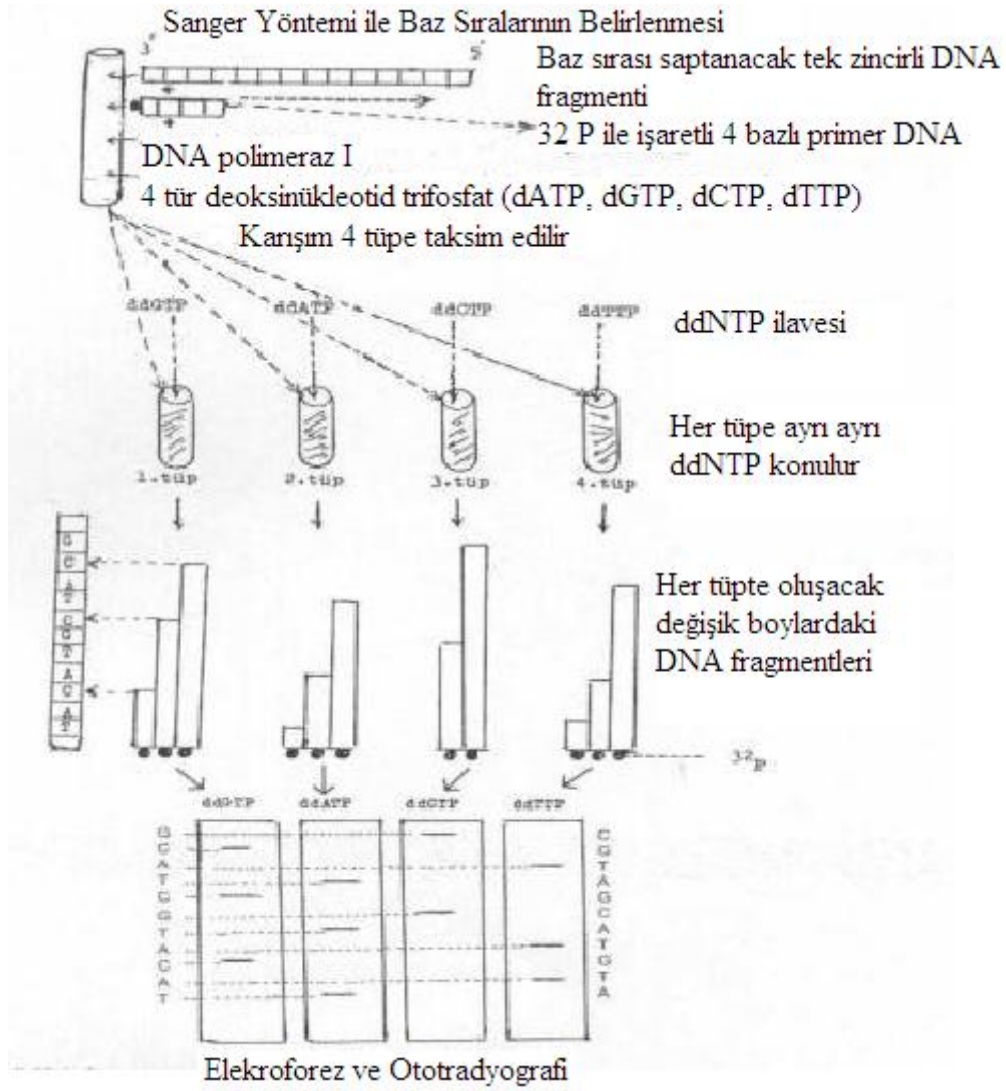
Primer DNA segmentleri, tayini yapılacak DNA segmentinin 3'-ucundaki 4 nükleotide bağlanınca, polimeraz I enzimi, ortamdaki deoksinükleotidleri (DNA segmentini kalıp olarak kullanarak) primerlerin 3' -OH ucuna yerleştirerek zincirin büyümesini sağlar. Ancak, sıraya ortamdaki spesifik dideoksinükleotidlerin girmesi halinde sentez durur ve sonlanır.

1. tüpte: Bu tüpe ddGTP konulduğunda: Tüpte polimerizasyon sırasında, baz sırası belirlenecek olan hedef DNA segmentinde sitozinin (C) sırada bulunduğu durumda, polimeraz enzimi bunun karşısına guanini (G) getirerek primerin 3'-OH ucuna ilave etmesi gerekecektir. Ortamda, normal guanozin trifosfatlar (dGTP) ile birlikte dideoksinükleotid guanozin trifosfatlar (ddGTP) da bulunmaktadır. Eğer, polimeraz enzimi ddGTP'yi, normal dGTP yerine, sıraya koyarsa, sentez bu aşamadan sonra daha ileri gidemez ve sonlanır.

2. tüpte: Bu tüpe ddATP konulduğunda: Bu durumda, polimerizasyon sırasında, enzim, DNA segmentinde timinin (T) sırada olduğu durumda, primerin 3'-OH ucuna adenini (A) ilave etmesi gerekir. Eğer enzim, ddATP'yi primerin ucuna katarsa, buradan itibaren sentez durur.

3. tüpte: Bu tüpe ddCTP konulduğunda, bu madde sentez sırasında DNA'daki guaninin karşısında sıraya girerek sentezi durdurur.

4. tüpte: Bu tüpe de ddTTP konulduğundan, sentez sırasında DNA'daki adenin karşısında bu ddTTP gireceğinden sentez sona erecek ve değişik boylarda segmentler oluşacaktır (97).



**Şekil 29. Sanger dideoksi metodu (96)**

Bundan sonra, 4 tüp ayrı ayrı poliakrilamid jel elektroforeze tabi tutularak segmentler boylarına göre, ayırma tabi tutulurlar. Sonra bunlar otoradyografi ile belirgin siyah bantlar haline getirilir ve aynen Maxam-Gilbert yönteminde olduğu gibi karşılaştırılarak baz sıraları saptanmaya çalışılır.

Ancak günümüzde her iki metot da ilk halleri ile kullanılmamaktadır. Onların yerini otomatize ve bilgisayar kontrollü, özelleşmiş elektroforez ortamları kullanan sistemler almıştır. Sanger metodunun prensiplerinin kullanıldığı, radyoaktif işaretleyiciler yerine floresan boyalar kullanılan ve elektroforetik ortamın çok ince kapiller tüpler içine sığdırıldığı otomatik sistemler en yaygın olan DNA dizileme sistemleridir.

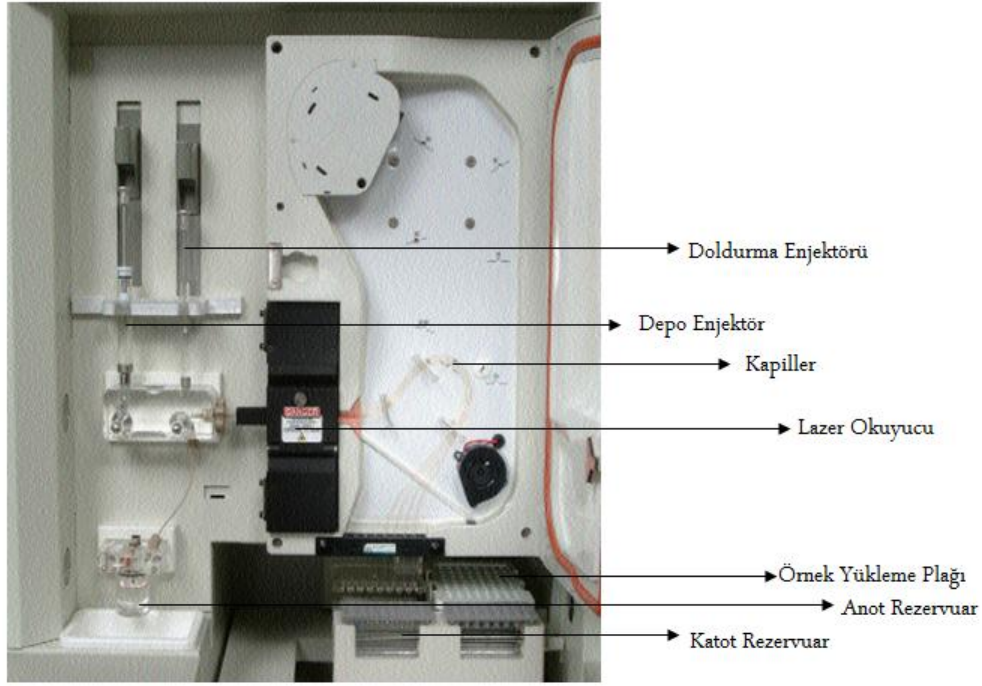
Otomatik DNA dizi analizi: Otomatik dizi analizinin elle yapılan dizilemeden ana temel farkı hedef DNA dizisini işaretlemek için radyoaktif madde kullanılmıyor oluşudur. Bunun yerine floresan boyalar ile işaretleme yapılır. İkinci önemli fark ise agaroz jel ya da poliakrilamid jel yardımıyla yapılan otoradyogram analizinin yerini artık lazerli bir optik okuma sistemi olarak bilgilerin bilgisayara direkt aktarımı sağlanmıştır.

Otomatik dizilemeye başlanılan ilk yıllarda her primer floresan boya ile işaretlenmesine rağmen artık bunun yerine floresan boyalı dideoksinükleotidler kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılan hedef DNA bölgesi temizlendikten sonra floresan işaretli dideoksi nükleotidlerin kullanıldığı ve I. PCR ürününün kalıp olduğu II. bir PCR reaksiyonu yapılır. Bu floresan işaretli reaksiyon ürünleri pürifikasyon işleminin ardından otomatik dizi cihazına yüklenir Cihaz örnekleri kapiller içine alıp otomatik olarak yürütür ve lazer okuyucu tarafından okunan floresans ışımaya ham veri olarak bilgisayara aktarılır (98). İkinci PCR’de kullanılan her dideoksinükleotid, türüne göre farklı renklerde floresan boya ile işaretlenmiştir. Bu farklı renklerde boyanmış nükleotidlerden elde edilen floresan ışımalar kromatogram denilen görsel bir veri olarak bilgisayarda değerlendirilebilir.

Örnek olarak; ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde ddNTP’lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler şöyledir.

**Tablo 18. ABI Prism Big Dye™ sisteminde kullanılan floresan boyalar (99)**

ddNTP	Floresan Boya	Renk
A	dR6G	Yeşil
T	dROX	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	DTAMRA	Siyah



**Şekil 30. DNA dizileme cihazı genel yapısı**

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 (24).

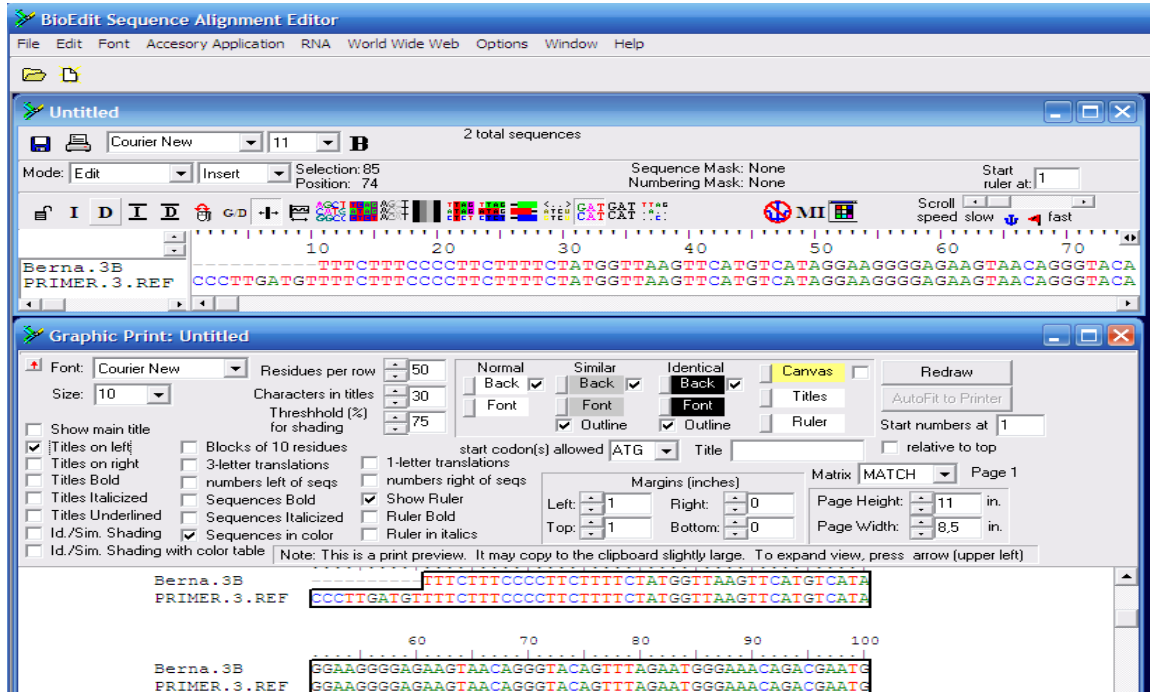
Dizi analizi yapılarak elde edilen ham veriler Proseq ve BioEdit gibi programlarla ayrıca değerlendirilmek zorundadır.

Proseq programında iki ayrı tüpte çoğaltılan bir dizinin ham görsel verilerinin değerlendirilerek referans dizi ile kıyaslanacak hale getirilmesini sağlar. Bu programda ham veriler aşağıda şekilde görüldüğü gibi kromatogram görüntüsü üzerinden takip edilerek şeklin üst kısmında yer alan penceredeki nükleotid dizileri kontrol edilir. Görsel farklılıklar tespit edilip düzeltmeler yapılır ve ardıl primer ile elde edilen dizi program yardımıyla "reverse complements" dizi şekline çevrilip iki dizinin ortak dizisi oluşturulur. Bu ortak dizi artık bioedit programında referans dizi ile karşılaştırılmaya hazırdır.



Şekil 31. Proseq programının ekran görüntüsü

Bioedit programında proseq programı ile oluşturulan ortak dizi referans dizi ile karşılaştırılarak farklara saptanır.



Şekil 32. BioEdit ekran görüntüsü

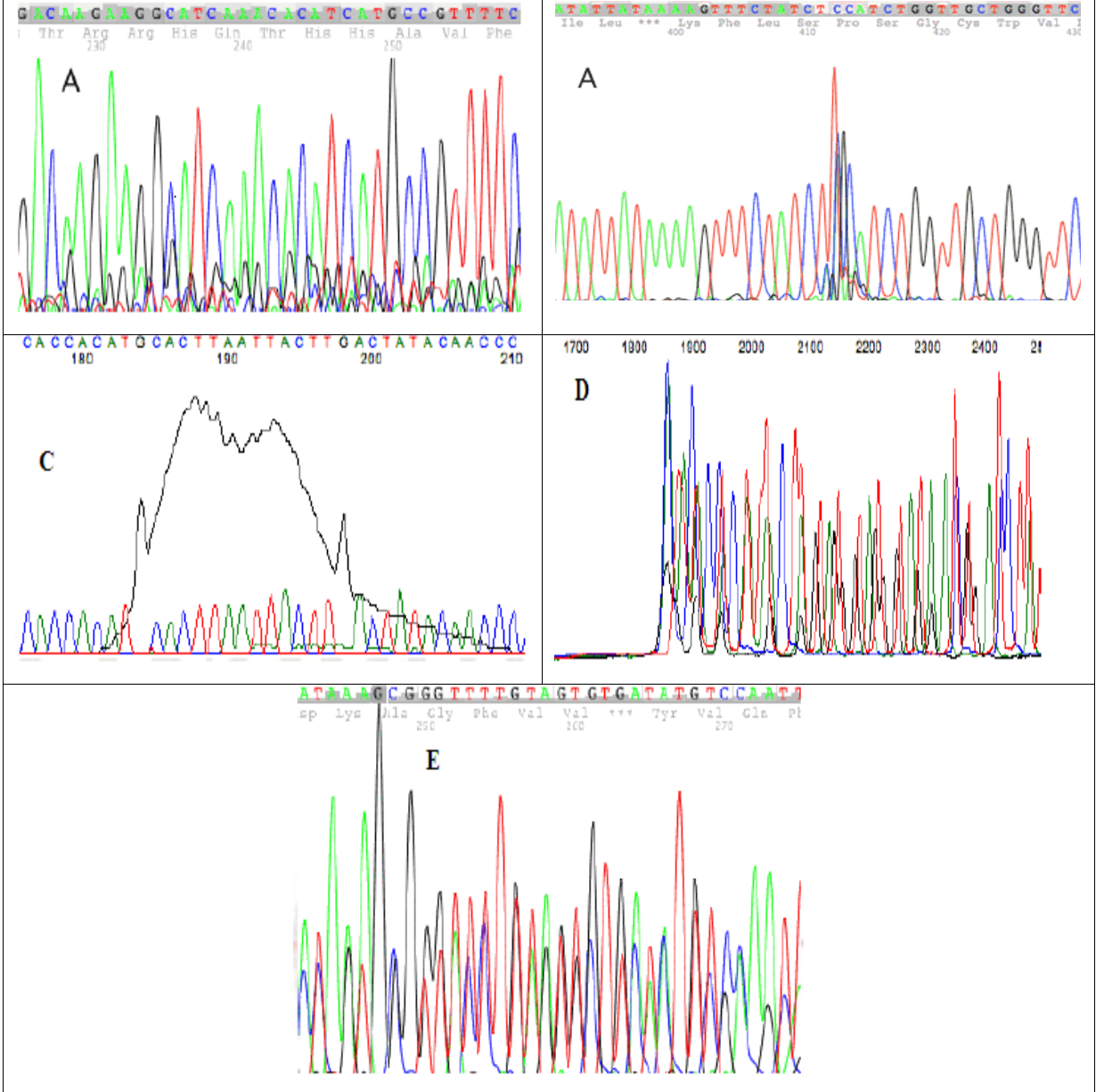
Dizileme sonrası yaşanacak olası problemler ve çözümleri:

Dizileme sonrasında sıklıkla yaşanan ve sağlıklı değerlendirme yapmamızı engelleyen problemler, nedenleri ve çözümleri tablo 19'da verilmiştir (100).



**Tablo 19. Dizileme sonrası yaşanan sorunlar, nedenleri ve çözümleri**

<b>Sorunlar</b>	<b>Nedenler</b>	<b>Çözümleri</b>
Dizilerin geç okunmaya başlanması	Protein veya tuz kalıntıları ile kontamine, kirli DNA	Birkaç basamak geri dönüp işlem tekrarı
Dizide keskin piklerin oluşması	Elektroforez esnasında kapillerden geçen çok küçük bir gaz oluşumunun laser ışımalarını CCD kameraya direkt yansıtması	Kapillerdeki hava kabarcıklarının iyi temizlenmesi, tampon çözeltilerinin uygun seviyede olması
Sinyalin kirli veya çok zayıf görünmesi	II. PCR işleminin kısmen başarısız olması, çok fazla veya yetersiz DNA kullanımı	Deneyin optimizasyonu ve tekrarı
Sinyal kirliliği	Sefadeks uygulamasından geçerken DNA örneğinin kirlenmesi	Sefadeksin daha temiz hazırlanması ve tekrarı, filtre temizliği ve sterilizasyonun tekrarı
Kromotogramda birden fazla DNA analizi görüntüsünün olması	Yabancı DNA kontaminasyonu	PCR ürününün agaroz jelde yürütülerek yabancı DNA kontaminasyonunun tespiti
Çok yüksek piklerin oluşması	İlk PCR'de 96°C denitürasyonun 20 siklustan az yapılması, DNA'nın az ya da fazla konulması	İlk PCR şartları ve cihaza yüklenen DNA miktarı kontrol edilir.
Bir veya daha fazla pikte genişlemeler görülmesi.	II. PCR sonrası etanolle yapılan temizleme işleminde yanlış konsantrasyonda etanol kullanılması, örnek sefadekse yüklenirken pipet ucunun sefadekse değmesi ve sefadeks kolonun çatlaması	Sefadeks tekrarı
Hedef dizinin istenilenden kısa okunması	DNA, primer miktarının az olması veya kirli DNA kullanımı	DNA miktarının ve primer konsantrasyonunun kontrolü, PCR ürününün saflığının kontrolü



Şekil 33. Kötü kromatogram örnekleri (100).

- A) Dizide kirlilik veya zayıf pikler
- B) Dizide keskin pikler
- C) Dizide oluşan geniş pikler
- D) Dizinin geç okunmaya başlaması
- E) Birden fazla kontamine DNA örneği

Klinik tanıda kullanımı: DNA dizilemenin amacı hedef DNA dizisindeki bazların yan yana doğru sıralanmış şekline ulaşmaktır. Yapılan çalışma sonunda bazlar incelenerek olması gerektiğinin aksi bir şekilde sıralanmışlarsa bu tespit edilebilir.

Bu yöntem ile daha çok tek nokta mutasyonları, tek bazlık ya da birkaç bazlık delesyon, inversiyon ve insersiyonlar tespit edilebilmektedir. Daha büyük çaptaki mutasyonların saptanabilmesi için çok uygun bir yöntem değildir.

