

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ILLUMINA VE DNB SEKANSLAMA TEKNOLOJİLERİ İLE
ELDE EDİLEN ÖZEL GEN DİZİLEME VERİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Tuğçe ACAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU

Ağustos, 2023

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ILLUMINA VE DNB SEKANSLAMA TEKNOLOJİLERİ İLE ELDE
EDİLEN ÖZEL GEN DİZİLEME VERİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Tuğçe ACAR tarafından hazırlanan tez çalışması 24.08.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muhammed Hamza
MÜSLÜMANOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Emre TEPELİ, Üye
Atlas Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Illumina ve DNB Sekanslama Teknolojileri ile Elde Edilen Özel Gen Dizilime Verilerinin Karşılaştırılması başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tuğçe ACAR



*Aileme
ve
çok değerli Hanifi Hoca'ma*

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca çok kıymetli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU'na, kendisi artık aramızda olmasa da geniş ufku sayesinde meslek hayatıma kattığı farklı bakış açılarıyla her zaman kalbimde olacak olan çok değerli hocam Dr. Hanifi AKTAŐ'a, lisanüstü öğrenimimde pes etmek üzere olduğumda yola devam etmeme vesile olan sevgili çalışma arkadaşım Ceren Aleyna KEÇECİ'ye ve hayatım boyunca maddi ve manevi olarak desteklerini hiçbir koşulda esirgemeyen çok kıymetli çekirdek ailemin her bir üyesine teşekkürlerimi borç bilirim.

Tuğçe ACAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vi
KISALTMA LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 DNA'nın Yapısı	4
2.2 DNA Polimerazlar	8
2.3 Restriksiyon Endonükleazlar	10
2.4 DNA Dizileme	12
2.5 NGS İle Üretilen Dataların Kalite Değerlendirmeleri	26
2.5.1 Data Boyutu	27
2.5.2 Datanın Derinliği	27
2.5.3 FastQC	28
3 MATERYAL-METOD/BULGULAR	39
3.1 Materyal-Metod	39
4 SONUÇ	54
4.1 Bulgular	54
4.2 Tartışma	60
4.3 Sonuç	62
4.4 Öneriler	64
KAYNAKÇA	65
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	67

SİMGE LİSTESİ

A	Adenin Bazı
C	Sitozin Bazı
G	Guanin Bazı
T	Timin Bazı
U	Urasil Bazı



KISALTMA LİSTESİ

bç	Baz Çifti
bp	Baz Çifti (Base Pair)
CRT	Döngüsel Tersinir Sonlandırma (Cyclic Reversible Termination)
dH ₂ O	Distile Su
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNB	DNA Nano Topu (DNA Nano Ball)
ddNTP	Di Deoksiribonükleotid
dNTP	Deoksiribonükleotid
dsDNA	Çift Zincirli DNA (Double Strand DNA)
fmol	Femtomol
gDNA	Genomik DNA
IGV	Bütünleştirici Genom Görüntüleyici (Integrative Genome Viewer)
NaOH	Soydum Hidroksit
NGS	Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
pmol	Pikomol
ssDNA	Tek Zincirli DNA (Single Strand DNA)
ss-cirDNA	Tek Zincirli ve Halkasal DNA (Single Strand Circular DNA)
SNA	Tek Molekül Ekleme (Single Molecule Addition)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 DNA'nın Yapısı.....	5
Şekil 2.2 Kromozomlardaki DNA organizasyonu.....	6
Şekil 2.3 İnsan genomunun sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.4 İnsan genomunu oluşturan genlerin işlevlerine göre sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.5 DNA replikasyonu.....	9
Şekil 2.6 Phi29'un RCA (yuvarlanan daire amplifikasyonu) etkinliği.....	10
Şekil 2.7 En sık kullanılan restriksiyon endonükleazlardan bazıları için tanıdığı diziler ve oluşturduğu uçlar.....	11
Şekil 2.8 Maxam-Gilbert radyoaktif fosfor işaretleme ile DNA dizileme yöntemi.....	13
Şekil 2.9 Maxam-Gilbert yönteminde örnek G reaksiyonu.....	13
Şekil 2.10 Sanger dizileme cihazı.....	14
Şekil 2.11 dNTP ve ddNTP yapıları.....	15
Şekil 2.12 Sanger Dizileme.....	15
Şekil 2.13 Sanger dizileme çıktısı.....	16
Şekil 2.14 Pirodizileme cihazı.....	16
Şekil 2.15 Pirodizileme yöntemi.....	17
Şekil 2.16 Emülsiyon PCR.....	19
Şekil 2.17 Illumina kütüphane hazırlama aşamaları.....	19
Şekil 2.18 Illumina köprü amplifikasyonu.....	20
Şekil 2.19 Illumina dizileme aşamaları.....	20
Şekil 2.20 İon Torrent ile DNA dizileme.....	21
Şekil 2.21 ABI/SOLID teknoloji ile DNA dizileme.....	22
Şekil 2.22 DNA'nın nanoball (DNB) formu.....	23
Şekil 2.23 ss-cir DNA yapısı.....	24

