

BÖLÜM 16

DİZİLEME YÖNTEMLERİNE GİRİŞ VE SANGER DİZİ ANALİZİ



Cengiz ÇAVUŞOĞLU¹

Giriş

Dizileme veya DNA dizi analizi bir DNA molekülündeki nükleotit bazlarının [Adenin (A), Guanin (G), Sitozin (C) ve Timin (T)] sırasının belirlenmesidir. James Watson ve Francis Crick tarafından 1953'te çift sarmallı DNA'nın keşfinden 15 yıl sonra 1968 yılında Wu ve arkadaşları¹ bakteriyofaj λ 'nın yapışkan uçlarını DNA polimeraz ile uzatarak 12 bazın sırasını belirlemişlerdir. Sadece belirli faj genomlarının uçlarına yakın kısa bölümlere uygulanabilen bu yöntem dizilemeye giriş için ilk adım olmuştur. Wu daha sonra, 1970 yılında DNA dizileme reaksiyonlarında ilk kez oligonükleotit primerleri kullanarak yönteminin genelleştirilmesi ve dolayısıyla dizilemenin gelişimi için yeni bir araç sağlamıştır^{2,3,4,5}.

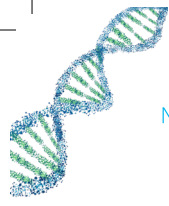
DNA dizilemesi için bir sonraki belirleyici olay, Smith ve arkadaşları⁶ tarafından restriksiyon enziminin bulunması olmuştur. Restriksiyon enzimleri, büyük bir DNA molekülünü, jel elektroforezi kullanılarak boyutlarına göre ayrılacak küçük parçalara kesmek için genel bir yöntem sağlamıştır. Bu parçalar birkaç yıl içinde geliştirilen jel tabanlı mo-

dern dizileme yöntemleri için başlangıç noktaları olarak işlev görmüştür².

Sanger ve arkadaşları⁷, 1975 yılında DNA dizilemesi için "*plus and minus*" yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde DNA polimeraz tarafından oluşturulan sentez ürünlerinin artan zincir uzunluğu sırasına göre ayrılması için poliakrilamid jellerin kullanılması "dideoksi" yönteminin yolunu açan kritik bir geçiş tekniği olmuştur². Şubat 1977'de Maxam ve Gilbert⁸ "kimyasal degradasyon", Aralık 1977'de Sanger⁹ dideoksi yöntemi ile DNA molekülündeki nükleotit bazlarının dizisini belirlemeyi başarmışlardır.

phi X174 fajının "*plus and minus*" yöntemiyle belirlenen 5386 baz uzunluğundaki tam dizisi 1977'de yayımlanmış ve 1978'de dideoksi yöntemiyle yeniden dizilendikten sonra revize edilmiştir^{10,11}. Sanger'in dideoksi yöntemi daha sonra teknolojideki gelişmelerle otomatize edilerek 2007'de yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesine kadar yaklaşık 30 yıl boyunca "İnsan Genom Projesi" de dahil olmak üzere DNA dizilerini belirlemek için tek yöntem olarak tüm dünyada başarıyla kullanılmıştır².

¹ Prof. Dr., Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD., cengizc2003@yahoo.com



alternatif bir yaklaşım olarak *shotgun* tüm genom dizilimini savunan bir makale yayınlamışlardır²⁰.

NIH liderliğinde, Uluslararası İnsan Genomu Dizileme Konsorsiyumu (*International Human Genome Sequencing Consortium*) tarafından Francis Collins başkanlığında yürütülen İnsan Genom Projesi'nde klon-klon yöntemi kullanılırken, Craig Venter liderliğinde Celera Genomics tarafından hükümet dışında paralel yürütülen projede *shotgun* yöntemi kullanılmış ve iki çalışmanın sonuçları aynı hafta içinde *Nature* ve *Science* dergilerinde yayımlanmıştır^{22,23}. *Shotgun* dizileme bazı yönlerden İnsan Genom Projesi tarafından seçilen klon-klon yönteminden daha az doğru olduğu yönündeki bazı iddialara rağmen²⁴, daha sonra bilim topluluğu tarafından geniş çapta kabul görmüş ve yeni nesil dizileme yöntemlerine giden yolu açmıştır.

Kaynaklar

1. Wu R, Kaiser AD. Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 1968;35: 523-37.
2. Hutchison III CA. DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research* 2007;35(18): 6227-37.
3. Wu R. Nucleotide sequence analysis of DNA. I. Partial sequence of the cohesive ends of bacteriophage lambda and 186 DNA. *J Mol Biol* 1970;51: 501-21.
4. Padmanabhan R, Wu R. Nucleotide sequence analysis of DNA. IX. Use of oligonucleotides of defined sequence as primers in DNA sequence analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;48: 1295-1302.
5. Xue Y, Wang Y, Shen H. Ray Wu, fifth business or father of DNA sequencing? *Protein Cell* 2016;7(7): 467-70.
6. Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 1970;51: 379-91.
7. Sanger F, Coulson A R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94: 441-48.
8. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 560-64.
9. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74: 5463-67.
10. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977;265: 687-95.
11. Sanger F, Coulson AR, Friedmann T, Air GM, Barrell BG, Brown NL, et al. The nucleotide sequence of bacteriophage phiX174. *J Mol Biol* 1978;125: 225-46.
12. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85: 2444-48.
13. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215: 403-10.
14. Pesole G, Saccone C. *DNA Sequencing Techniques*, pp: 133. In: Pesole P, Saccone C (eds), *Handbook of comparative genomics: principles and methodology*. 2003. Wiley-Liss, New York.
15. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986;321: 674-79.
16. Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer User Guide. 2010, Life Technologies Corporation, California.
17. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 2008;26(10): 1135-45.
18. Daniels RS, Harvey R, Ermetal B, Xiang Z, Galiano M, Adams L, et al. A Sanger sequencing protocol for SARS-CoV-2 S-gene. *Influenza Other Respi Viruses* 2021;15: 707-10.
19. Fleischmann FD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995;269(5223): 496-512.
20. Weber JL, Myers EW. Human whole-genome shotgun sequencing. *Genome Res* 1997;7(5): 401-9.
21. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409: 860-921.
22. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507): 1304-51.
23. Shreeve J. Gen Savaşları: İnsanlığın Geleceği Kimlerin Elinde? 2007. Doğan Kitapçılık 1. Baskı. İstanbul.
24. Olson MV. The Human Genome Project: A Player's Perspective. *J Mol Biol* 2002;319: 931-42.