**Tablo 20. Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda sıklıkla kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı**

<b>TBE : TRIS, Borik Asit, EDTA</b>	54 gr TRIS + 27.5 gr Borik asit + 3.72 gr EDTA steril distile su ile 1 litreye tamamlanır.
<b>MgCl<sub>2</sub>:</b>	50 mM'lık bir çözelti hazırlamak için 1.165 gr'lık MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 100 ml steril distile su içinde çözündürülür
<b>Proteinaz K çözeltisi (400 µg/ml)</b>	4 mg proteinaz K, 10 ml TE tamponu içinde çözündürülerek hazırlanır. TE tampon çözelti: 10 mM Tris 1 mM EDTA pH:8
<b>Etidyum Bromür (5 mg/ml)</b>	50 mg etidyum bromür 10 ml'lik distile su içinde manyetik karıştırıcı üzerinde birkaç saat karıştırılarak çözünmesiyle hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltilerden her 100 ml'lik agaroz çözeltisi için 10 µl kullanılabilir.
<b>Dietilpirokarbonat (DEPC H<sub>2</sub>O)</b>	1000 ml deiyonize su içerisine 1 ml DEPC konulup karıştırılır. Birkaç saat oda ısısında bekletildikten sonra 60°C'de 2 saat otoklavlanır. +4°C'de 1 yıl saklanabilir.

## SİTOGENETİK LABORATUVAR TEKNİKLERİ

Sitogenetik, fenotipik özelliklerin kromozomlarla olan ilişkisini incelemeyi konu edinen bilim dalıdır. Sitoloji ve genetik bilimlerinin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır. Genetik materyalin hücresel düzeyde incelenmesini esas alır. Amacı DNA’da meydana gelen yapısal, sayısal değişiklikleri ve köken farklılıklarını saptayarak elde edilen sonuç ile fenotip ve genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir (101,102).

Konvensiyonel sitogenetik analizler insan kromozomları üzerinde çalışılarak yapılmaktadır. İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafında görülmüş fakat kromozom sözcüğü 1888 yılında Waldeyer tarafından kullanılmıştır. Tjio ve Levan 1956’da insan fetal akciğer fibroblastları ile yaptıkları kültürlerde kolşisin kullanarak insan kromozomlarının sayısının 46 olduğunu bulmuşlardır (103,104,105).

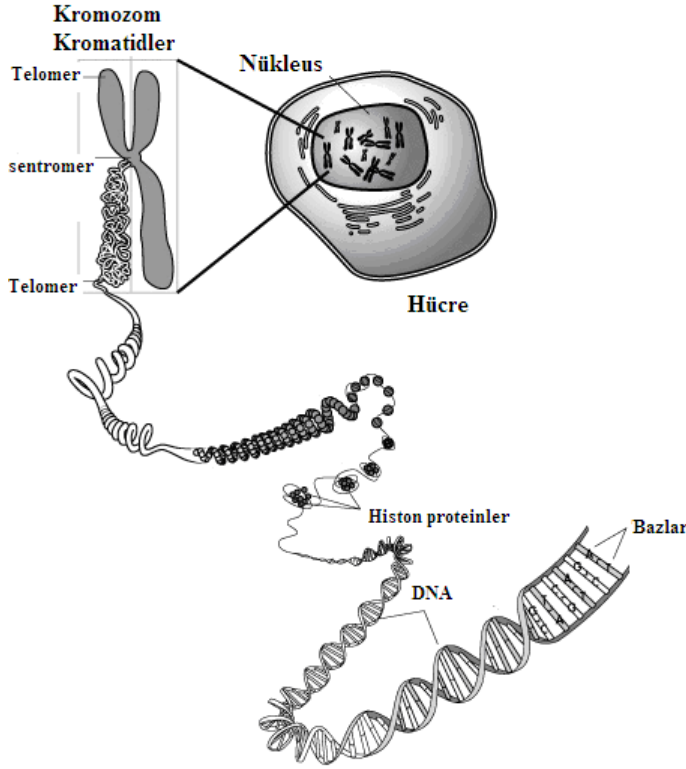
Kromozomlar bölünme halindeki bir hücreye ait olan kromonema ipliklerinin kısalıp kalınlaşması ve spiralleşerek etraflarında bir matrix oluşturmasıyla meydana gelen genetik materyali taşıyan yapılardır. Bölünme halindeki her kromozomda 2’şer çift kromatid bulunur. Bu kromatid çiftleri sentromerde birbirleri ile birleşirler. Kromozomlar ışık mikroskobu kullanılarak hücre bölünmesinin metafaz evresinde çok rahat incelenebilirler.

Bir kromozom genel hatlarıyla şu bölgelere ayrılır:

Sentromer (Primer boğum): Heterokromatin yapıda özel DNA dizisi içeren kısımdır. Kromozomlar sentromer bölgesinde boyuna bölünüp ayrılırlar. Sentromerlerin üzerinde uçları kutuplara dönük olan özelleşmiş protein komplekslerine kinetokor denir. Bölünme esnasında kromatitler bu noktalardan kutuplara çekilirler.

Satellit: Belirli bazı kromozomların kısa kollarına ince bir sapla bağlanan kromatin materyalidir.

Sekonder Darlık: Sentromerden farklı olarak oluşan küçük bir darlıktır. Özellikle 1, 3, 6, 9, 11 ve 16. kromozomlarda görülürler (106).



**Şekil 34. Kromozom genel yapısı (107)**

Kromozomlar sentromerlerinin lokalizasyonu dikkate alınarak sınıflandırılır. Buna göre tüm kromozomlar kendi içlerinde morfolojik olarak 3 gruba ayrılır:

**Metasentrik:** Sentromeri ortada olan ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlardır.

**Submetasentrik:** Sentromeri merkezden uzak ve iki kolunun uzunluğu da birbirine eşit olmayan kromozomlardır.

**Akrosentrik:** Sentromer bölgesi kromozomun bir ucuna daha yakın olan kromozomlardır.

**Telosentrik:** Sentromer kromozomun bir ucuna çok daha fazla yakın ve ikinci kolun görünmediği kromozomlardır (106).

Sitogenetik incelemelere başlamadan önce alınan materyal bir takım işlemlere tabi tutulur. Bu işlemleri sıralamak gerekirse, öncelikle alınan kan örnekleri kültür ortamına alınarak hücrelerin bölünmeye devam etmesi ve metafaz evresinde durması sağlanır. Hücrelerin metafaz evresine gelmesi için uygun zaman beklendikten sonra materyal kültür ortamından çıkarılarak boyanıp incelenmeye hazır hale getirilir. Çeşitli boya ile boyanan kromozomlar artık mikroskopta incelenebilirler.

## **Hücre Kültür Yöntemleri**

Hücre kültür çalışmalarında ökaryotik organizmalara ait farklı hücre tipleri kullanılabilir. İnsan hücrelerinden pek çoğu da kültür çalışmalarında kullanılmaktadır. Kültür ortamına alınan hücreler direkt olarak bireylerden temin edilebildiği gibi özellikle kanser hücre tipleri için daha önceden bir bireyden alınıp hücre serisi haline getirilmiş ticari olarak elde edilen hücreler de kültür için kullanılabilir.

İncelenecek duruma göre farklı hücre tiplerinin kültürleri yapılabilir. Hücre seçimi yapılırken hücrenin döngü süresi, incelenecek klinik durumla ilgisi, hastadan elde edilebilirliği gibi bazı noktalara dikkat etmek gerekir.

Burada rutin çalışmalarda en çok tercih edilen hücre tiplerinden biri olan periferik kan lenfositleri baz alınarak kültür aşamalarından bahsedilecektir. Çünkü lenfositler hastadan elde edilmesi kolay, döngü süresi nispeten kısa, çoğaltılması kolay ve vücudumuzda bulunan kromozomal aberasyonları en kolay ortaya koyabileceğimiz genetik materyaldir.

**a) Lenfositlerden kromozom eldesi:** Sitogenetik çalışmada kullanılacak olan kan örneği (lenfositler için) ya da kemik iliği (kan kök hücreleri için) hasta kişiden heparinle yıkanmış enjektörle ya da direkt heparinli tüplerin içine alınmalıdır (104,108).

Kendiliğinden bölünme hızı yüksek olan hücrelerle direkt olarak sitogenetik çalışma yapılabilirken bölünme hızı düşük olan hücreler önce kültür ortamına alınarak yapay uyarıcılarla mitoz bölünmeye teşvik edilir. Sonra çoğaltılır ve ardından sitogenetik çalışmada kullanılabilir.

Hiçbir uyarıcıya gereksizce kendiliğinden bölünen hücreler: kemik iliği, lenf nodülleri, solid tümörler, fetus ya da yenidoğan kanı gibi dokuların hücreleridir. Bunların dışında kan lenfositleri, amniyon sıvısı, koryonik villus, deri ve fibroblast içeren dokuların ise kendiliğinden bölünme hızı çok düşük olduğundan bir uyarıcı faktöre ihtiyaç duyarlar (109,110).

**b) Hücre kültürü:** Kendiliğinden bölünme hızı düşük olan hücreler kültür ortamına alınarak çoğaltılırlar. Çalışılacak materyale ve yapılacak araştırmanın tipine göre uzun ya da kısa kültürler hazırlanır. Kısa süreli kültürler 24-48-72 ve bazen de 96 saat sürerken uzun süreli kültürlerin işlemleri 1-3 hafta arası değişebilir (102).

Kültürlerde dikkat edilmesi gereken en önemli şeylerin başında pH ve kültürün içinde bulunduğu ortamın sıcaklığı gelmektedir. pH vücut sıvılarının değerine yakın olmalıdır. 7-7.4

kültür ortamı için en uygun aralıktır. Kültür için uygun olan ısı 37°C'dir fakat bu ısı 36-39°C arasında değişmektedir. Isının çok fazla yükselmesi hücrelerin ölümüne neden olurken aşırı düşmesi de hazırlanan preparatların kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (111). Kültürleri inkübasyon için bıraktığımız etüvlerin CO<sub>2</sub>'li olmasına özen gösterilmelidir.

**c) Kültür için gerekli materyaller:** Yapılan çalışmalarda hücrelerin çoğalması için oluşturulan kültürde mutlaka olması gereken malzemeler; besiyeri, serum, antibiyotik, L-Glutamin ve mitoz uyarandır (108).

Besiyeri için; öncelikli olarak besiyerleri dengelenmiş tuz solüsyonu ile hazırlanmaktadır. İçerisinde glikoz, aminoasitler ve mineraller gibi hücre metabolizması için gerekli materyaller bulunur. Besiyerlerine örnek vermek gerekirse: RPMI 1640, TC Medium 199, Minimal Essential Medium (MEM), McCoy's 5A, Nutrient Ham's F-10, vb.

Serum için; dana serumu (FBS) ya da sığır fetusu serumu (FCS) kullanılır. Serumlarda, hücre büyüme faktörleri, adezyon faktörleri, hormonlar ve vitaminler bulunur.

Antibiyotikler için; en çok tercih edilen penisilin ve streptomisindir. Bunlar bakteri enfeksiyonlarına engel olmak amaçlı kullanılırlar. Ayrıca mantar enfeksiyonlarını engellemek için de amfoterisin ve nistatin kullanılabilir.

L-Glutamin ; esansiyel amino asittir. Kültür ortamına mutlaka eklenmesi gerekir.

Mitoz uyararı olarak; en sık kullanılan fitohemaglütinindir (PHA). Periferik kanda lenfositleri uyararak onları bölünmeye teşvik eder (102,108). Bunun dışında kullanılan mitojenler ise, Epstein Barr Virüs (EBV), Pokeweed Mitojen (PWM), Phorbol Ester (TPA)'dir.

Rutin çalışmalarda kullanılan bazı sarf malzemeler ve cihazlar:

Kültür kapları, falkon tüpler, pastör pipet, mikropipet, su banyoları, etüv, hot-plate, vorteks, santrifüj, lam, lamel, yapıştırıcı, steril eldiven.

Kültür ekimi: Hücre kültür ekim işlemleri tamamen steril şartlarda mümkünse kapalı kabinde yapılmalıdır. Bu şekilde dışarıdan meydana gelebilecek kontaminasyona karşı önlem alınmış olunur. Ortamda bulunan yüzeyler uygun şekilde fiziksel olarak (%70'lik alkol, %8 formaldehit, %6 -10 stabilize hidrojen peroksit, %5 fenol, %5 krezol, %3 lizol) temizlendikten sonra ayrıca UV ışıkla (210-300 nm dalga boyunda) sterilizasyon yapılmalıdır (112).

Tüm kültür malzemesi ve kan örneğinin steril kabine alınmadan önce %70'lik alkolle dış yüzeylerinin fiziksel olarak temizlenmiş olması gerekir. Ekimi yapacak kişi steril eldiven giyerek steril olan kültür kabına her bir örnek için aşağıda verilen miktarlarda malzemeyi koyarak kültür medyumunu hazırlayabilir. Gerekli durumlarda kültür malzemesi filtre edilerek kültür ortamına konulmalıdır. 9.5 ml'lik kültür mediumuna 0.5 ml'lik kan ya da kemik iliği eklenerek ekim tamamlanır. Kültür kapları istenilen süre beklemek üzere (24,48,72 saat, vs) CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılır.

Periferik lenfositler için kültür mediumu:

%87 RPMI 1640

%10 Fetal Bovine Serum,

%1 penicillin streptomycine,

%1 L-glutamin,

%1 Hepes Buffer içeren (113).

Kültürün sonlandırılması: Kültür gerekmeyen hücrelere çalışmaya başlamadan iki saat önce ve kültüre alınmış olan hücrelere de sonlanmaya 4 saat kala kolşisin eklenerek mitoz durdurulur. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra kültür kaplarının içindeki materyal tüplerin içine aktarılarak santrifüjlenir ve santrifüjlemenin ardından sıvı faz uzaklaştırılır. Altta kalan çökeltinin üzerine vorteksleyerek hipotonik çözelti (0.075 M KCl) eklenir ve 20 dakika kadar bekletilir. Hipotonik çözelti hücrelerin şişerek patlamasını ve hücre içindeki kromozomların serbestleşmesini sağlar. Ardından tekrar santrifüj işlemi yapılır ve sıvı faz uzaklaştırılır. Daha sonra önceden hazırlanan (3 kısım etanol: 1 kısım asetik asit) fiksatif ile yıkanır. Yıkama sırasında her defasında yaklaşık 10 cc fiksatife ihtiyaç vardır. Asetik asidin bu orandan fazla olması erken hücre zarı yırtılmalarına ve paralelinde kromozom kayıplarına yol açar. En son olarak elde edilen hücre fazı daha önceden fiziksel ve kimyasal olarak temizlenmiş lamlara yayılarak boya için hazır hale getirilir (108,111).





Şekil 35. Kültürde kullanılan malzeme ve cihazlar

- A) Kültür malzemesi (falkon tüp, flask, RPMI, L-Glutamin, penisilin streptomisin, fetal calf serum)
- B) Laminar air-flow ekim yapılı
- C) CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılır
- D) İvert-Faz-kontrast mikroskobunda hücrelerin kontrolü

Kültürü yapılan hücreleri incelemek için kullanılan teknikleri 2 ana başlık altında inceleyebiliriz:

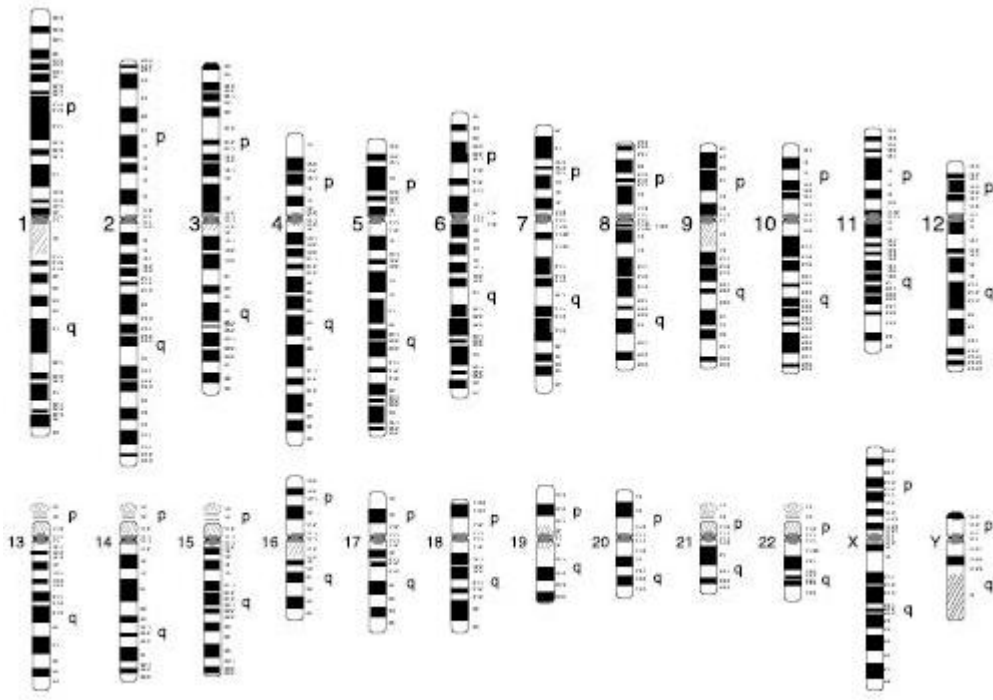
- Konvansiyonel sitogenetik teknikler
- Moleküler sitogenetik teknikler

## **Konvensiyonel Sitogenetik Teknikler**

**En sık kullanılan boyama yöntemleri:** Kromozomlar üzerinde araştırmak istediğimiz bölgeye farklı tekniklerle boyama yapabiliriz. Çeşitli boyalar kullanılarak yapılan tekniklerin başında bantlama işlemleri gelir. Bu bantlama teknikleri kullanılan boyanın ya da boyanan bölgenin ismiyle adlandırılırlar. Klasik bantlama teknikleri oldukça basit ve fiyat olarak uygun olduğundan ilk basamakta bunlar tercih edilmektedir. Bantlama; kromozomların, açıklı-koyulu boyanarak, birbirleri ile bağlantılı segmentler şeklinde görünüp tanımlandığı bir tekniktir (114).

**1) Giemsa bantlama yöntemi (G bantlama):** Giemsa kullanılarak yapılan boyama yöntemidir. Bu boyama yönteminin temelinde kromozomların yapısında yer alan proteinlerin tripsinizasyon yöntemi ile uzaklaştırılması yatar. Proteinleri uzaklaştırılmış kromozomlar giemsa ile boyandıkları zaman enine açık ve koyu renkte bantlar elde edilir. AT'ce zengin ve bölgeler koyu boyanırken GC'ce zengin boyalar açık renk bantları meydana getirir. AT'ce zengin bölgelerde transkripsiyon düşük düzeydedir. GC'ce zengin bölgeler ise korunmuş genleri içerir. Koyu renk bölgelerde paketlemenin daha sıkı olması nedeniyle, bu bölgede yer alan DNA'ya bağlı proteinlerin tripsinizasyonla kaybolmadığı düşünülmektedir (111,115,116,117,118,119,120). G bantlama ile 300-700 arasında bant değerlendirilebilir. Kromozomların idiogramları ilk kez Paris kongresinde belirlenmiş ve en son şekli 2005 International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)'de yayınlanmıştır. Bu yöntemle genom taranarak 10 Mb (1Mb:1.000.000 baz çifti) büyüklüğünde değişiklikler saptanabilir (121).

G bantlama da en iyi sonucu elde etmek için 3-5 gün oda ısısında yaşlandırılan preparatlar tercih edilmelidir. Bu uzun süreli yaşlandırma işlemi yerine bir gece boyunca 56-60°C arası sıcaklıkta bekletilerek yaşlandırma da yapılabilir. Her ikisi de daha net bantlar elde etmemiz için tercih edilen uygulamalardır (111,114,122,123).



**Şekil 36. İdiogram (Kaynak 124)**

Tripsin –Giemsa Bantlama:

Gerekli Materyal:

- PBS (pH:7): 0.92 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8 gr  $\text{NaCl}$ , 0.2 gr  $\text{KCl}$  ve 0.2 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bütün maddeler 1 litre su içinde karıştırılarak hazırlanır.
- %0.005 tripsin çözeltisi: 35 mg tripsin 1/250 (difco) 70 ml PBS

Not: Çözelti yaklaşık 1 gün stabil edilir.

- Fosfat tampon çözeltisi (pH:6.8) : 0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.4g/1 litre) pH:6.8 olan %50'lik  $\text{NaOH}$  ile titre edilmesiyle meydana gelir.
- Giemsa boya: 2.5 ml giemsa boyaya 45 ml fosfat tampon solüsyonu (pH:6.8) ilave edilir.

Protokol:

1. Oda sıcaklığında 1-3 gün inkübe edilen slaytlar 20-40 saniye (Oda sıcaklığında) tripsin çözeltisi içinde bekletilir.
2. Slaytlar soğuk PBS çözeltisi ile tamamen durulanır.
3. Slaytlar 8 dakika giemsa boyada bekletilir.
4. Ardından 2 kez distile su ile durulanır.

