

FLOWSİTOMETRİ

Hücre çekirdeği içindeki DNA miktarını hesaplamak için ilk girişimler Casperssonshultz vasıtasıyla 1930 yılında, kalıttaki merkezi rolünü bulmak amacıyla yapıldı. Bir süre sonra her canlı varlıkta DNA'dan sabit bir miktar elde edildi ve C değeri terimi Swift tarafından belirlendi. Sistemik biyoloji ve ekoloji olmak üzere C değeri bilgisinden birçok bilimsel sistem yararlanmaktadır. C value'nin önemine rağmen sadece bitki türlerinin bir kısmı için tanınmıştır. Hücrenin DNA miktarını ölçmek için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan biri, UV ışık miktarı emilimine göre çekirdek miktarını ölçen çekirdeği tek başına ölçme yöntemidir. Bu yöntemde, çekirdek Fulgen metodu vasıtasıyla renklendirilir ve ışık renk tarafından emilir.

Kromozomların ve çekirdek şeklinin düzgün olmaması, mikrospektrofotometri ile daha detaylı ve hassas tarama yönteminin gelişmesine yol açmıştır. Mikrospektrofotometriye elektronik bir frekans verildiği zaman, DNA'dan sitometri görüntü, dözenmektedir. Triticum ve Aegilops türlerinde, hücre çekirdeğindeki DNA içeriğini analiz etmek amacıyla, maydanoz (*Petroselinum crispum*) veya arpa (*Hordeum vulgare*) tohumundan yeni filizlenmiş yaprakciklardan (standart bitki olarak), hücre ekstrasyon solüsyon içinde jilet yardımıyla parçalanmıştır. Hücre duvarı kimyasal ve fiziksel olarak çözüldükten sonra, protoplast süspansiyonu 40 mikrometrelik filtreden süzülüp ribonuclease A) daha sonra serbest bırakılmış protoplastlara enzim ve Propidium Iyodid (PI) veya 4–6-Diamidino–2-phenylindole (DAPI eklenmiştir. Elde edilen süspansiyon 1 saat boyunca buz üstünde bekletilip daha sonra 20 mikrometrelik filtreden geçirilmiştir. Boyanmış genomun floresan derecesi, Flow Sitometri cihazıyla ölçülmüştür. Floresanın yoğunluğu, her bitkiden ve her biri en az 100.000 boyanmış hücre çekirdeği olarak, 5 örnekli yaprak ortalaması esasında, iki peak olarak gösterilmektedir. Keten peakinin maydanoz peakine mode oranı ($p1/p2$) hesaplanır (Rauppinson 2006) ve DNA miktarı, Yokoya vd.(2000) verdiği formüle göre aşağıdaki gibi hesaplanmıştır. Örneğin; Çekirdek başına düşen DNA miktarının belirlenmesinde Arumuganathan and Earle (1991b)'nin tanımladığı prosedür uygulanmıştır. Prosedür kısaca, bitki dokusunun kıyılması ve protoplastların MgSO₄ tamponu ile parçalanması ile bozulmamış hücre çekirdeği süspansiyonu hazırlamak ve bunu DNA standartları ile karıştırmak, çekirdeği DNase-serbest RNase içeren bir çözeltide propidium iyodin (PI) ile boyamaktan oluşmaktadır. Boyanan

çekirdeklerin floresan şiddeti flow sitometri ile ölçülmüştür. Test popülasyonunun çekirdek DNA'sı içeriği değerlerini hesaplamak için elde edilen çekirdek floresan şiddetleri diploid arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Hitchcock) veya hexaploid buğday (*Triticum aestivum* L. cv. Arapahoe) DNA standartları ile karşılaştırılmıştır. Aegilops fidelerinin yaprak boyun kısmından alınan yaklaşık 50 mg taze, yeşil doku kesilip 35x10 mm boyutlarında steril plastik bir petri kapına yerleştirilmiştir. Yaklaşık 20 mg arpa ve buğday yaprak dokusu da standart olarak bunun üzerine eklenmiştir. Arpa ve buğday için hücre başına 2C DNA eşleniği sırasıyla 10,68 ve 34,68 pg. Arpa ($2n = 2x = 14$) ve buğday ($2n = 6x = 42$) DNA içeriklerinin büyük kısmı analiz edildiğinden standart olarak kullanılmışlardır. Yaprak dokusu (Aegilops ve standart) 0,25-1,0'lık segmentler halinde kesildi ve 1 mL çözeltiliye konuldu A [24 mL MgSO₄ tampon (soğuk); 25 mg dithiothreitol; 500 µL propidium iodide stoğu (1 mL çift distile edilmiş su içinde 5 mg propidium iodide); 625 µL Triton X-100 stok (10 mL çift distile edilmiş su içinde 1,0 g Triton X-100)]. Homojenat 33 µm por açıklığına sahip naylon filede filtre edilip bir mikrosantrifüj tüpü ile 13,000 RPM hızında 20 saniye santrifüj edildi (VS-15 microcentrifuge, Shelton Scientific, Shelton, CT)..Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet 400 µL çözeltide yeniden askıya alındı B [7,5 mL A çözeltisi; 17,5 µL RNaz (DNazsız)] ve flow sitometri analizinden önce 15 dk. 37 C° inkübe edildi.