Şekil 2.24 DNB'lerin Flow Cell üzerindeki bağlanma noktaları.....	24
Şekil 2.25 Pasific Bioscience yöntemi ile DNA dizileme.....	25
Şekil 2.26 Oxford Nanopore tekniği ile DNA dizileme.....	26
Şekil 2.27 DNA dizileme sonucu elde edilen bir datanın IGV görüntüsü.....	27
Şekil 2.28 Örnek bir FastQC raporu.....	28
Şekil 2.29 Örnek bir her bazın sekans kalitesi raporu.....	29
Şekil 2.30 Flow Cellin koordinatlarına göre sekans kalitesi iyi bir dataya örnek grafik.....	30
Şekil 2.31 Flow Cellin koordinatlarına göre sekans kalitesi kötü bir dataya örnek grafik.....	30
Şekil 2.32 Dizi başına kalite puanı iyi bir dataya örnek grafik.....	31
Şekil 2.33 Dizi başına kalite puanı kötü bir dataya örnek grafik.....	32
Şekil 2.34 Her sekanstaki baz içeriğine örnek bir grafik.....	33
Şekil 2.35 GC içeriği açısından kaliteli dataya örnek bir grafik.....	34
Şekil 2.36 GC içeriği açısından kalitesi kötü dataya örnek bir grafik.....	34
Şekil 2.37 Her bazın N içeriği parametresi açısından kaliteli dataya örnek bir grafik.....	35
Şekil 2.38 Dizi uzunluklarının tüm dizilere dağılımı açısından kaliteli dataya ait örnek bir grafik.....	36
Şekil 2.39 Sekans duplikasyon oranı açısından kaliteli dataya ait örnek bir grafik.....	37
Şekil 2.40 Sekans duplikasyon oranı açısından kalitesi kötü dataya ait örnek bir grafik.....	37
Şekil 2.41 FastQC raporundan örnek yinelenen dizilerin listesi.....	38
Şekil 3.1 MGI DNB Seq G400 ile dizileme iş akışı.....	39
Şekil 3.2 Illumina Miniseq ile dizileme iş akışı.....	49
Şekil 4.1 MGI ve Illumina datalarının boyutları (MB cinsinden).....	55
Şekil 4.2 MGI ve Illumina datalarının ortalama derinlikleri (x cinsinden).....	56
Şekil 4.3 MGI ve Illumina'ya ait dataların GC içerikleri (% cinsinden).....	58
Şekil 4.4 MGI ve Illumina'ya ait dataların duplikasyon seviyeleri.....	59
Şekil 4.5 MGI ve Illumina'ya ait dataların yinelenen dizi miktarları.....	60

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Fragmantasyon reaksiyonu	40
Tablo 3.2 Fragmantasyon programı.....	40
Tablo 3.3 ERAT reaksiyonu.....	41
Tablo 3.4 ERAT programı.....	41
Tablo 3.5 Ligasyon reaksiyonu.....	42
Tablo 3.6 Ligasyon programı.....	42
Tablo 3.7 PCR reaksiyonu.....	43
Tablo 3.8 PCR programı.....	43
Tablo 3.9 Denatürasyon programı.....	45
Tablo 3.10 ss-cirDNA reaksiyonu.....	45
Tablo 3.11 ss-cirDNA programı.....	45
Tablo 3.12 Enzimatik parçalama reaksiyonu.....	45
Tablo 3.13 Enzimatik parçalama programı.....	45
Tablo 3.14 DNB-1 reaksiyonu.....	47
Tablo 3.15 DNB-1 programı.....	47
Tablo 3.16 DNB-2 reaksiyonu.....	47
Tablo 3.17 DNB-2 programı.....	47
Tablo 3.18 DNB yükleme reaksiyonu.....	48
Tablo 3.19 PE100 Sekans kartuşu hazırlama.....	48
Tablo 3.20 Fragmantasyon reaksiyonu.....	50
Tablo 3.21 Fragmantasyon programı.....	50
Tablo 3.22 Pürifikasyon programı.....	50
Tablo 3.23 PCR reaksiyonu.....	51

Tablo 3.24 PCR programı.....	51
Tablo 3.25 Kütüphane dilüsyon reaksiyonu.....	53
Tablo 4.1 MGI ve Illumina’da dizilenen pollara ait amplikon sayıları ve elde edilen data boyutları.....	54
Tablo 4.2 MGI ve Illumina’da dizilenen pollara ait dataların ortalama derinlik miktarları (x cinsinden).....	55
Tablo 4.3 MGI ve Illumina’ya ait dataların FastQC raporundan her sekanstaki baz içeriği ile alakalı kalite raporu.....	56
Tablo 4.4 MGI ve Illumina’ya ait dataların GC içerikleri (% cinsinden).....	57
Tablo 4.5 MGI ve Illumina’ya ait dataların duplikasyon seviyeleri.....	58
Tablo 4.6 MGI ve Illumina’ya ait dataların yinelenen dizi miktarları.....	59

ILLUMINA VE DNB SEKANSLAMA TEKNOLOJİLERİ İLE ELDE EDİLEN ÖZEL GEN DİZİLEME VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tuğçe ACAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU

DNA'nın yapısı aydınlatıldıktan sonra DNA nükleotid dizilemesi için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında en günceli Yeni Nesil Dizileme(NGS) teknolojileridir. NGS platformları farklı yöntemlerle kısa sürede, genomun bir kısmının, hatta tamamının dizilenmesini sağlar. İnsan genomu dizilemede üretilen ticari kitlerin dışında in-house dizileme ile; çok sayıda, birbiriyle ilişkisi olmayan genleri aynı anda dizilemek mümkündür. NGS teknolojileri fastq formatında ham data üretir. Dizileme sırasında; kimyasal reaksiyonda, cihazın mekaniğinde veya laboratuvar kısmında meydana gelebilecek hatalar dataların kalitesini, dolayısıyla ham datadan yapılacak analizin doğruluğunu doğrudan etkiler. Ham datadaki potansiyel sorunları tespit etmek ve datanın kalitesini değerlendirmek için FastQC gibi çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir. Bu çalışmada, farklı yöntemlere dayalı Illumina(sentez yoluyla dizileme) ve MGI(DNB teknolojisi ile dizileme) platformlarında in-house dizileme verilerinin kalitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. 100-280 amplikondan oluşan 24 çift gen havuzu, MGI ve Illumina platformlarında in-house dizileme tekniği ile dizilenmiştir. Her iki platformdan elde edilen ham dataların FastQC raporlarından; her sekanstaki baz içeriği, dizilerin GC içeriği, duplikasyon oranı ve yinelenen diziler parametreleri ile data boyutu ve ortalama derinlik parametreleri açısından karşılaştırılmıştır. FastQC parametrelerine uygulanan t

testi sonucunda; her iki platform için de her sekanstaki baz içeriği ($p=2,01;p>0,05$), dizilerin GC içeriği ($p=0,88;p>0,05$) ve duplikasyon oranları ($p=0,08;p>0,05$) arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Yinelenen diziler arasında ise MGI'dan üretilen dataların yinelenen dizi ortalaması daha düşük olup, her iki platform arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p=0,04;p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte kullanılan MGI DNBSseq-G400 cihazının kapasitesi Illumina-Miniseq cihazından daha fazla olduğundan; MGI DNBSseq-G400 cihazından data boyutu ve ortalama derinlik açısından daha fazla veri elde edilmiştir. Bu iki parametre için uygulanan t testi ile, her iki cihazdan elde edilen data boyutu ($p=5,58;p>0,05$) ve ortalama derinlik ($p=1,57;p>0,05$) arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak in-house dizilemede; dizilenecek gen sayısı, elde edilmek istenen data miktarı gibi koşullar göz önünde bulundurularak, amaca uygun her iki platform da verimli bir şekilde kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: FastQC, Illumina, MGI.

COMPARISON OF IN HOUSE GENE SEQUENCING DATA OBTAINED BY ILLUMINA AND DNB SEQUENCE TECHNOLOGIES

Tuğçe ACAR

Department of Molecular Biology and Genetics

Master of Science Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Muhammed Hamza MÜSLÜMANOĞLU

After the structure of DNA was elucidated, many methods were developed for DNA nucleotide sequencing. The most up-to-date among these methods is Next Generation Sequencing(NGS) technologies. NGS platforms enable the sequencing of part or even the entire genome in a short time using different methods. Apart from the commercial kits produced for human genome sequencing, with in-house sequencing; it's possible to sequence large numbers of unrelated genes simultaneously. NGS technologies produce raw data in fastq format. During sequencing; errors that may occur in the chemical reaction, the mechanics of the device or the laboratory part directly affect the quality of the data and therefore the accuracy of the analysis to be made from the raw data. Various algorithms, such as FastQC, have been developed to detect potential problems in raw data and evaluate the quality of the data. In this study, it was aimed to compare the quality of in-house sequencing data on Illumina (sequencing by synthesis) and MGI (sequencing by DNB technology) platforms based on different methods. 24 pairs of gene pools of 100-280 amplicons were sequenced separately on the MGI and Illumina platforms by in-house sequencing. From FastQC reports of raw data obtained from both platforms; the base content in each sequence, GC content of the sequences, duplication rate and repetitive

sequences parameters were compared in terms of data size and average depth parameters. As a result, in-house sequencing; considering the conditions such as the number of genes to be sequenced and the amount of data to be obtained, both platforms suitable for the purpose can be used efficiently.

Keywords: FatsQC, Illumina, MGI.