5. Havada kuruması sağlanır.
6. Üzerine 2-3 damla entellan damlatılır.
7. Üzerine lamel kapatılır.

Not: Slaytlar uzun süre muhafaza edilebilir. Sonuç olarak bu bantlama tekniği oldukça önemli bilgiler almamızı sağlayabilir. Eğer kromozomlar bulanık görünüyorsa, slaytların yaşlandırma işleminde bir sorun vardır. Fazla tripsinlendiğinde kromozomlar üzerindeki bantların görüntüsü fazla geniş ve solgun olabilirken tripsin az geldiğinde bantlar koyu fakat ince görülmektedir. Eğer bantlar solgun ve mavi ise tampon solüsyonunun pH'sını kontrol etmek gerekir. Kromozomlar genellikle çok koyu görülebilir böyle durumlarda distile su ile hafifçe durulamak sorunu çözmeye yardımcı olabilmektedir (125).



**Şekil 37. G bantlama (Kaynak 126)**

Klinikte kullanımı: Bu teknikten faydalanarak kromozomlarda meydana gelen sayısal ve yapısal aberasyonlar tespit edilebilir. Öploidi, anöploidi, delesyon, duplikasyon, translokasyonlar idiogram grafikleri ile karşılaştırılarak anomaliler saptanabilir.

**2) Floresans bantlama (Kinakrin bantlama) yöntemi (Q bantlama):** İlk kullanılan bantlama şekillerinden biri kinakrin (Q band) bantlamadır. Sitolojide kullanılan bazı boyalar floresans ışına yapar bunlara “fluorochrome” denir (111). Quinacrine mustard ve Quinacrine dihydrochloride gibi floresan boyalar kullanılarak yapılan bantlama şeklidir. Bunun dışında sıklıkla kullanılan floresan boyalar Floresan isothiocyanat (FITC), Tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) ve 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)’dir (127). Parlak ve soluk renkli bantlar elde edilir. Parlak renkler AT’ce zengin bölgeleri işaret ederken soluk renkler GC’ce zengin bölgelere karşılık gelir. 1., 9., ve 16. kromozomların sentromer bölgelerinde, akrosentrik kromozomların satellit bölgelerinde ve Y kromozomunda farklılıklar göstermektedir (128). Dezavantajı floresan sinyalin uzun süreli dayanıklılık göstermemesidir. Buna çözüm olarak çalışılan materyale ait veriler hızlı bir şekilde tespit edilip fotoğraflanarak bilgisayar ortamında muhafaza edilebilir (119,123).

Kinakrin bantlama:

Gerekli Materyal:

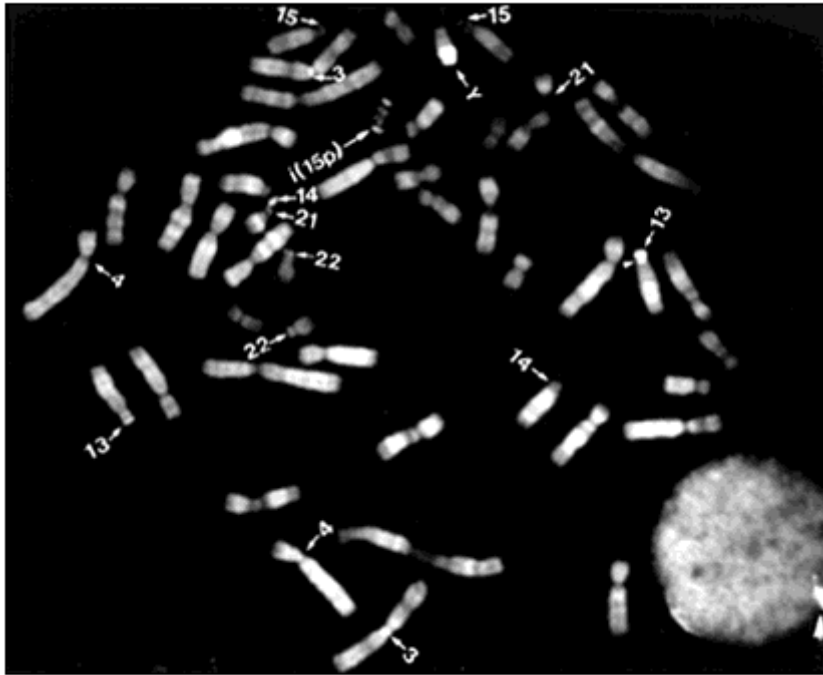
- Kinakrin dihidroklorid çözeltisi: 0.5 gr kinakrin dihidroklorid 100 ml su içine ilave edilir. Çözelti bir kap içinde folyoya sarılarak buzdolabında muhafaza edilebilir.
- MacIlvaines tampon (pH:5.6): 0.1 M anhidrositrik asit (Çözelti A: 19.2 gr/1litre) ve 0.4 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Çözelti B: 56.8 gr/1litre) karıştırılır. Tampon çözeltisine 92 ml solüsyon A ve 50 ml solüsyon B ile pH:5.6 civarında ayarlanır.

Protokol:

1. Slaytlar kinakrin boyanın içinde 10 dakika bekletilir.
2. Kısaca musluk suyuna tutularak fazla boyalar çıkartılır.
3. Hazırlanan tampon çözeltisi içinde 1-2 dakika bekletilir.
4. Slaytların üzerine birkaç damla tampon solüsyonu damlatılıp lamel ile kapatılır (Fazla gelen çözelti bir kağıt yardımıyla lamelin köşesinde kağıdın fazla çözeltiyi emmesi sağlanarak uzaklaştırılır).
5. Eğer istenirse slaytların kenarları su geçirmeyen bir lastikle kapatılıp hava alması engellenir (Isıya dayanıklı bir yapışkanda kullanılabilir).
6. Mutlaka floresan mikroskop ile kromozomlar aranmalı ve uygun filtreler takılmalıdır.
7. Tekrar çalışmalar için sinyal kaybı yaşanacağında elde edilen görüntüler hızla fotoğraflanıp kaydedilmelidir.

Not: Kromozomlar düşük floresan verdiğinde mikroskopun ışığı biraz düşürülmelidir. Yapılan boyama işlemi çalışılan floresan mikroskop için uygun olup olmadığı kontrol edilmelidir. Ayrıca lamelin altına damlatılan tampon çözelti fazla geldiği durumlarda floresan ışık hızla genişleyebilir. Yüksek oranda bir siliklik varsa bunun nedenin yanlış mercek ve yağ (Immersion oil) seçimi olabilir.

Eğer slaytların çevresi bir yapışkan ile çevrelendiyse bunu çıkarma işlemi distile su içinde birkaç dakika bekletilerek yapılabilir böylece slaytların zarar görmesi engellenmiş olur (125).



**Şekil 38. Kinakrin bantlama (Kaynak 129)**

Klinikte kullanımı: İncelemeler floresan mikroskop altında yapılmak zorunda olduğundan tespit edilen veriler fotoğraflanarak bilgisayar ortamına aktarılarak saklanmalıdır. G bantlamada olduğu gibi sayısal ve yapısal anomalilerin tespitinde yardımcı olabilen alternatif bir tekniktir.

**3) Reverse bantlama yöntemi (R bantlama):** G bantlamadaki koyu renkli bantların açık, açık renkli bantların koyu boyandığı bir tekniktir. Bu bantlamaya G bantlamasının tersi anlamına gelen “reverse” R bantlama denilmiştir. Yüksek ısı ve kontrollü pH ile muamele edilen preparatlar giemsa ile boyanır. G ve Q bantlama da soluk olarak boyanan telomerik

bölgelerin daha koyu boyanmalarına imkan vermektedir. Kromozomların uç kısımların bulunan anomalilerin tespitinde sıklıkla tercih edilir (111,115,123).

R bantlama chromomysin A<sub>3</sub> ile:

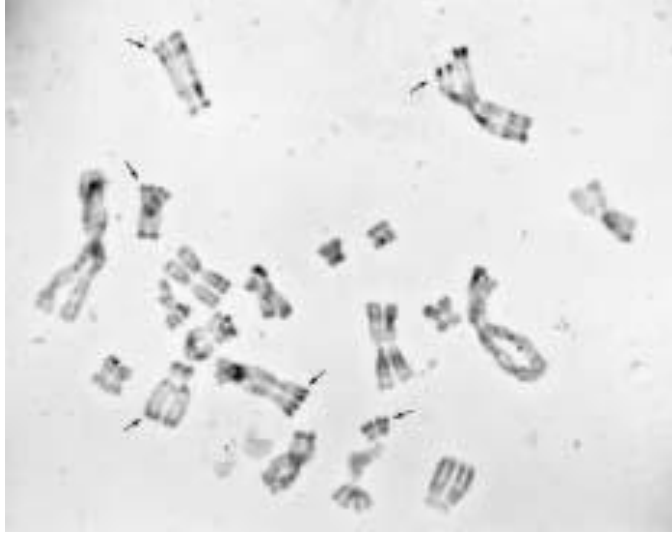
Gerekli Materyal:

- 0.14 M fosfat tampon çözeltisi (pH:6.8) (500 µM MgCl<sub>2</sub> içeren):  
Çözelti A: 19.3 gr NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (sodyum dihidrojen fosfat) 1 litre distile su içinde karıştırılır.  
Çözelti B: 19.9 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 litre su içinde karıştırılır.  
Çözelti B'nin pH'ı 6.8 olana kadar çözelti A ile titrasyon yapılır. pH 6.8 olan tampon çözeltisinin her 100 ml'si için 10 mg MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O eklenir.
- Fosfat tampon çözelti (pH:6.8) (100 µM kromomisin A<sub>3</sub> içeren):  
1 mg kromomisin A<sub>3</sub> yukarıda tanımlanan 1 ml tampon çözeltinin içinde eritilir. İstenirse bu stok solüsyon dondurulup saklanabilir. Çalışma yapılacağı zaman 0.3 ml stok 0.2 ml fosfat tampon çözeltisi ile dilüe edilir.
- 0.005 Hepes tampon çözeltisi (pH:7) (0.15 M NaCl içeren):  
1.75 gr NaCl ve 238 mg Hepes final hacmi 200 ml olacak şekilde distile su içinde karıştırılır. 1M NaOH ile pH:7'ye ayarlanır.
- 0.15 M NaCl/0.005 M Hepes (100 µM metil green içeren):  
2.6 mg metil green 50 ml NaCl/Hepes tampon çözelti içinde eritilir. Bu çözelti metil green'in stabilitesi bozuluncaya kadar bir gün boyunca taze kalabilir.

Protokol:

1. Slaytlar 0.14 M fosfat tampon çözelti (pH:6.8) ve 50 µM MgCl<sub>2</sub> içinde 10 dakika bekletilir.
2. Slaytların üzerine 3-4 damla kromomisin A<sub>3</sub> damlatılır.
3. Üzeri lamel ile kapatılıp 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
4. Slaytlar 0.15 M NaCl/0.005 M Hepes ile durulanır.
5. Slaytların üzerine 4-6 damla civarında 100 µM metil green damlatılıp lamel ile kapatılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
6. Slaytlar 0.15 M NaCl/0.005 M Hepes ile durulanır.
7. Slaytların üzerine gliserol damlatılarak slaytların üzeri lamel kapatılır.

8. Floresan mikroskopta incelenmeye hazırdır. Gliserol, kromomisin A<sub>3</sub>'ün daha iyi yayılmasını sağlayabilir bu nedenle en iyi floresan sinyal bir gün sonra alınır (125).



**Şekil 39. R bantlama (Kaynak 130)**

Klinikte kullanımı: Sayısal ve yapısal anomalilerin tespiti için alternatif bir tekniktir.

**4) Sentromer bantlama yöntemi (C bantlama):** Bu bantlama tekniği “yapısal heterokromatin bantlama” olarak da adlandırılır. C bant bölgelerinde bulunan histon olmayan proteinler bölge DNA’sına çok sıkı bir şekilde bağlanmışlardır. Ayrıca tekrarlayan satellit DNA’da histon proteinlerce sıkı bağlanmıştır. Bu DNA bölgeleri asit ve alkol ile muamele edildiğinde C bant içeren bölgelerin dışında kalan DNA bölgeleri kaybolurken, C bant bölgesindeki DNA korunarak saklı kalır. İnsan kromozomlarında koyu boyanan C bant bölgeleri sentromere lokalizedir. Bu durumun tek istisna olduğu bölge Y kromozomudur. Burada C bant bölgesi Y kromozomunun uzun koluna lokalizedir. Kromozom kayıpları bu yöntemle değerlendirilebilir (111,117,118,119,123).

Sentromer bantlama:

Gerekli Materyal:

- Baryum hidroksid çözeltisi (Ba(OH)<sub>2</sub>: 0.07 M): 11.04 gr 1 litre su içinde karıştırılır, havası alınmış bir şişe içinde depolanıp saklanabilir.

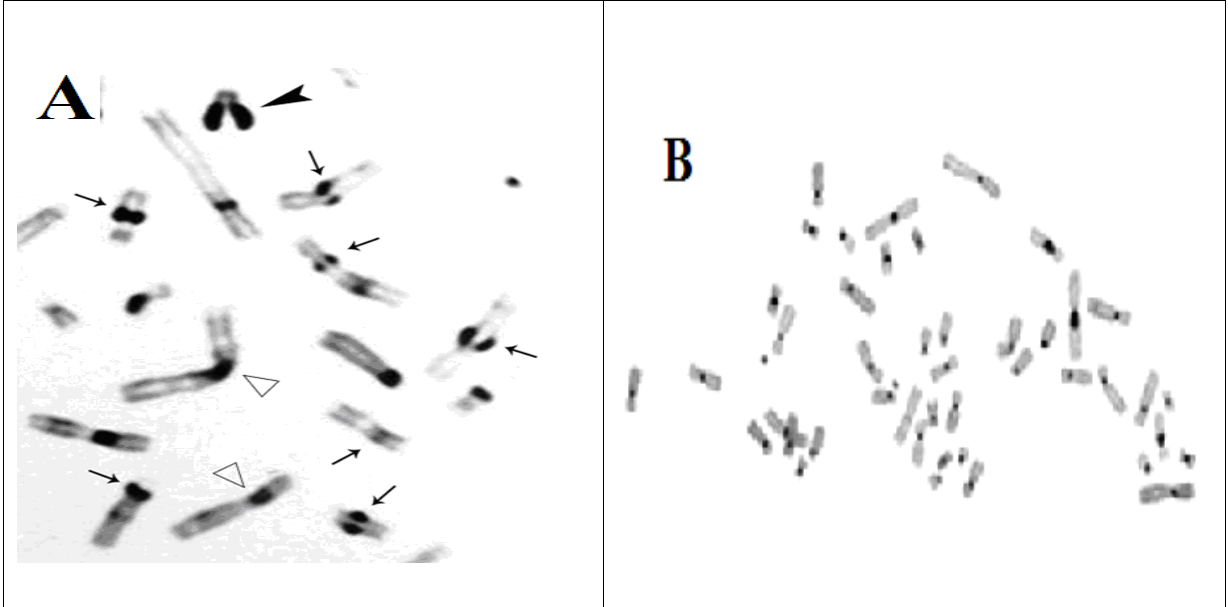


- 2 x SSC çözeltisi: 0.3 M sodyum sitrat (17.4 gr/litre) 0.03 M NaCl (8.82 gr/litre) birebir oranında karıştırılarak hazırlanır.
- Giemsa çözeltisi hazırlanır (G bantlamada anlatılmıştır bakınız).
- 0.2 M HCl

Protokol:

1. Önceden ısıtılmış olan ısı banyolarına 37°C'ye Ba(OH)<sub>2</sub> ve 65°C'ye 2 x SSC çözeltileri bir jar içinde konulur.
2. Slaytlar 0.2 M HCl ile oda sıcaklığında 30 dakika muamele edilir.
3. Slaytlar iki kez deiyonize su ile durulanır.
4. Slaytlar 37°C'de Ba(OH)<sub>2</sub> solüsyonunda 10 dakika muamele edilir.
5. Slaytlar üçüncü kez deiyonize su ile durulanır.
6. Slaytlar 2 x SSC solüsyonunda 65°C'de 2 saat inkübe edilir.
7. Tekrar distile su ya da deiyonize su ile durulanır.
8. Slaytlar giemsa solüsyonun içerisinde 1-2 saat boyanması için bekletilir.
9. Distile su ile durulanıp havada kurutulur.

Not: Eğer Ba(OH)<sub>2</sub> solüsyonunun dibinde çökelme olmuşsa bu kromozomların silik görünmesine neden olabilir ve tekrar boyamak gerekebilir (125).



Şekil 40. C bantlama

A) Sentromer işaretleme (Kaynak 131)

B) Sentromer işaretleme (Kaynak 132)

Klinikte kullanımı: Tüm kromozom kayıplarında ya da trizomi şüphelerinde sıklıkla başvurulan bir tekniktir.

**5) Gümüş-NOR bantlama yöntemi:** rRNA'ları kodlayan gen bölgeleri özellikle akrosentrik kromozomların kısa kollarında lokalize olmuştur. rRNA'ların yoğunlukta olduğu bu bölgelere nükleer organizatör bölgeler (NOR) denilmektedir ve bu bölgeler gümüş boyalarına karşı yüksek afinite gösteren bölgelerdir. Gümüş nitrat ile NOR siyah noktalar şeklinde boyanır (133). Bu afinite nonhiston proteinler olan Ag-NOR proteinlerin varlığına bağlıdır. Metafaz safhasındaki hücrelerde bulunan iki önemli Ag-NOR proteini transkripsiyonda görevli UBF (upstream binding factor) ve RPI (RNA polymerase I) proteinleridir.

NOR: 18S ve 28S rRNA genlerini içeren bölgedir (134).

NOR boyama gümüş nitrat ile:

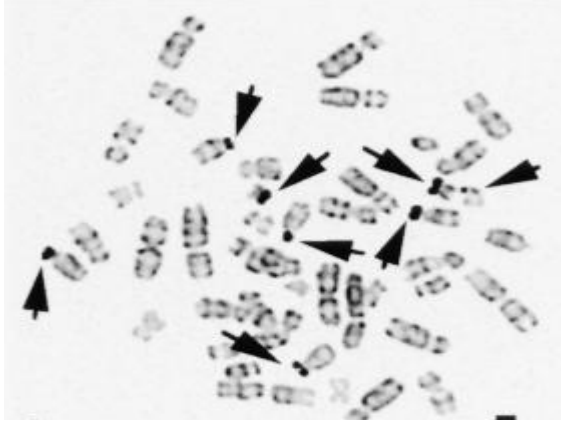
Gerekli Materyal:

- %50 gümüş nitrat solüsyonu (10 ml distile su içinde 5 gr AgNO<sub>3</sub>). Solüsyon koyu renk bir şişenin içinde bir soğutucuda saklanabilir.

Protokol:

1. Hafif nemli bir filtre kağıdı petrinin altına uygun bir şekilde yerleştirilir.
2. Slaytlar nemli filtre kağıt üzerine dikkatlice yerleştirilirken üzerleri gümüş nitrat solüsyonu ile kapatılır. Slaytların üzeri bir lamel ile kapatılır. Mümkünse ışığa maruz bırakılmadan kaçınarak 37°C'de 1 gün inkübasyon için bırakılır.
3. Slaytlar distile su ile iyice yıkanır.
4. Giemsa ya da uygun olan başka bir boya seçilerek boyanır.

Not: Uygulanması kolay olmasına rağmen çok güvenli bir method değildir. Boyama yapıldıktan sonra yapılan inceleme diğer bantlama tekniklerinden herhangi biri ile (Q bantlama, R bantlama, G bantlama) desteklenmelidir (123).



**Şekil 41. Gümüş-NOR boyama (Kaynak 133)**

Klinikte kullanımı: Bu sitogenetik çalışma ribozomal gen aktivitesinin tanımlanması hakkında fikir vericidir.

**6) Kardeş kromatid değişimi (SCE):** Kardeş kromatidler arasında birbirine eş segmentlerin karşılıklı olarak yer değiştirmesidir. Bu olay sonucunda kromozom morfolojisi kesin olarak değişmektedir. SCE analiz yönteminde tek bir kromozomun iki ayrı kolu farklı renkte boyandığından DNA'daki bozukluk kolayca saptanabilir. Bu farklı boyamayı sağlamak için kültür ortamına eklenen bromo-deoksi-uridin (BrdU) hücre bölünmesinin sentez fazında kendini eşleyen DNA'nın yapısına girerek timin nükleotidinin yerini alır. Tekrar mitozu giren hücrelerde, birisi ana hücreden gelen ve diğeri yeni sentezlenen nükleotidler arasında parça değişimi meydana gelir. Parça değişimlerini saptamak için giemsa ile kromozom boyanır. BrdU bağlayan bölgeler boyayı tutmadıkları için kromozomlar üzerinde açık koyulu bölgeler oluşur (111).

SCE analizi DNA hasarını kromozomal düzeyde gösterebilen bir yöntemdir. Vücudumuzdaki toplam DNA'nın %1'inden daha azında bile meydana gelebilecek değişimler bu teknik ile ortaya konabilir. SCE replikasyonun farklı döngülerini saptama ve bir tek hücre döngüsünde erken ya da geç replikasyon arasında ayrımı fark etmemizde bize yardımcı olur böylece SCE yöntemi ile tüm genomun replikasyon takvimi öğrenilebilmiştir (128).

Kardeş kromatid boyama:

Kültür:

Standart 72 saatlik kültür yapılır. Tek farklı kültüre BrdU (Bromo-deoksi –uridin) eklenmesidir. BrdU kültür ortamına eklenince yeni DNA'nın sentezi sırasında timidinin

yerine geçer. BrdU içeren yeni DNA Hoescht boyası ile boyanıp ardından Giemsa ile boyanırsa, BrdU bölgelerine daha sıkı bağlanan Hoescht boyası Giemsa'nın bu bölgeleri boyamasına izin vermemektedir. Böylece yeni ve eski DNA'ları ayırd etmek mümkün olmaktadır.

