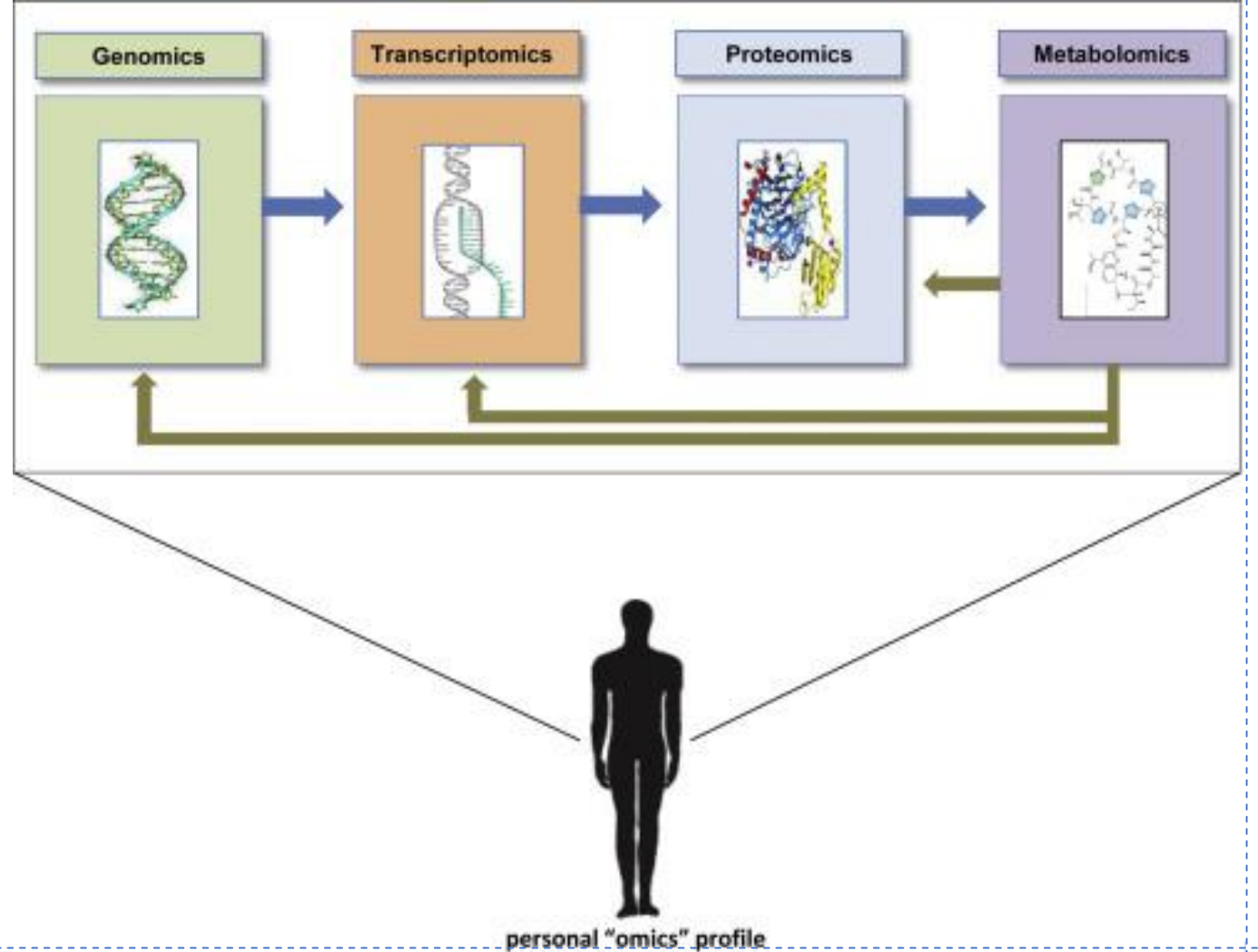


OMİKS TEKNOLOJİLERİNE GENEL BAKIŞ

Prof. Dr. E. Sümer ARAS

-Omik(s) (-omics) Teknolojileri

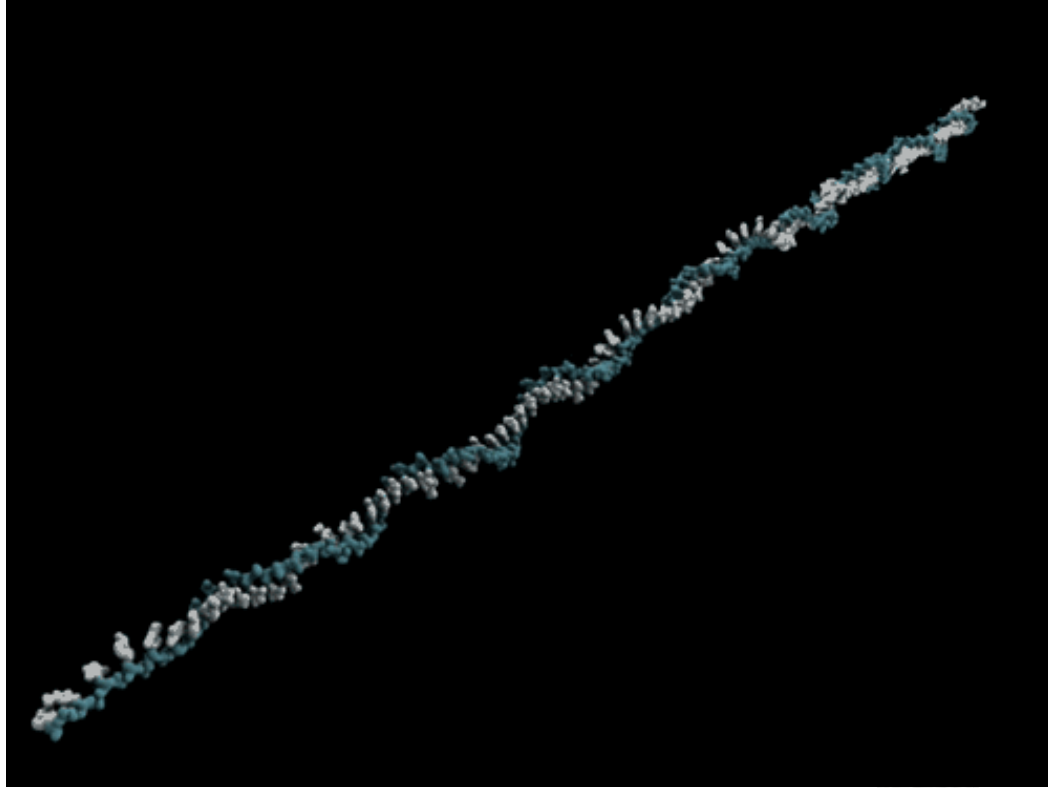
- Yunanca –ome eki kelimeye bütünlük, tümlük anlamı katmaktadır.
- –omiks (omics), karmaşık sistemleri bütüncül bir bakış açısıyla ele almayı ifade eder.



Omiks Teknolojilerine Genel Bakış

- **Genom:** Bir organizmanın tüm kromozomlarındaki genetik bilginin tamamını ifade etmektedir.
- **Genomik(s):** Bir canlının genomunu tanımlamak, genleri belirlemek, birbirleriyle ve çevreyle etkileşimlerini ortaya koymak için uygun yöntemler ile gelişmiş teknolojileri kullanılarak yapılan çalışmaları ve bu çalışmalardan elde edilen bilginin veri tabanlarında depolanmasını ifade eder.

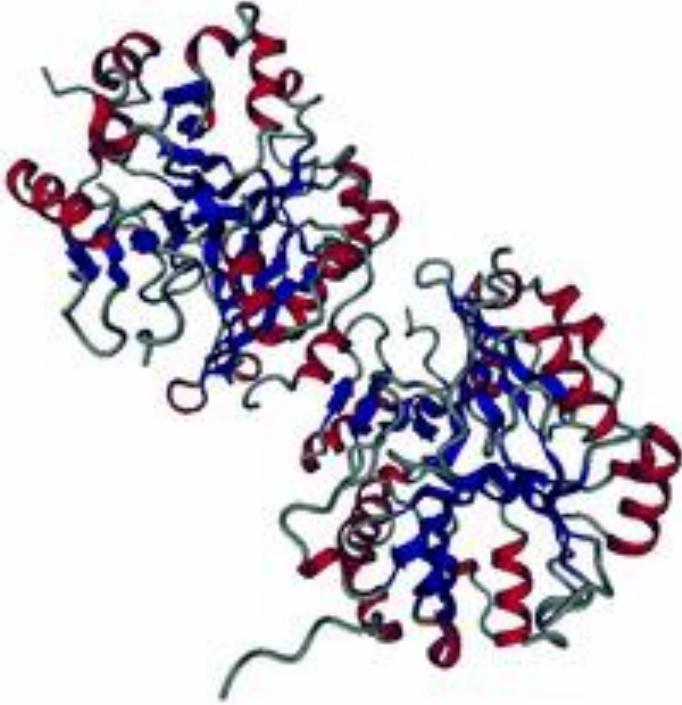




Omiks Teknolojilerine Genel Bakış

- **Transkriptom:** Bir organizmada "belirli yer ve zamanda" üretilen tüm mRNA'ları tanımlar.
- **Transkriptomik(s):** Transkriptomun kalitatif ve kantitatif analizini içeren tüm çalışmaları kapsamaktadır.

Omiks Teknolojilerine Genel Bakış

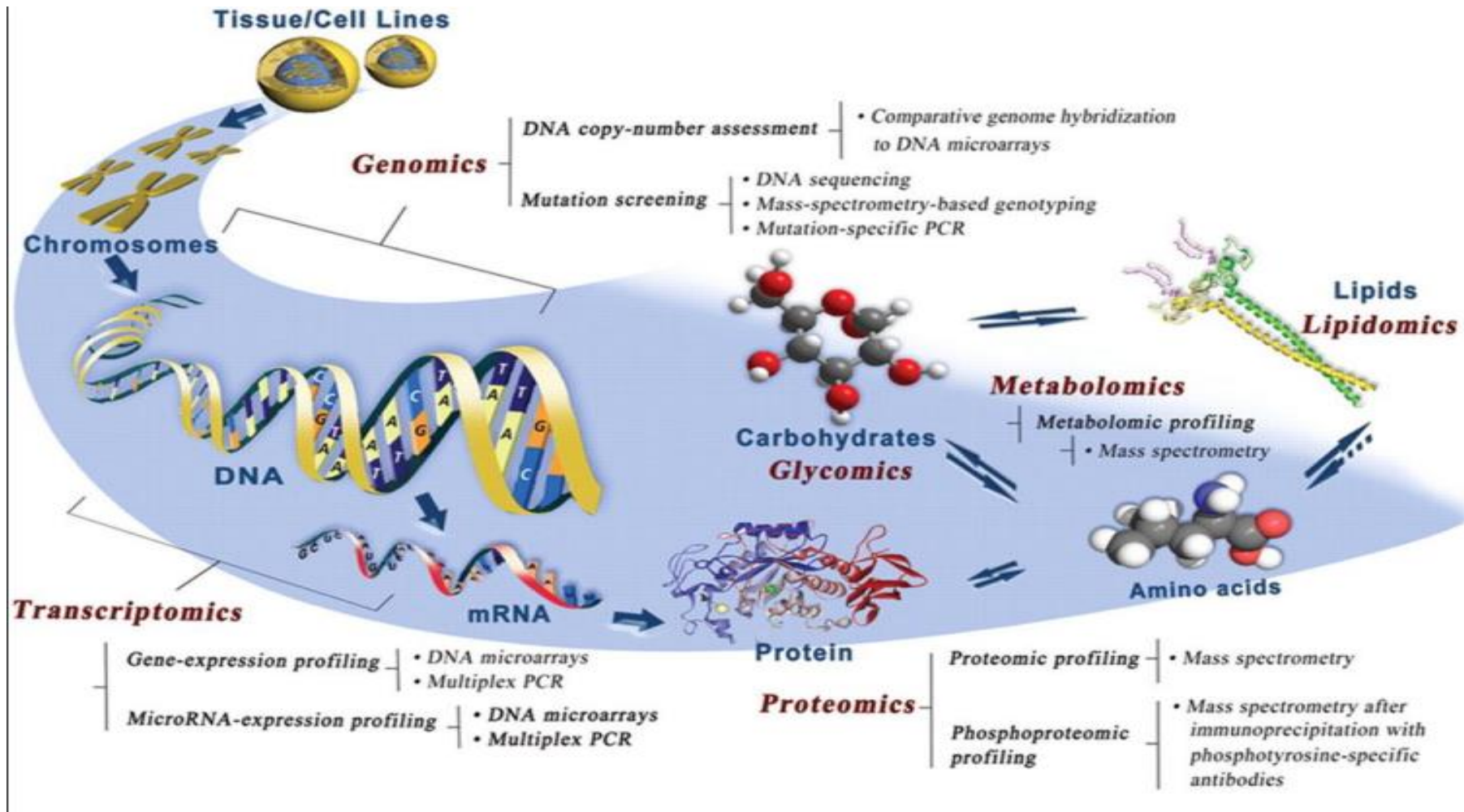


- **Proteom:** Bir organizmada "belirli yer ve zamanda" bulunan tüm proteinleri tanımlar.
- **Proteomik(s):** Proteomun kalitatif-kantitatif analizini ve proteinlerin birbirleriyle etkileşimlerini içeren tüm çalışmaları kapsar.

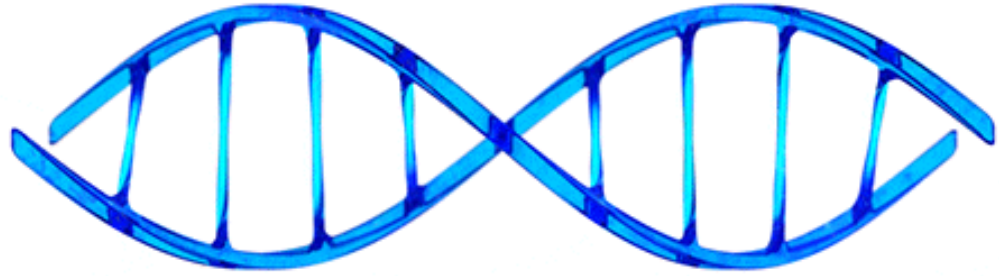


Omiks Teknolojilerine Genel Bakış

- **Metabolom:** Bir organizmada "belirli yer ve zamanda" üretilen tüm metabolitlerdir.
- **Metabolomik(s):** Metabolomun kalitatif ve kantitatif analizini içeren tüm çalışmaları kapsar.
- Moleküler biyoloji alanında bütüncül bakış açısıyla yapılan çalışmaları tanımlayan birçok farklı omiks'ten bahsedilmektedir. **Ör: lipidomiks, interaktomiks, epigenomiks, glikomiks, sekretomiks vd.**



• Şekil 1. Omiks teknolojilere genel bakış



Genomiks

- Genom analizi ile ilgili tüm çalışmaları kapsamaktadır.
- Genomiks çalışmaları, genom projelerinin başladığı 90'lı yılların başında ivme kazanmıştır. DNA sekanslama tekniklerinin bulunması ve gelişmesi, genomiks alanında ilerleme sağlamıştır.
- Veri depolama ve analizlerinde bilgisayarların kullanılması (biyoinformatik), genomiks alanına çok önemli katkılar sağlamıştır.



Genomiks

- Yapılan çalışmaların niteliği bakımından genomiks, yapısal ve işlevsel genomiks olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.
- **Yapısal genomiks**, DNA dizi bilgisinin ortaya çıkarılmasıyla ilgili tüm çalışmaları kapsar (ör: belli genlerin dizilenmesi veya genom dizilemeleri)
- **İşlevsel (fonksiyonel) genomiks** ise DNA üzerinde ifade edilen bölgelerin ürünlerini, mRNA analizini kapsar (ör: mRNA dizilenmesi). İşlevsel genomiks'in amacı bir bakımdan DNA dizisine anlam kazandırmaktır.

Genomiks

- İnsan Genom Projesi kapsamında insan genomunun yaklaşık 3.2 milyar baz çiftinden oluştuğı bilgisine ulaşılmıştır.
- İşlevsel genler nelerdir?
- İfadesi ne zaman, hangi koşullarda gerçekleşir?
- Bu genlerin ifade edilmesinin hastalıklarla ilişkileri var mıdır?

Genomiks çalışmalarında kullanılan başlıca yöntemler

DNA ve RNA
dizileme teknikleri

Gen ifade (mRNA)
seviyesine bakmak

Gen fonksiyonunu
belirlemek

Genoma ait dizi
bilgisi

Kromozomda her
bir genin pozisyonu

Potansiyel gen
bölgeleri

Genlerin etrafındaki
düzenleyici bölgeler

Gen ürünü olan
proteinlerin genetik
kodu hakkında bilgi
verir.

DNA Dizileme Yöntemleri

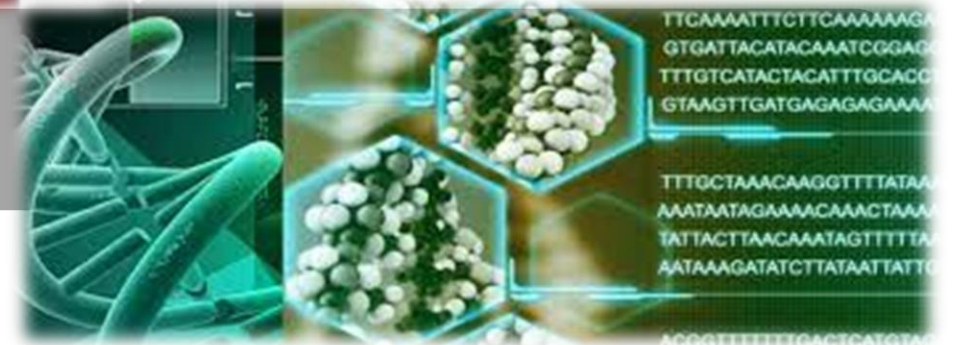
DNA Dizileme (Sekanslama)

Genomların dizilenmesini iki önemli buluş mümkün kılmıştır:

PCR



DNA dizileme yönteminin geliştirilmesi ve otomatize edilmesi



DNA Dizileme (Sekanslama)

- 1977 yılında Alan M. Maxam ve Walter Gilbert DNA'nın kimyasal modifikasyonunu takiben özgül bölgelerden kırılması prensibine dayanan bir DNA dizileme yöntemi tanımlamışlardır.
- Aynı yıl F. Sanger, S. Nicklen ve A. R. Coulson, 1975 yılında yayınladıkları yöntemi modifiye ederek dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu ile DNA dizileme yöntemini yayınlamışlardır.
- Walter Gilbert ve Frederick Sanger bu çalışmaları neticesinde 1980 yılında kimya dalında Nobel ödülü almışlardır.