1.1 Literatür Özeti

1953 yılında DNA'nın yapısı ortaya koyulduktan sonra DNA dizileme ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. DNA'nın yapısının keşfinden 12 yıl sonra 1965 yılında ilk kez Holley ve ark. maya hücrelerinin 77 nükleotidlik alanın tRNA polinükleotidinin nükleotid dizisini ortaya koymuşlardır. İlerleyen araştırmalar sonucunda DNA dizileme yönteminin geliştirilmesi yaklaşık 25 yıl sürmüştür. (Sanger F, 1977) 1977 yılında Maxam Gilbert kimyasal yıkım yöntemiyle DNA dizileme ve Sanger sentez yoluyla dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. İlerleyen yıllarda Sanger dizileme yönteminin geliştirilmesiyle, 1987 yılında Applied Biosystems tarafından ilk otomatize DNA dizileme cihazı piyasaya sürülmüştür. Bu gelişme İnsan Genom Projesi'nin önünü açmıştır. 10 yılda tamamlanan İnsan Genom Projesi sonucunda Sanger dizilemenin zaman ve maliyet açısından büyük DNA bölgelerini dizilemek için uygun bir yöntem olmadığının anlaşılması Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojilerinin geliştirilmesine öncü olmuştur. NGS teknolojisi ile genomda büyük bölgelerin küçük fragmanlara ayrılarak kısa sürede dizilenmesini sağlayan 2. nesil dizileme cihazları (sentez yoluyla dizileme yapan Roche, Illumina, Ion Torrent; ligasyon yoluyla dizileme yapan ABI/SOLID, Complete Genomics, BGI, MGI), sonrasında ise daha büyük DNA parçalarının dizilenmesini sağlayan 3. nesil dizileme cihazları (Pacific Bioscience, Oxford Nanopore) geliştirilmiş olup günümüzde NGS alanındaki geliştirme çalışmaları hala devam etmektedir.

NGS teknolojilerinden elde edilen dataların genetik analizlerinin doğruluğu için kalitelerinin değerlendirilmesine olanak tanıyan, yapılacak analizin özelliğine göre farklı algoritmalar (FaQCs, FastQC, FASTX-Toolkit ve PRINSEQ-lite) geliştirilmiştir. Bu algoritmalar arsında insan gDNA'sının gen kodlayan bölgelerinin analizinde en çok FastQC algoritması tercih edilir. FastQC, yüksek verimli yeni nesil dizileme verilerindeki potansiyel sorunları tespit etmek için tasarlanmış bir algoritmadır. FastQC, bir ya da birden fazla fastq dosyası üzerinde bir dizi analiz çalıştırarak, dizilemenin kalitesini

gösteren sonuçları özetleyen bir rapor üretir. Kalite değerlendirmesi sonucu genetik analizlerin güvenilir olarak yapılmasını sağlar.

Literatürde farklı NGS platformlarından elde edilen dataların çeşitli yönlerinin karşılaştırılmasına ait çok sayıda çalışma olmakta birlikte; MGI teknolojisinin piyasaya sürülüş tarihi Illumina'dan daha yeni olması sebebiyle MGI ve Illumina'ya ait dataların karşılaştırılmasıyla alakalı sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır. Literatürde her iki platformdan elde edilen datalar; data boyutları, ortalama derinlikleri, GC içeriği, SNP ve Indel tespitleri, kullanılan kitlerin hedef kapsamaları, Q20 ve Q30 değerleri gibi çeşitli parametreler üzerinden karşılaştırılmıştır.

1.2 Tezin Amacı

Genetik hastalıkların tanısında kullanılan yöntemlerin başında DNA dizileme gelir. DNA'nın yapısının keşfinden günümüze gelişen teknoloji ile birlikte DNA'nın dizilenmesine olanak tanıyan çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında en günceli Yeni Nesil Dizileme (NGS) teknolojisidir. Bu başlık altında farklı firmalar; temelinde aynı amaca hizmet eden, farklı yöntemler kullanarak DNA'nın baz dizisinin belirlenmesini sağlayan DNA dizileme cihazları geliştirmiş ve geliştirmeye devam etmektedir. DNA dizileme cihazları tarafından üretilen bu dataların, genetik tanı koyabilmek için elbette doğruluğundan emin olmak gerekmektedir. Datalar analiz edilmeden önce, dataların kalitesi FastQC gibi geliştirilen algoritmalar ile kolaylıkla değerlendirilebilir. Bu çalışmada, farklı yöntemlere dayalı Illumina (sentez yoluyla dizileme) ve MGI (DNB teknolojisi ile dizileme) platformlarında in house dizileme verilerinin kalitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

NGS platformları nispeten kısa zaman diliminde, düşük maliyetler ile DNA'nın bir kısmının veya tamamının baz dizisini büyük çıktılar halinde verir. Dizileme sırasında; cihazın mekaniğinde, yazılımında veya kimyasal reaksiyon sırasında oluşabilecek bir aksaklık datanın güvenilirliğini olumsuz etkiler. Bu sebeple elde edilen datalar analiz edilmeden önce bir kalite değerlendirmesine tabi tutulmalıdır. Bu amaçla geliştirilen FastQC raporlarındaki parametrelerin yanı sıra, elde edilen datanın boyutu, ortalama derinliği gibi parametreler de datanın kalitesi hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar. Bu çalışmadaki önermemiz; iki farklı yöntemeye dayalı olarak DNA'nın dizilenmesini sağlayan Illumina Miniseq (sentez yoluyla dizileme) ve MGI DNB Seq-G400 (ligasyon

yoluyla dizileme) cihazlarından elde edilen dataların kalitelerinin karşılaştırarak, yöntemsel olarak MGI teknolojisinin kullandığı RCA amplifikasyonunun PCR hata oranı birikimi Illumina'nın köprü amplifikasyonundan daha az olduğundan, MGI DNB Seq-G400'den elde edilen dataların kalitelerinin Illumina Miniseq'den elde edilen datalardan daha iyi olacağıdır.