#### Gerekli Materyal:

- BrdU stok çözeltisi: 15,37mg BrdU+ 10 ml steril distile su (-20°C'de karanlıkta saklanır).
- Hoescht 33258 stok çözeltisi: 1mg boya + 10ml steril distile su (Stok karanlıkta -20°C'de saklanır).
- Sorensen Tampon Çözeltisi: (pH:6.8) 9,94 gr /lt, Na<sub>2</sub>HP O<sub>4</sub>+ 9,53 gr/lt KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Giemsa boyası: 5ml Giemsa +95 ml Sorensen çözeltisi
- 0,075 M KCl çözeltisi (0,056 gr KCl 100 ml distile suda çözünür).
- Fiksatif (1kısım asetik asit+3 kısım metanol)(Yıkama başına yaklaşık 10 ml).

#### Hücre kültürü (72 saat):

%87 RPMI 1640

%10 Fetal Bovine Serum,

%1 penicillin streptomycine,

%1 L-glutamin,

%1 Hepes tampon.

NOT: 0,1 ml BrdU(stok çözeltiden) 0,5 ml kan ekilir. Kültür 37°C'lik CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırılır. 68. saatte kültüre 0,3 ml Kolşemid (10 mg/ml) eklenir. 72. saate kültür sonlandırılır.

#### Protokol:

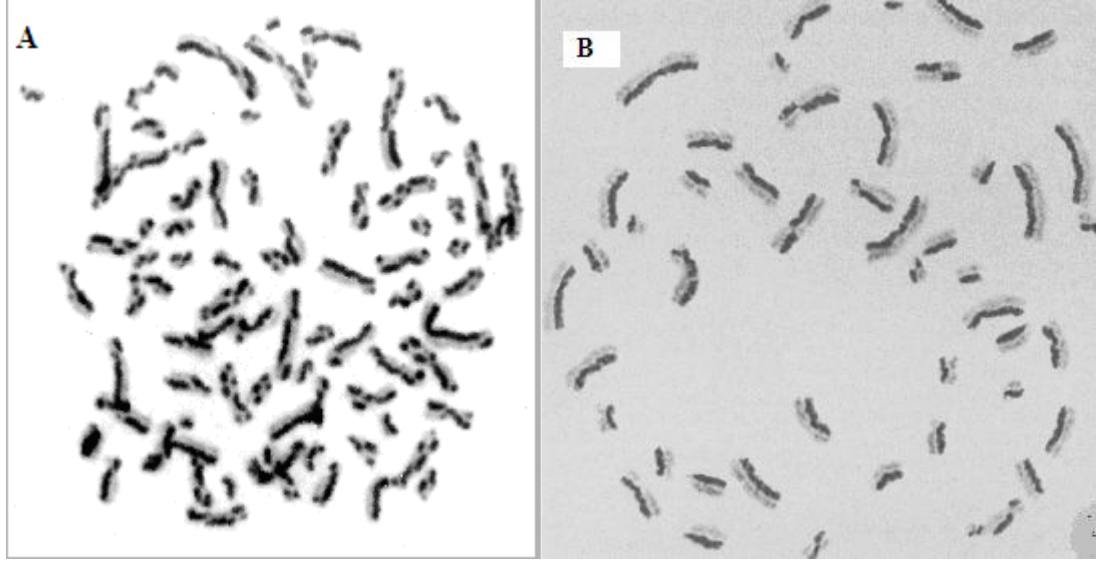
1. Kültür süspansiyonu 800 rpm'de 8 dk santrifüjlenir.
2. Üstteki sıvı kısım atılır. Hücre pelleti kalır.
3. Pellet kibarca vortekslenerek ( 750-800 rpm) dağıtılır.
4. Peletin üzerine 10 ml'ye tamamlanana kadar vorteksleyerek damla damla KCl eklenir.
5. 20 dakika 37°C'lik etüve kaldırılır.
6. Daha sonra kültür süspansiyonu 800 rpm'de 8 dk santrifüjlenir (Üstteki sıvının şeffaf kırmızı olması gerekir).
7. Üstteki sıvı kısım atılır. Hücre pelleti kalır.

8. Pellet yavaşça vorteksenerek dağıtılır. Pellet iyice dağılınca üzerine damla damla yavaşça fiksatif eklenerek 10 ml'ye tamamlanır.
9. Fiksatifli kültür süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlenir.
10. Üstteki sıvı kısım atılır. Hücre pelleti kalır. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanıp hücreler yıkanır.
11. Yıkama işlemi bittikten sonra hücreler fiziksel olarak temizlenmiş lamların üzerine damlatılarak yayılır ve faz kontrast mikroskopta metafaz miktarı kontrol edilir. Boyadan önce en az 1 gece oda ısısında bekletilir.

Boya ( Karanlık Odada):

1. Şaleye konulmuş 100 ml 2xSSC içine 50 µl stok Hoescht boyası eklenir. Önceden hücrelerin yayıldığı lamlar şalenin içine konur ve 10 dakika karanlıkta bekletilir.
2. Lamlar distile su ile yıkanır ve havada kurutulur.
3. Lamlar bir tepsiye hücre yayılı yüzeyleri üste gelecek şekilde dizilir ve üzerlerini 2-3 ml geçecek şekilde 2xSSC çözeltisi konulur.
4. Lam tepsi 25 cm mesafeden ışınlanacak şekilde UV kaynağının altına konur. 40 dk. oda ısısında bekletilir.
5. UV'den alınan lamlar Önceden 60°C'ye Isıtılmış su banyosundaki 2xSSC çözeltisi bulunan şaleye konur ve 1,5 saat bekletilir.
6. Su banyosundan çıkarılan lamlar distile su ile yıkanır ve havada kurutulur.
7. Kuruyan lamlar taze hazırlanmış Giemsa ile 15 dk boyanır (Şale içinde).
8. 2 kez distile su ile yıkanır ve dikey olarak havada kurutulur.
9. Kuruyan lamların üzerine 2-3 damla entellan damlatılır ve 24x60 mm'lik lamel kapatılır. İstenildiği zaman ışık mikroskobu ile inceleme yapılır. Lamlar oda ısısında muhafaza edilir.

Değerlendirme: Işık Mikroskobunda önce küçük büyütmede 10x objektifle metafaz bulunur. Ardından 100 x immersiyon objektifi ile 46 kromozomlu metafazlarda değişimler sayılır. En az 20 metafaz sayılmalıdır (111).



**Şekil 42. Bloom Sendromu**

**A) Bloom sendromlu hastalarda kardeş kromatid boyama (Kaynak 135)**

**B) Kardeş kromatid boyama (Kaynak 108)**

Klinikte kullanımı: Bu teknik Bloom Sendromu ve çeşitli genotoksiklerin etkilerinin araştırılması için kullanılmaktadır.

**7) Mikronükleus tekniği:** Mikronükleuslar hücre bölünmesi esnasında ortaya çıkan esas çekirdek dışındaki kromozomlar veya asentrik kromozom parçalarıdır. Mitotik iğdeki hatalar nedeniyle kutuplara çekilemeyen kromozomların sitoplazmada yoğunlaşması sonucu oluşurlar. Bu nedenle MN kromozomal fragment veya tüm bir kromozom içerebilir (136). Çok fazla hücre değerlendirmesine izin vermesi ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermesinden dolayı yaygın olarak kullanılan ve tercih edilen bir tekniktir (137,138).

Bu metot, kültüre alınarak mitoz geçirmeye teşvik edilmiş hücrelerin üzerine Cytochalasin-B (Cyt-B) eklenerek sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine 1.mitozdan önce (44.saatte) uygun konsantrasyonda (0.6 µg/ml) 0.3 ml Cyt-B ilave edilmektedir. Böylece sitokinez tamamlanamayınca çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş iki nükleuslu (binukleat) hücreler sayılarak MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir (136).

Mikronükleus yöntemi:

Gerekli Materyal:

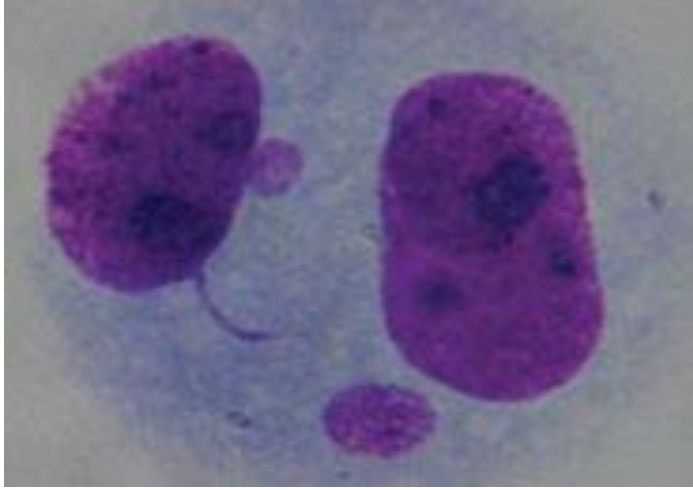
- RPMI-1640,

- %10 Fetal Calf Serum,
- %1 Penisilin/Streptomisin,
- Phytohemaglutinin (PHA) (stok 1 mg/ml),
- Cytohalasin-B (DMSO içinde) (stok 0.1 mg/ml),

10 ml medyum içine kültür ortamını zenginleştirmek amacıyla %10 Fetal Calf Serum ve bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilmelidir. Medyuma en son 0,5 ml periferik kan, ve lenfositleri bölünmeye teşvik etmek amacıyla 0.15 ml PHA eklenir. Kültür işlemleri UV lambası ile steril edilen bir doku kültür laboratuvarında, laminar air flow kabini içinde gerçekleştirilmelidir. Hazırlanan kan örnekleri 37°C' de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde kültüre alınır. Kültüre 44.saatte 0,3 ml Cytohalasin-B ilave edilir. 72. saatte kültürler durdurularak fiksasyon işlemi başlatılır.

#### Harvest:

1. Kan örnekleri 15 ml'lik falkon tüplerine aktarılır.
2. 800 RPM'de 5 dakika santrifüj edilir.
3. Süpernatant atıldıktan sonra buz soğuşunda 0.075 M KCL çözeltisi ilave edilerek hipotonik şok uygulanır.
4. Örnekler 800 rpm'de 8 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılır. Pellet üzerine %1 oranında formaldehid içeren Carnoy Fiksatif (3:1 (v/v) metanol:asetik asit) voerteks üzerinde damla damla eklenir 10 cc'ye tamamlanır.
5. Örnekler 1000 rmp'de 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır.
6. Pelletin üzerine bu kez formaldehidsiz fiksatif vorteks üzerinde damlatılarak 10 cc'ye tamamlanır.
7. Örnekler 1000 rmp'de 5 dakika santrifüj edilir ve üstteki sıvı atılır.
8. 6. ve 7. basamaklar tekrar edilir.
9. Hücreler, önceden dondurulmuş slaytların üzerine 45°C'lik açı ile 30 cm yükseklikten damlatılarak yayılır ve kurumaya bırakılır.
10. Ardından bir jar içinde distile su içine 5 ml giemsa boyası damlatılarak 10 dakika bekletilir. Slaytlar mikronükleus incelemesi için hazır hale getirilmiş olur (137).



**Şekil 43. Mikronükleus genel yapısı (136)**

Klinikte kullanımı: Mikronükleus sayısındaki artış anöploidiyi uyaran çeşitli mutajen veya karsinojenlerin hücrede yol açtıkları sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin dolaylı olarak değerlendirilmesini sağlar. Genellikle genotoksisite değerlendirme testi olarak da isimlendirilir. Karsinojenlerin ve farmasötik ajanların yaptıkları sitogenetik harabiyetin tespitinde sıklıkla tercih edilir (137). Fiziksel ve kimyasal ajanların sebep olduğu sitogenetik hasarın tespitinde, radyolojik kazaların genetik materyal üzerine oluşturduğu hasarı belirlemek için, iyonizan radyasyon gibi dış etkenlerin mikronükleus oluşumuna etkisi ve mikronükleus oluşumunun sayısal ve yapısal kromozom anomalileri üzerine indirek etkisinin araştırılmasında kullanılabilir (138).

**8) Frajil bölge tespiti:** Frajil bölgeler kromozomlar üzerinde yer alan, özel kültür koşulları altında bazı faktörler tarafından baskılanınca boyanmadığı gözlenen kırıklar, aralıklar ve triradiyal bölgelerdir. Frajil bölgeleri görüntülemek için hücreleri değişik kültür ortamlarında çoğalmak ya da farklı kimyasallarla karşı karşıya bırakmak gerekir. Frajil bölgeler, baskılayıcı ajan tipi ve toplumda görülme sıklıkları dikkate alınarak sınıflandırılırlar.

Nadir gözlenen frajil bölgeler: Ortalama % 2.5'in altında gözlenirler. Folat stresi, BrdU veya distamsin-A ile baskılanırlar.

Sık gözlenen frajil bölgeler: Hemen hemen tüm bireylerde gözlenir. Afidikolin, 5-azasitidin, kafein ve etanol tarafından baskılanınca ortaya çıkarlar.

Frajil bölgeler kalıtsal geçiş gösterebilirler. Örneğin klinik olarak anlamlı olduğu tespit edilmiş olan Frajil X sendromunun sorumlusu fra Xq27.1 bölgesidir (139).



Timidin indüksiyonlu Frajil bölge tespiti:

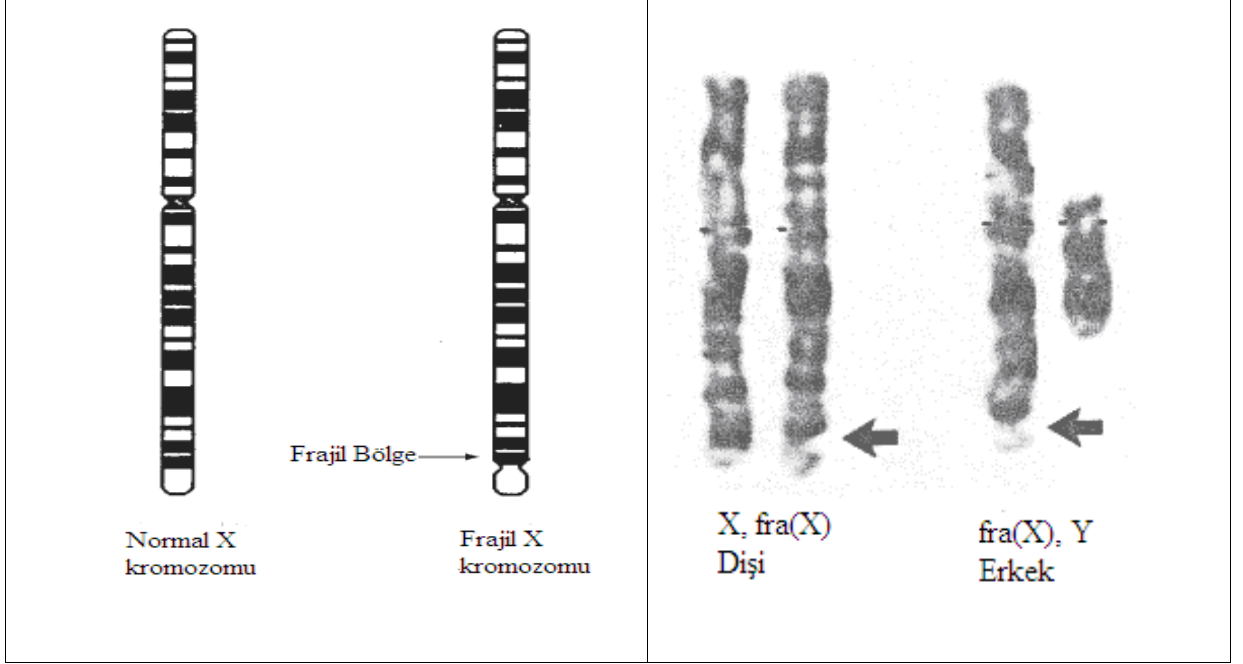
Gerekli Materyal:

- RPMI-1640
- Fitohematoglutinin
- L-Glutamin
- Streptomisin
- Penisilin
- Fetal calf serum
- Timidin
- Kolşemid

Lityum heparin içeren tüplerin içine alınmış olan kandan, 5 ml RPMI-1640 içine 0.2 ml eklenir. Üzerine 0.05 ml fitohematoglutinin, 1.4 mM/l L-Glutamin 50 µg/ml streptomisin 50 IU/ml penisilin içeren %10'luk fetal calf serum eklenir. Hazırlanan kültür 37°C'de 72 ya da 96 saat harvest öncesi inkübasyona bırakılır. 24. saate 300 mg/l timidin eklenir ve harvest yapılmasından 4 saat önce 0.5 µg/ml kolşemid ilave edilir (140).

Harvest:

1. Kültür içeriği santrifüj tüplerine aktarılarak 500 g'de 5 dakika çevirilir.
2. Süpernatant uzaklaştırılır ve karışımın üzerine 10 ml 0.075 M KCl eklenir. Ardından 37°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır.
3. 500 g'de 5 dakika santrifüjlenir.
4. Süpernatant atılır altta çökelen hücreler bir kez vortekslenir (2-3 sn). Üzerine 3:1 oranında hazırlanmış metanol asetik asit fiksatifinden damla damla 10 ml eklenir.
5. 500 g'de 5 dakika santrifüjlenir.
6. Süpernatant atılır altta çökelen hücreler bir kez vortekslenir (2-3 sn). Üzerine 3:1 oranında hazırlanmış metanol asetik asit fiksatifinden damla damla 10 ml eklenir.
7. 500 g'de 5 dakika santrifüjlenir.
8. Tekrar süpernatant atılırken küçük bir miktar soğuk fiksatif eklenerek vortekslenir. Hazırlanan fiksatiften slaytların üzerine birkaç damla damlatılıp slayt temizlendikten sonra 2-3 damla hücreli çözeltilerden damlatılarak incelenir (125).



**Şekil 44. Frajil bölge (Kaynak 141)**

Klinikte kullanımı: Frajil bölgelere bağlı klinik durumların tespiti için kullanılır  
Örneğin frajil x sendromu (105).

**9) X Kromatini tespiti:** X kromatini, cinsiyet kromatini, sex kromatini gibi adlar verilen barr cisimciği yalnızca dişi memeli hücrelerinde interfaz nükleusunda bulunan çekirdek zarına yapışmış özel bir kromatindir. 1947 yılında dişi ve erkek kedilerin sinir hücrelerinin morfolojik özelliklerini araştıran Barr ve Bertram tarafından bulunmuştur. Bu araştırmacılar Barr cisimciği adı ile anılan X kromatininin yalnızca dişi kedilerin sinir hücrelerinde olduğunu erkek kedilerde olmadığını tespit etmişlerdir. Barr cisimciği dişilerde X kromozomlarının yalnızca birinde, hücre siklusunda interfaz evresinin yalnızca S fazında rastgele yoğunlaşmış bir bölge olarak görülür (105,142,143). Dişilerde 2 X kromozomunda birinde Barr cisimciği bulunur. Erkeklerdeki tek X kromozomunda barr cisimciği yoktur zaten barr cisimciği hayati fonksiyonlar üzerinde etkisi olmayan inaktif X'i sembolize etmektedir. Bu rastgele yoğunlaşmış bölgeyi tespit etmek için farklı boyalar kullanılabilir. Sıkça kullanılan dört farklı boya vardır. Bunlar; hematoxylin-eozin, guard, feulgen, papnicolaou boylarıdır. Hepsi Barr cisimciği tespitinde kullanılabilir (114). Sonuçları arasında büyük farklar yoktur. Barr cisimciği tayini cinsiyet fizyolojisi bozuklukları aramak, doğum öncesi cinsiyeti belirlemek, transplantasyonlarda alıcı verici hücreleri takip etmek ve adli tıpta cinsiyet belirlenmesi alanlarında kullanılır (144).

X kromatin işaretleme:

Materyal:

- %2'lik aseto orsein boyası: 4 gr sentetik orsein 200 ml asetik asit içinde 80°C'de bir karıştırıcı yardımıyla çeker ocakta 4-5 saat karıştırılır.
- Toplam hacim 2 litre olacak şekilde ayarlanıp karıştırılır daha sonra filtre kağıdından geçirilerek süzülür.
- Hazırlanan solüsyon serin bir yerde koyu renk bir şişenin içinde kullanıncaya kadar saklanabilir.

Protokol:

1. Slaytların üzerine 3-4 damla serin bir yerde muhafaza edilmiş olan %2'lik aseto orsein boyasından damlatılır.
2. Bir lamel ile üzeri kapatılır.
3. Slaytların üzerinden aşırıya kaçmadan hafifçe bastırılır ve lam ile lamelin arasından akan fazla boya bir kurulama kağıdı ile alınır.
4. Değerlendirme ışık mikroskobu altında yapılmalıdır ve en az 100 hücre sayılarak Barr cisimciği aranmalıdır (125).