Walter Gilbert
(1932-, US Physicist and Biochemist)



Frederick Sanger
(1918-, UK Biochemist)

DNA Dizileme (Sekanslama)



İlk otomatize DNA dizileme cihazı, Sanger yöntemi esas alınarak 1986 yılında Applied Biosystems tarafından üretilmiştir.



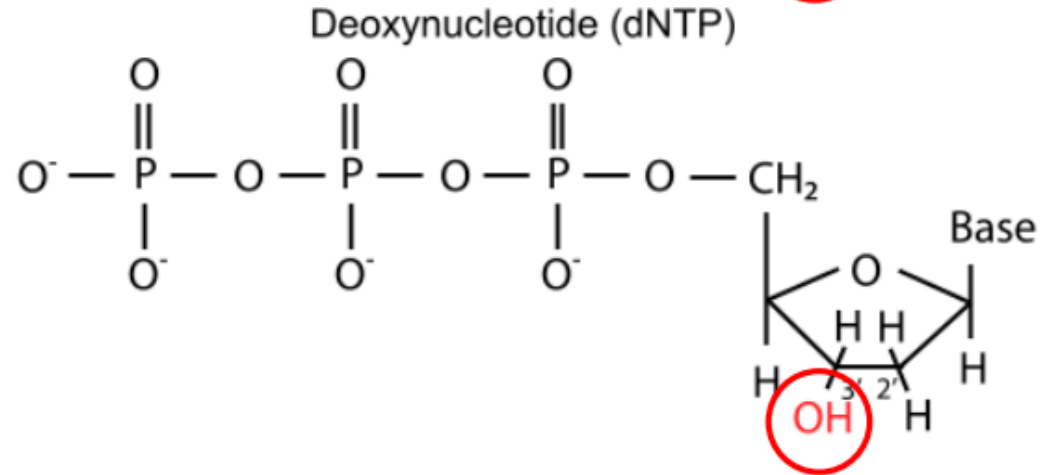
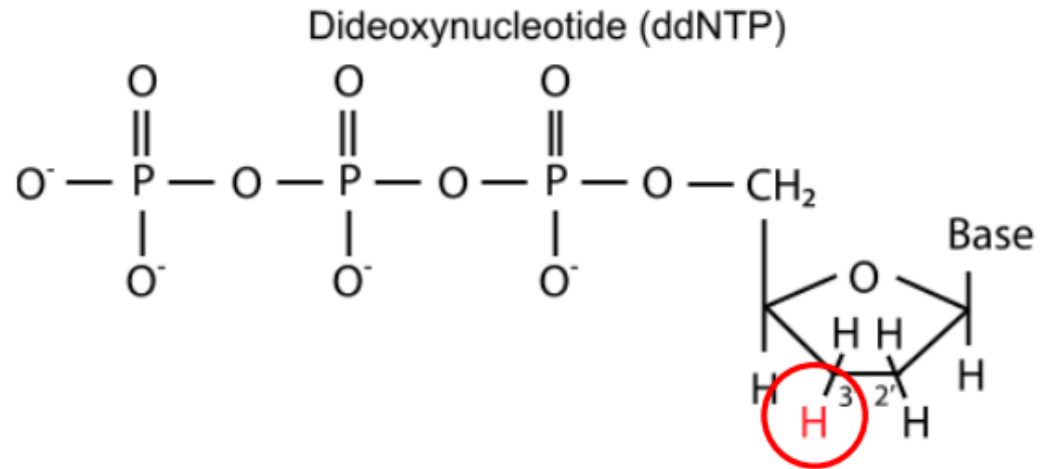
Günümüzde yeni nesil dizileme teknolojileri geliştirilmiştir. Ancak hala Sanger sekanslama yöntemini temel alan cihazlar da kullanılmaktadır.

Sanger dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu

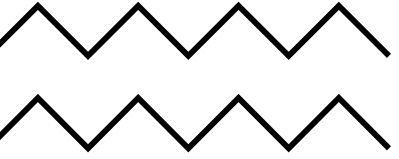
Sanger dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu, Sanger ve ark. tarafından 1977 yılında yayınlanan yöntemdir. Kısaca Sanger dizileme yöntemi olarak da bilinmektedir.

Yöntemin temeli; radyoaktif işaretli primer, dideoksi nükleotit ve poliakrilamid jel elektroforezi kullanımına dayanmaktadır.

DNA sekanslama için öncelikle DNA'nın izole edilmesi gerekmektedir. Daha sonra PCR ile ilgili bölge çoğaltılır ve takip eden prosedürler uygulanır. DNA'nın iyi ve degrade olmadan izole edilmesi sekanslama verimini artırır.



- Şekil 2. ddNTP ve dNTP'nin yapısal formülasyonu



Sanger dideoksi zincir sonlanma reaksiyonu

- Floresan işaretli ddNTP'ler geliştirilmiştir. Her bir dideoksi nükleotit (ddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP) farklı dalgaboylarında emisyon veren floresan boyalar ile bağlanmış bir şekilde üretilmiştir.
- Bu şekilde hepsini tek bir tüpte karıştırarak tek bir reaksiyon mümkün olur. Sonlanmanın gerçekleştiği fragmentin sonundaki nükleotidin hangi baz olduğu floresans ışımının ölçülmesiyle tespit edilebilir.
- Bu gelişmelerden sonra üretilen cihazlarda içi jel dolu kapillerde yapılan elektroforez ile farklı boylardaki fragmentler birbirinden ayrılarak floresan işaretler ile okunur.



Daughter strands of different lengths can be produced by using a mix of dNTPs and ddNTPs.

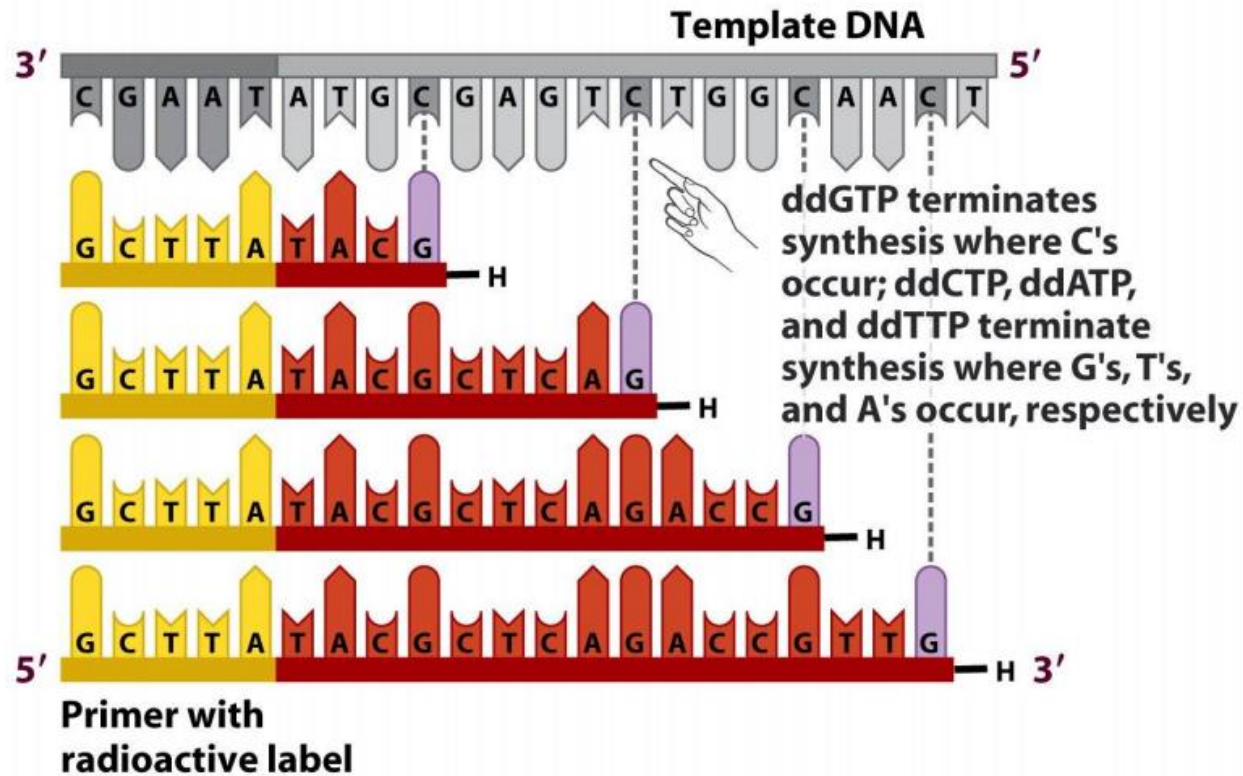
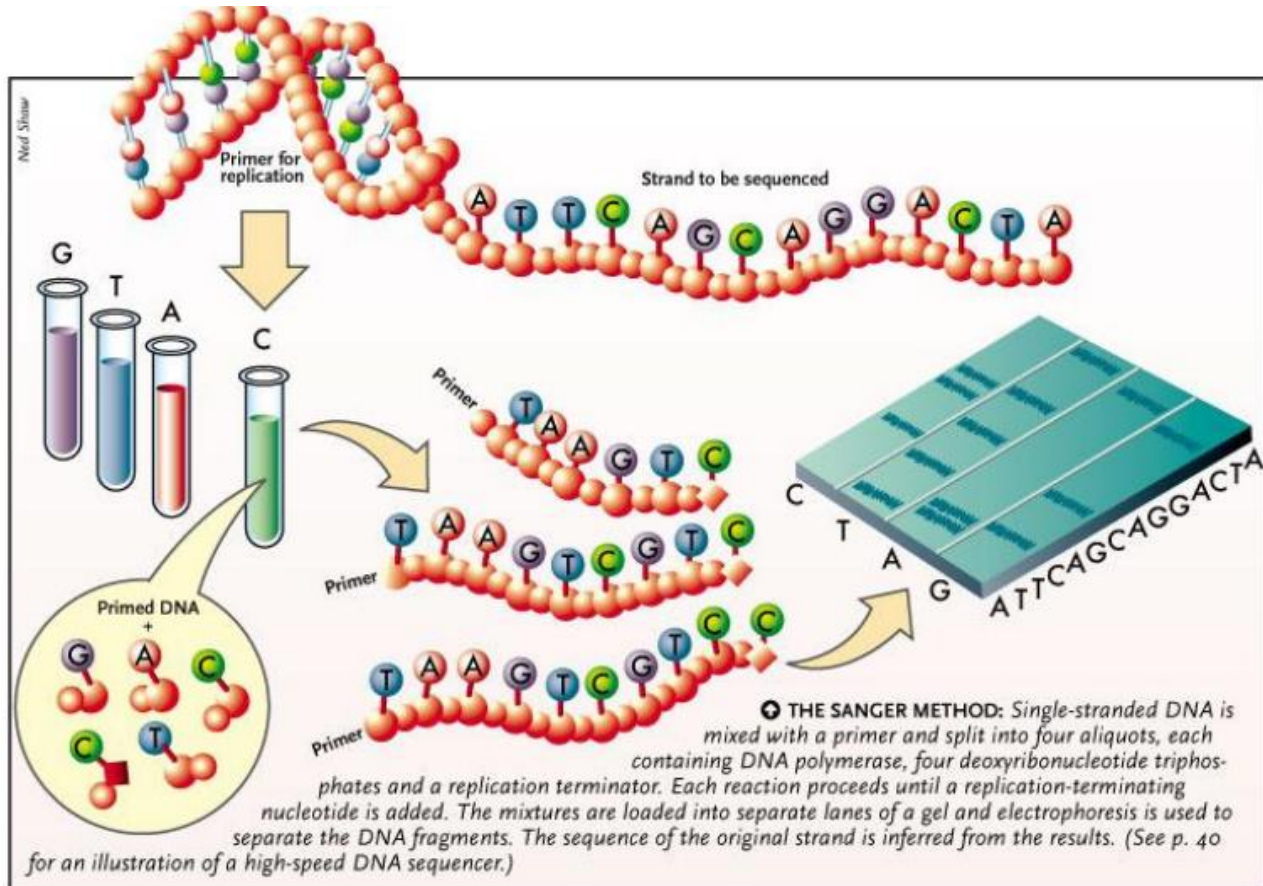


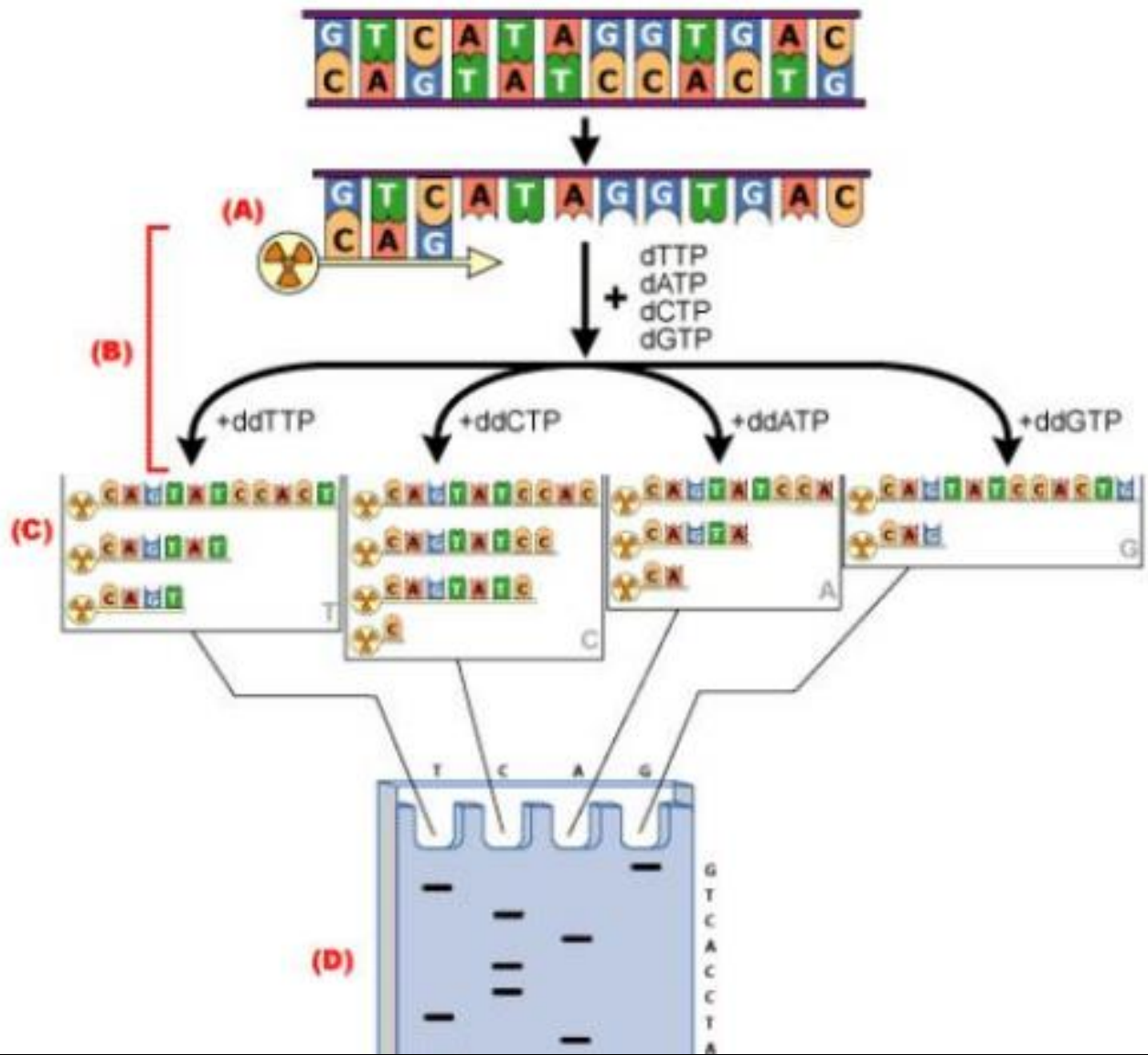
Figure 19-6b Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Şekil 3. Sanger dizileme metodu

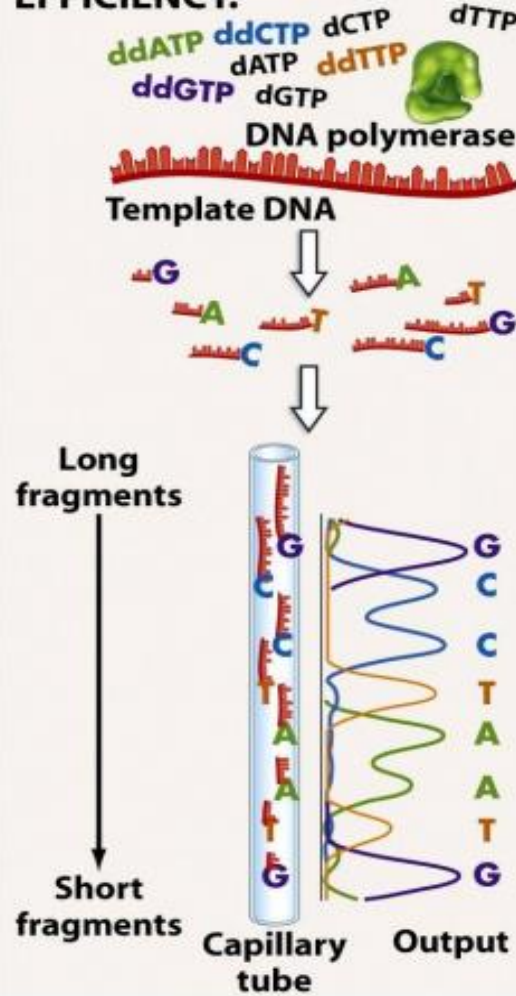


- Şekil 4. Sanger metodu



- Şekil 5. Sanger metodu

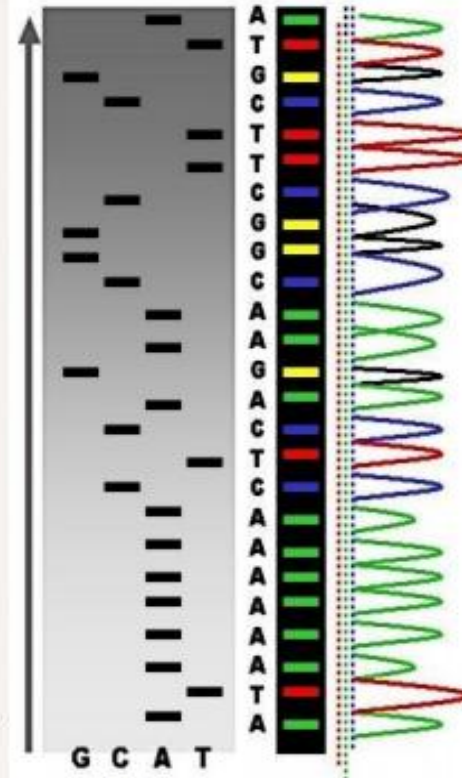
FLUORESCENT MARKERS IMPROVE SEQUENCING EFFICIENCY.