Hazırlanan materyal Namık Kemal Üniversitesi Ziraat fakültesinde tarla bitkilerinde genetik ve sitogenetik laboratuvarında analiz edildi. Ölçümler için, 1000 çekirdekten PI floresan alan sinyali (FL2-A).CellQuest yazılımı ile toplandı (Becton Dickinson Immunocytometry system, San Jose, CA). Çekirdekten floresan ölçümlerini kullanmak için FL2-A histogramı oluşturmaya olanak sağlayan FL2-2 ve FSC parametrelerini çalıştırarak bir canlı geçit konfigürasyonu enstrümanı kullanıldı. Örneğin ve ara standardın G0/G1 (çekirdek) orta pozisyon pikini verilerin CellQuest yazılımı ile analizi sonucu belirlendi. Çekirdek başına düşen ortalama içerik için 1000 çekirdek taraması baz alınmıştır. Floresan değerlerinin DNA içeriğine dönüştürülmesi için kullanılan formül: Çekirdek DNA içeriği = (Bilinmeyen bir pikin orta pozisyonu)/(Bilinen orta pozisyon) x bilinen standart DNA içeriğidir.

Hücrelerin çekirdekdeki DNA miktarı nicel olarak sitometri cihazı ile çok hızlı bir şekilde ölçülebilir. Bu nedenle, DNA ile bantlanan bir floresan boyası, çekirdek süspansiyon ve geçirgen tek hücrelere ilave edilir. Ölçüm cihazı floresan bağıl

şiddeti ve DNA miktarını gösterir. Belirsiz bir örneğin genom büyüklüğü, sadece genom boyutu bilinen standart çekirdeklerle birleştikten sonra tahmin edilebilir. Bu araştırmada *Petroselinum crispum* bitkisi, kontrol bitkisi olarak ve 2C DNA=4/46 pg miktarında kullanılmıştır. Çekirdekdeki DNA miktarını doğru tahmin edebilmek için incelenecek örneklerin her birinde, her kitle üç defa incelenmiştir.

Gerekli sıvılar

Bu araştırmada pH= 7/5 ve (CyStain UV Precise P" kit) partec ticari çekirdek ekstraksiyon tamponu ile elde edilen Tris-MgCl₂, 200mM Tris, MgCl₂. 6H₂O4mM, 0.5 % Triton X-100 (v/v)'un kullanılmıştır. Boyamak için 4–6-Diamidino–2-phenylindole (DAPI) kullanılmıştır. Bu boya çok net görünmeyen bir boyadır ve kompleks bir şekilde A-T baz alanlarında bantlanmakta ve bazik alanlar arasında yerleşmemektedir.

DNA Miktarının Tahmini İçin Örneklerin Elde Edilmesi

Kütlelerin ploidi miktarını ölçmek için örnek elde etmek amacıyla, yeni bitki yaprakları ve yeni kontrol bitki yaprakları bir şişe içine konulduktan sonra 500 mikrolitre çekirdek izolasyon tamponu ilave edilmiştir ve bir jilet yardımıyla örnekler parçalanmıştır. Daha sonra 500 mikrolitre renklendirme sıvısı örneklerle ilave edilerek 40 dakika süre ile örnekler renklendirme sıvısına bırakılmıştır. Bu süreden sonra örnekler özel huni yardımıyla sitometri cihazı içindeki balona (30 µm) boşaltılıp balon cihazın içine yerleştirilmiştir. Sonra örneklerden elde edilen pikler kitlelerin genom büyüklüğünü incelemek amacıyla araştırılmıştır.

Genom boyutu tahmini, Tohum ve Bitki Gelişim Enstitüsü'nün gen bankasındaki sitojenik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir ve sitometri cihazından ticari adıyla bilinen partec akımı kullanılmıştır.