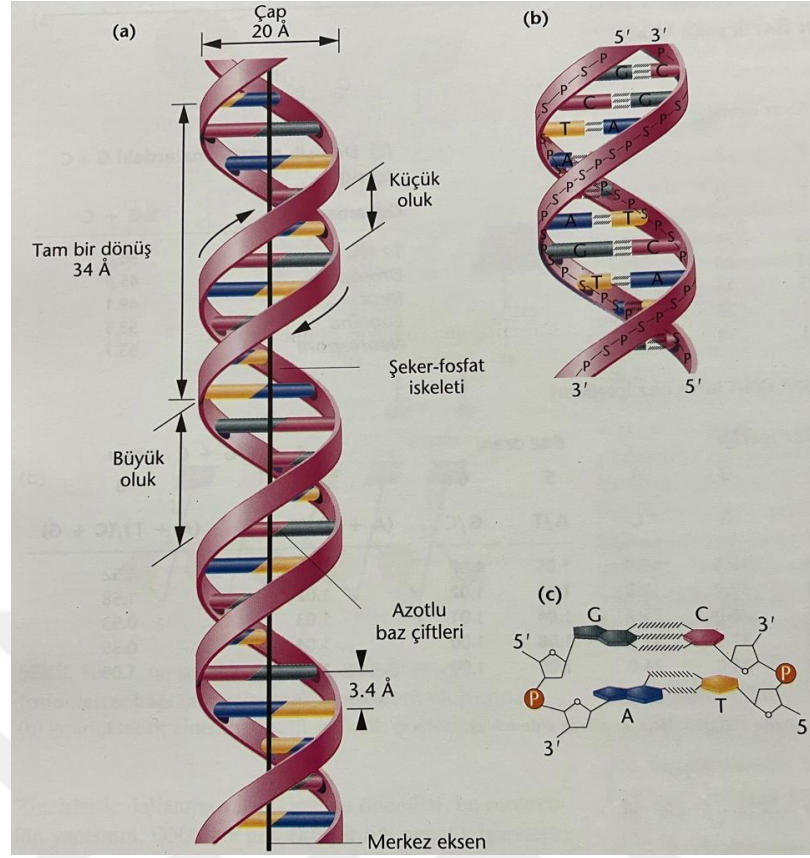
2.1 DNA'nın Yapısı

2.1.1 DNA'nın Moleküler Yapısı

DNA, nükleotidlerden oluşan bir nükleik asittir. Nükleotidler; bir pentoz şekeri (5-karbonlu şekere), bir azotlu baz (A,G,C,T,U) ve bir fosfat grubundan oluşur. DNA'nın yapısında azotlu baz olarak; 2 halkalı pürinlerden A (adenin) ve G (guanin), tek halkalı pirimidinlerden C (sitozin) ve T (timin) bulunur.

Avery, MacLeod ve McCarty'nin transformasyon deneyleri sonucunda 1944 yılında genetik bilgiyi DNA'nın (deoksiribonükleik asit) taşıdığı kanıtlanmıştır. Ardından DNA'nın yapısını ve fonksiyonunu belirlemek için bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. 1953 yılında James Watson ve Francis Crick'in yaptığı deneysel çalışmalar sonucu DNA'nın ikili sarmal modeli ortaya koyulmuştur. İkili sarmal modeline göre DNA'nın yapısal özellikleri şu şekilde tanımlanır:

- Birbirine antiparalel konumlanmış (iki zincirin C-5' ve C-3' yönleri birbirine terstir) iki polinükleotid zincirinden oluşur.
- İki polinükleotid zinciri bir merkez etrafında kıvrılarak DNA'nın sarmal yapısını oluşturur.
- Sarmal yapının dış iskeletini fosfat ve 5 karbonlu şekere oluşturur. Azotlu bazlar iskeletin iç kısmında konumlanmıştır.
- Polinükleotid zincirindeki her iki baz arasında 0,34 nm mesafe vardır. DNA sarmalının bir tam dönüşü 3,4 nm olup, her bir zincirde bir dönüşte 10 azotlu baz yer alır.
- Sarmalın çapı 20 nm'dir.
- DNA'nın ikili sarmalı major (büyük) ve minor (küçük) oluklardan oluşur.
- Bir polinükleotid zincirindeki bazlar, karşı zincirdeki bazlara Hidrojen Bağı ile bağlanarak; A=T, G≡C şeklinde eşleşirler.