1. Do one sequencing reaction instead of four. Reaction mix contains ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP with distinct fluorescent markers. (With radioactive labels, four reactions are needed—one labeled ddNTP at a time.)

2. Fragments that result have distinctive labels.

3. Separate fragments via electrophoresis in mass-produced, gel-filled capillary tubes. Automated sequencing machine reads output.



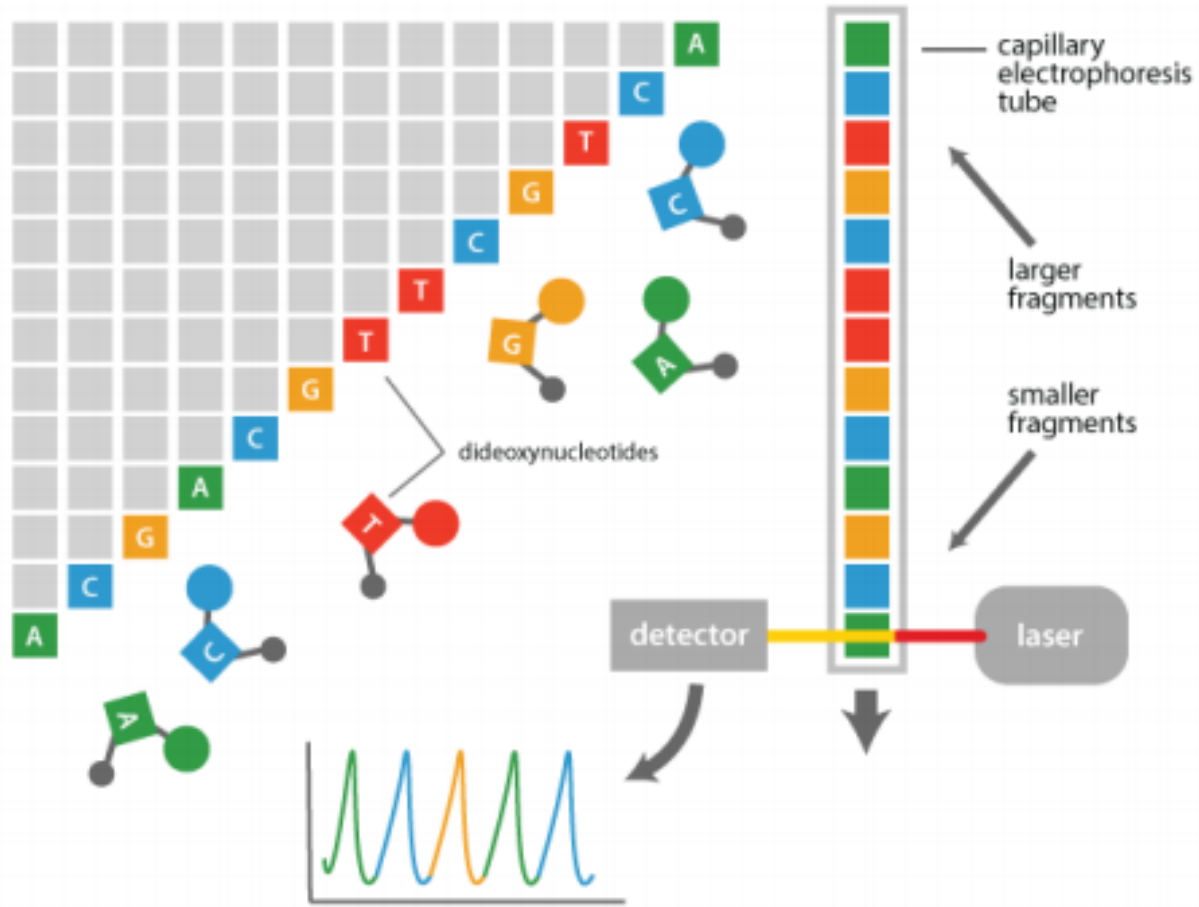
Kapiller elektroforez sistemi ile büyük jeller kullanılmamakta ve cihazların otomatikleştirilmesi ve aynı anda birden fazla örneğin çalışılması mümkün olmuştur.

Figure 20-1 Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Şekil 6. Kapiller jel Elektroforezi Gösterimi

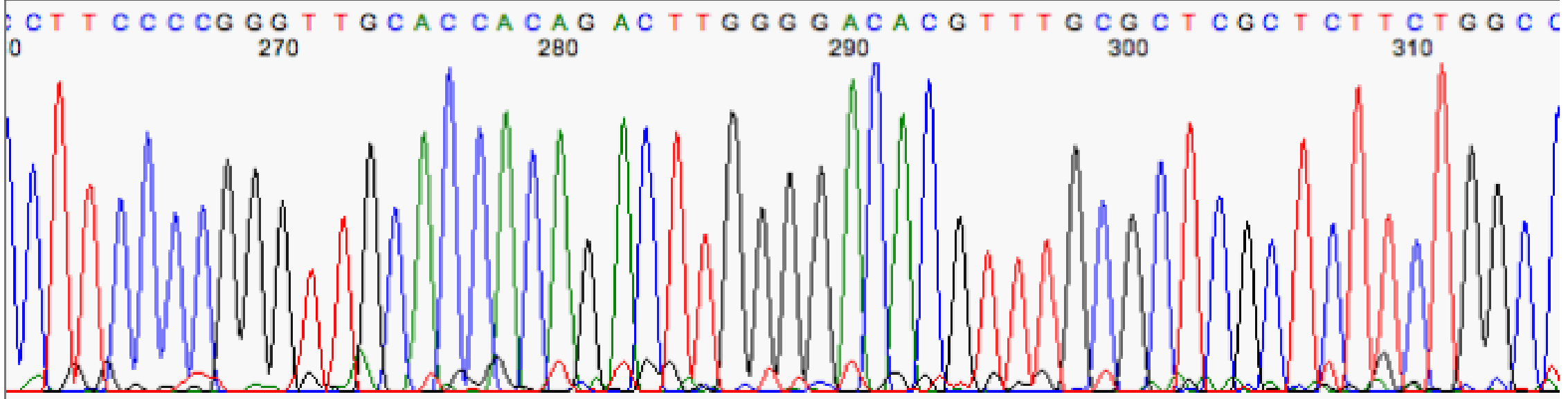
Sanger Sequencing



- Şekil 7. Sanger Sekanslama

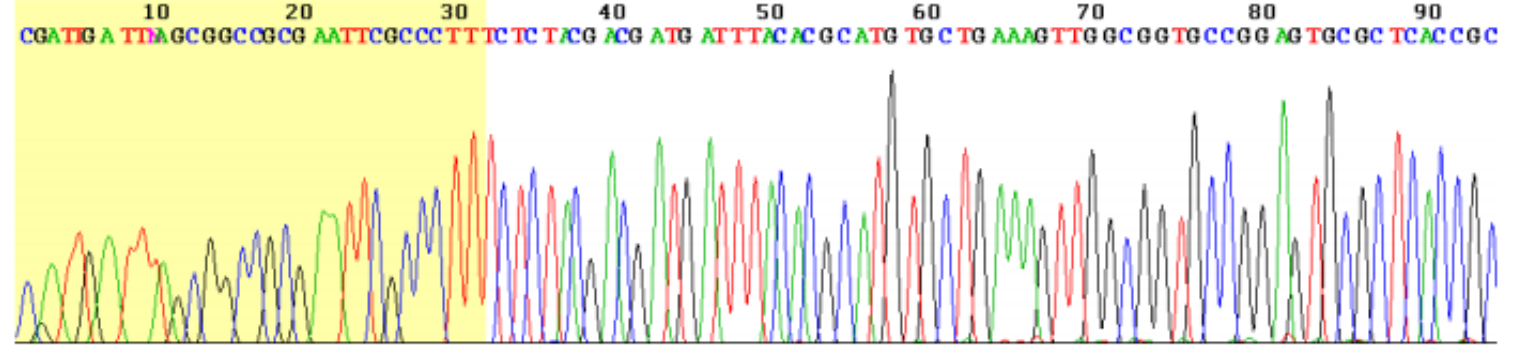
Şekil 8. Applied Biosystems firması tarafından 1986 yılında üretilen ilk otomatize DNA dizileme cihazı (büyük format jel tabanlı)





Şekil 9. Sanger sekanslama sonucu cihazdan elde edilen kromatogram

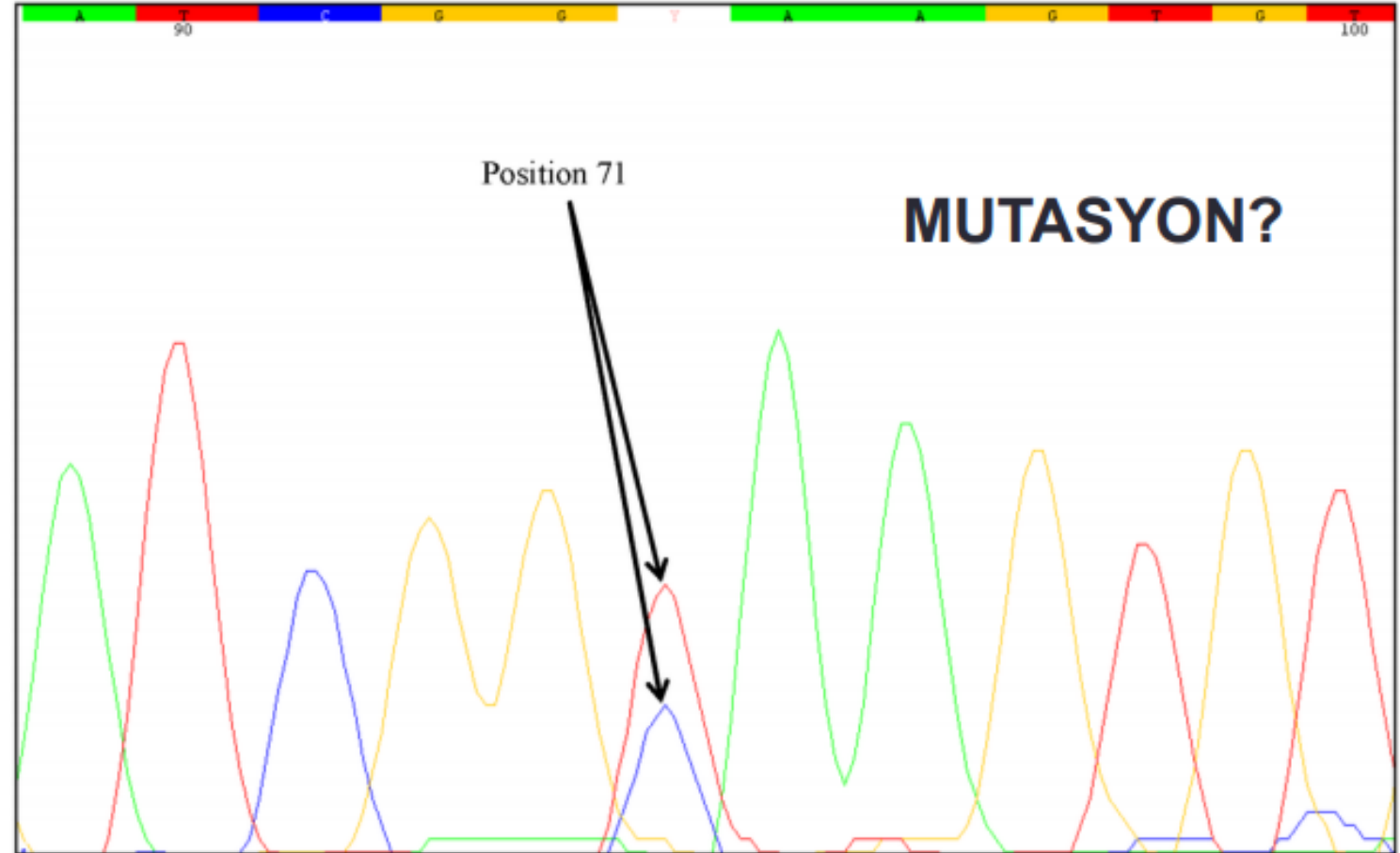
Şekil 10. Sanger sekanslama sonucu cihazdan elde edilen kromatogram



Sekanslama kalitesi!

İdeal ve sekans bilgisine güvenilebilecek bir kromatogramda gürültü az olmalı, pikler birbirinden yeterince ayrı, parçalanmamış ve sıralı bir şekilde görünmeli.

Şekil 11. Sanger sekanslama sonucu cihazdan elde edilen kromatogram



Yeni Nesil Sekanslama (NGS)



Keşfedilmemiş milyarlarca genom ve bilinen genomlardaki “bilinmeyenler”, biyolojik sistemleri tüm resmi görerek ele alma arzusu araştırmacıları daha hızlı ve tercihen daha ucuz sekanslama yapma yönünde motive etmiştir. 1990’ların ortasından itibaren bilinen yöntemlerin dışında, özellikle daha hızlı sonuç verebilecek yeni DNA sekanslama teknikleri ve teknolojileri geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır. Bu yeni teknolojiler, “**yeni nesil sekanslama**” olarak isimlendirilmektedir.

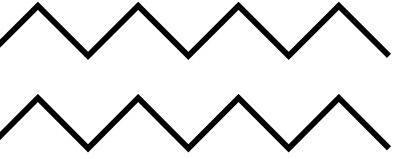


Bu sistemlerin genel özelliği aynı anda birçok DNA polimerini sekanslamalarıdır (massively parallel sequencing).



İkinci Nesil DNA Dizileme Teknolojisi (SGS)

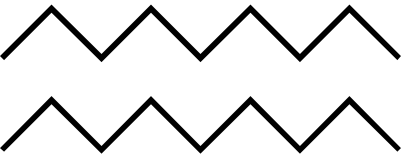
- İkinci nesil DNA dizileme teknolojisi (SGS), birinci nesil dizilemenin yüksek maliyetine ve düşük verimine yanıt olarak 2005 yılında uygulanmaya başlanmıştır.
- Bu sorunu gidermek için SGS uygulamalarıyla, yüksek miktarda DNA molekülü dizileyerek daha yüksek verim elde edilmiştir.
- Birçok SGS teknolojileriyle, özdeş iplikçiklerin yüz binlercesi belirli konumda verilen, tekrarlı yıkama ve tarama işlemlerinden oluşan bir süreçte belirlenmiştir.



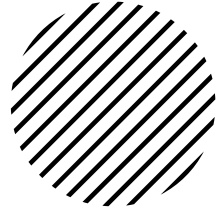
Üçüncü Nesil DNA Dizileme Teknolojisi (TGS)

- Birinci ve ikinci nesil DNA dizileme (SGS) teknolojileri genomik alanında devrim yaratan bir yol açmıştır.
- Çok sayıda bilimsel çalışmalarda şaşırtıcı gelişmelere sebep olmuştur ki bunlar; tüm canlı genom dizisinin anlaşılması ve hangi bilgileri kodladığı, hangi bilgileri taşıdığı, dahası metilasyon düzeylerinin, transkripsiyonun, protein ve DNA'nın aralarındaki etkileşimlerin tam anlaşılması açısından yapılan çalışmalardır.





Üçüncü Nesil DNA Dizileme Teknolojisi (TGS)



- Bununla birlikte üçüncü nesil DNA dizileme (TGS) teknolojileri, mevcut dizileme teknolojilerine yenilikçi, verimli ve daha az maliyet gerektiren bir zemin oluşturmuşlardır.
- Yeni nesil tek zincir molekül dizileme teknolojisi (TGS), daha uzun dizileme ve okuma için potansiyel oluştururken, aynı zamanda maliyeti düşürmekte ve bütün bunlar mevcut dizileme için harcanan vakti azaltmaktadır.

Üçüncü Nesil DNA Dizileme Teknolojisi (TGS)



Mevcut dizileme teknolojilerine karşılık üçüncü nesil dizileme teknolojilerinin avantajları;

- Daha yüksek verim
- Daha hızlı geri dönüş süresi
- Uzun okuma oranları
- Yüksek uzlaşma doğruluğu
- Küçük miktarlarda başlangıç materyali
- Düşük maliyetli olması

Yeni Nesil Dizileme Ne Vadeder?