Çekirdek Genom Boyutunun Tahmini

DNA akım sitometri uygulamalarının birçoğu basit ve anlaşılırdır. Ancak DNA miktarını veya çekirdek genom boyutunu tahmin etmek zor bir işlemdir. Akım sitometir analizi, nisbi floresans yoğunluğu ve DNA'nın nisbi miktarını tahmin etmek bu kategoride yer almaktadır. Örnek genom boyutu belirsiz olduğunda, sadece standart bir kaynakla kıyaslayarak örneğin boyutunu belirlemek mümkündür. Bu

işlem birkaç yöntemle yapılabilir. Bu yöntemlerden biri farklı analizlere sahip dış örnek standardının kontrol ve standart örneklerle kıyaslanmasıdır. Analizde bazen cihazdaki sorunlar veya örneğin elde edilmişindeki değişiklik yüzünden sorunlar yaşanabilir. Cihazı standardize etmek başka bir deyişle örnek ile standart çekirdeği birbirinden ayırarak bu sorun çözülebilir. Bazı araştırmacılar, kaynak standart ve amaç çekirdeği birbirinden ayrı olarak renklenmeden önce karıştırıp analiz ederek bu ikisi arasında bir uzlaşma sağlamaktalar. Bu yöntem, çekirdeğin ayırımı ve renklenmesi arasındaki farktan dolayı, açık bir şekilde yanlışlıkları gidermez

Çekirdek Süspansiyonunun Hazırlanması

Net DNA miktarının hesaplanması amacıyla çekirdek süspansiyonunun hazırlanması için neredeyse evrensel bir şekilde Galbrath yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, sitoplazmadan çekirdeğin kolayca ayrılması, endonükleazların DNA'ya saldırısını önlemek ve DNA'nın kolay renklenmesi amacıyla çekirdek ayrı olarak buffer madde içine konulur. Çekirdek kromatini, magnezyum iyonları vasıtasıyla, klorid magnezyum ve sülfat magnezyum maddesinde ve eprifin yardımıyla polifin maddesinde tespit edilir. Buffer Marei'de glikoz varlığı çekirdeğin sağlam ve kusursuz kalmasına yardımcı olur. Sıvıların pH'ı yaklaşık 7-8 civarında tutulur. Triton X-100 ve Tween 20 olmak üzere iki iyonsuz renkli madde, sitoplazmadan çekirdeğin serbest bırakılmasına yardımcı olur. Çekirdekler asit sitrikle tespit edilmiş diye buffer otto 1 içine bırakılır ve renklendirme işi otto 1 ve otto 2'den oluşan bir ortamda ve 1:4 oranıyla gerçekleşir. Çekirdeklerin buffere eklendikten kısa bir süre sonra ölçümleri yapılmalıdır. Çünkü bazı türlerin çekirdekleri bu aşamadan sonra hızla azalmaya başlarlar. Bazı türlerde temizleyici madde konsantrasyonunun artması gerekmektedir (%0. 5-1). Fenolu yüksek olan dokularda çekirdeğin ayrılması için biraz polivinil prolidine ilave edilmesi gerekmektedir.

Çekirdek DNA'nın Florsent Rengi

DNA miktarının tahmini için yapılan başlangıç deneyler, etidyum bromid (EB) gibi florsent renklere ve Hoechs renklerini geniş bir biçimde kullanılmaktadır. Tercihen GC bölgelerinden zengin DNA için genellikle diğer florsan antibiyotiklerle birlikte Mitramisin kullanılmaktadır. Tercihen AT açısından zengin bölgeler için ise Hoechst renkleri özellikle DAPI kullanılır. AT ve GC bölgelerinde floro kromların kullanımı söz konusu yöntemde hataya neden olmaktadır. Araştırmacılar bu konuda propiddium

iyot iyot (PI) kullanılmaktadır. Kromatinin EB ve PI'ya duyarlılığı dikkate alındığında, bu iki maddenin dokuda kromatinin azalmasına ve sonuç olarak DNA miktarının hesaplanmasında hataya neden olabilir. Galbrath 1998'de hedef ve standart dokunun birbirinden ayrılması gerektiğini ve floresanın son derecesine ulaşmak ve PI ve EB analizini yapmak için konsantrasyonların doyurarak uygulanması gerektiği tavsiyesinde bulunmuştur. Çekirdeklerin renklenmesi, ayıran buffer bileşiklerinin yanı sıra sitoseli bileşiklerinden de etkilenmektedir. Jhonston ve Price sistolsi bileşiklerinin etkisini birkaç türün PI floresansına test ettiler. Test edilen bitkiler arasında, floresansın Petunia çekirdeğini yaklaşık %20 azalttığı tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin kafe üzerinde çok az, tatlı patates bitkisi üzerinde ise çok net ve belirgin etkisi olduğu anlaşılmıştır. Hataları minimuma indirmek için standart ve kaynak bitkiler kullanılır. Çekirdek süspansiyonunun sulandırılması sistoselinin kaldırılması ile sistolitik bileşiklerin azalması amacıyla ve santrifüj makinelerin yardımıyla gerçekleştirilir.