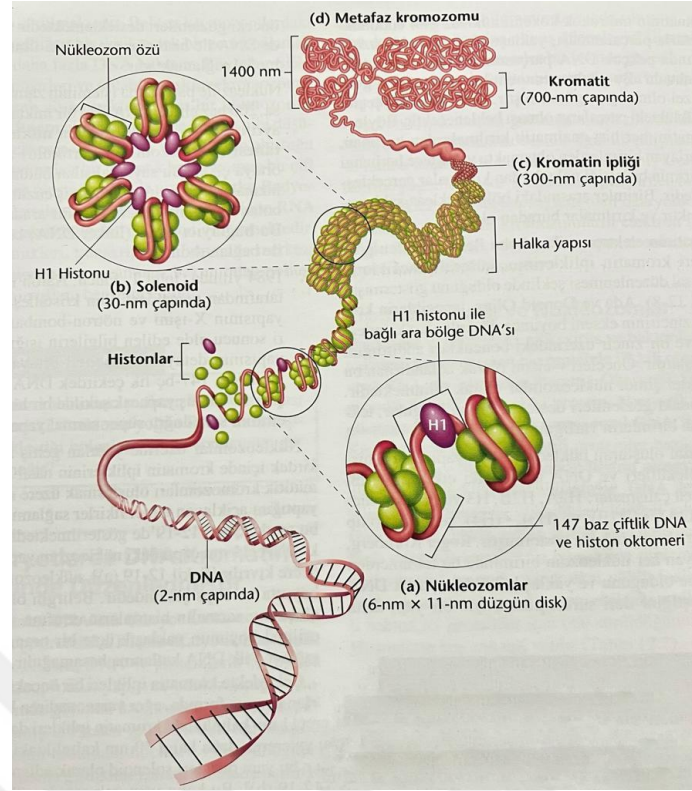


Şekil 2.1 DNA'nın Yapısı (Klug v.d. 2011, s.246)

a) Watson ve Crick'in önerdiği DNA'nın ikili sarmal modeli. **b)** Sarmalın; fosfat omurgasının, azotlu bazlarının ve hidrojen bağlarının görünümü. **c)** İkili sarmalın antiparalel yapısı ve bazların yerleşiminin gösterilişi.

Genetik kavramlar

DNA hücre çekirdeğinde; lizin ve arjinin açısından zengin, bazik ve pozitif yüklü histon proteinleriyle etkileşime girerek kromozom yapıları şeklinde paketlenir. DNA'dan kromozom yapısının oluşmasındaki organizasyonun ilk basamağı; 2 nm çapındaki DNA'nın 147 bç'lik kısmının 4 çift histon proteinine sarılarak, 11 nm çapındaki nükleozom birimlerini oluşturmasıdır. Bir sonraki aşamada nükleozomlar katlanmaya devam ederek 30 nm çapındaki solenoid yapılarını oluşturur. Solenoid yapısı, birbiri üzerine ilmik şeklinde daha ileri katlanmalarla 300 nm çapındaki kromatin ipliği oluşturur. Bu iplikler kıvrılarak kromozomunun kolları olan 700 nm çapındaki kromatidleri oluştururlar. İki kromatidin yanyana gelmesiyle de DNA'nın kromozom halinde paketlenme organizasyonu tamamlanmış olur. İnsana ait toplam DNA uzunluğu yaklaşık 2 metre olmasına rağmen; kromozom organizasyonu sayesinde insan DNA'sı, yaklaşık 5-10 µm çapındaki hücre çekirdeğine sığmaktadır.



Şekil 2.2 Kromozomlardaki DNA organizasyonu

(Klug v.d. 2011, s.294)

DNA; kendini eşleme (semikonservatif replikasyon), genetik bilgiyi taşıma, genetik bilginin ifade edilmesi (gen ekspresyonu) ve mutasyonlarla kendini çeşitlendirme (varyasyon) özelliklerini taşır.

2.1.2 DNA'nın Organizasyonu

İnsan genomu 3×10^6 'dan fazla nükleotid içerir, fakat insan genomunun yalnızca %5'lik kısmı kodlayan dizilerden oluşur. Genomun kalan kısmının en az %50'si LINE ve Alu gibi yer değiştirebilen dizilerdir. İnsan genomunun kodlayan %5'lik kısmı $\cong 20.000$ gen içermektedir. Genlerin %40'ından fazlasının tanımlanmış bir moleküler işlevi yoktur. (William S. Klug, 2011, s. 497) [Şekil 1.4] Genler insan genomunda 23 otozomal kromozom ve cinsiyet kromozomları (X ve Y) üzerinde konumlanmıştır. Genlerin kromozomlar üzerindeki dağılımı homojen olmayıp; gen ekspresyonu bakımından aktif, ökromatin (açık) bölgeler ile inaktif, heterokromatin (sıkı paketlenmiş) bölgeleri oluşturur.

2.2 DNA Polimerazlar

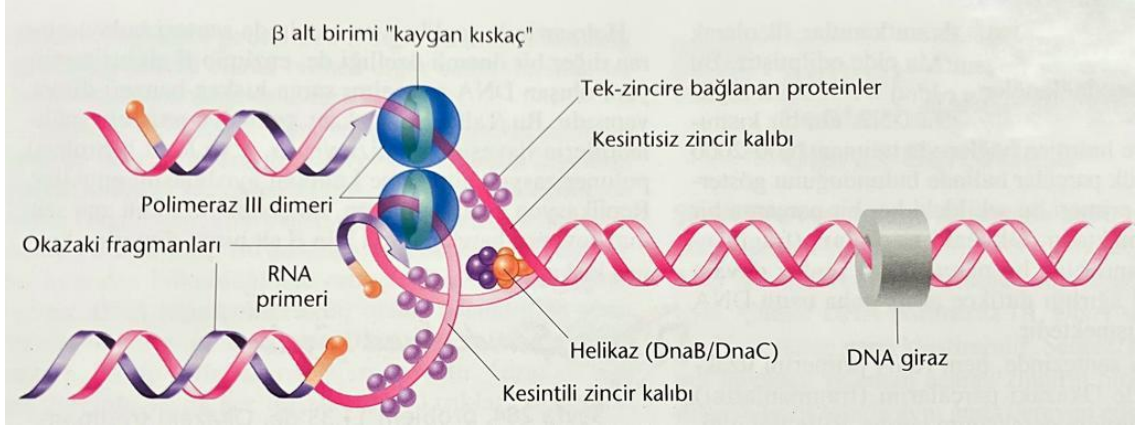
DNA'yı manipüle eden enzimler reaksiyon türlerine göre 5 başlık altında toplanabilir:

- Nükleazlar; DNA'yı kesen veya parçalayan enzimler.
- Ligazlar; 2 DNA parçasını birbirine bağlayan enzimler.
- Polimerazlar; DNA zincirlerinin kopyalanmasını sağlayan enzimler.
- Modifiye edici enzimler; DNA'ya kimyasal grupların eklenip çıkarılmasını sağlayan enzimler.
- Topoizomerazlar; DNA çift sarmalında super kıvrımları oluşturur veya uzaklaştırırlar.

DNA'nın başlıca özelliklerinden biri de kendini replike edebilmesidir. İnsan genomunda DNA replikasyonu için çok sayıda replikasyon orijini mevcuttur. DNA replikasyonu hücre döngüsünün S evresinde gerçekleşir.

DNA'nın replikasyonu sırasında ilk olarak replikasyon orijininde, birbirine antiparalel uzanan 2 iplik helikaz enzimi ile ayrılır ve replikasyon çatalı oluşur. DNA'nın her iki ipliği de replikasyon için kalıp zincir olarak kullanılır. DNA polimerazlar replikasyonu başlatmak için bir primer RNA molekülüne ihtiyaç duyar. Primaz enzimi tarafından RNA primeri sentezlendikten sonra, DNA polimeraz bu primere bağlanarak yeni DNA ipliğinin sentezini başlatır. DNA polimeraz; deoksiribozun 3' -OH grubu ile dNTP'nin 5' -fosfat grubu arasındaki fosfodiester bağının oluşumunu katalizler. Zincir uzaması DNA Polimerazın kalıp diziyeye komplementer dNTP'lerin eklenmesiyle 5'→3' yönünde devam eder.

Kalıp DNA'nın 3'→5' yönündeki ipliğinde ise; aralıklı olarak 5'→3' yönünde bağlanan RNA primerleri ile DNA polimeraz 100-200 nükleotid uzunluğunda kesintili parçalar (Okazaki Fragmentleri) halinde sentezi gerçekleştirir. Okazaki fragmentlerinin oluşumundan sonra, RNA primerleri ayrılır ve yerine kalıp ipliğe komplementer diziler sentezlenir. Sentezlenen bu diziler son olarak DNA Ligaz enzimi ile birleştirilir. Bu şekilde DNA'nın yarı korunumlu replikasyonu tamamlanır. Replikasyon sırasında çok sayıda yardımcı protein de rol oynar.



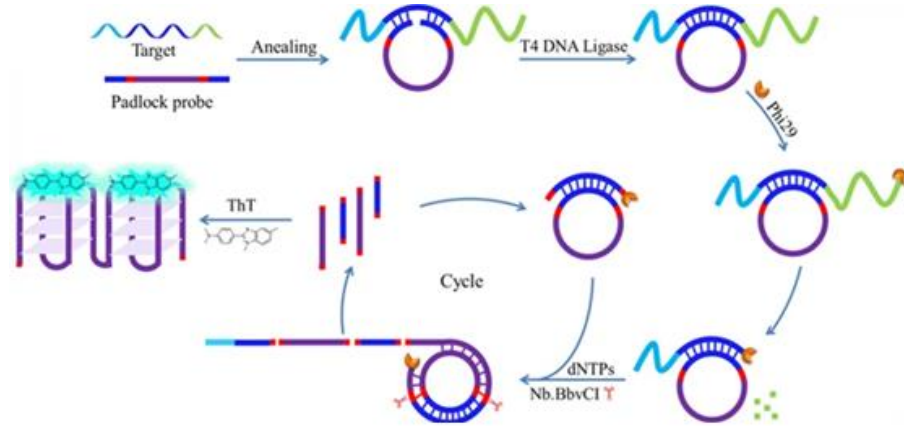
Şekil 2.5 DNA replikasyonu (Klug v.d. 2011, s.274)

Prokaryotik DNA replikasyonunda DNA polimeraz I, II ve III görev alırken; ökaryotik DNA replikasyonunda DNA polimeraz α , δ , ϵ ve γ görev alır. Ökaryotik DNA polimerazlar DNA replikasyonu, DNA tamiri, kross-over ve mitokondriyal replikasyona katılır. Ökaryotik DNA polimerazların replikasyon hızı prokaryotik DNA polimerazlardan daha yavaşken; replikasyon sırasında aynı anda çok sayıda replikasyon orjininden yeni iplik sentezi başlaması DNA'nın kısa sürede replike olmasını sağlar.