- Yeni nesil dizileme (NGS), çok farklı bir yaklaşımdır. Bütün genom dizilimi, ekzon dizilimi, DNA-protein ve RNA dizilimi dahil geniş bir uygulama dizisini ifade eder.
- Sanger dizilemesinden daha hızlı ve ucuzdurlar, otomasyona elverişlidirler. Yeni nesil dizilimi kapsayan yöntemler çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Ancak şu anda büyük ölçüde, polony dizilimi, pyrosequencing, boya dizilimi ve ligasyonla dizilimi içerir.



NGS için pek çok uygulama var ve sürekli olarak yeni yöntemler geliştiriliyor.

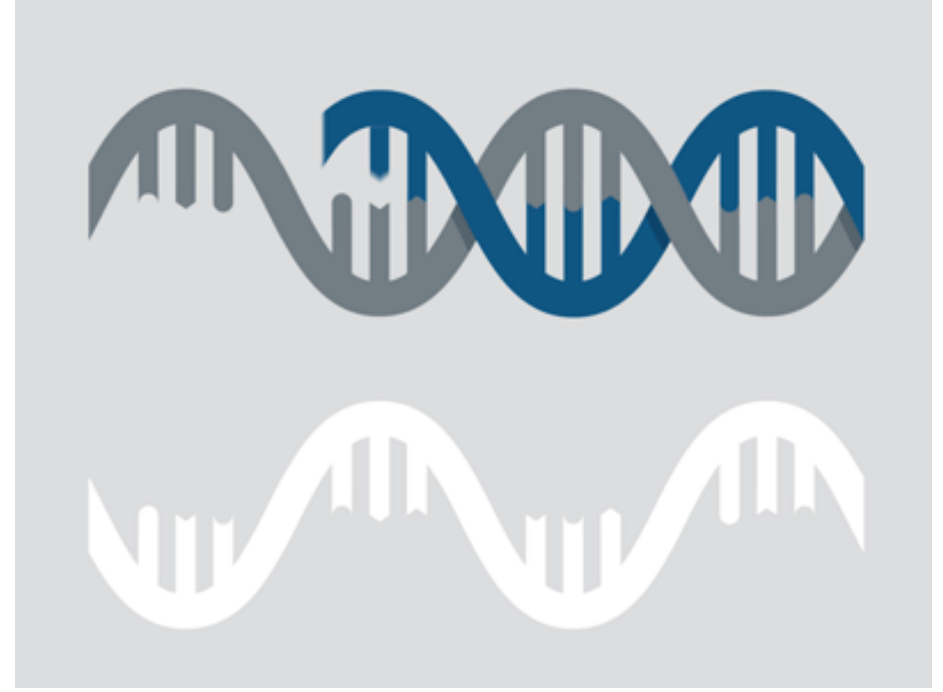
NGS uygulamaları için birkaç sınıflandırma vardır. Bunlar;

(1) Araştırmacılar, bilinmeyen organizmalardan yeni bir genom oluşturmak için kendiliğinden oluşan bir dizi birleştirme yöntemi kullanırlar.

Bu kendiliğinden oluşan genom düzeneği “assembler” olarak adlandırılan bir alet gerektirir. Genom dizisi oluşturmak için bölgeleri üst üste gelecek şekilde hizalayarak yapboz gibi parçalanmış DNA okumaları bir araya getirilir.

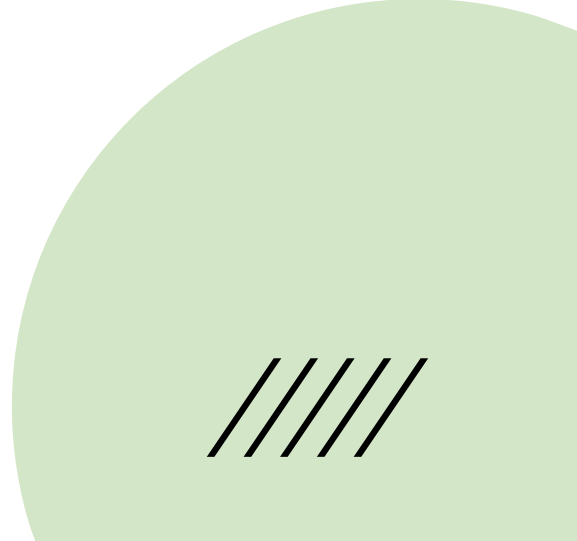
(2)Mevcut bir referans genomu olan bir organizmadan genetik çeşitliliği tanımlamak için DNA dizilimi, RNA dizilimi ve epigenom dizilimi yapılabilir.

DNA dizilimi durumunda, bütün genom NGS teknolojilerinde mevcuttur. Araştırmacılar, dizileme sonuçlarını referans genomlarla karşılaştırarak yapısal değişimleri, kopya numarası değişimlerini ve genetik değişimleri saptayabilirler.

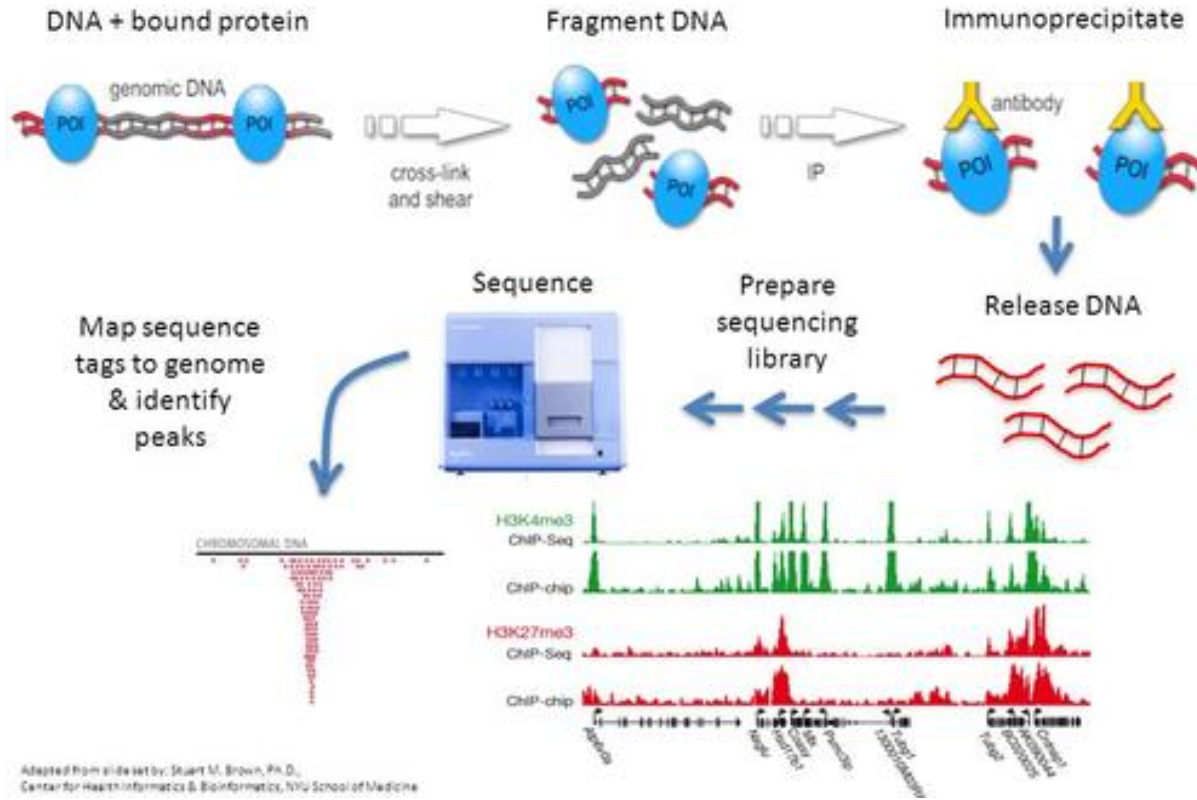


(3) Dizilim ile transkriptom sonuçlarını analiz etmek için RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezlenir.

NGS platformları için piyasada RNA hazırlama kütüphane kitleri vardır. RNA dizilimi, araştırmacıların RNA, gen füzyonu, gen mutasyonu incelemesini sağlar.



ChIP-seq overview



(4) Genomun düzenleyici mekanizmaları için, ChIP-Seq, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerleri gibi protein-DNA etkileşimlerini analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir.

ChIP-Seq, canlı hücrelerde proteinlerin bağladığı **DNA** bölgelerini zenginleştirmek için ilgilenilen proteinler için antikorlar gerektirir. Birçok araştırma makalesi, genom çapında düzenleme ağlarını göstermek ve tahmin etmek için biyoinformatiğe dayalı ChIP-Seq'i kullanmıştır.

- **(5) NGS teknolojileri, mikrobiyal ekoloji bilim adamlarının, çevresel örneklerden gelen genetik materyalleri muazzam bir ölçekte incelemelerine izin veriyor.**
- Bilim adamları çevresel örneklerden çıkarılan DNA'yı kullanabilirler.

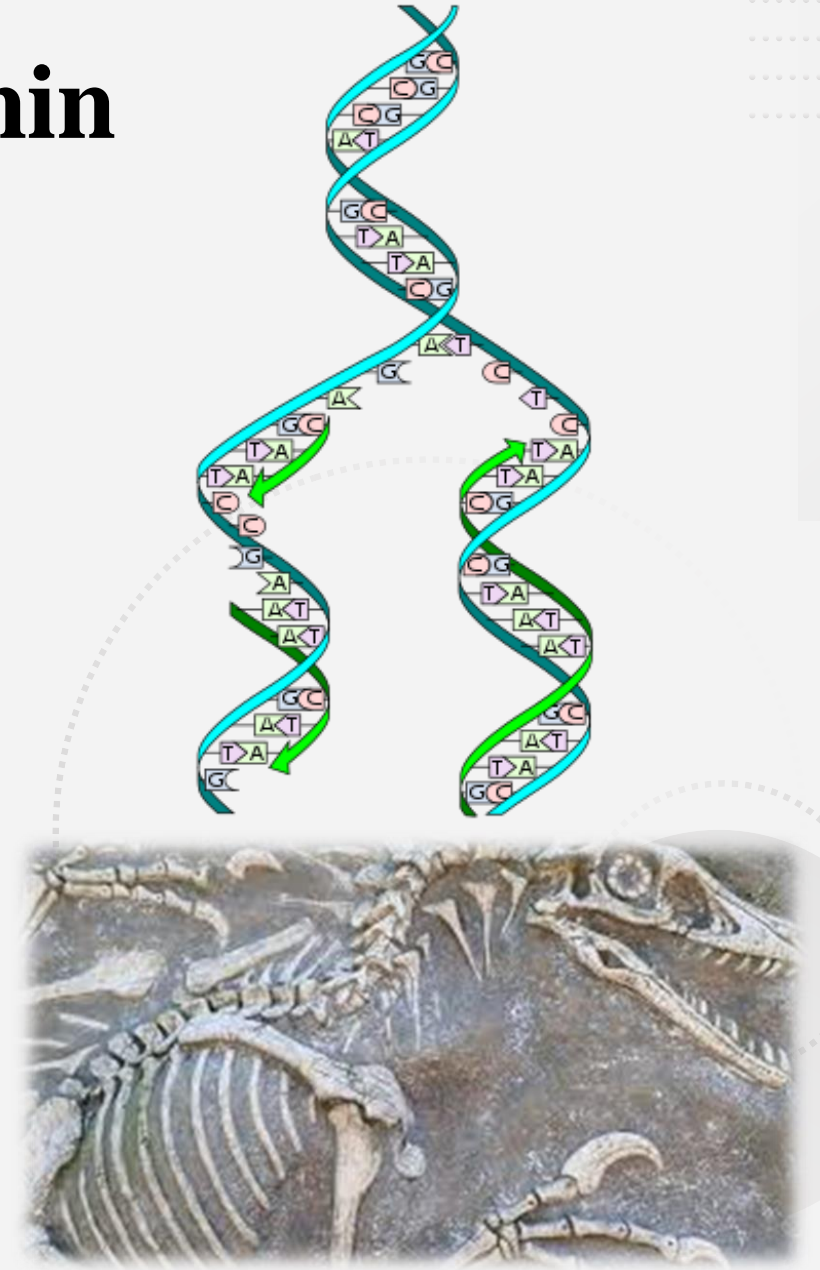


Yeni Nesil Dizileme Teknolojisinin Kullanım Alanları

- ATASAL DNA

Yeni nesil dizileme sistemleri ile fosilden, saç, kemik gibi donmuş veya korunmuş örneklerden elde edilen DNA'ların geniş kapsamlı analizini yapmak mümkündür. Dizileme sonucunda, atasal hedef diziler çevresel kontaminasyondan ayırt edilebilir.

Yapılan bir çalışmada yeni nesil dizileme ile 38000 yaşında Neanderthal fosilinden elde edilen atasal DNA dizilenerek günümüz insan ve şempanze DNA'ları ile karşılaştırılmış ve Neanderthal DNA dizisinin modern insan DNA dizilerinden 500 000 yıl kadar önce birbirinden ayrıldığı tespit edilmiştir.



Yeni Nesil Dizileme Teknolojisinin Kullanım Alanları

• TRANSKRİPTOM

Transkriptom dizileme, mRNA transkripsiyon-ekspresyon analizi, yeni genlerin keşfi, henüz genomu tamamıyla tanımlanmamış organizmalarda gen bölgelerinin tanımlanması, tüm gen dizisinin oluşturulması, tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP) belirlenmesi, insersiyon-delesyonlar ve splicing varyantların tespiti, allel spesifik ekspresyonların analizi ve kromozomal yeni düzenlenmelerin belirlenmesini kapsar.





Yeni Nesil Dizileme Teknolojisinin Kullanım Alanları

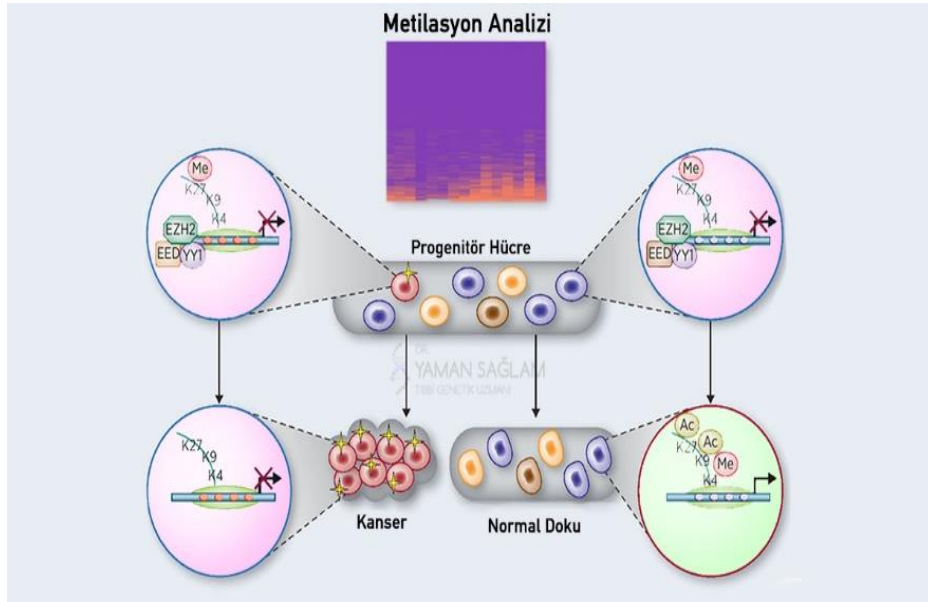
- **SMALL RNA**

Küçük RNA'lar, microRNA'lar, endojen siRNA'lar ve Piwi-interacting RNA'ların dahil olduğu gruptur. Bu sistem sayesinde bakteri içerisinde klonlanma yapılmadan, yüzlerce hatta binlercesi tanımlanabilir ve miktarı belirlenebilir. Daha önce tanımlanmamış küçük RNA'lar tespit edilebilir ve farklı ekspresyon profili çıkartılabilir veya küçük RNA transkriptomları ile karşılaştırılabilir.

Yeni Nesil Dizileme Teknolojisinin Kullanım Alanları

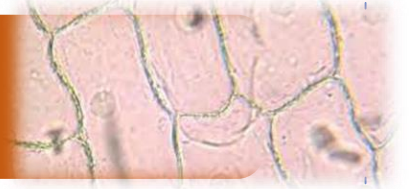
• METİLYASYON ANALİZİ

Gen aktivasyonunun epigenetik düzenlenmesi, gelişimsel süreçte son derece önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, DNA metilasyonundaki değişikliklerin kanser, nörolojik hastalıklar (Şizofreni, Alzheimer) ve kardiyovasküler hastalıklar (Ateroskleroz, Homosisteinemi) ile ilişki olduğunu göstermiştir. Genom boyu metilasyon kaybı ya da bazı genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu, bu hastalıkların gelişiminde son derece önemlidir. Kanserlerin ailevi formlarıyla ilişkili genlerin yaklaşık % 50'sinde promotor hipermetilasyonu görülmüştür. Bu sistem ile hedef genomik dizideki metilasyon belirlenir. Ayrıca hipermetile olan CpG dinükleotidlerinde birbirleri arasında metilasyon farkları da tespit edilebilir.

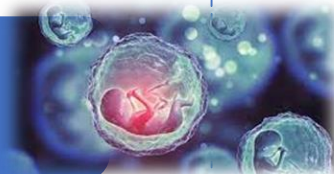


Yeni Nesil Dizileme

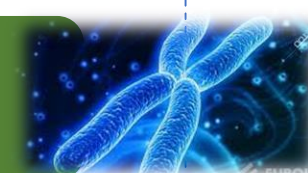
Günümüze kadar NGS ile yapılan çalışmalar daha çok kan örneklerinden veya epitel hücrelerinden elde edilen genomik DNA örneklerinde yapılmıştır.