**Şekil 45. Barr cisimciği (Kaynak 145)**

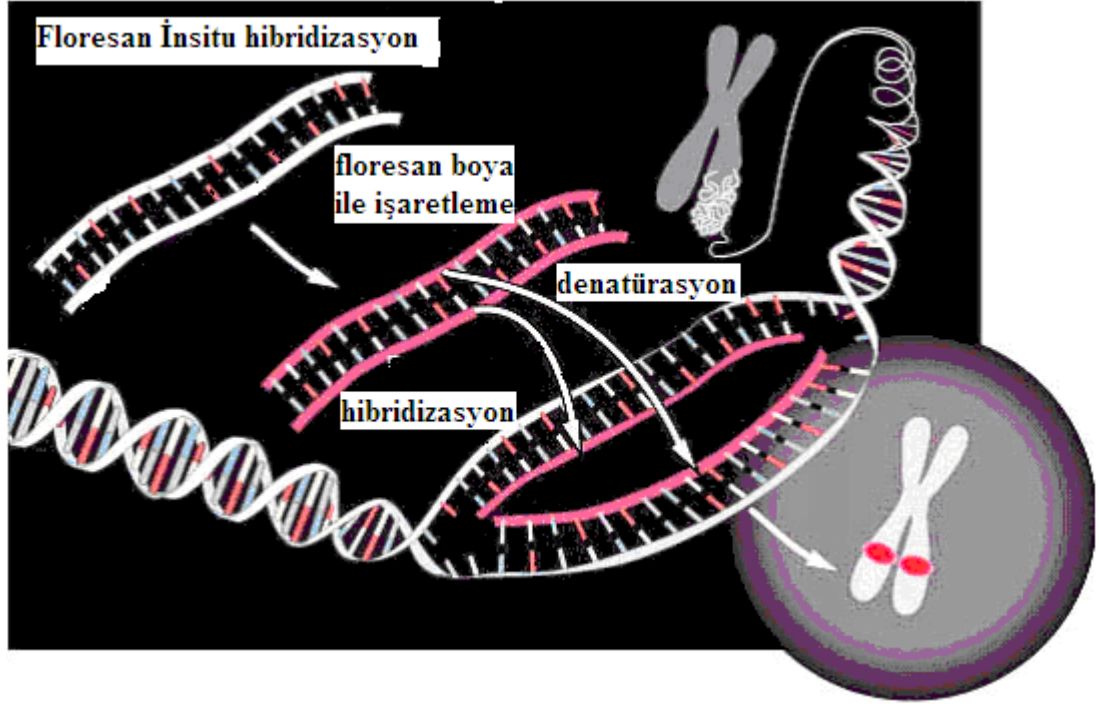
Klinikte kullanımı: Basitçe X kromozomuna ait sayısal anomalilerin tespitinde kullanılır. Örneğin 45, X0 olan Turner Sendromlu dişilerde Barr Cisimciği gözlenmezken, 47, XXX karyotipli süper dişilerde 2 Barr Cisimciği, 47, XXY karyotipli Klinefelter Sendromlu erkeklerde bir adet Barr Cisimciği gözlenmektedir.

## **Moleküler Sitogenetik Teknikler**

Sitogenetik ve moleküler genetik teknikleri bir araya getiren teknolojiye moleküler sitogenetik denebilir. Moleküler sitogenetik teknikler denince de akla ilk gelen teknik FISH'tir. Klasik sitogenetik yöntemlerle belirlenemeyen aberasyonların metafazla birlikte interfaz safhasında da değerlendirilebilmesine olanak sağladığından tıbbi tanıda kısa sürede önemli bir yer edinmeyi başarmıştır. Moleküler tekniklerin sitolojik preparatlara uygulanabileceği gerçeği ilk olarak 1969 yılında Gall ve Pardue tarafından ortaya atılmıştır (144).

**1) Floresans In Situ Hibridizasyon (FISH):** FISH, sentetik nükleik asit dizileri (Prob) hücre içinde genomik DNA'ya hibridizasyonu aracılığı ile genomik DNA'daki yapısal ya da sayısal değişimleri tespit etmeyi sağlayan bir tekniktir. FISH tekniğinin moleküler tekniklerdeki ilerlemelere paralel olarak gelişmesi ve geniş bir uygulama alanı bulmasının altında yatan gerçek, bu tekniğin kolay uygulanabilir olması, duyarlılığı ve güvenilirliğinin yüksek olması, diğer moleküler DNA hibridizasyon yöntemlerine göre rezolüsyon gücü, mozaikizm tanısı gibi avantajlarının olmasıdır.

Kanserli hastalara ait hücrelerden kültür şartlarında metafaz kromozomları elde etmek çok zordur. Kültür sonrası elde edilen metafaz kromozomlarının morfolojilerinde meydana gelen bozukluk da bunların klasik sitogenetik tekniklerle incelenmesine engel olmaktadır. FISH tekniği ise bize İnterfaz evresinde inceleme imkanı sağlayarak özellikle hematolojik kanserli hastalarda hastalığın tanı ve seyrinde en çok tercih edilen teknik olmuştur (125,144,146).



**Şekil 46. FISH tekniği genel yapısı (147)**

FISH tekniğinin kullanım alanlarına şunları örnek verebiliriz:

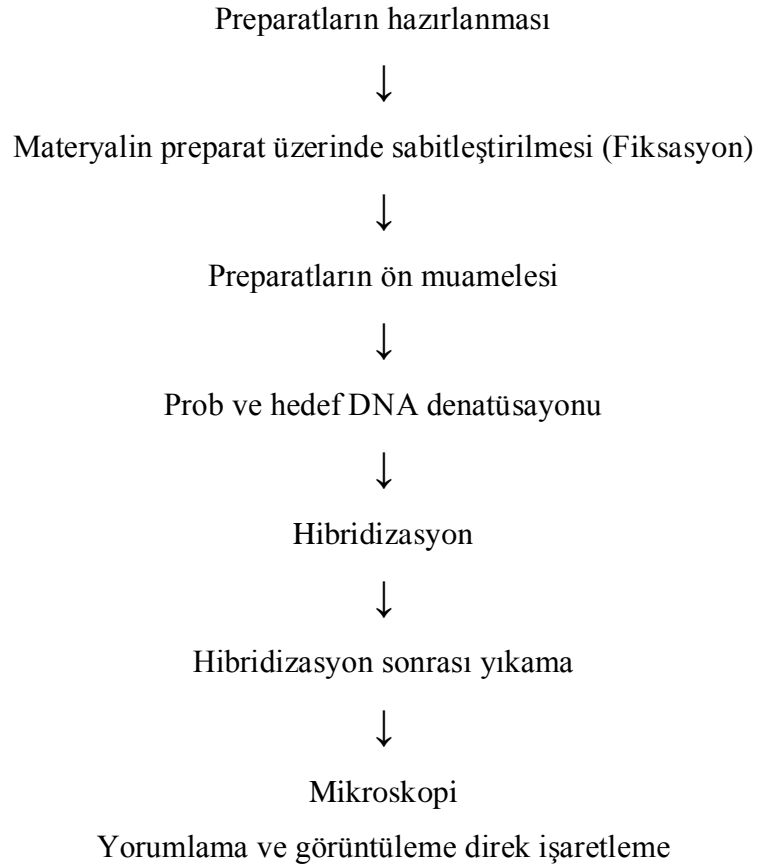
1. Prenatal sendromik tanımlamalarda,
2. Postnatal sendromik tanımlamalarda,
3. İnterfaz ve metafaz hücrelerinde aberasyon tanımlamalarında,
4. Dokuda enfeksiyon ajanlarının tanısında,
5. Gen haritalamasında,
6. Somatik hücre hibrit analizlerinde,

Tüm In Situ Hibridizasyon (ISH) yöntemlerinde aynı prensip uygulanmaktadır. Prob olarak kullanılan DNA molekülü indirekt ya da direkt metoda uygun olarak işaretlenir. Prob işaretlendikten sonra lam/lamel üzerine fikse edilen metafaz ve/veya interfazdaki hücrenin proteinleri uzaklaştırılır. Çift sarmal halde bulunan gerek prob gerekse hedef DNA'lar denatürasyon ile tek zincir haline getirilir. Önceden işaretlenmiş prob ile spesifik eşleşmenin olacağı uygun koşullarda genomik DNA hibridize edilir.

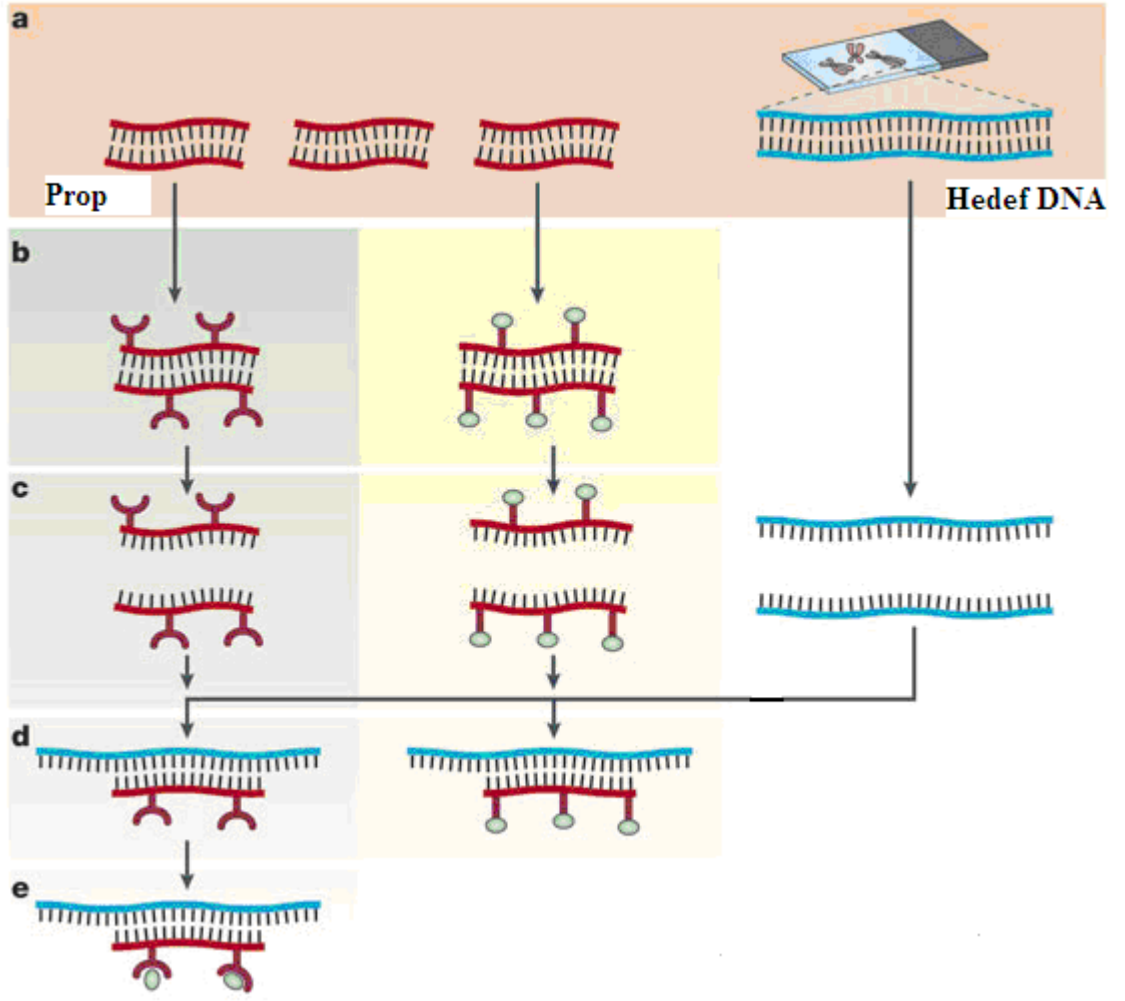
Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir;

1. Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında yeterince açık olması ve bu açıklığın yeterli süre korunması,
2. Probla hedefin yüksek affiniteyle birbirlerine bağlanması,
3. Hibridizasyonun spesifik aktivitesi yüksek bir işaretleyici ile görüntülenmesidir.

Bir hibridizasyon reaksiyonunda tolere edilebilen yanlış eşleşme derecesi ‘stringency’ olarak ifade edilir. Yüksek stringency koşullarında, sadece hedef diziyile tam homolog olan problemler stabil hibridler oluştururlar. Düşük stringency koşullarında ise prob sadece % 70–90 homoloji gösteren diziler bağlanabilir. Bu spesifik olmayan sinyallerin oluşumu, hibridizasyon sonrası yıkamalarda yüksek stringency koşullarının (yüksek ısı + düşük tuz konsantrasyonu) sağlanmasıyla engellenebilir. Daha sonra oluşan hibrit özgül görüntüleme sistemleri ile belirgin hale getirilir (146).



**Şekil 47. FISH tekniğinde uygulanan basamaklar (3)**



**Şekil 48. İndirekt ve direkt işaretleme**

a) FISH için hazırlanan DNA problarının farklı amaçları vardır. Hazırlanan probler hibridizasyonda iki farklı şekilde bağlanırlar. Bunlar direkt işaretleme ve indirekt işaretleme şeklinde ayrılırlar.

b) İndirekt işaretleme için, prob haptten içeren modifiye nükleotidlerle oluşturulurken direkt işaretlemede ise hazırlanan prob florokromun direkt bağlandığı nükleotidlerle oluşturulur. Direkt işaretleme yöntemi daha kısa sürede tamamlanmasına karşın floresan sinyalin kalıcılığı indirekt işaretlemeyle nazaran çok daha kısadır.

c) İşaretili prob ve hedef DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir.

d) Komplementer dizileri ile hibridize olmak üzere probun lam üzerindeki hücre DNA ile birleşir.

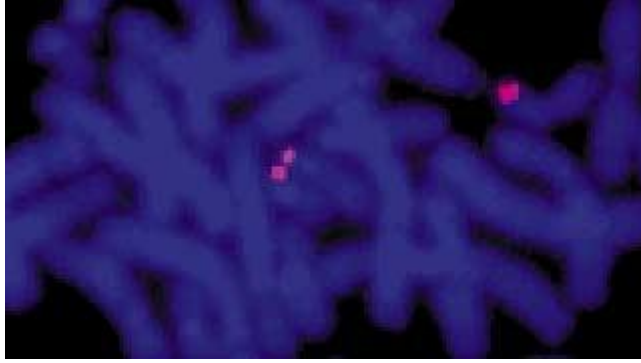
e) Eğer prob indirekt işaretili ise görüntüleme için fazladan bir uygulama daha yapılmalıdır. Floresan işaretleyicileri taşıyan ve hapttenler tarafından yakalanacak olan antikörlerin ortama konulması gerekir (148).

FISH tekniğinde kullanılan proplar ve özellikleri:

Prob; örneklerde aranan genetik materyale (DNA veya RNA) komplementer, radyoaktif veya nonradyoaktif (günümüzde floresan) madde ile işaretli DNA veya RNA segmentidir.

FISH tekniği ile tanıda kullanılan başlıca proplar şunlardır; (149).

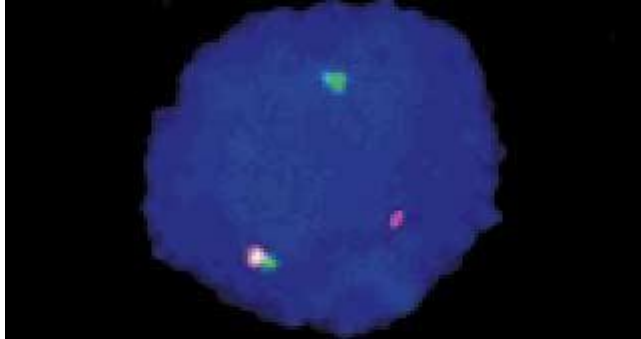
1. Lokusa spesifik proplar



**Şekil 49. p 53 mutasyonu (spektrum orange) (Kaynak 150)**

2. Translokasyon probları

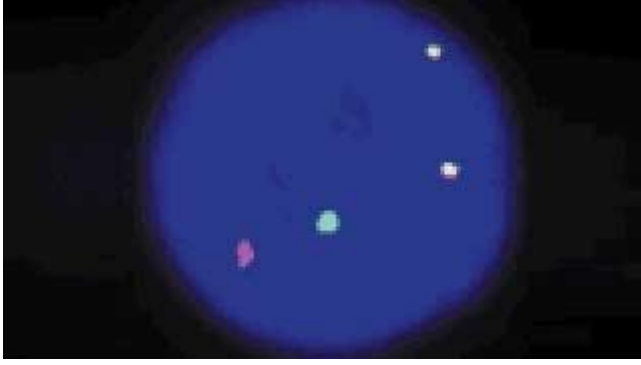
- Tek füzyon (single fusion)



**Şekil 50. t(9:22) tek füzyon translokasyonu (Kaynak 151)**



- Çift füzyon (dual fusion)



Şekil 51. t(8:21) Çift füzyon translokasyon (Kaynak 152)

- Tek füzyon ekstra sinyal (extra signal)



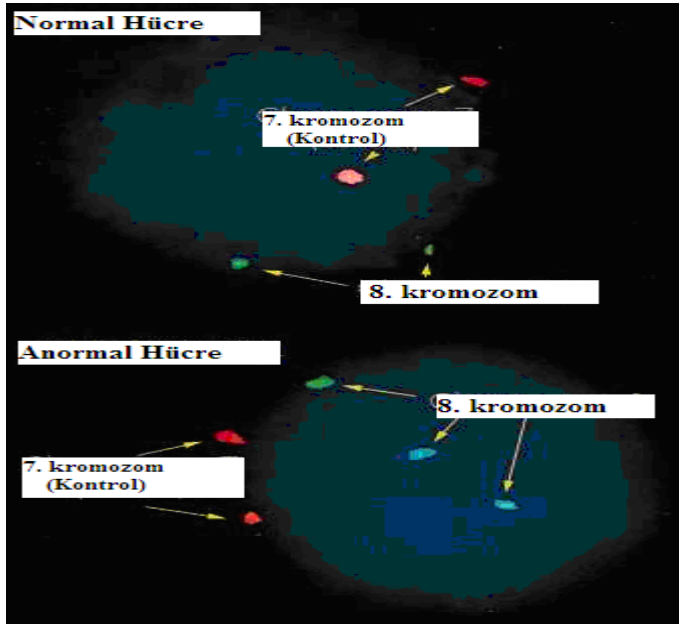
Şekil 52. t(9:22) Tek füzyon ekstra sinyal translokasyon (Kaynak 153)

3. Kırık noktası yeniden düzenlenme (break apart rearrangement) problemleri



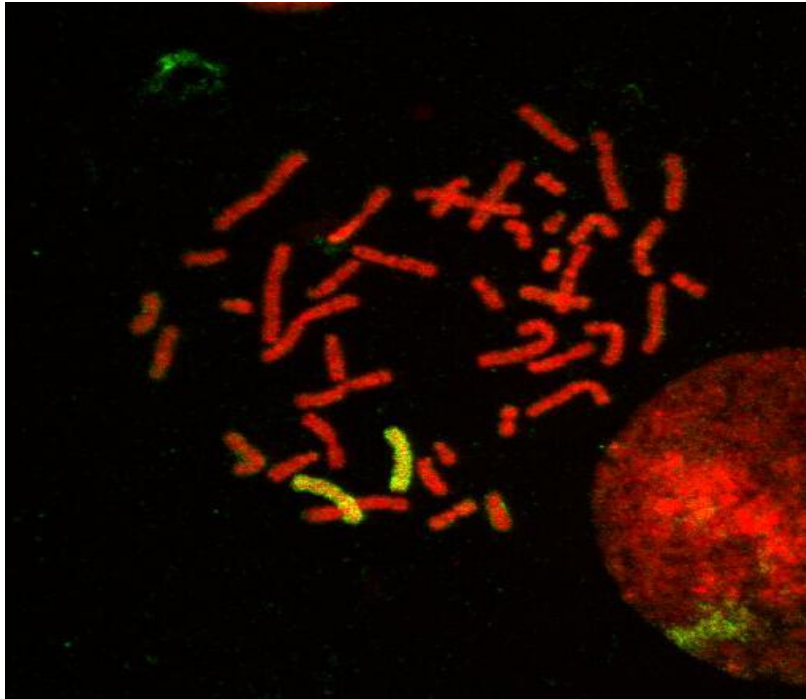
Şekil 53. Kırık noktası yeniden düzenlenme (Kaynak 154)

4.  $\alpha$ -satellit problemleri



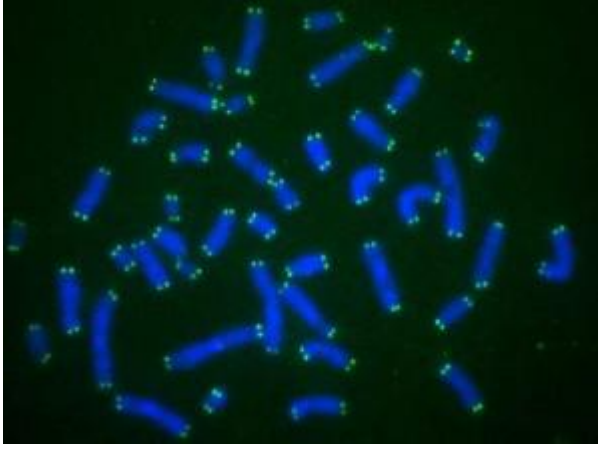
Şekil 54.  $\alpha$  satellit bölge (Kaynak 155)

5. Tüm kromozom problemleri



Şekil 55. Tüm kromozom boyama (Kaynak 156)

## 6. Telomer problemleri



**Şekil 56. Telomer bölge işaretleme (Kaynak 157)**

Klinikte kullanımı: Kromozomlarda meydana gelen yapısal ve sayısal anomalilerin belirlenmesinde kullanılır. Sayısal anomaliler bazı sendromlara sebep olmaktadır. Yapısal kromozomal anomaliler ise pek çok kanser türünün etyolojisinde önemli rol oynamaktadır.