Bu yöntemin tüp bebek embriyolarında kullanılması ile ilgili olan tecrübeler henüz sınırlı olmakla birlikte yakın bir zaman önce NGS yöntemi kullanılarak elde edilen ilk canlı doğum Amerika Birleşik Devletleri'nde rapor edilmiştir.



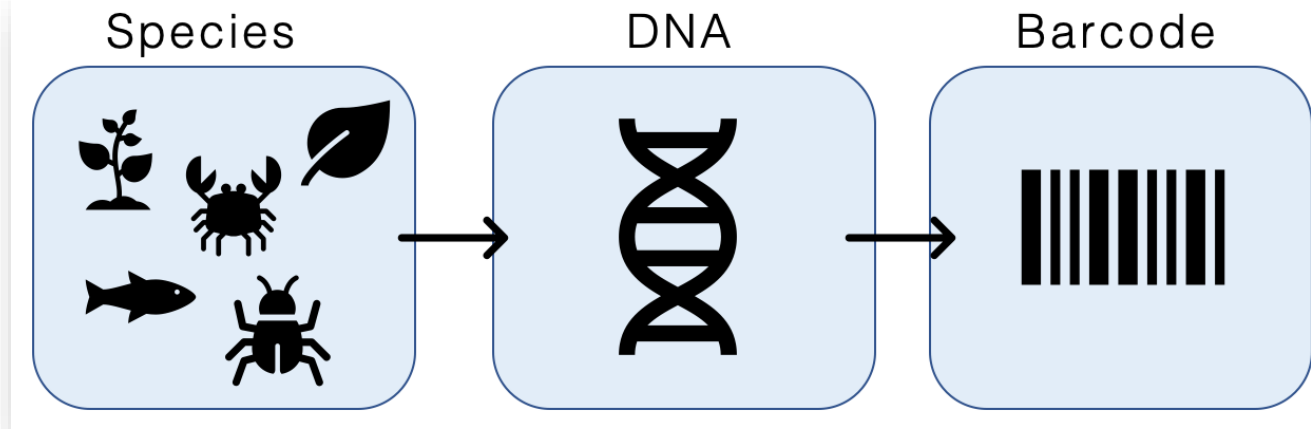
Bu sonuca göre bu yöntemle doğan bebek yaklaşık 3000'den fazla tek gen hastalığı açısından test edilmiş, kromozom sayıları analiz edilmiş ayrıca sonradan bebekte çıkabilecek birçok genetik hastalık açısından da taranmıştır.



Bazı etik tartışmaları da beraberinde getirecek olan bu en gelişmiş genetik analiz yöntemi, gelecekte maliyetleri düşürmesi ve çok kapsamlı bilgi elde edilebilmesi açısından diğer yöntemlerin yerini alacak, bir zamanlar hayal olan birçok test veya analiz embriyolar üzerinde aynı anda ve kısa bir süre içinde yapılmaya başlanacaktır.

Yeni Nesil Dizileme

- NSG, DNA'yı oluşturan nükleotidlerin sıralarını yani nasıl dizildiklerini belirler.
- NGS'de daha önceki genetik dizileme tekniklerinden farklı olarak, paralel birçok dizileme reaksiyonu aynı anda yapılarak yüksek hacimli ve hızlı sonuç alınmaktadır. Yüksek hacimli bir analiz yöntemi olmasının yanı sıra barkod yöntemi ile DNA parçalarının hangi örneğe ait olduğu kolayca takip edilmekte ve bu sayede aynı reaksiyonda onlarca örnek bir arada çalışılıp örnek başına maliyet düşürülmektedir.



- **Yeni nesil dizileme şu basamaklarda açıklanabilir:**

Kütüphane hazırlanması "Library preparation"

- Sekanslama öncesi ilk olarak organizmaların DNA'sı izole edilir. İzole edilen DNA'nın YNS cihazında kullanılabilmesi için geçmesi gereken bir dizi işleme kütüphane hazırlama (library preparation) işlemleri denir.
- Sekanslama işleminin gerçekleşmesi için her bir DNA dizisinin parçalanarak boyutunun küçültülmesi ve sekanslama ortamına sabitlenmesi/iliştirilmesi gerekir. Sekanslanacak DNA'nın boyu uzadıkça hem bazların okuma hassasiyeti düşer hem de enzimatik nedenli hata miktarı artar. Bu nedenle birçok cihazın güvenilir okuma sağlayabildiği azami uzunluk 400-600 baz arasında değişir.
- Her bir DNA parçasının sekanslanması sonucu elde edilen DNA dizilimine okuma [read] adı verilir.

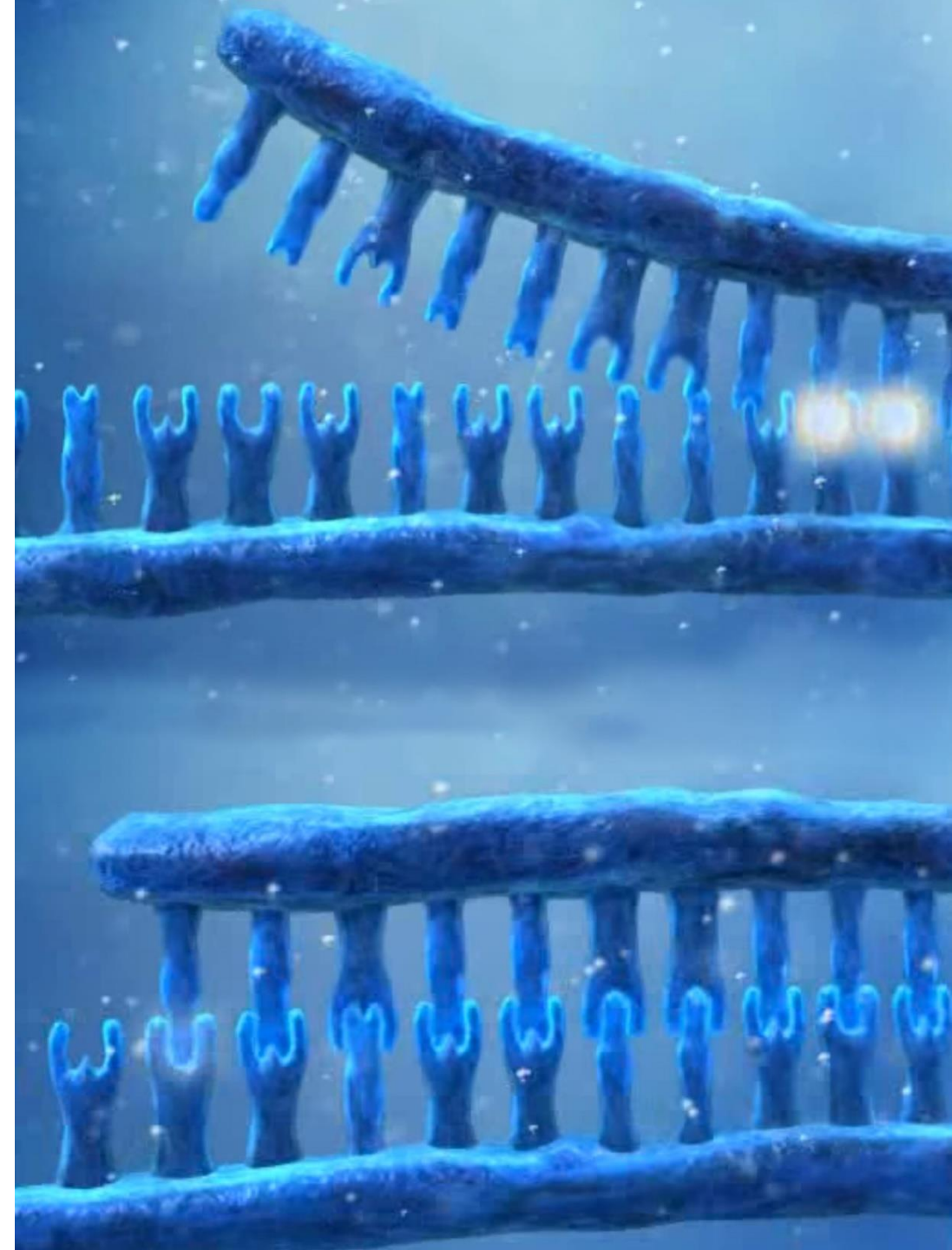
Yeni Nesil Dizileme İş Akışı

Bu aşamada sekanslanacak DNA'nın kullanılacağı teknolojinin izin verdiği boyutlara küçültmek için kullanılacak birçok yöntem var. Bunlardan günümüzde en sık kullanılanı transpozonlar ile DNA'yı parçalara ayırmadır.

Uzunluğu ayarlanmış DNA parçalarının NGS cihazına yüklenmesi için bir aşamaya daha ihtiyaç var. DNA parçalarını bir yüzeye sabitlemek veya bir nanopora yönlendirmek için her iki ucuna da birer adaptör takılır. Adaptör olarak ifade edilen kısım, dizilimi önceden bilinen bir oligonükleotittir.



- Kütüphane hazırlama aşaması “indeks ekleme” basamağı ile sonlandırılır. Eğer tek bir örnek sekanslanıyorsa indeks ekleme basamağı atlanarak, hazırlanan kütüphaneyi doğrudan NGS cihazına yükleyebilirsiniz. Ancak birden fazla örnekle çalışılıyorsa bu durumda DNA'ların bir veya iki ucuna birden o örneğin belirteci olan 6-8 bazlık bir oligonükleotit daha eklenerek DNA örnekleri sekanslanmaya hazır hale getirilir.



Yeni Nesil Dizileme İş Akışı

Yeni nesil dizilemede DNA sentezi ve okuma işlemi aynı anda gerçekleşir ve eş zamanlı olarak bir çok dizileme yapılır.

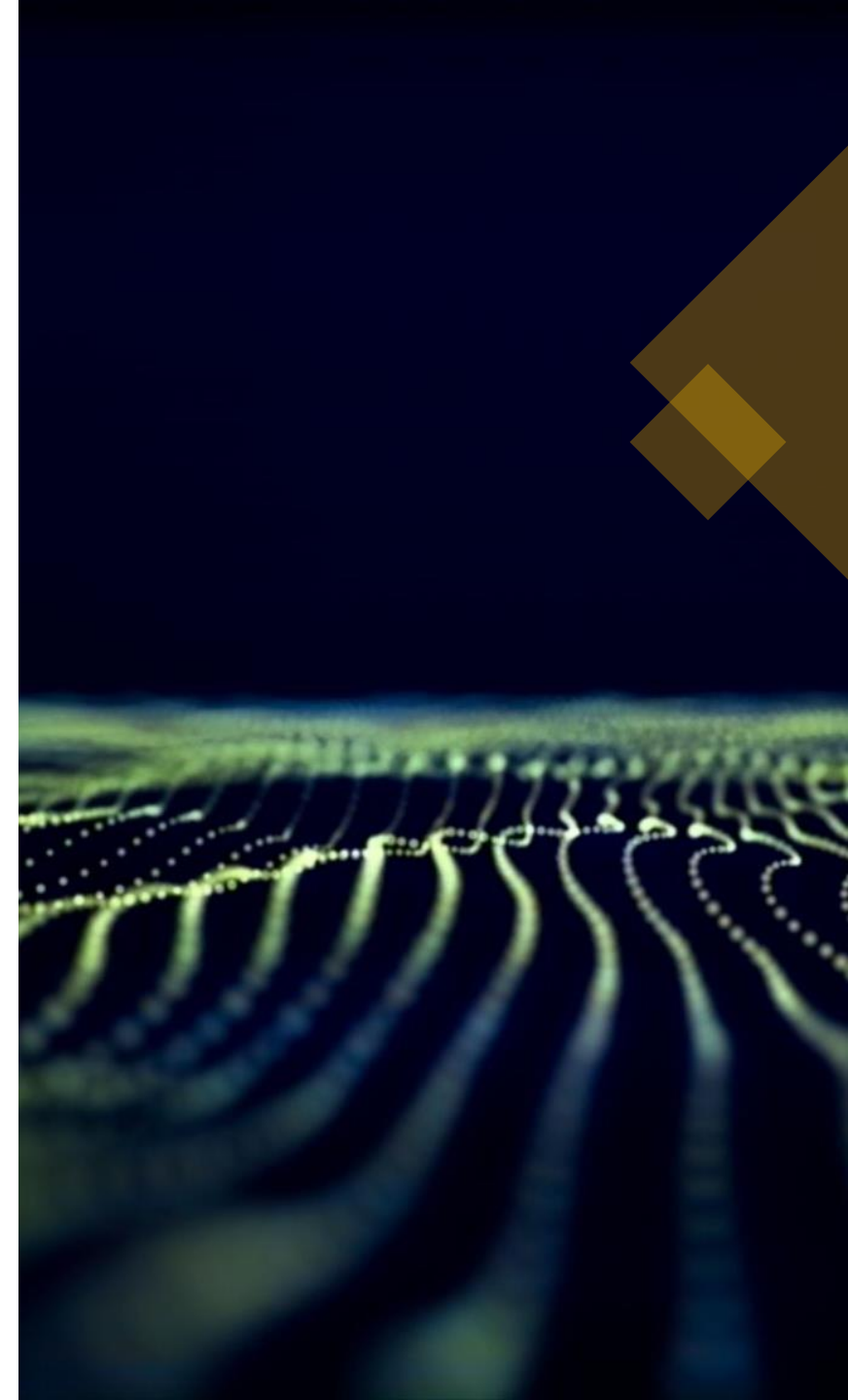
Kısa ve/veya hatalı okumanın ana nedeni de bu işlem sırasındaki desenkronizasyondur.

Yeni Nesil Dizileme İş Akışı

Reaksiyon sonlandıktan sonra bilgisayarda kompleks biyoinformatik analizler yapılır.

Bu sırada aynı bölgeyi kapsayan 10-20 adet dizileme reaksiyonu sonucu üst üste getirilmekte ve herhangi bir nükleotit değişikliğinin olup olmadığı referans dizisiyle birebir kontrol edilip ortaya çıkarılmaktadır.

Böylelikle aynı anda hem mutasyon analizi hem de kromozomların sayısındaki artma ve azalma tespit edilir.



1. NESİL DİZİLEME

- Sanger Metodu
- Maxam – Gilbert Metodu

2. NESİL DİZİLEME

- Pirodizileme Metodu
- Ligasyon Yoluyla Dizileme
- Ion Torrent
- Illuminia Genome Analyzer
- Roche 454 Genome Analyzer
- Solid Dizileme
- Nano Dizileme

3. NESİL DİZİLEME

- Tek İplikli DNA Molekülünün Real Time (SMRT) Sekansı
- Floresan Rezonans Enerji Akımı (FRET) Kullanan Real Time DNA Sekanslama Yaklaşımı
- Elektron Mikroskopu (TEM)'na Dayalı DNA Sekanslama Yaklaşımı
- Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM/STM)'na Dayalı DNA Sekanslama Yaklaşımı
- Nanopor Teknolojisi ile DNA Sekanslama

Pirodizileme Metodu

Sentez yoluyla dizileme yöntemi kullanılır.

Temeli, DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitine dayanır.

Dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın tek sarmalı (ssDNA) üzerinde tamamlayıcı sarmalının (complementaryDNA/cDNA) sentezlenmesi şeklindedir.

Elimizde çift zincirli DNA olsa dahi H bağlarının kırılarak tek zincirli hale geçmesi gerekir. Bunun için DNA (400-800 bp'lik) küçük fragmentlere ayrılır.

Bu fragmanlara dizileme primerlerini taşıyan adaptörler eklenir. Adaptörleri taşıyan DNA fragmentlerinin mikroreaktörler içerisinde emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu (em-PCR) gerçekleşir.

5'-3' ucuna adaptör bölgeler eklenerek seçici hale getirilir. (çünkü adaptör bölgesinin dizisi biliniyor)

Adaptör bölgelere primerler bağlanır.

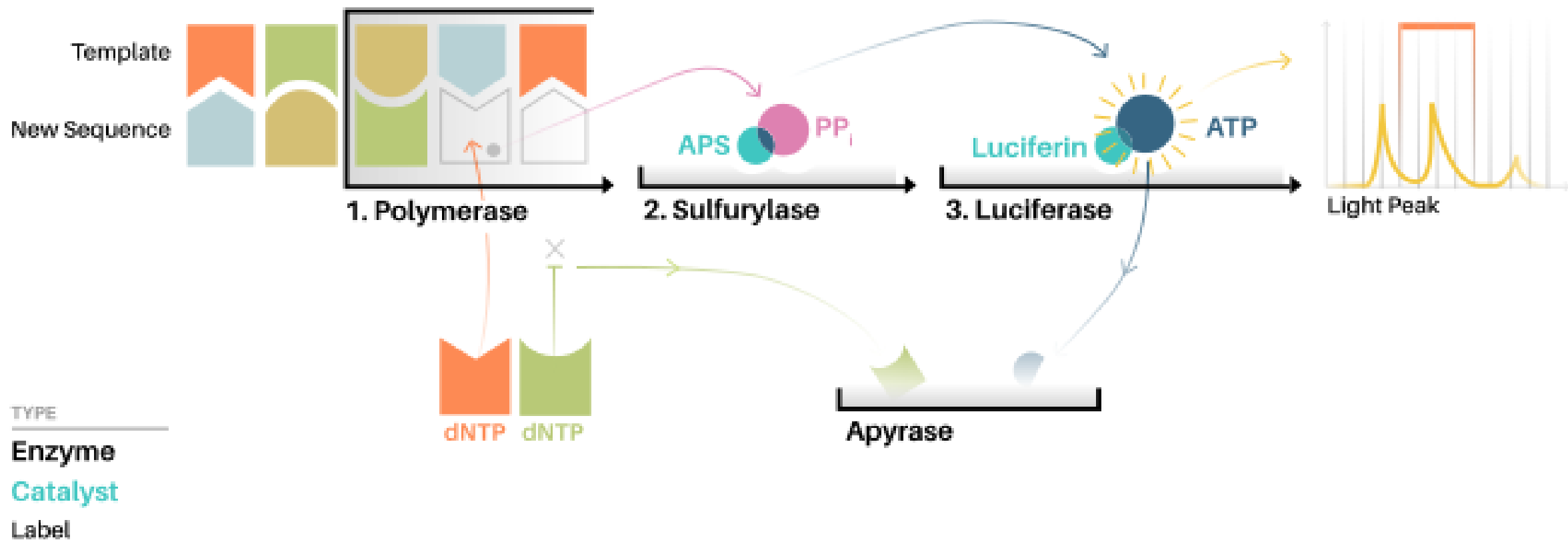
Bu aşama sonucunda yaklaşık 10 milyon kopya çıkarılır. Yaklaşık 3,6 milyon kuyu içeren bir plate'de dizilenir.

Dizileme primerleriyle sabitlenen tek sarmallı kalıp DNA üzerine ardışık olarak akan A,G,T,C nükleotitlerinin kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olması durumunda ortamda bir ışık oluşur.

Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi nükleotidin bağlanması sırasında oluştuğu tespit edilir, CCD kamera tarafından kaydedilir ve bilgisayar program yardımıyla dizi verilerine (flogram) dönüştürülür.

Bu yöntem ile klonlama yapmadan 7,5 saatte 100-150 milyon bazlık dizileme yapmak mümkündür.

Pirodizileme Metodu



Ligasyon Yoluyla Dizileme

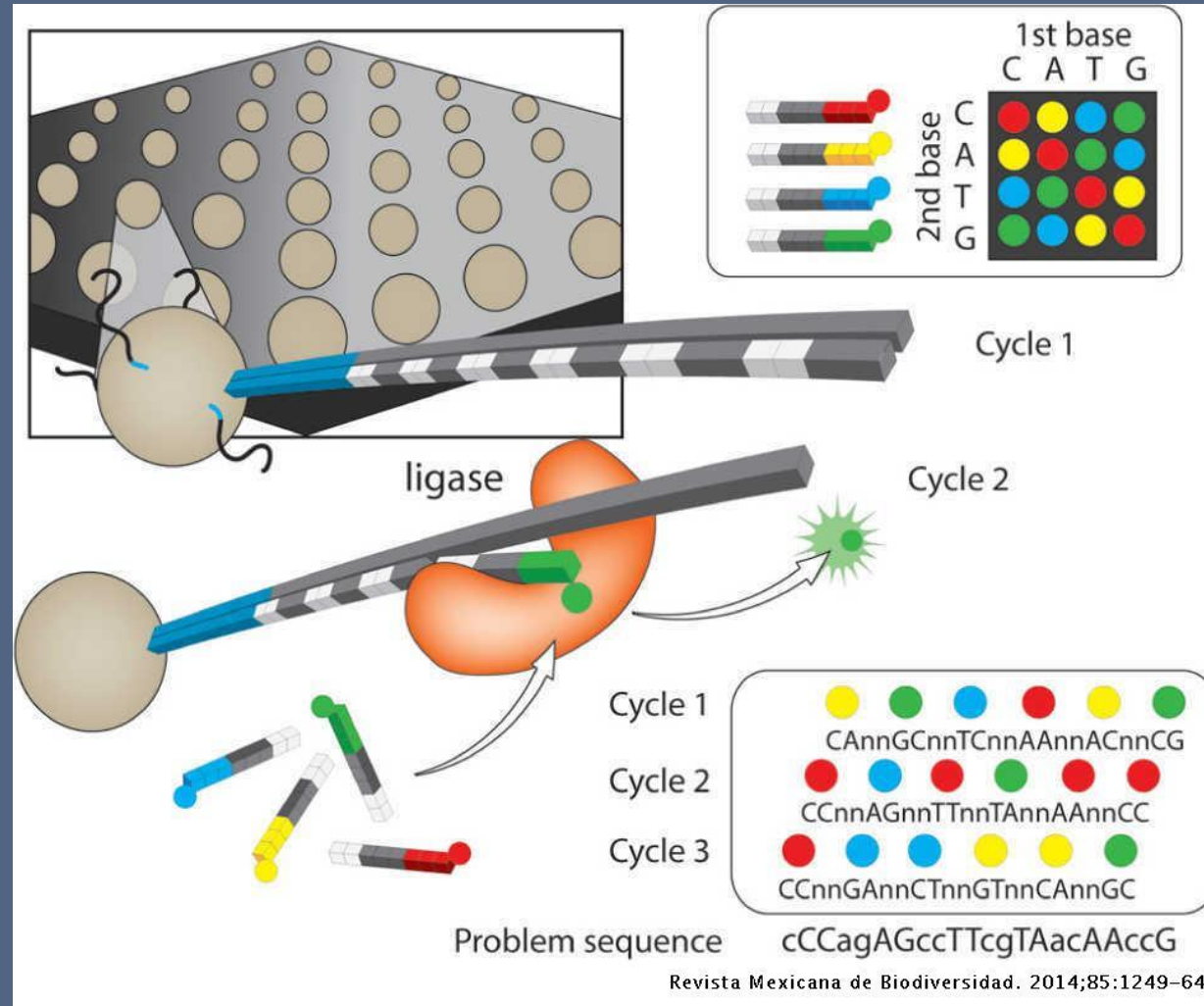
Bu dizileme yönteminde, pirodizilemedeki gibi em-PCR yapılır. Pirodizilemede olduğu gibi primerler, adaptör diziler yardımıyla kalıp ipliğe hibridize olur.

Bu metotta diğerlerinden farklı olarak DNA polimeraz yerine DNA ligaz kullanılır. Floresan işaretli oligonükleotitlik proplar kullanılır, proplar kalıp DNA'ya hibridize olur ve primerlerle ligasyona girer.

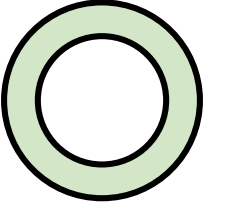
Floresan delesyonundan sonra, oligonükleotit propların işaretli 5' fosfat ucu kesilerek yeni bir ligasyon siklusuna geçilir.

Ligasyon deteksiyon ve ayrılma, sikludan tekrarlanarak DNA dizisi belirlenir.

Ligasyon Yoluyla Dizileme



Bu metod DNA'nın polimerizasyonu sırasında ortaya çıkan H iyonlarının saptanmasına dayanır.



Tek bir kalıp DNA dizisini içeren mikro kuyuya tek tip nükleotit akışı uygulanır.

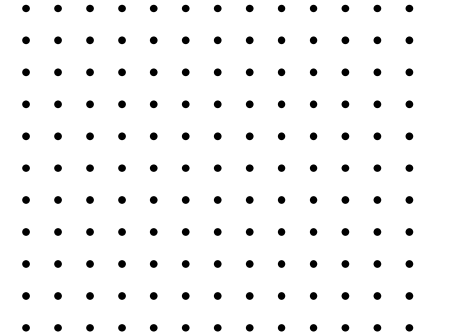
Verilen nükleotit, kalıp ipliğe komplementer olduğu durumda yeni oluşan ipliğin yapısına katılır ve H iyonu salınımı olur. H iyonları hipersensitif iyon sensörleri tarafından algılanır.

Kalıp DNA'da homopolimer tekrarların varlığı durumunda tek siklusta birden fazla nükleotit yeni ipliğin yapısına girer ve salınan H iyonlarının sayısına göre daha fazla elektronik sinyal elde edilmesiyle DNA dizisi belirlenir.

Her bir nükleotit kuyucuğu farklı ve çıkan H iyonu belirlenerek dizileme gerçekleşir.

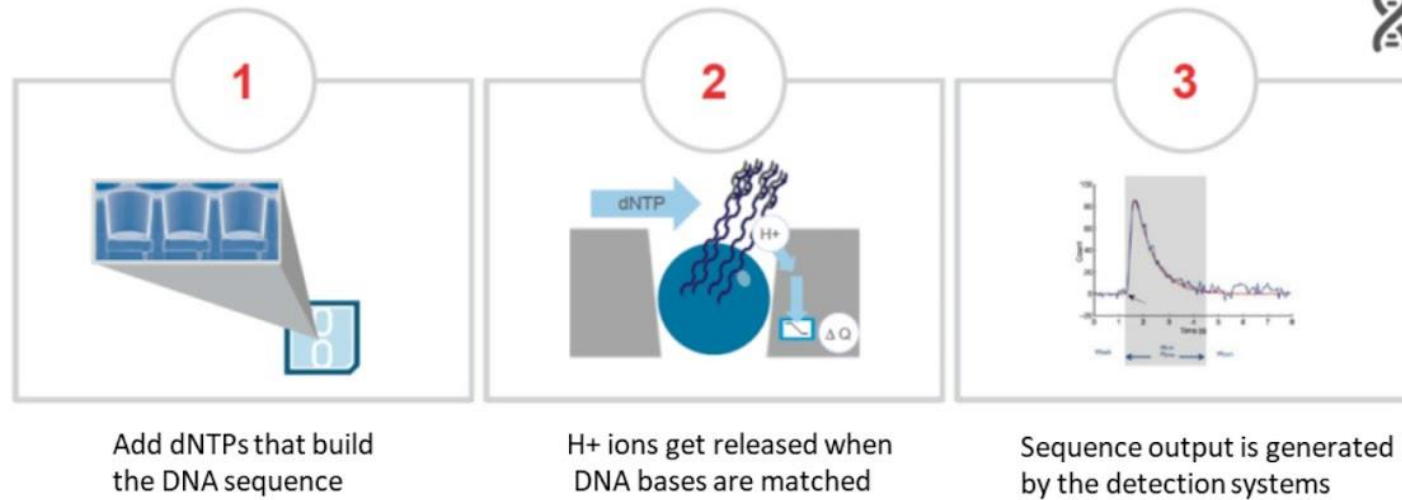
DEZAVANTAJI: Homopolimer tekrarlarının delesyonu

Ion Torrent



Ion Torrent

Principles of Ion Torrent Sequencing



Illumina Genome Analyzer



Sentez yoluyla dizileme yöntemi kullanılır.



100-150bç'lik okumalarda kullanılır. Solexa, tersinir boya sonlandırıcılarına dayanan dizileme teknolojisini geliştirmiştir.



DNA molekülleri bir lam üzerindeki ana parçalara bağlanır. Sonra çoğaltılarak yerel klonlanmış koloniler oluştururlar.



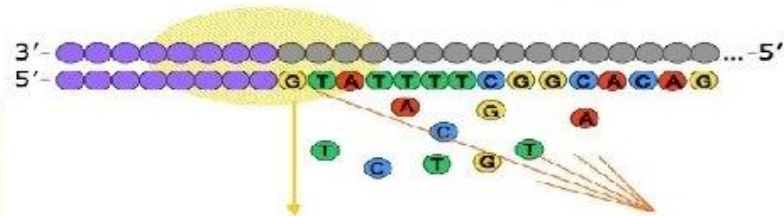
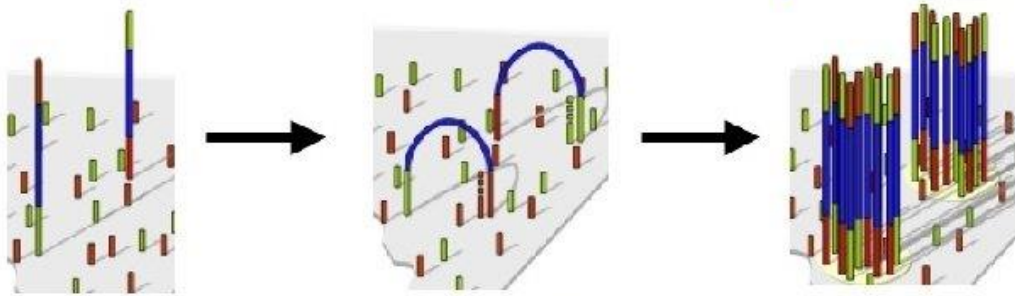
4 tip baz eklenir, dahil edilmeyen nükleotitler yıkanıp atılır.



Bir kamera ile floresan işaretli nükleotitlerin resmi çekilir. Sonra 3. Karbona yerleştirilmiş olan zincir uzamasını durduran madde ve floresan boya birlikte kimyasal olarak çıkarılır ve bir sonraki döngü başlar.

Illumina Genome Analyzer

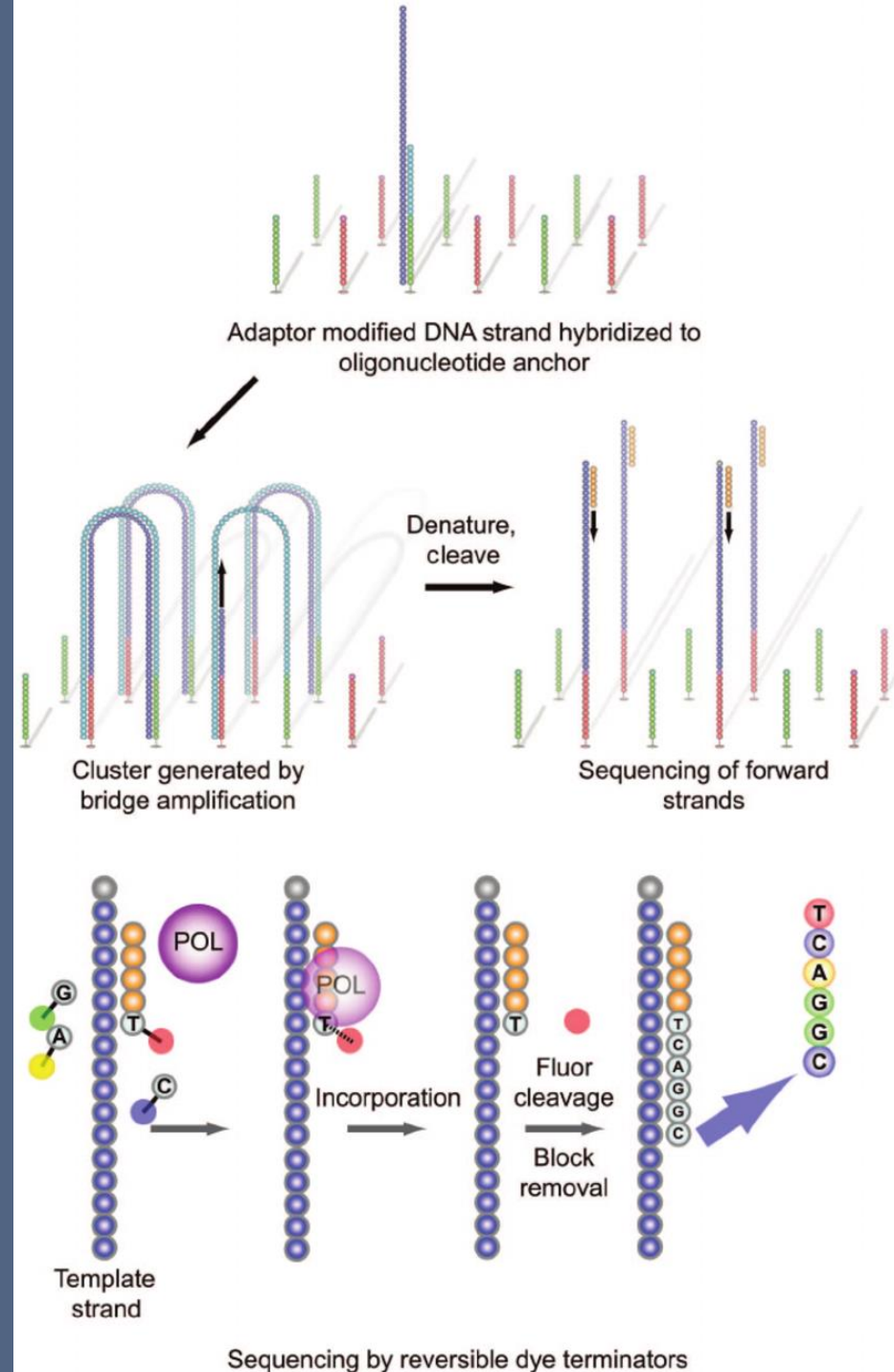
Illumina Genome Analyzer

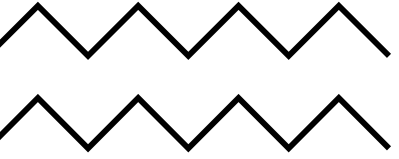


- Cycle 1:** Add sequencing reagents
First base incorporated
Remove unincorporated bases
Detect signal
- Cycle 2-n:** Add sequencing reagents and repeat



Richard K. Wilson





- Illuminia'dan daha uzun okumaları sekanslayabilir.
- Adaptörler uçlara eklenir ve her bir DNA fragmenti başına bir boncuk olacak şekilde boncuklara bağlanır.
- Parçacıklar daha sonra adaptöre, spesifik primerler kullanılarak PCR ile amplifike edilir.
- Her bir boncuk daha sonra tek bir oyuğa yerleştirilir. Böylece her kuyu, tek bir dizinin birçok PCR kopyasıyla kaplı tek bir boncuk içermiş olur.

Roche 454 Genome Analyzer



Solid Dizileme



Applied Biosystems'in SOLID teknolojisinde **bağlanma yoluyla dizileme yöntemi** kullanılır.



Burada belli uzunluktaki tüm olası oligonükleotitlerin bir karışımı, dizilenen konuma göre işaretlenir.



Oligonükleotitler ayarlanır ve ligasyona uğrar. DNA ligazın birbirleriyle eşleşen dizileri, bağlanma tercihi nedeniyle o pozisyon için bilgilendirici bir sinyal verir.



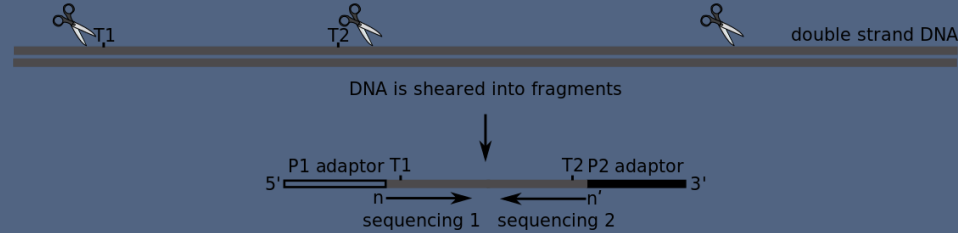
Dizilenmeden önce DNA, PCR ile çoğaltılır. Elde edilen genomların her birinde aynı DNA'nın kopyaları bulunmaktadır. Bu parçalar bir cam lamın üzerine yerleştirilir.