Lokusa spesifik problemler ile istenilen kromozom bölgesi tespit edilebilir. En yaygın kullanıldığı tanısal alan, delesyon gibi kromozomlarda yapısal değişikliklere yol açarak gen fonksiyonlarını etkileyen aberasyonların tespitidir. Bu değişikliklerin tespiti özellikle bazı kanser türleri için tanısal olarak çok değerlidir. En önemli avantajı İnterfaz hücrelerinde de kullanılabilmesidir.

Tekrarlayan dizi problemleri (satellit problemleri); kromozomların sentromerlerinde yer alan  $\alpha$  satellit dizileri gibi özel dizilerin işaretlenmesinde kullanılır. Metafaz kromozomlarında bu bölgeler incelenerek tüm kromozom kayıpları ya da disentrik oluşumlar tespit edilebilmektedir.

Tüm kromozomu boyayan problemler (library problemleri); metafaz plaklarında her kromozomun özgül olarak boyanmasını sağlarlar. Böylece incelenen kromozoma ait sayısal (örn; trizomi) ya da yapısal (örn; translokasyon) varlığı tespit edilebilir.

Telomer bölgesine özgü problemler; metafaz kromozomlarında sadece telomer bölgelerini işaretleyerek bu bölgelerde meydana gelen yapısal değişiklikler tespit edilebilmektedir.

Translokasyon problemleri; hem interfaz hemde metafaz hücrelerinde kromozomlar arası parçaların yer değişimlerinin tespiti için kullanılır. Bu yer değiştirmeler özellikle hematolojik kanserlerde tanısal değeri çok yüksek olan bulgulardır.

Kırık noktası düzenleme problemleri; 11q23 bölgesinde meydana gelen delesiyon en sık rastlanılan mutasyondur. Sadece kırık noktası düzenleme probu ile bu bölge işaretlenerek anomali olup olmadığı saptanabilir.

FISH protokolü:

t(15,17) PML/RAR  $\alpha$  (Cytocell)

RAR kromozom 15. kromozomun PML bölgesi ile 17. kromozomun RAR  $\alpha$  bölgesinin translokasyonu incelenir. AML-M3 için tanı koydurucudur. Normal bir hücrede iki kırmızı iki sarı sinyal görülür. Resiprokal translokasyon varsa 2 sarı sinyal, tek taraflı translokasyon varsa 1 sarı, 1 kırmızı ve 1 yeşil sinyal görünür.

Dikkat edilmesi gerekenler:

1. DNA prob ve DAPI yüklenirken eldiven kullanılmalıdır (Prob içerisine formamid gibi teratojen ve karsinojen özelliği olan maddeler bulunmaktadır).
2. Sıcak su banyolarında yüksek sıcaklıkta bulunan materyal gerekirse ısı geçirmez bir malzeme ile transfer edilmelidir.
3. Problemlerin ışık ile temasından her aşamada kaçınılmalıdır (Çalışmalar loş bir ortamda yapılmalıdır).
4. Kitler son kullanma tarihine kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanabilir. Problemlerin ve DAPI'nin uzun süre oda ısısına maruz kalması önlenmelidir.

Gerekli materyal:

1. Sıcak su banyosu
2. Mikropipet 1-200  $\mu\text{l}$
3. Su banyosunun sıcaklığı  $72^{\circ}\text{C}$  sabitlenmeli kontrol edilmelidir
4. Plastik ya da bardak jar
5. Pens
6. Floresan ataçmanlı mikroskop
7. Masa üstü santrifüj

Solüsyon:

1. Fiksatif için 3:1 metanol: buzlu asetik asit
2. Etanol serileri %70, %85, %100
3. 2x SSC
4. 0.4xSSC (100 ml)+ Tween 20 (50 $\mu\text{l}$ )
5. 2xSSC (100 ml)+ Tween 20 (50 $\mu\text{l}$ )

## 6. %100 metanol

Slayt hazırlanması: Hücre kültürü yapılarak hazırlana hücre süspansiyonlar fiziksel ve kimyasal olarak temizlenmiş lamların üzerine damlatılarak (4-5 damla) yayılır ve lamlar kurutulur. Slaytların yaşlandırılmasına gerek yoktur. Faz-kontras mikroskopunda hücrelerin kalite ve sayı bakımından ön kontrolü yapılabilir. Uygun olan preparatlar boyaya alınabilir.

### 1.GÜN

Ön uygulama:

1. Slaytları oda sıcaklığında 2xSSC'de 2 dakika yıkanır
2. Etanol serisinde (%70,%85,%100) herbiri için en az 2 dakika bekletilir. Kurumasına izin verilir.

Pre-Denatürasyon (Prob hazırlanması):

3. problar -20°C'den çıkartılır ve oda ısınsa gelmesi sağlanır.
4. Solüsyonlar pipetle tekrar tekrar ve düzenli olarak karıştırılması sağlanmalıdır.
5. Sonraki aşama 10 mikrolitre prob mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir.
6. Slaytlardaki örneklere uygun problar hazırlanır ve 24x24 büyüteçle lameller ön ısınma olarak 37 derecede portatif ısıtıcıda 10 dakika ısıtılır.
7. Hücre örneklerinin üzerine 10 mikrolitre prob karıştırılır ve lamel uygun şekilde ve dikkatlice kapatılır. Belirlenen lastik solüsyon yapıştırıcısı ile tamamının kurumasına izin verilir. Çünkü tampon solüsyon ve prob beraber bu nedenle pipetaj yapılmalıdır.

Denatürasyon:

8. Denatüre edilen örnekler ve prob aynı zamanda portatif ısıtıcıda 75°C 2 dakika ısıtılmalıdır.

Hibridizasyon:

9. (Üzerine prob uygulanmış örnekler) Nemli ışık geçirmez bir kaba yerleştirilen problar 37°C'de bir gece bekletilmelidir.

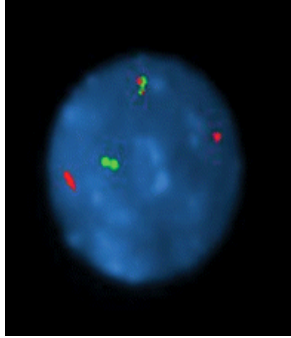
### 2.GÜN

Hibridizasyon sonrası yıkama:

10. Tüm yapıştırıcıyı ve lameli dikkatlice uzaklaştırılmalıdır.
11. Yıkanan slaytlar 0,4xSSC içinde 72°C 2 dakika bekletilmelidir.
12. 2xSSC'de yıkanan ve suyu çekilen slaytlar, %0.05'lik tween-20 (ph:7) ve 2xSSC'de yıkanır oda sıcaklığında 30 saniye bekletilmelidir.

13. Slaytların suyu çekilir (distile su ve alkol serilerinde geçirerek olabilir) ve 10 mikrolitre DAPI ile hücrelerin solması engellenebilir.
14. Lamel ile kapatılır ve boyananların karanlıkta 10 dakika banyo edilmeye bırakılır
15. Floresan mikroskopta bakılır

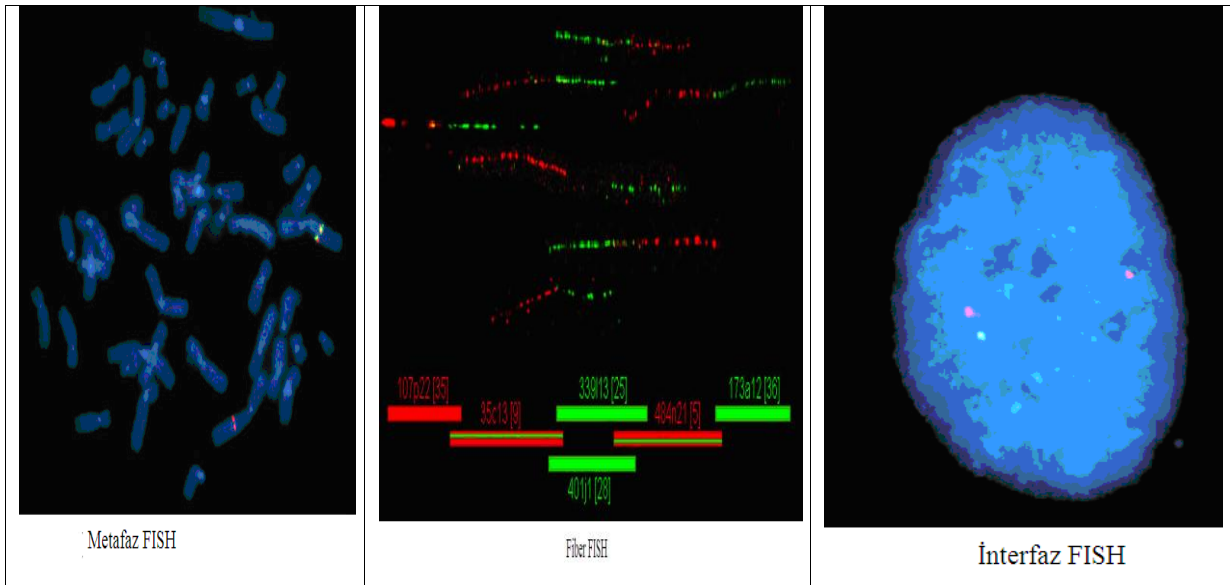
Not: Slaytlar -20 kaldırılır ve istenildiği zaman floresan mikroskopta incelenir (158).



Şekil 57. t(15,17) PML/RAR  $\alpha$  (Kaynak 159)

## 2) Fiber FISH:

Standart FISH tekniğinden daha farklıdır. İnterfaz kromatin lifleri kullanılarak DNA fragmentlerinin floresan boya ile işaretlenerek daha yüksek rezolüsyonlu haritalama gerçekleştirilir. İnterfaz evresinde kromozomlar daha az kondanse oldukları için yoğunlukları metafaz evresinden daha düşüktür. İnterfaz durumunda birkaç yüz kb uzaklıkta olan belirleyiciler farklı renkteki boya ile işaretlendiklerinde birbirlerine göre sıralarını belirlemek mümkün olmaktadır (160).



Şekil 58: Fiber FISH'in Metafaz FISH ve İnterfaz FISH'ten farklı gösterimi (161)

Metafaz FISH çalışmaları yaklaşık olarak 2Mbp'lik kromozom bantlarını ayırmak için uygundur.

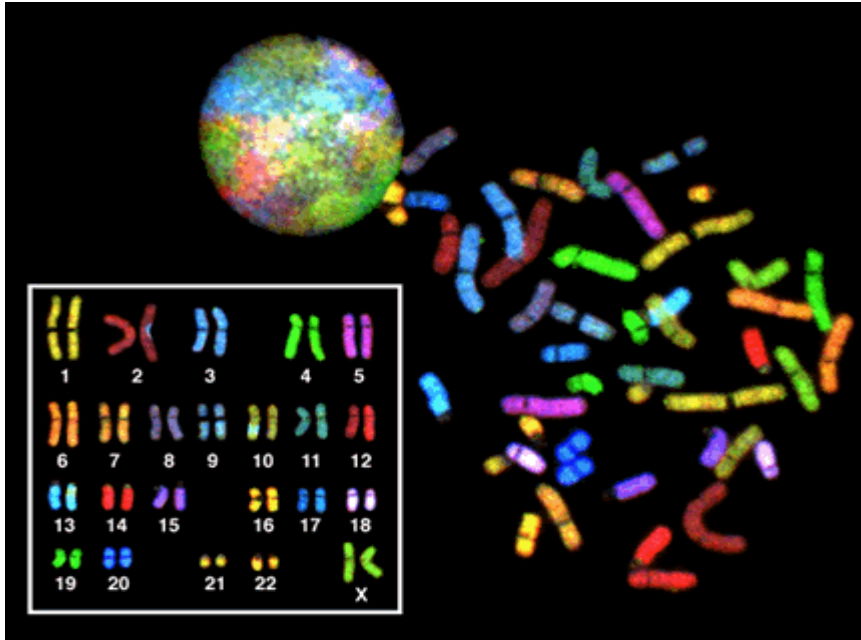
İnterfaz FISH'te ise bu değer aralığı 100 Kbp - 2 Mbp arası değişmektedir.

Son olarak Fiber FISH için ayırım gücü 10 Kbp - 500 Kbp'dir. Böylece Metafaz FISH ya da İnterfaz FISH teknikleri ile alamadığımız ayrıntılı sonuca Fiber FISH tekniği ile ulaşabiliriz.

Klinikte kullanımı: Fiber FISH tekniği genetik hastalıkların tanımlanmasında son derece yararlı olmuştur. Çünkü bu teknik bir hastalıkla ilgili genin çevresindeki farklı genlerin sırası ve aralarındaki uzaklıklar hakkında detaylı bilgi verebilmektedir.

### 3) Multicolor-FISH:

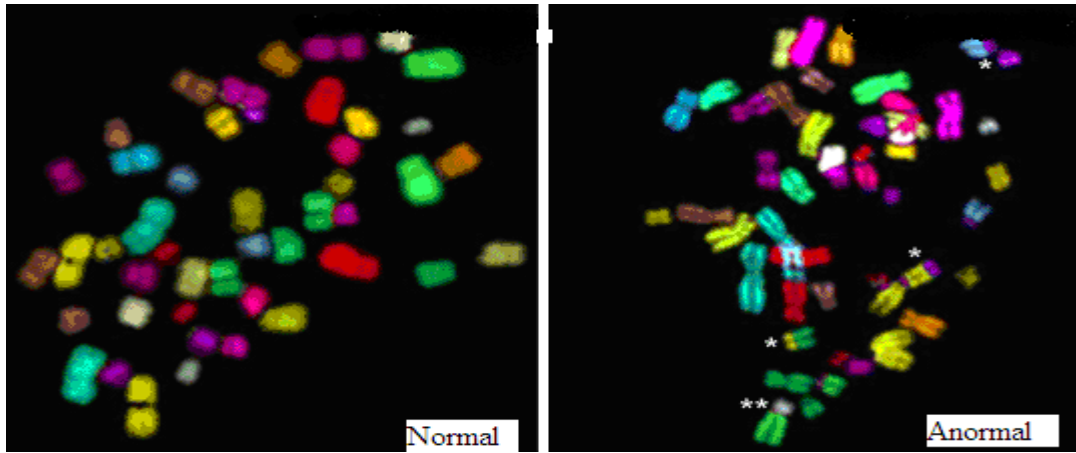
a) Spektral karyotipleme (SKY): Tekniğin esası beş farklı renkte florokrom boya kullanılarak 24 kromozomun eş zamanlı olarak farklı renklerde boyanması ve tek tip bir floresans mikroskoptan analizine dayanmaktadır. Aynı anda bir metafaz plağı üzerinde yer alan tüm kromozomların farklı renkte görüntülenmesine ve birbirinden ayrılmasına imkan verir. Her bir kromozom kendine ait farklı bir floresansta izlenir (162).



Şekil 59. SKY FISH Tekniği (163)

Klinikte kullanımı: Bu teknik ile 1.5 Mb'nın (1 Mb: 10000 bp) altındaki parça değişimleri saptanabilir. Klasik bantlama tekniklerinden üstünlüğü çok küçük boyutlardaki anomalilerin daha kolay tanımlanabilmesine olanak vermesidir (162).

b) Multiplex FISH (M-FISH): SKY FISH'te olduğu gibi 5 farklı florokromun çeşitli kombinasyonları ile hazırlanmış problemlerin hibridizasyonuna ve farklı floresan sinyallerin analizine dayanan bir tekniktir. Beş farklı florokromdan yansıyan floresan ışığın bilgisayarda üst üste çakıştırılarak değerlendirilmesi esasına dayanır (161,162).

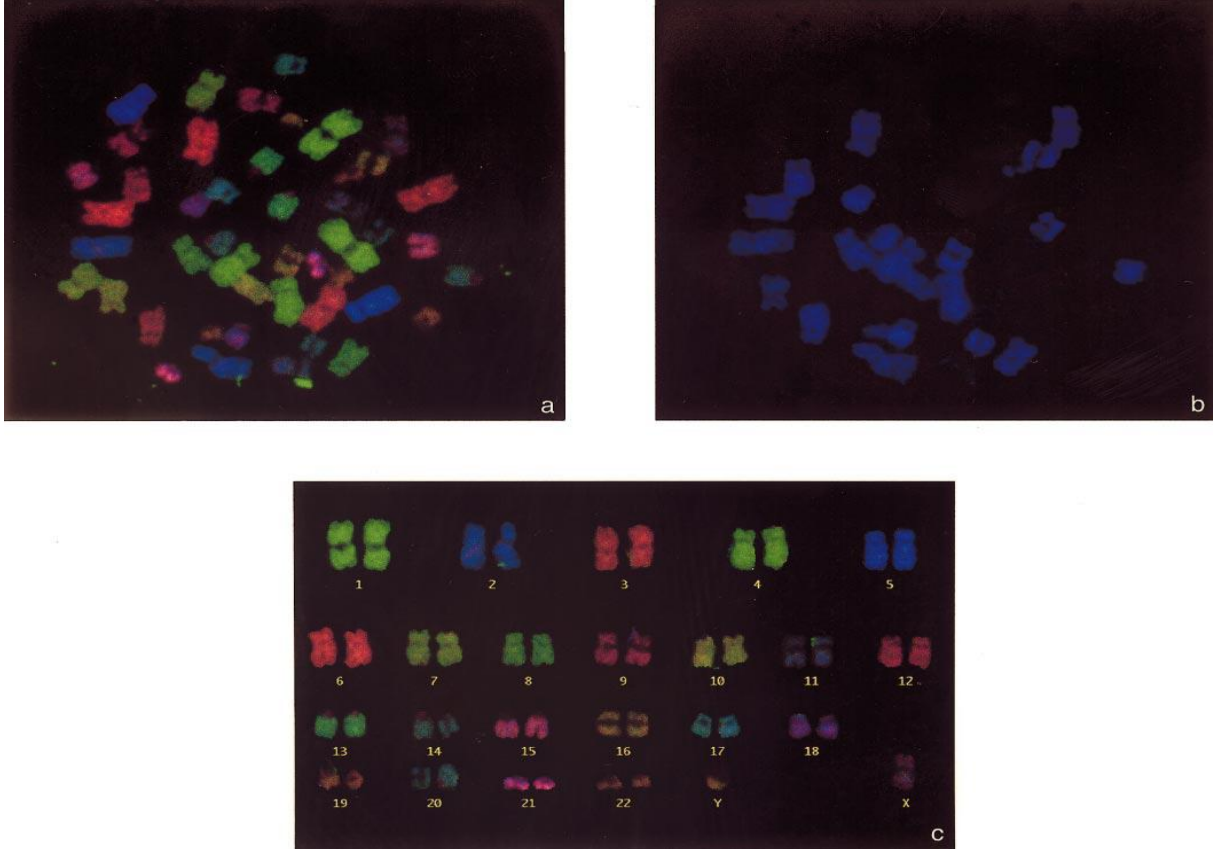


Şekil 60. Multipleks FISH Tekniği (164)

Klinikte kullanımı: Bu tekniğin sadece sentromer bölgesine özgü veya sadece telomer bölgesine özgü uygulanan tetkikleri de mevcuttur (speicher karyotipleme). Tüm kromozom kayıplarının belirlenmesinde tercih edilebilir.

c) Cobra-FISH (Combined binary ratio FISH): Bu teknikte diğer FISH yöntemlerinde farklı olarak 4 florokrom kullanılmaktadır. 24 kromozom iki ayrı gruba 12'şerli olarak incelenir. Birinci grup 3 farklı florokromla incelenirken diğer gruba 4. bir florokrom ilave edilir. Florokrom sayısının çok fazla önemi yoktur 5 tane de kullanılabilir.