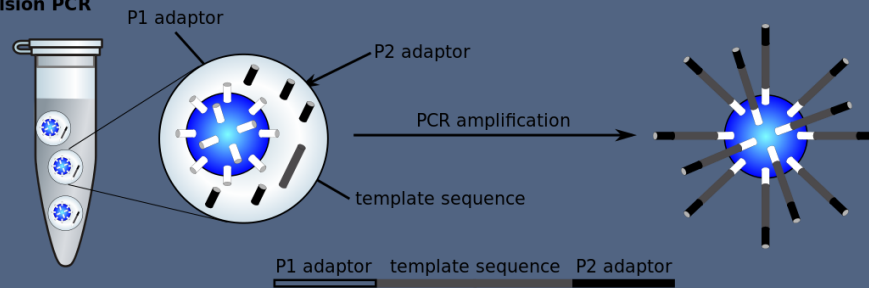
SONUÇ: Illuminia dizilemesine benzer sayı ve uzunluklarda diziler elde edilir.

Solid Dizileme

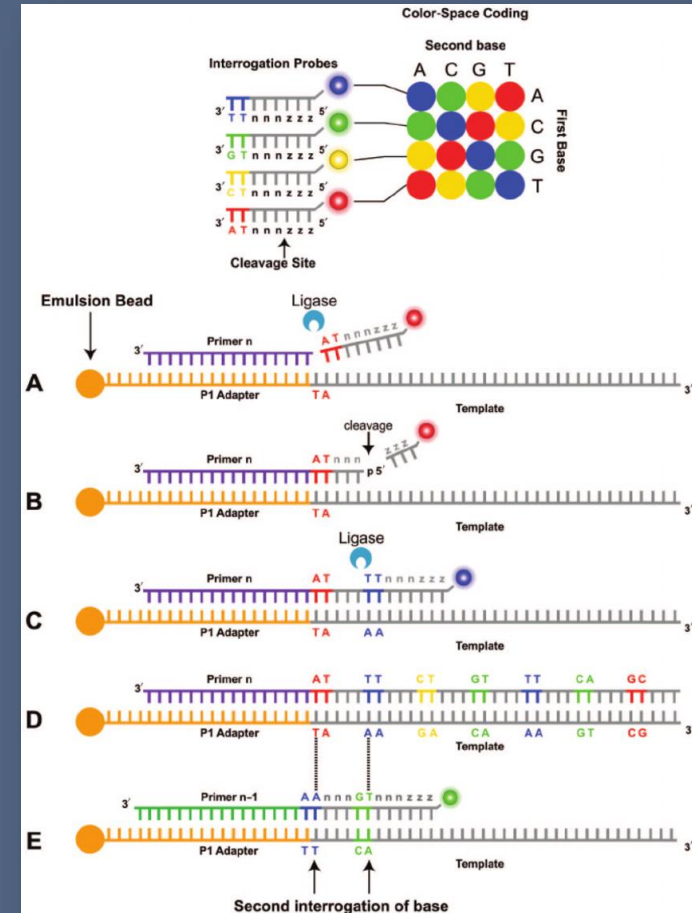
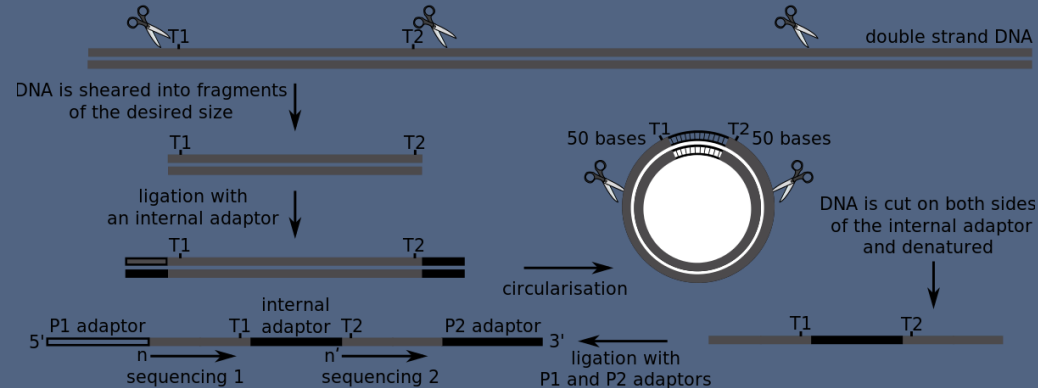
(A) Single-end and paired-end sequencing



(B) Emulsion PCR



(C) Mate-pair sequencing



Nano Dizileme

- Bu yöntem de **sentez yoluyla dizileme** esasına dayanır.
- Direk moleküler sensör olarak, biyomühendislikte üretilmiş farklı bir polimeraz ve dNTP'ler kullanılır.
- Her bir nano makinede tek bir DNA molekülünün sentezi gerçek zamanlı olarak izlenebilir.



Tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) sekansı

3. nesil DNA dizileme teknolojileri için geliştirilen ilk yaklaşımdır.

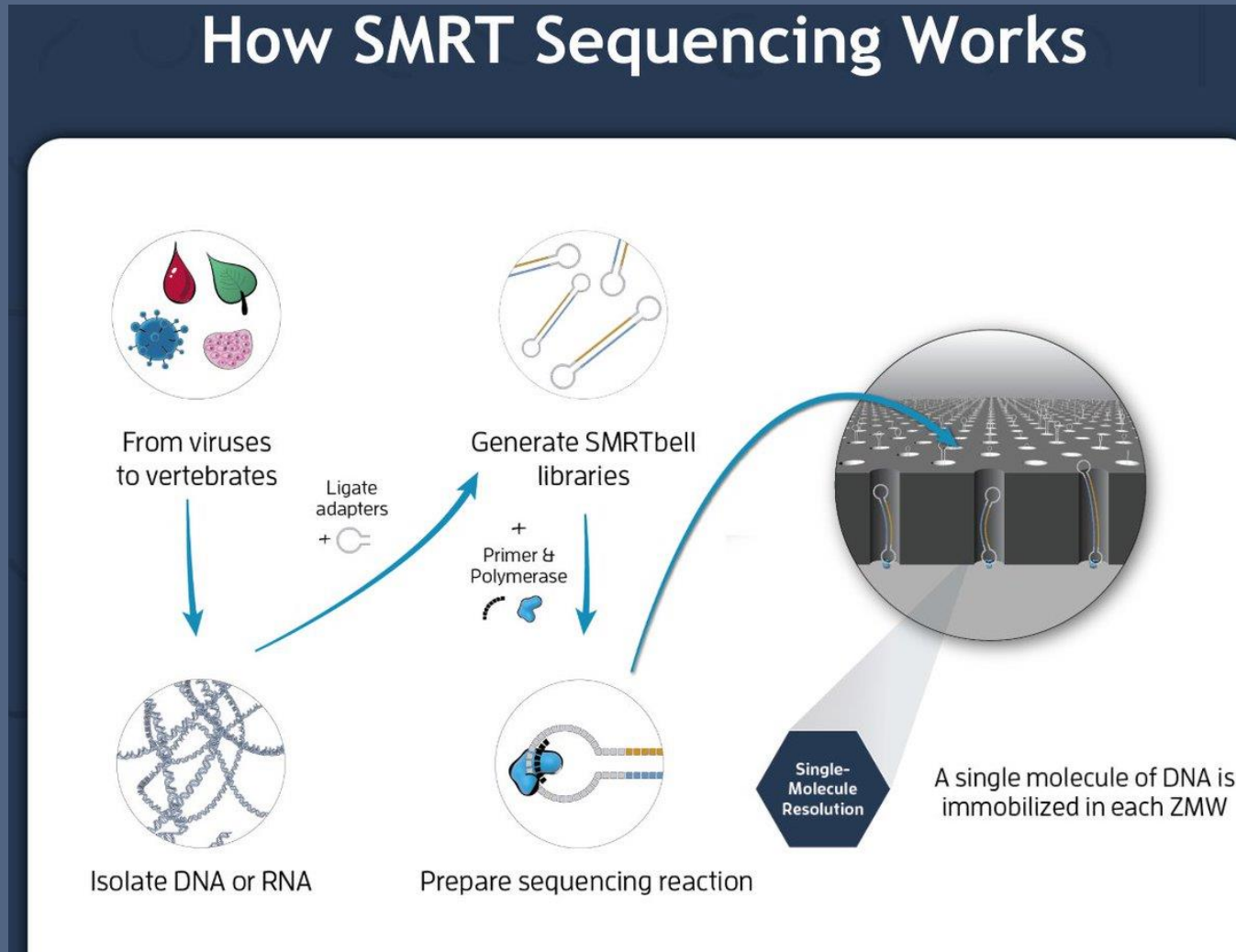
Bu yaklaşım DNA polimeraz enziminin hız ve üretim kapasitesine doğrudan etki ederek 2. nesil DNA dizileme teknolojilerinin birçok eksikliğini tamamlamıştır. Fakat yine de Real Time ile yapılan DNA sentezinin direkt gözlemini etkinleştirmek için üstesinden gelinmesi gereken 2 önemli engel vardır;

Kalıp DNA şablonuna göre, ilgili bazın birleştirilmesinde, doğru bazın eklenmesi için ihtiyaç duyulan sinyal eşik değerinin aşılması esnasındaki gözlemlenebilir seviyenin enzim kontrolü altında sınırlandırılabilmesi

Sentez işlemi esnasında, nükleotitlerin kalıp DNA'ya doğru, sırayla sentezlenmesini sağlamak amacıyla, nükleotitlerin etiketlenmesinde kullanılan nükleotit boyalarının, birleştirme esnasında ayrılırken yaydıkları ışınlar sınırlandırılan seviyede kalmayabilir ve sinyal eşik değeri seviyesini bozabilir.

Tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) sekansı

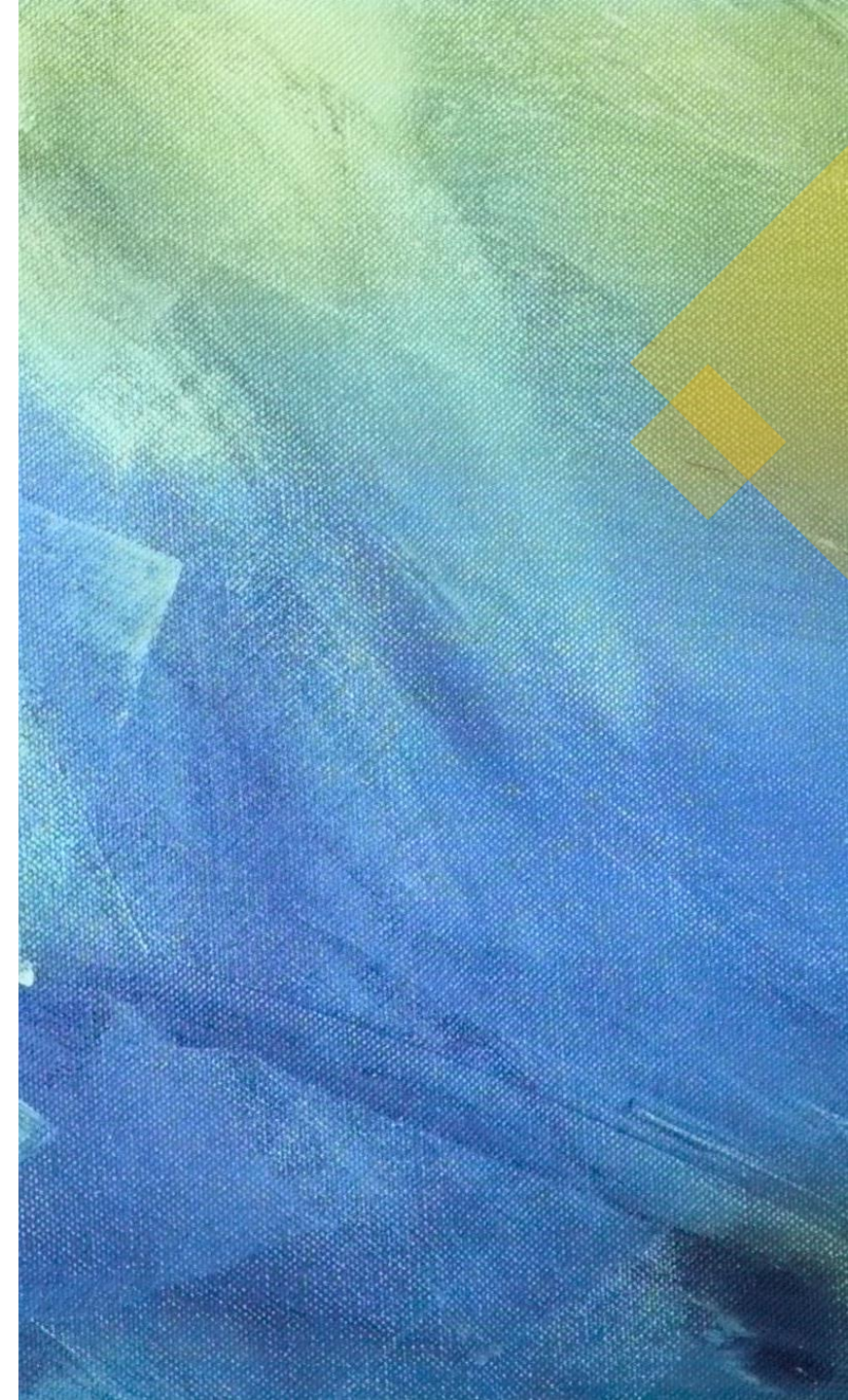
How SMRT Sequencing Works



Tek iplikli DNA molekülünün Real Time (SMRT) sekansı (devam)

DNA sentezi boyunca, büyük bir nükleotit havuzundan nükleotitlerin tek tek alınarak doğru sıraya göre birleştirilmesi ve karşılaşılan bu 2 sorunun çözülmesi için, sıfır dalga boyu (Zero Mode Waveguides/ZMW) teknolojisi geliştirilmiştir. ZMW teknolojisi, basit bir mikrodalga fırının kapağındaki koruyucu ekranın var olma prensibiyle çalışmaktadır. Bu ekran, mikrodalgaların dalga boyundan çok daha küçük olan porlara sahiptir. Bu porlar, sahip oldukları boyutlar sayesinde çok daha uzun dalga boylarını geçirmeyerek, ekrana nüfus etmesini önüyor. Böylece sadece istenilen dalga boyuna sahip ışınların geçmesi sağlanır.

Diğer sorunun çözülmesi ise nükleotit etiketleyici boyalar, bazların aksine fosfat zincirlerine bağlanır. Doğal bir süreç içerisinde etiketlenmiş nükleotit, DNA zincirine bağlandığında etiketleyici bu boyalar, DNA polimeraz tarafından fosfat zincirinden ayrılır. Ayrılan bu boyalar, difüzyonla herhangi bir etki yaratmadan ortamdaki uzaklaştırılırlar. Böylece etiketleyici boyalardan kaynaklanan sorun da ortadan kalkmış olur.



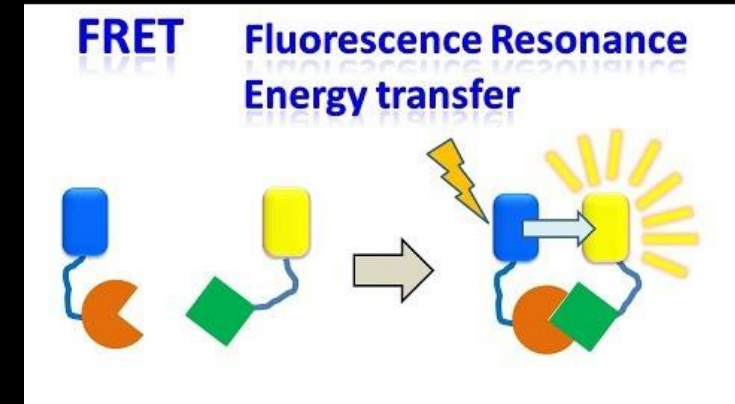
Floresan Rezonans enerji akımı (FRET) kullanan Real Time DNA sekanslama yaklaşımı

Visigen biyoteknoloji sistemleri, DNA polimerazın florofor boyaıyla etiketlenmiş nükleotitlerinin yaydığı floresan rezonans enerji aktarımı (FRET) sinyallerini tanıması üzerine yenilikçi yaklaşımlar sunmuştur.

Nükleotitlerin birleşmesinden sonra nükleotitler üzerindeki florofor etiketler ayrılır.

Bu tür bir yaklaşım, saniyede milyonlarca bazı taşıma potansiyeline sahip yüksek teknolojiler için imkan verebilmekte, fakat şu an için bunun ölçümü çok zordur.

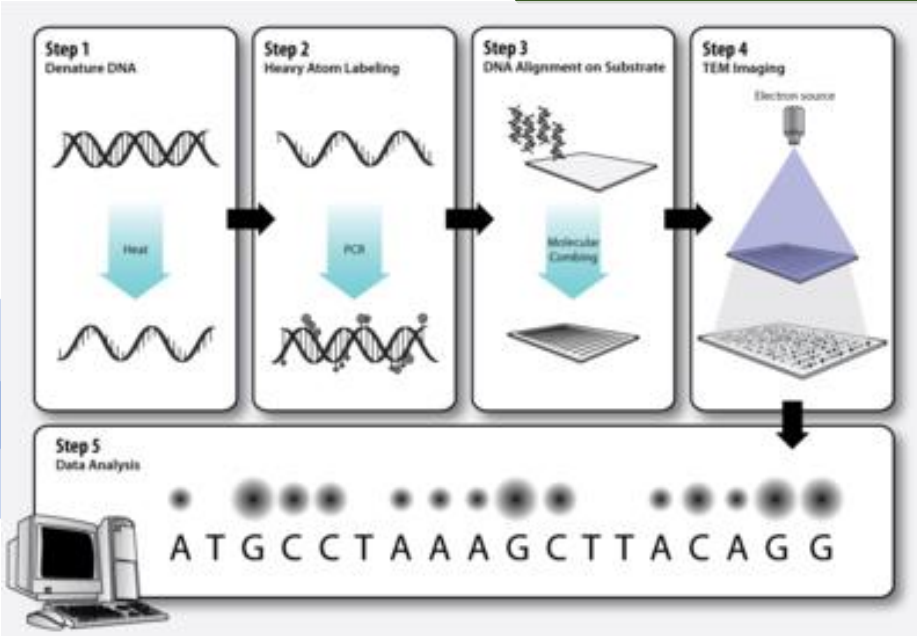
Uygulanabilirliğini gösteren bilimsel bir çalışma ve yayın henüz bulunmamaktadır.



Elektron mikroskopu (TEM)'na dayalı DNA sekanslama yaklaşımı

HALCYON MOLEKÜLER; DNA İPLİĞİNDEKİ NÜKLEOTİTLERİN KİMYASAL YAPILARINA BAKILARAK TEK TEK TANINMASI VE DİREK GÖRÜNTÜLENMESİ YÖNÜNDE ELEKTRON MİKROSKOPUNU KULLANAN İLK YAKLAŞIMIN SAHİBİDİR.

HALCYON MOLEKÜLER, TEM TEKNOLOJİSİNİN ÖTESİNDE, DİREKT OLARAK ELEKTRON MİKROSKOBU KULLANARAK GÖRÜNTÜLENEN DNA DİZİSİNDEKİ NÜKLEOTİTLERİN FONKSİYONEL İĞNELER KULLANILARAK, TEK TEK BİR SUBSTRAT ÜZERİNE TUTTURULMASI YÖNÜNDE DESTEKLEYİCİ TEKNOLOJİLER GELİŞTİRMIŞTİR.



ANCAK ŞİMDİYE KADAR BU TEKNOLOJİNİN KULLANILDIĞI HERHANGİ BİR ÇALIŞMA BULUNMAMAKTADIR. FAKAT BU ÖNGÖRÜNÜN BAŞARILI OLMASI HALİNDE ÇOK UZUN OKUMA ZİNCİRLERİNİ ÇOK DAHA AZ MALİYETLE ELDE ETMEK MÜMKÜN OLACAKTIR.

Taramalı elektron mikroskopu (SEM/STM)'na dayalı DNA sekanslama yaklaşımı

Reveo; IBM'nin DNA transistor yaklaşımıyla bağlantılı olarak geliştirdiği teknolojide, DNA iletken bir yüzey üzerine yerleştirilir ve taramalı elektron mikroskop uçları ve buna bağlı olarak tünel akım ölçümü kullanılarak bazlar belirlenir.

STM'nin uçları bıçak ağzı şeklindedir ve nano ölçekli boyutlara sahiptir.

Bu teknolojinin uygulanmasındaki hedef DNA molekülünü gererek ve sınırlandırarak tünel akım ölçümü sayesinde nükleotitlerin tanınmasıdır.

Bu teknoloji, hem nükleotitlerin etiketlenmesi olayını ortadan kaldırmaktadır hem de çok uzun zincirlerin daha az maliyet ve daha kısa sürede okunması sağlanacaktır.

Nanopor teknolojisi ile DNA sekanslama

1

2

3

4

5

Pek çok nanopor dizileme teknolojisi, DNA molekülünün ya da nükleotitlerin bir pordan geçmesi ve nükleotitlerin bu geçiş esnasındaki elektrik akımı ve optik sinyal alıcıları üzerine etkisinin gözlemlenmesi sayesinde bazlardan belirlenmesi esasına dayanır.

Oxford nanopor teknolojisinde teknik, DNA polimeraz enzimi kullanımını sınırlandırmakta ve ligaz enzimi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır.

Tek zincirli DNA molekülünü kullandığı için çok çok az miktarlarda bile çok daha hızlı çalışma potansiyeline sahiptir.

Hem mühendislik sonucu elde edilmiş proteinler kullanılarak imal edilmiş hem de tamamıyla sentetik olarak imal edilen nanoporlar, sürekli geliştirilmekte olup her geçen gün teknolojik seviyeri artmaktadır.

AVANTAJ: Dizileme maliyetinin düşürülmesi ve enzime minimum miktarda bağlı olması



1. 2. ve 3. Nesil Dizileme Teknolojilerinin Değerlendirilmesi



DNA dizileme bir DNA paracığıının baz dizisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan yöntemler arasında altın standart olma özelliğini korumaktadır.



Sanger ve Maxam Gilbert dizileme yöntemleri birinci nesil dizileme olarak tanımlanmaktadır. Zincir sonlandırma tekniği ile dizileme belli bir süre yaygın olarak kullanılmış ve insan genomunun ilk projesi bu yöntem ile dizilenmiştir.



Yeni nesil dizileme, yaklaşımları çok sayıda paralel analiz, yüksek verimlilik ve düşük maliyet açısından önem taşımaktadır. İdeal DNA dizileme teknolojisi hızlı, doğru, kolay kullanılabilir ve ucuz olmalıdır. Bu açılardan bakıldığında, Sanger metodunun hız, kolaylık ve maliyet açılarından sınırlamaları bulunmaktadır.

1. 2. ve 3. Nesil Dizileme Teknolojilerinin Değerlendirilmesi

- İkinci nesil dizileme teknolojileri, çok sayıda paralel analiz, yüksek verimlilik düşük maliyet açısından Sanger metodunun sınırlamalarını gidermektedir.
- Yüksek verimli yeni nesil DNA dizileme teknikleri biyolojik bilimlerde hızlı, güvenilir ve kullanım kolaylığı sağlayan fırsatlar açmaktadır.
- Yeni nesil dizileme metotları kullanışlı ve pratik olmalarının yanında veri analizlerinin ve genomların anlaşılmasındaki biyolojik açıklamaları hala sınırlıdır.

1. 2. ve 3. Nesil Dizileme Teknolojilerinin Değerlendirilmesi



Sanger dizileme tekniğinde, floresan olarak işaretlenmiş n¼kleotidlerin kullanılmasında, uzunlukları birbirinden sadece bir n¼kleotid farklı DNA fragmentlerinin ayrılmasında, agaroz jel yada polimerin gerekliliğinde, nispeten d¼ř¼k sayıda ¼rnek analiz edilebilirliğinde, numune hazırlama zorlukları ve otomasyondaki sınırlamalarında neler olduğunu bilmektedirler.



Bu sınırlamaların giderilmesi ¼abaları jel kullanılmayan ve n¼kleotid dizilemenin eşzamanlı yapılabildiği yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişimini başlatmıştır.

1. 2. ve 3. Nesil Dizileme Teknolojilerinin Değerlendirilmesi

Yeni nesil DNA dizileme teknikleri hız ve verimlilik sağlamaktadır.

Sanger dizileme tekniği ile genom dizileme projeleri uzun zaman alır iken günümüz dizileme yaklaşımları ile kısa sürede (bir hafta) tamamlanabilmektedir.

Yeni nesil dizileme yaklaşımlarına biyokimyasal reaksiyonlar açısından bakıldığında, Sanger dizilemeden farklı biyokimyasal temelleri bulunmaktadır.

İkinci nesil dizileme teknolojisinin biyokimyasal yaklaşımı DNA dizilerini sentez ile dizileme ve ligasyon ile dizileme yaklaşımlarını içermektedir.

1. 2. ve 3. Nesil Dizileme Teknolojilerinin Değerlendirilmesi



İkinci nesil dizileme teknolojileri hızlı, yüksek verimlilik ve düşük maliyet özellikleri ile moleküler uygulamalarda yer almıştır. Ancak ikinci nesil dizilemeler PCR amplifikasyonuna dayalı olduklarından dolayı dizilemede yanlış okumalar teknolojinin ana problemini oluşturmaktadır.



İkinci nesil dizilemenin artan kullanımı ve yeni modifikasyonlarına rağmen üçüncü nesil dizileme yeni bir yaklaşım getirmektedir. Üçüncü nesil dizilemenin iki temel özelliği bulunmakta;

Dizilemeden önce PCR işlemi gerekliliğini ortadan kaldırarak dizilemenin kısa zamanda yapılması,

Sinyallerin (elektrik akımı) eş zamanlı olarak algılanmasıdır.

Klasik Dizileme

Sınırlı büyüklük

900-1000 bp

Tüm dizi tek çıktı

Mozaiklik için yetersiz

Dizi başına ~5 USD (baz başına 5/1000USD)

Motiften bağımsız yüksek özgünlük

Altyapı göreceli ucuz

Run maliyeti ucuz*

Yeni Nesil Dizileme

Tüm genom kadar

75-400 bp

Her bir hedef için çok kopya

Mozaiklik için uygun

Exon ~500 USD (500/30x103USD)

Motife göre değişen özgünlük

Altyapı pahalı

Run maliyeti pahalı*

Dizileme Teknolojilerinin Arasındaki Farklar

	1. Nesil	2. Nesil	3. Nesil
Gerekli Teknoloji	Sentez yoluyla dizileme (SBS)	Sentez yoluyla dizileme (SBS), Yıkama ve tarama	Sentez yoluyla dizileme (SBS) ya da direkt olarak DNA molekülüne fiziksel müdahale
Kullanılan kalıp DNA	DNA'nın parçalara ayrılmış kopyaları	DNA'nın parçalara ayrılmış kopyaları	DNA'nın tek zinciri
Okuma Doğruluğu	Yüksek oran	Yüksek oran	Yüksek oran
Okuma Uzunluğu	800-1000 baz çifti	Kısa (Sanger metoduna göre)	1000 baz çifti ve daha fazlası
Verim	Düşük	Yüksek	Yüksek
Maliyet	Yüksek	Yüksek	Düşük
RNA Dizileme	cDNA kullanarak	cDNA kullanarak	cDNA kullanarak ya da direkt olarak RNA molekülü
Zaman	Saatler	Günler	Dakikalar
Örnek Hazırlama Şekli	Kısmen karmaşık PCR'a gerek yok	Karmaşık PCR'a gerek var	Teknolojisine göre basit-karmaşık PCR'a gerek yok

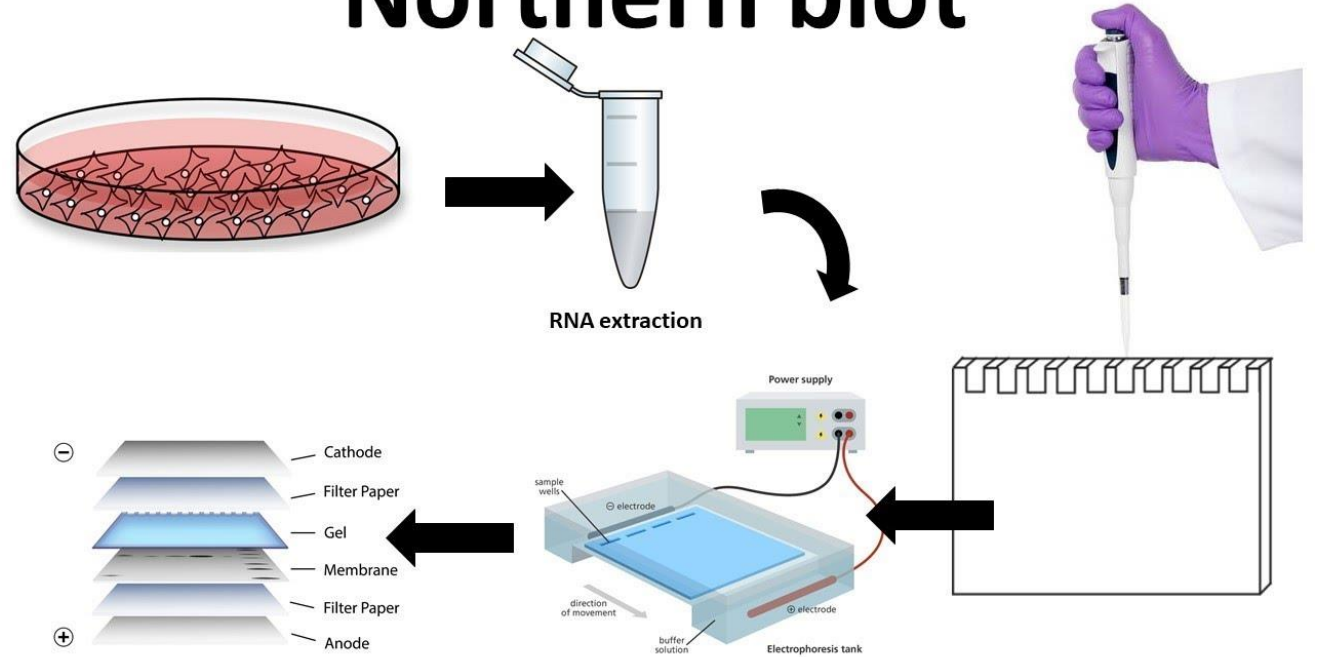
Gen İfade Analizleri



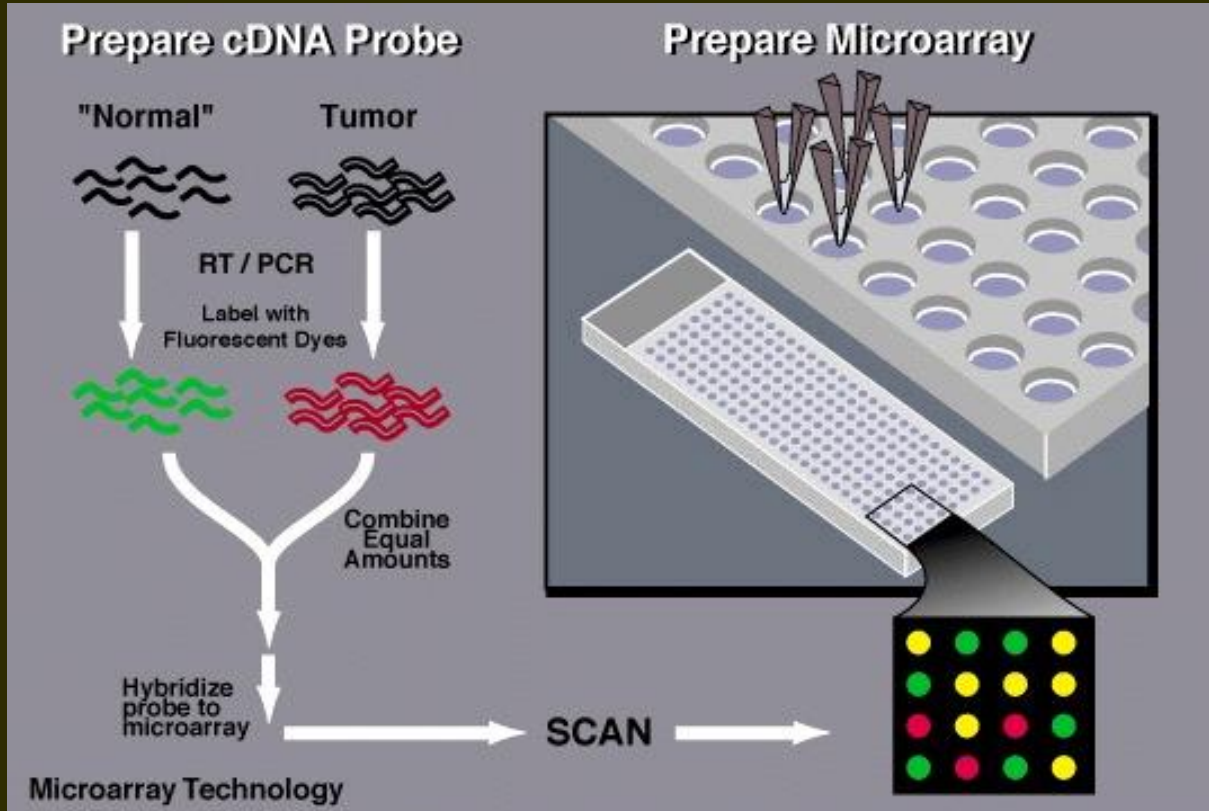
Northern Blot

- 1977'de geliştirilen northern blot tekniği, 1975'te Edwin Southern tarafından geliştirilen southern blot tekniğine çok benzemektedir.
- Southern Blotta DNA tespit edilirken, northern blotta ise RNA tespit edilmektedir.

Northern blot



DNA Mikrodizi (Microarray)



- Tek bir deney ile binlerce genin ifade profilinin aynı anda incelenmesi
- Mikrodizi sistemleri üç gruba ayrılabilir: cam üzerine sentezlenen cDNA mikrodizileri, membran üzerine (ör: naylon membran) sentezlenen cDNA mikrodizileri ve oligonükleotit mikrodizileri (DNA çipleri)
- Mikrodizi ile sadece mRNA (ifade) analizi değil, DNA (mutasyon, dizi) analizi yapılabilir.
- Tipik bir DNA mikrodizi çalışmasında yüzey üzerine sabitlenmiş DNA dizileri, örnekten izole edilen mRNA ile hibridize edilir.

DNA Mikrodizi (Microarray)

Bir mikrodizi çalışmasının temel aşamaları:

1. Prob: Oligonükleotit, cDNA

2. Çip üretimi: Probların çipe (cam, naylon membran, silikon, kuvarz yüzeyler) yerleştirilmesi. Fotolitografi, pipet, dokundurma, püskürtme

3.Hedef: Floresan işaretli örnek, RNA (mRNA), cDNA

4. Deney: Hibridizasyon, yıkama, tarama

5. Sonuç: Floresan ışım

6. Analiz: Görüntü işleme, İstatistik, Biyoinformatik analiz