**Şekil 61. Cobra FISH Tekniği**

**A) 12 farklı renk ile boyanan Metafaz hücreleri**

**B) diethylaminocoumarin (DEAC)**

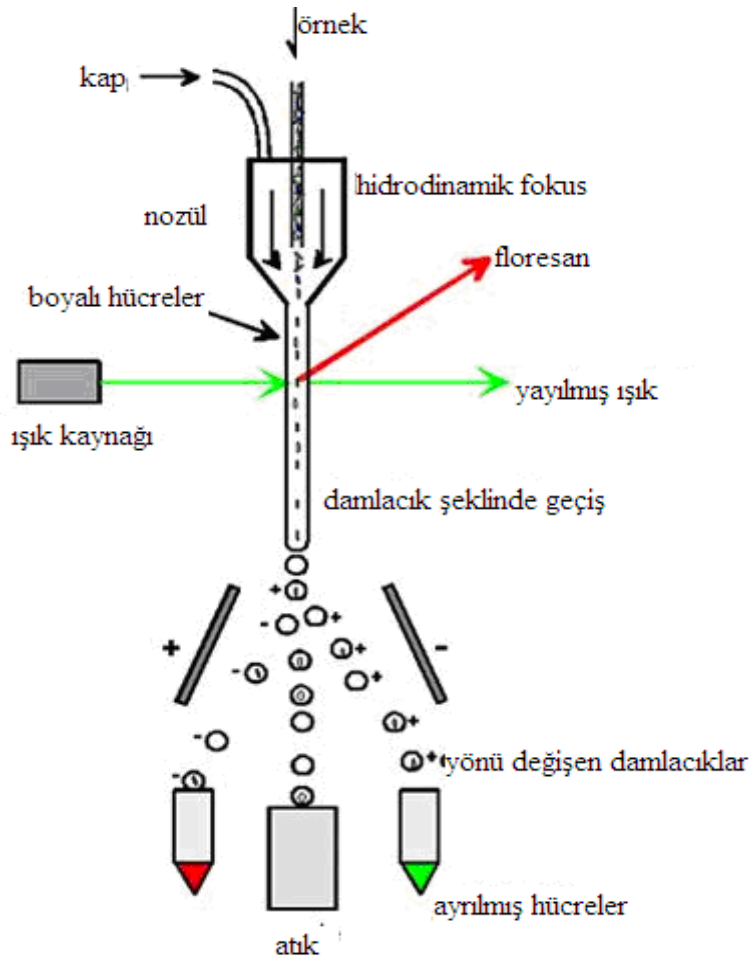
**C) a ve b'deki kromozomların karyogramda otomatik sıralanmış şekli (165)**

Klinikte kullanımı: Bu teknik genellikle kromozom kollarına özgü boyama sağladığı için tercih edilir (165,166).

**4) Akım karyotipleme (Flow karyotipleme):** Flow sitometri temel olarak 5 bölümden oluşmaktadır. Bunlar; akış sistemi, lazer kaynağı, filtreler, bilgisayar, ayırma mekanizması bileşenleridir. Tekniğin temeli hücrelerin bir sıvıyı içinden teker teker geçmesine ve hücreler hakkındaki verilerin istatistiksel olarak bilgisayar ekranına yansımaya dayanır (167). Analiz hücre süspansiyonunun hazırlanması, hücrelere monoklonal antikorların bağlanması, cihazın kalibrasyon ve kontrolü ardından örneklerin cihaza yüklenmesi ve analizin yapılması verilerin eldesi ve en son olarak yorumlanması ile son bulur. Hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla çeşitli, materyal kullanılabilir örneğin; kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, asit sıvısı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürü örnekleri

kullanılabilir. Bu teknik her hücre için ayrı ayrı ölçüm yapmamızı sağlar. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen veriler bir havuz içinde toplanarak araştırmacıya ortalama bir değerin sonucu aktarılmaktadır (168). Flow sitometri ile metafaz kromozomlarının analizi için iki lazerli floresan aktive edici hücre sayacı kullanılır. Her biri farklı dalga boylarında ışık dalgası göndererek kullanılan boyadan floresan ışımaya sağlarlar. DNA florokromları Hoechst 33258 AT zengin bölgelere bağlanırken, Chromomisin A3 ise GC zengin bölgelere bağlanmaktadır.

Örneğin 21. kromozoma ait trizomi araştırılan vakalarda 21. kromozom artış oranı grafik üzerinde %50'nin üzerinde olduğunda tanı konmasına izin verilebilir. Translokasyonlarda meydana gelen değişim eş düzeyde ise kromozom içeriği aynı oranda kalacağından değişim fark edilemeyebilir (169).



**Şekil 62. Flow sitometri genel çalışma prensibi. Örnek cihaza konur, boyalı hücreler borudan tek tek akarak lazer ışımından geçirilir ve hücreler ışık saçılımı ile floresan veriri ve yüklerine göre ayrılırlar (170)**

Klinikte kullanımı: Hücre tiplendirme, apoptoz gibi çalışmalarda tercih edilmektedir (171,172). Örneğin; AIDS hastalarının kanında CD4 lenfosit seviyesinin izlenmesinde kullanılmaktadır (173).

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik laboratuvarlarında kullanılan moleküler genetik ve sitogenetik teknikleri tanıtmak, klinikte kullanım alanları ile sınırları hakkında bilgi vermektir.

Çalışmanın ilk bölümünde öncelikle incelenecek genetik materyal olan deoksiribonükleik asit ve ribonükleik asit'in yapısı hakkında temel bilgiler verilmiş, deoksiribonükleik asit ve ribonükleik asit'in elde edilmesi için kullanılan yöntemlerin prensiplerinden bahsedilmiştir. Ardından deoksiribonükleik asit ve ribonükleik asit'in yapısal ve sayısal olarak incelenmesi için kullanılan moleküler teknikler, gereken temel bilgiler de verildikten sonra çeşitli protokollerle desteklenerek anlatılmış ve klinikte kullanım alanlarına örnekler verilmiştir. Ayrıca laboratuvar ortamında genetik bir çalışmaya başlamadan önce yapılması gereken işlemlere, kullanılan araç, gereç ve cihazların çalışma prensiplerine, çeşitli kaza ve öncül korunmayla ilgili alınması gereken önlemlere de değinilmiştir.

İkinci bölümde ise, incelenecek materyal olan metafaz kromozomlarının ve interfazdaki hücre çekirdeklerinin elde edilmesi için kullanılan hücre kültür yöntemleri hakkında temel bilgi verilmiştir. Metafaz kromozomlarının incelenmesini sağlayan konvansiyonel sitogenetik ve interfazda inceleme yapmaya olanak sağlayan moleküler sitogenetik teknikler protokollerle desteklenerek anlatılmıştır. Bu teknikler ile ilgili laboratuvar şartları, malzeme bilgisi ve her tekniğin kullanım amacı ve sınırları ayrıca örneklerle anlatılmıştır.

Her iki bölümde de tekniklerin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi sırasında ortaya çıkabilecek olası problemler için çözüm yolları alternatifli olarak verilmiştir.

Çalışmanın moleküler genetik ve sitogenetik laboratuvarlarında kullanılacak teknik bir rehber olması hedeflenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Moleküler genetik, sitogenetik, laboratuvar teknikleri

# **CYTOGENETIC AND MOLECULAR TECHNIQUES IN CLINICAL APPLICATIONS**

## **SUMMARY**

The aim of this study is, to introduce techniques of molecular genetics and cytogenetics that are used in medical biology and genetics laboratories and to give information about usage areas in clinical application and limitations.

In the first part of this study, it is given basic information about the structures of genetic materials deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid which will be investigated with principles of methods that used for extracting deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid. After giving basic information about molecular techniques that are utilized for structural and quantitative analysis of deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid, the given information was supported with various protocols and many examples for clinical applications were stated. Moreover, at first part of this study, topics such as "actions that needs to be taken before starting a genetics study", "working principles of devices and equipments", "preventive actions for possible accidents" were mentioned.

The second part of this study, it is given many information about tissue culture methods that are using for obtaining of metaphase chromosomes and interphase cells' nuclei. Conventional cytogenetic techniques that are utilized for of metaphase chromosomes and molecular cytogenetic techniques that are utilized for investigation at interphase nuclei, were explained by supporting with protocols. Additionally, laboratory conditions for each

technique, material information and usage purpose and limitations of each technique were explained with related examples.

In order to overcome possible problems that can occur during applications of these techniques that were mentioned at both first and second part, solutions were explained with alternatives for each possible problem.

It is aimed that this study will be a technical guide for molecular genetics and cytogenetics laboratories.

**Key words:** Molecular genetic, cytogenetic, laboratory techniques

## KAYNAKLAR

1. Ginzirger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002;30(6):503-12.
2. Puszyk WM, Crea F, Old RW. Noninvasive prenatal diagnosis of aneuploidy using cell-free nucleic acids in maternal blood: promises and unanswered questions. *Prenat Diagn.* 2008;28(1):1-6.
3. Başaran N. Teorik ve Pratik Floresan In Situ Hibridizasyon (Başaran N, ed. Artan, S. Acar) ETAM, Eskiřehir, 1996.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (Çeviri: Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M.). DNA ve kromozomlar. Hücrenin moleküler biyolojisinde. Ankara: Tüba Yayınları; 2008:191-197.
5. Khosravinia H, Ramesha KP. Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology* 2007;6(3):184-187.
6. Duvigneau JC, Sipos W, Hartl RT, Bayer M, Moldzio R, Stevenson L, Adair B, Gemeiner M. Heparin and EDTA as anticoagulant differentially affect cytokine mRNA level of cultured porcine blood cells. *Journal of Immunological Methods* 2007;324:38-47.
7. Newton CR. PCR essential data. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 1995:35-49.
8. Yıldırım A, Bardakçı F, Karatař M, Tanyolaç B. Moleküler Biyoloji. 2007;1:470.



9. Park D. Nucleic acids. Hilario E, Mackay J (Eds.). In; Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes. second edition. Totowa: Humana Press Inc; 2007. p.3-15.
10. Sarıkaya AT. DNA'nın izolasyonu ve analizi. Temizkan G, Arda N (Editörler). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler'de. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004. p.54-70.
11. Birben E. Periferik kandan DNA izolasyonu. Astım ve Alerji İmmünolojisi 2008; 6(2):111-112.
12. Aslan G, Emektaş G, Ülger M, Tezcan S, Kaya A, Doğu O, Kuyucu N. Tüberküloz meninjit tanısında Polimeraz zincir reaksiyonun kullanılması. Türk Mikrobiyoloji Cem. Derg. 2007;37(4):204-208.
13. Omega Bio-Tek. (USA). Eazy nukleic acid isolation. Doraville: The institute; 2009.
14. Yıldırım A, Turhan H, Yanmaz V, Bakan E. EDTA'lı Tam Kan Örneklerinden Otomatik DNA İzolasyonu: Manuel DNA İzolasyonu ile Karşılaştırma. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2008;3:32-38.
15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (Çeviri: Buyru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M.). Hücre genomu nasıl okur: DNA'dan proteine. Hücrenin moleküler biyolojisinde. Ankara: Tüba Yayınları; 2008:299-305.
16. Splittstoesser DF, Wilkison M. Some factors affecting the activity of diethylpyrocarbonate as a sterilant. Micuomology 1973:853-857.
17. Editorial: Centrifuges and rotors. Current Protocols in Protein Science John Wiley & Sons, Inc: 1995;1-5.
18. Editorial: Techniques in plant virology cip: Basic principles in centrifugation. International potato center 1999;5(3):1-8.
19. Tenser RB. Ultracentrifugal inoculation of herpessimplex virus. Infect Immun. 1978;21:281-285.
20. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques 2008;44:619-626.
21. Klug WS, Cummings MR, Spencer C. DNA'nın yapısı ve analizi. Öner C (Editör). Genetik kavramlarda. Ankara: Palme Yayıncılık; 2009:241-257.
22. Devrim AK, Kaya N. Polimeraz zincir reaksiyonu. Kafkas Üni. Vet. Fak. Derg. 2004;10(2):209-214.

23. Laboratuvar Yöntemler Araçlar Kimyasallar Uygulamalar Biyoinformatik İletişim  
[www.genetiklab.com/altsayfa.php](http://www.genetiklab.com/altsayfa.php) 27.05.2010
24. Sambrook J, Russell DW. In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction. Sambrook J, Russell DW (Eds.). In molecular cloning: a laboratory manual, third edition. New York: Cold spring harbor laboratory pres; 2001;2:18-90.
25. Baret J. Atomic structure and periodicity. The royal society of chemistry. Bristol 2002:128-130.
26. Talor GR, Logan WP. The polymerase chain reaction: new variations on an old theme. Curr Opin Biotechnol. 1995;6:24-9.
27. Lynch JR, Brown JM. The polymerase chain reaction: current and future clinical applications. Med. Genet. 1990;27:2-7.
28. Sequences blog [www.genotyping.wordpress.com/.../](http://www.genotyping.wordpress.com/.../) 27.05.2010
29. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Developmental Biology 2005; 278(2):274-288.
30. Sanghvi YS. A roadmap to the assembly of synthetic DNA from raw materials. Garfinkel MS, Endy D, Epstein GL, Friedman RM (Editors). In: working papers for synthetic genomics. Risks and Benefits for Science and Society. California: Rasayan inc.; 2007.p.17-33.
31. Bansal M, Sasisekharan V. Molecular model-building of DNA: Constraints and restraints. In Theoretical Chemistry of Biological Systems 1986;2:127-218.
32. Bansal M. DNA structure: revisiting the watson–crick double helix. Institute of bioinformatics and applied biotechnology 2003;85(11):1556-63.
33. Breslauer KJ, Franks R, Lockers H, Markyt LA. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Biochemistry 1986;83:3746-50.
34. Rich A, Watson JD. Some relations between DNA and RNA. California institute of technology 1954;759-64.
35. Keha EE, Küfrevioğlu Öİ. Nükleotid ve nükleik asitlerin yapıları. Biyokimya'da. Erzurum: Aktif yayınevi, 2004:199-211.
36. Microbiological Visual Media (Pictures of microbiology)  
<http://dna.microbiologyguide.com/s/10002/pics/phosphodiesterbond.png> 27.07.2010

37. Gözükara EM. Nükleik asitler ve DNA RNA yapısı. Biyokimya'da. Ankara: Ofset pepianet ltd.şti, 1990:279-312.
38. A Repository for Data from NMR Spectroscopy on Proteins, Peptides, Nucleic Acids, and other Biomolecules [www.bmrb.wisc.edu/.../molName=adenine](http://www.bmrb.wisc.edu/.../molName=adenine) 27.05.2010
39. Wikipedia, the free encyclopedia. Guanine chemical. [www.wikipedia.org/wiki/Dosya:Guanine\\_chemical\\_...](http://www.wikipedia.org/wiki/Dosya:Guanine_chemical_...) 27.05.2010
40. Chemical Structures Starting with the Letter T. <http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---T/Thymine.-LZ5.htm> 27.05.2010
41. Wikipedia, the free encyclopedia. Nükleotidi. <http://sq.wikipedia.org/wiki/Nukleotidi> 27.05.2010
42. Transcription. [www.phschool.com/.../transcription/phosbd.html](http://www.phschool.com/.../transcription/phosbd.html) 27.05.2010
43. Hantz E, Larue V, Ladam P, Moyec LL, Gouyette C, Dinh TH. Solution conformation of an RNA–DNA hybrid duplex containing a pyrimidine RNA strand and a purine DNA strand. *International Journal of Biological Macromolecules* 2001;28:273-84.
44. Molecular biology and nükleik acids DNA'a B form A form and Z form. [www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3B3.htm](http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch3B3.htm) 27.05.2010
45. Double heliks model [www.bb100.com/blife/2005/4475.htm](http://www.bb100.com/blife/2005/4475.htm) 27.05.2010
46. Dickerson RE, Drew HR. Kinematic model for B-DNA. *Proc natl acad sci* 1981;78(12):7318–22.
47. Başaran N. Tıbbi genetik. Genetik materyalin yapısı. Bursa: Bilim teknik yayınları; 1999:5-37.
48. Başaran A. Nükleus. *Tıbbi biyolojide. Güneş-nobel tıp kitapevi*, 2005:99-109.
49. General Notes on Primer Design in PCR (Makale) [http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view\\_cache.cgi?ID=734](http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=734) 27.05.2010
50. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length thermus aquatlcus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome research* 1993;2:275-87.

51. Ferraro P, Franzolin E, Pontarin G, Reichard P, Bianchi V. Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Research* 2009;10:1-7
52. Newton CR. PCR essential data. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 1995:75-81.
53. Product Directory Home (Laboratuvar kimyasalları üretim ve pazarlama şirketi)  
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html> 27.05.2010
54. Aslanzadeh J. Preventing PCR Amplification Carryover Contamination a Clinical Laboratory. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 2004;34:389-396
55. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics 2. Chapter 6; PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis.* Oxford. Garland Science: 1999.
56. Williams DR, Rapley R. Agarose gel electrophoresis of nucleic acids. In; Rapley R (Ed). *The nucleic acid protocols.* Humana press: Totowa 2000; p.67-70.
57. Robertson J, Ross AM, Burgoyne LA. *DNA in forensic science: theory, techniques, and applications.* Chichester: Ellis Horwood Limited, 2002:1;98
58. SFY Li. Capillary electrophoresis principles, practice and applications. *J Chrom* 1993;52:1-30.
59. Altshuler ML. PCR troubleshooting the essential guide. Agarose gel electroforesis Mecknikov Institute of Vaccine and Sera Department of Microbiology Moscow Caister Academic Pres 2006:57-58.
60. Aşıcıoğlu F, Koluçak ST, Çetinkaya Ü, Akyüz F. Kapiller Elektroforez Teknolojisinin Klinik ve Adli Amaçlı DNA Analizlerinde Kullanımı: Geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma. *Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Biyoloji İhtisas Dairesi, İstanbul. Adli Tıp Derg.*, 2002;2(16);88-93.
61. Harwood AJ. *Basic DNA and RNA protocols. chapter 13: Native polyacrylamide gel electrophoresis* Humana press. Totowa 1996;58:93-97
62. Western blotting yöntemi [www.norbil.hacettepe.edu.tr/west\\_ornek.shtml](http://www.norbil.hacettepe.edu.tr/west_ornek.shtml) 27.05.2010
63. Bonasera V, Alberti S, Sacchetti A. Protocol for high-sensitivity/long linear-range spectrofluorimetric DNA quantification using ethidium bromide. *BioTechniques* 2007;43:173-176.
64. Hames BD. *Gel elektroforesis of proteins.* 3.baskı. Newyork 1998;1:57.

65. How Ethidium bromide acts on ssDNA and dsDNA? [www.madsci.org/](http://www.madsci.org/).. 27.05.2010
66. Biochemical genetics 2, Tools for detection genetic variation [www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b241/biochemical\\_2.html](http://www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b241/biochemical_2.html) 27.05.2010
67. Arda M. Biyoteknolojinin Önemi, Kısa Tarihçesi, Restriksiyon Endonukleazlar ve RNA'dan cDNA Elde Edilmesi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Temel Mikrobiyoloji 2009:1-10.
68. Kieleczava J. DNA sequencing optimizing the process and analysis. Mississauga. Jones and Bartlett Publishers 2005:123-130.
69. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 2001;29:1-17.
70. Abrahao JS and at all. Nested-multiplex PCR detection of Orthopoxvirus and Parapoxvirus directly from exanthematic clinical samples. *Virology journal* 2009;6:140-145.
71. Apte A, Daniel S. PCR Primer design. In: Dieffenbach CW, Diveksler GS (Eds.). *PCR Primer a laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.p.65-68.
72. Olmos A, Esteban O, Bertolini E, Cambra M. Nested RT-PCR in a single closed tube. Bartlett JMS, Stirling D. (Eds.) *Methods in molecular biology PCR protocols*. Second edition. Totowa: Humana Pres Inc.; 2003.p.151-155
73. Institute for Viral Pathogenesis, Detection of HHV-6, EBV and HTLV-2 Genomic DNAs by Nested PCR [www.ivpresearch.org/nested\\_pcr.htm](http://www.ivpresearch.org/nested_pcr.htm) 27.05.2010
74. Poddar SK, Sawyer MH, Connor JD. Evaluation of PCR Assays in Presence of Antibody to Thermostable DNA Polymerases for Detection of Microbial Agents: Avoiding False Negative Results for Specimen Containing Low-Titer Agent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 1998;12:238–241.
75. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 1988;120:621-623.
76. Inverse PCR Background <http://www.pcrstation.com/inverse-pcr/> 27.05.2010
77. Nuova GJ. Co-labeling Using In Situ PCR: A Review. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2001;49(11):1329-1339.

78. Use of the MasterAmp™ PCR Optimization Kit in Multiplex PCR to Detect Dystrophin Gene Deletions Characteristic of Duchenne and Becker Muscular Dystrophies (Makale) [www.epibio.com/newsletter/f4\\_4/f4\\_4mp.asp](http://www.epibio.com/newsletter/f4_4/f4_4mp.asp) 27.05.2010
79. Adler M. Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. *Adv Clin Chem* 2005;39:239-92.
80. Niemeyer CM, Adler M, Wacker R. Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *TRENDS in Biotechnology* 2005;23(4):208-218.
81. Atienzar FA, Jha AN. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies. *Mutation research* 2006;613:76-102.
82. The University of Nottingham Population Biology of Fungi including Lichens. [www.nottingham.ac.uk/genetics/people/dyer/res...](http://www.nottingham.ac.uk/genetics/people/dyer/res...) 27.05.2010
83. Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research* 1997;25:2516-2521.
84. Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gündeş S, Özbek U, Vahaboğlu H. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology* 2003;52:403-408.
85. Waterfall CM, Cobb BD. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. *Nucleic acids research* 2001;29:1-8.
86. Kuşkucu MA. REAL Time PCR. I. Tıbbi biyolojik bilimler kongresinde: 2005-ocak-04; İstanbul, Türkiye. İstanbul,2005;6.
87. Fislage R, M. Berceanu M, Humboldt Y, Wendt M, Oberender H. Primer design for a prokaryotic differential display RT-PCR. *Nucleic acids research* 1997;2:1830–1835.
88. Oconnell J. Method in Molecular Biology RT PCR protocols. In: Oconnell J (Eds.). *RT-PCR biomedicine*. Humana Press Totowa 2002:193;1-18.
89. Tag CG, Gressner AM, Weiskirchen R. An unusual melting curve profile in LightCycler multiplex genotyping of the hemochromatosis H63D/C282Y gene mutations. *Clin Bioc* 2001;34;511-515.
90. Walker JM, Rapley R. In: *Molecular biology and biotechnology*. Fourth edition. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2000:57-64.

91. Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ. (Çeviri: Tekeli A, Ustaçelebi Ş.). Otomotize DNA dizi analizi. Alcorn TM, Anderson SM. (Editörler). Moleküler mikrobiyoloji tanı prensipleri ve uygulamalarında. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006:p.153-161.
92. Work TS, Burdon RH (Ed). DNA sequencing by the Maxam Gilbert chemical procedure. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier biomedical. Amsterdam 1983:p.230-275.
93. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 1977;74:2:560-564.
94. DNA baz sıralarının saptanması [www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10...](http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10...) 27.05.2010
95. Weaver RF, Hedrick PW. Genetics. Dubuque: WmC Brown Publishers, 2001:439-469.
96. Dideksinücleotid triphosphate [www.core.iddrc.org/molecular-genetics/?page\\_id=28](http://www.core.iddrc.org/molecular-genetics/?page_id=28) 27.05.2010
97. Sanger F. Determination of nukleotide sequences of DNA. Bioscience reports 2004;24:239-245.
98. Karaaslan Ç, Birben E, Saçkesen C. Laboratuvar teknikleri sekans tekniği. Astım Allerji İmmünoloji 2006;4(3):159-161.
99. ABI PRISM 3100- Avant Genetic Analyzer User Guide Applied Biosystems 2002.
100. Basmacı T. DNA dizi analizi problemler ve çözümleri. Genomed. Applied biosystems:1-10.
101. Rooney DE, Czepulkowski BH (Eds.). In: Human cytogenetics constitutional analysis, A Paractical Approach. 2nd Edition. New York: IRL Press at Oxford University Press; 1992.p.1-10.
102. Kılıç GL. Yapısal Kromozom Anomalilerinin Saptanmasında "High Resolution" Bantlama Yönteminin Rolü (tez). İstanbul: İst Üniv Tıp Fak; 1990.
103. Harper PS. The discovery of the human chromosome number in Lund. Human Genetic 2006;119:226-232.
104. Alp MN. Malignite ile Tek Gen Mutasyonları ve Kromozom Düzensizliklerinin İlişkisi Üzerine Araştırmalar (tez). Diyarbakır: Dicle Üniv Sağ. Bil. Enst.; 1983.

105. Uçar F. Cinsiyet Kromatini (Barr Cisimciği) Tayini ve Non-Fonksiyonel X-Kromozomlarının Klinik Tanıda Kullanılması ve Önemi (tez). Trabzon: KTÜ Tıp Fak; 1990.
106. Başaran A. Tibbi Biyoloji, Nükleus, Güneş-Nobel Tıp Kitapevi, 2005:99-109
107. Kromozom genel yapısı (Güncel bilimsel yayın)  
www.ncbi.nlm.nih.gov/.../chromosome.html 27.05.2010
108. Koç G. Spontan Düşük Vakalarında, Y koromozomunun Moleküler ve Sitogenetik İncelenmesi. İstanbul: Marmara Üni. Sağ. Bil. Enst.; 2009
109. Karaüzüm SB. Hematolojik malignansilerde sitogenetik. Akdeniz Üni. Tıp Fak.: Antalya. 1-2. <http://www.akdeniz.edu.tr/tip/genetik/cv/karauzum.htm>
110. Ovalı E, Uçar F. Hematolojide uygulamalı hücre teknikleri kurs kitabı. Trabzon, 2003;217:7-16.
111. Tanrıverdi N. Kardeş Kromatit Değişimi. Adana: Çukurova Üni. Sağ. Bil. Enst.; 1991
112. Halkman AK. Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Ankara. Başak matbaacılık, 2005:358.
113. Oktar N. K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin MTT (3-(4,5-dimethyliazole-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromide; thiazolyl blue) ile araştırılması (tez). Adana: Çukurova Üni. Sağlık Bil.Enst.; 2009.
114. Khalid G, Neumann H, Flemans RJ, Hayhoe FGJ. A comparative study of chromosome G-banding using trypsin, papain, and pretreatment with emulphogene, Journal of Clinical Pathology 1979;32:482-487.
115. Lüleci G, Başaran S, Bağcı G, Keser İ. Sitogenetik uygulama yöntemleri. Ankara: Meteksan, 1990:1-18.
116. Grace E, Bain AD. A simple method for chromosome banding. J Clin Pathol 1972;25:910-911.
117. Verma RS, Dosik H. Simultaneous G- and C- banding for human chromosomes. Journal of Medical Genetics 1980;17:72-76.
118. Popescu NC, Evans CH, DiPaolo JA. Chromosome patterns (G and C bands) of in Vitro chemical carcinogen-transformed guinea pig cells, Cancer Research 1976;36:1404-1413.



119. Davidson NR. Photographic techniques for recording chromosome banding patterns. *Journal of Medical Genetics* 1973;10:122-126.
120. Drets ME, Shaw MW. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1971;68(9):2073-2077.
121. Sfafter LG, Tommerup N (Eds.). In: *ISCN 2005 An international system for human cytogenetic nomenclature*. Karger; 2005.p.3-5.
122. Benn PA, Tantravahi U. Chromosome staining and banding techniques. Rooney DE (Ed.). In: *Human cytogenetics constitutional analysis*. Third edition. New York: Oxford university press; 2001.p.99-130.
123. Shaw MW. Uses of banding techniques for the identification of human diseases of cytogenetic origin. *Environmental Health Perspectives* 1973;151-156.
124. İdiogram [www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g...](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=g...) 27.05.2010
125. Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human cytogenetics*. New York: Oxford university press, 1992:91-117
126. Standard chromosome testing [www.subtelomeres.org/ClinicalDiagnosis\\_6.html](http://www.subtelomeres.org/ClinicalDiagnosis_6.html) 27.05.2010
127. Pala FS. Hematolojik kanserlerde FISH uygulamaları. *Trakya Üniv. Tıp Fak Derg.* 2005;22(3):132-136.
128. Verma RS, Babu A. *Human chromosomes: manual of basic techniques*. Chromosome Research 1996;4:80-81.
129. Chromosome banding techniques [www.currentprotocols.com/protocol/hg0402](http://www.currentprotocols.com/protocol/hg0402) 27.05.2010
130. Scientific elektronik library online [www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-4757199800](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-4757199800) 27.05.2010
131. Roberts Sendrome (Makale)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=rbs> 31.05.2010
132. Chromosome Analysis: Karyotyping, Banding and FISH [http://carolguze.com/text/442-4-chromosome\\_analysis.shtml](http://carolguze.com/text/442-4-chromosome_analysis.shtml) 31.05.2010

133. Heliot L, Mongelard F, Klein C, Donohue MF, Chassery JM, Nicoud MR, Usson Y. Nonrandom Distribution of Metaphase AgNOR Staining Patterns on Human Acrocentric Chromosomes. *The Journal of Histochemistry*, 2000;48(1):13–20.
134. Pathak S. Cytogenetic research techniques in humans and laboratory animals that can be applied most profitably to livestock. *J Dairy Sci* 1979;62:836-843.
135. Bloom Sendrome (Site anasayfası fotoğraflar)  
[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?index=430&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?index=430&lang=1) 31.05.2010
136. Vinca institute of nuclear sciences –micronucleic-  
<http://www.vin.bg.ac.rs/050/radiobiology.html>
137. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E; HUMAN Micronucleus project. "HUMAN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures."; *Mutat Res.*, 2003;534(1-2):65-75.
138. Demirel S, Zamani AG. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Derg* 2002;12(3):123-127.
139. Kara N. Frajil X sendromlu hastaların ve taşıyıcıların tanısında sitogenetik ve moleküler genetik yöntemlerin kullanılması (tez). Samsun: 19 Mayıs Üni. Sağ. Bil. Ens.; 1999.
140. Griffiths MJ, Strachan MC. A single lymphocyte culture for fragile X induction and prometaphase chromosome analysis. *Journal of Medical Genetics* 1991;28(12):837-839.
141. Fragile X Sendrome (Anasayfa genel tanım) [www.genetics.com.au/factsheet/fs42.asp](http://www.genetics.com.au/factsheet/fs42.asp)  
31.05.2010
142. Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the mammalian x-chromosome. *Am J Hum Genet* 1962;14(2):135-148.
143. Kaur S, Sambyal V, Sharma A, Kaur P. Buccal mucosal x-chromatin frequency in breast and cervix cancer. *Anthropologist* 2006;8(4):223-225.
144. Dixon AD, Torr JBD. Sex chromatin in oral smears. *British Medical Journal* 1956;2:792-799.
145. X kromatini (Anasayfa) <http://www.britannica.com/EBchecked/topic-art/650332/1690/The-Barr-or-sex-chromatin-body-is-an-inactive-X> 31.05.2010
146. Çankaya T, Gündüz C, Özkınay F, Çoğulu Ö, Sağol S, Özkınay C. İnterfaz hücrelerinde flüoresan in-situ hibridizasyon yöntemi ile anöploidi aranması. *Ege Tıp Dergisi* 2006;45(3):149-154.

147. How does FISH work? (Anasayfa)  
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Stonestreet/howitworks.htm> 31.05.2010
148. Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics* 2005;6:782-792.
149. Durak B, Aslan V, Başaran N, Gülbaş Z. t(8;21) in Saptanmasında FISH Yonteminin Konvansiyonel Sitogenetik Yöntemle Karşılaştırılması. Türk Hematoloji Derneği 29.Ulusal Kongresi 25-29 Ekim 2002, Kemer-Antalya. *Turkish Journal of Haematology* 2002;19(3) :121.
150. Vysis LSI p53 (17p13.1) SpectrumOrange Probe (Firma katalog)  
[http://www.abbottmolecular.com/LSIp5317p131SpectrumOrangeProbe\\_5185.aspx](http://www.abbottmolecular.com/LSIp5317p131SpectrumOrangeProbe_5185.aspx)  
31.05.2010
151. Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe (Firma katalog)  
[http://www.abbottmolecular.com/LSIBCRABLDualColorSingleFusionTranslocationProbe\\_5362.aspx](http://www.abbottmolecular.com/LSIBCRABLDualColorSingleFusionTranslocationProbe_5362.aspx) 31.05.2010
152. Vysis LSI AML1/ETO Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Firma katalog)  
[http://www.abbottmolecular.com/LSIAML1ETODualColorDualFusionTranslocationProbe\\_5342.aspx](http://www.abbottmolecular.com/LSIAML1ETODualColorDualFusionTranslocationProbe_5342.aspx) 31.05.2010
153. Vysis LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe (Firma katalog)  
[http://www.abbottmolecular.com/LSIBCRABLESDualColorTranslocationProbe\\_5370.aspx](http://www.abbottmolecular.com/LSIBCRABLESDualColorTranslocationProbe_5370.aspx) 31.05.2010
154. Vysis LSI (Anasayfa) [www.international.abbottmolecular.com/VysisFOXO1B...](http://www.international.abbottmolecular.com/VysisFOXO1B...)  
31.05.2010
155. FISH analysis and AML [www.meds.com/leukemia/guide/guide\\_chapter4.html](http://www.meds.com/leukemia/guide/guide_chapter4.html)  
31.05.2010
156. Human chromosome 8 [www.science.csustan.edu/.../RH35overlay.htm](http://www.science.csustan.edu/.../RH35overlay.htm) 31.05.2010
157. Stem cells open a window on aging, cancer and a devastating disease (Yayın)  
<http://childrenshospitalblog.org/?s=chromosome> 31.05.2010
158. CytoCELL Aquarius probes, PML/ RAR $\alpha$  dual fusion translocation probe. Ref: LPH023. Cambridge 2007. [www.cytoCELL.com](http://www.cytoCELL.com)

159. Wang HY, Ding J, Vasef MA, Wilson KS. bcr3/Short Form PML-RAR $\alpha$  Transcript in an Acute Promyelocytic Leukemia Resulted From a Derivative Chromosome 17 Due to Submicroscopic Insertion of the PML Gene Into the RAR $\alpha$  Locus. *American Journal of Clinical Pathology* 2009;13:64-71.
160. Heng HQ. Released Chromatin or DNA Fiber Preparations for High-Resolution Fiber FISH. In: Arby IA (Eds.). *Methods in Molecular Biology: In Situ Hybridization Protocols*. 2. ed. Totowa: Humana Press Inc.; 2000.p.69-75.
161. Molecular Cytogenetics and Microscopy [www.well.ox.ac.uk/cytogenetics/image8.shtml](http://www.well.ox.ac.uk/cytogenetics/image8.shtml) 31.05.2010
162. Maierhofer C, Jentsch I, Lederer G, Fauth C, Speicher MR. Multicolor FISH in two and three dimensions for clastogenic analyses. *Mutagenesis* 2002;17(6):523–527.
163. Sky spectral karyotype [http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Sky\\_spectral\\_karyotype.gif](http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Sky_spectral_karyotype.gif) 31.05.2010
164. Multicolour Fluorescence in situ Hybridisation (mFISH) to detect Radiation-induced Chromosome Aberrations in Human Cells (Yayın)  
[http://www.med.nus.edu.sg/phys/Projects\\_Cytogenetics\\_Prakash.htm](http://www.med.nus.edu.sg/phys/Projects_Cytogenetics_Prakash.htm) 31.05.2010
165. Lee C, Gisselsson D, Jin C, Nordgren A, Ferguson DO, Blennow E, Fletcher JA, Morton CC. Limitations of chromosome classification by multicolor karyotyping. *Am. J. Hum. Genet* 2001;68:1043-1047.
166. Tanke HJ, Wiegant J, Gijlswijk RPM, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK , Vrolijk J. New strategy for multi-colour fluorescence *insitu* hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. *European Journal of Human Genetics* 1999;7:2-11.
167. Dunphy CH. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2004;128(9):1004-1022.
168. Sözer O. Klinikte ve pratikte akım sitometri. Ankara: Haberal eğitim vakfi,2009:1-5.
169. Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)  
<http://missinglink.ucsf.edu/lm/molecularmethods/flow.htm> 31.05.2010
170. Davies DC, Monard SP, Young BD. Chromosome analysis and sorting by flow cytometry. In: Ormerod MG (Ed). *Flow cytometry vol.3*. Reigate: Oxford University Press; 2000.p.189-201.
171. Park MT, Kang JA, Choi JA, Kang CM, Kim TH, Bae S, Kang S, Kim S, Choi WI, Cho CK, Chung HY, Lee YS, Lee SJ. Phytosphingosine induces apoptotic cell death via

caspase 8 activation and bax translocation in human cancer cells. *Clinical Cancer Research* 2003;9(2):878-85.

172. Bariogic B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Göhde W, Andreeff M, Freireich EJ. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Research* 1983;43:3982-3997.
173. Laane E, Tani E, Bjorklund E, Elmberger G, Everaus H, Skoog L, Porwit MA. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-hodgkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* 2005;64(1):34-42.

## ŞEKİLLER VE TABLOLAR

		<b>Sayfa</b>
Şekil 1	Vorteks	13
Şekil 2	Termal blok	13
Şekil 3	Normal santrifüj, soğutmalı santrifüj	15
Şekil 4	PCR cihazları	16
Şekil 5	PCR ana işlem basamakları	17
Şekil 6	PCR ürünlerinin aritmetik olarak kopyalanması	18
Şekil 7	Fosfat şeker ve organik bazlar	20
Şekil 8	Adenin bazının yapısı	21
Şekil 9	Guanin bazının yapısı	21
Şekil 10	Timin, sitozin, urasil bazlarının yapısı	21
Şekil 11	Nükleozid oluşum şeması	23
Şekil 12	Hidrojen bağlarının ve fosfodiester bağlarının oluşumu	24
Şekil 13	DNA'nın çift sarmal yapısı	25
Şekil 14	DNA çeşitleri	26
Şekil 15	Elektroforez işlem basamakları	37
Şekil 16	Poliakrilamid jelde ürün yükleme	41
Şekil 17	A) Etidyum Bromürün genel yapısı B) Etidyum bromürün DNA çift sarmalına bağlanması	42
Şekil 18	Restriksiyon enzim kesim şeması	44
Şekil 19	AS-PCR işlem mekanizması	48
Şekil 20	ARMS-PCR işlem mekanizması	49

Şekil 21	Nested-PCR işlem mekanizması	50
Şekil 22	Ters (Inverse) PCR işlem mekanizması	51
Şekil 23	Multipleks PCR işlem mekanizması	52
Şekil 24	İmmuno PCR işlem mekanizması	53
Şekil 25	RAPD-PCR işlem basamakları	54
Şekil 26	A) JAK-2 mutasyonunun Real-Time PCR değerlendirilmesi için Rotor-Gene 6000 ekran görüntüsü	55
	B) Sonuçların % olarak değerlendirilmesi	56
Şekil 27	Maxam gilbert degradesyon yönteminin şematik açıklaması	60
Şekil 28	Sanger kimyasal degradesyon yönteminde eksik olan O gruplarına fosfat moleküllerinin bağlanarak işaretlenmesi	61
Şekil 29	Sanger dideoksi metodu	63
Şekil 30	DNA dizileme cihazı genel yapısı	65
Şekil 31	Proseq programının ekran görüntüsü	66
Şekil 32	Bioedit ekran görüntüsü	66
Şekil 33	Kötü kromatogram örnekleri	68
Şekil 34	Kromozom genel yapısı	71
Şekil 35	Kültürde kullanılan malzeme ve cihazlar	75
Şekil 36	İdiogram	76
Şekil 37	G bantlama	78
Şekil 38	Kinakrin bantlama	80
Şekil 39	R bantlama	82
Şekil 40	C bantlama	83
Şekil 41	Gümüş-NOR boyama	85
Şekil 42	Bloom Sendromu	88
Şekil 43	Mikronükleus genel yapısı	90
Şekil 44	Frajil bölge	92
Şekil 45	Barr cisimciği	94
Şekil 46	FISH tekniği genel yapısı	95
Şekil 47	FISH tekniğinde uygulanan basamaklar	96
Şekil 48	İndirekt ve direkt işaretleme	97
Şekil 49	p 53 mutasyonu	98
Şekil 50	t(9:22) Tek füzyon translokasyon	98

Şekil 51	t(8:21) Çift füzyon translokasyon	99
Şekil 52	t(9:22)Tek füzyon ekstra sinyal translokasyon	99
Şekil 53	Kırık noktası yeniden düzenlenme	99
Şekil 54	$\alpha$ satellit bölge	100
Şekil 55	Tüm kromozom boyama	100
Şekil 56	Telomer bölge işaretleme	101
Şekil 57	t(15,17) PML/RAR $\alpha$	104
Şekil 58	Fiber FISH'in Metafaz FISH ve İnterfaz FISH'ten farklı gösterimi	105
Şekil 59	SKY FISH Tekniği	106
Şekil 60	Multipleks FISH Tekniği	106
Şekil 61	Cobra FISH Tekniği	107
Şekil 62	Flow sitometri genel çalışma prensibi.	109
Tablo 1	DNA ve RNA temel farkları	25
Tablo 2	DNA çeşitleri ve özellikleri	27
Tablo 3	%50 GC oranına göre primer uzunluk hesaplanması	30
Tablo 4	PCR karışım protokolü	32
Tablo 5	Ekson 10 PCR standartları	33
Tablo 6	Dizileme için PCR işlem materyali	33
Tablo 7	Dizileme (Sekans) için PCR programı	33
Tablo 8	DNA molekülünün büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonunun ayarlanması	36
Tablo 9	Elektroforezde rastlanabilecek olası problemler ve çözümleri	39
Tablo 10	Elektroforezde sıklıkla tercih edilen boyalar	40
Tablo 11	DNA molekülünün büyüklüğüne göre poliakrilami konsantrasyonunun ayarlanması	41
Tablo 12	Yapışkan uç oluşturan enzimler etken maddeleri ve kesim bölgeleri	45
Tablo 13	Küt kesim oluşturan enzimler etken maddeleri ve kesim bölgeleri	46
Tablo 14	İzoşizomer oluşturan enzimler etken maddeleri ve kesim şekilleri	46
Tablo 15	Değişken tanıma bölgesine sahip enzimler ve tanıma bölgeleri	47
Tablo 16	Maxam Gilbert kimyasal degradasyon yönteminde kullanılan kimyasallar ve hedef bölgeleri	58
Tablo 17	Kimyasal kırılma yöntemi ile yapılan reaksiyonların elektroforez	59



sonrası görüntüsü ve okuma sonucu; 3'-GCAGTACGAT-5'-<sup>32</sup>P

Tablo 18	ABI Prism Big Dye™ sisteminde kullanılan floresan boyalar	64
Tablo 19	Dizileme sonrası yaşanan sorunlar, nedenleri ve çözümleri	67
Tablo 20	Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda sıklıkla kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı	69

## **ÖZGEÇMİŞ**

1986 yılında İstanbul'da doğdu. 2003 yılında İstanbul Ticaret Odası Çatalca Çok programlı Lisesinden mezun oldu. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2003-2007 yıllarında lisans eğitimini tamamlayarak 2007 eylül ayında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.