- **Phi29 DNA Polimeraz**

ϕ 29 DNA polimerazın gerçekleştirdiği yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA), belirlenmiş sabit bir sıcaklıkta ssDNA amplifikasyonun yapıldığı izotermal amplifikasyon yöntemlerindedir. ϕ 29 bakteriyofajı tarafından kullanılan bu polimerazın, hedef molekül üzerindeki zincir uzaklaştırma özelliğinden faydalanılır. (Dean v.d 2001)

ϕ 29 DNA polimeraz; halkasal DNA'ların polimerizasyonunu gerçekleştirirse de, lineer DNA'lar için de asma kilit şekilli problemlerin(padlock prob) hibridizasyonu sayesinde kazandırılan dairesel form ile ϕ 29 DNA polimerazın etkinliği kullanılır.



Şekil 2.6 Phi29'un RCA (yuvarlanan daire amplifikasyonu) etkinliği (Li v.d, 2017)

ϕ 29 DNA polimeraz, herhangi bir yardımcı protein olmasa dahi oldukça verimli bir polimerizasyon gerçekleştirir. ϕ 29 DNA polimeraz, simetrik bir DNA replikasyonu modelini destekler.

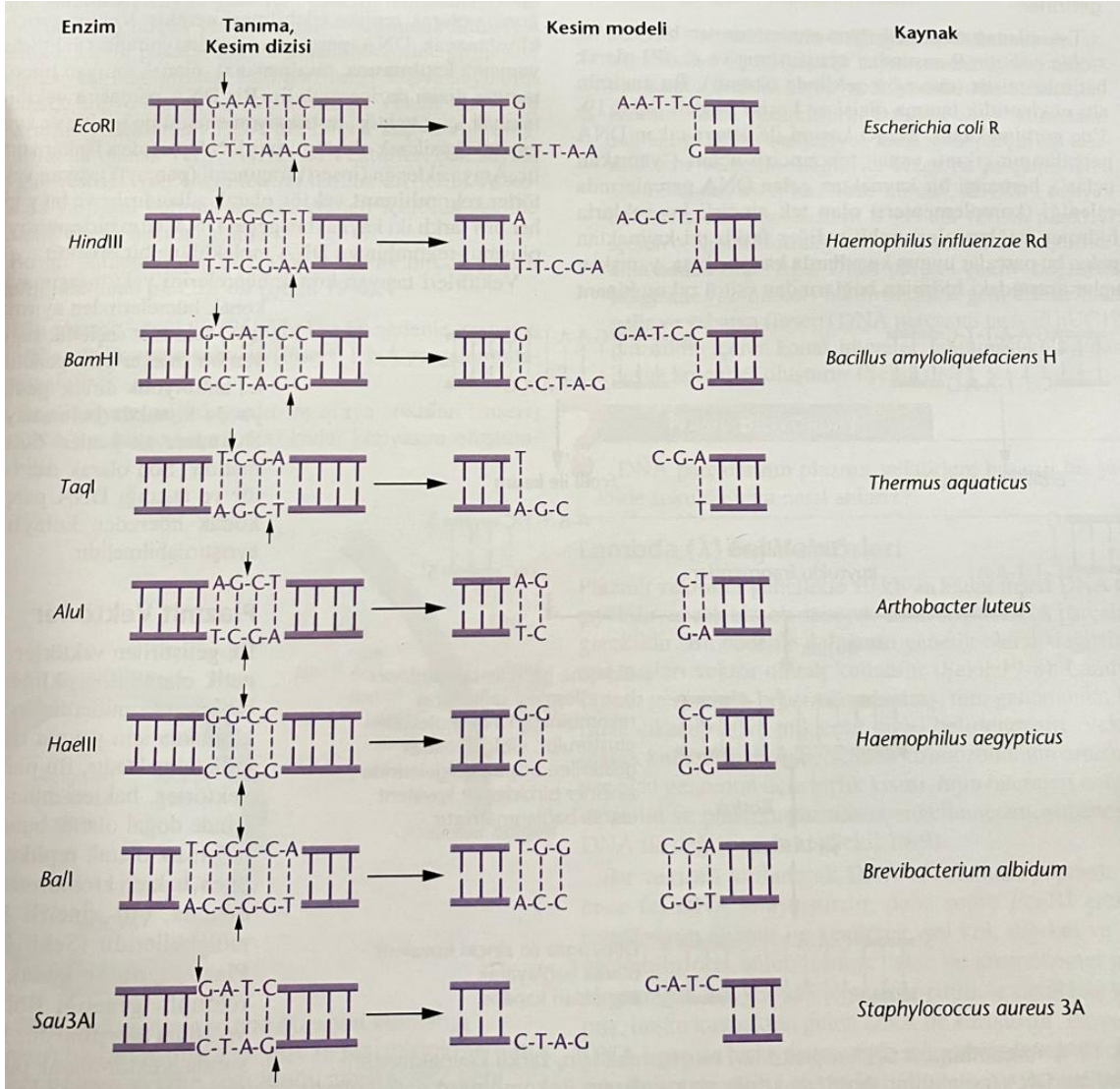
RCA reaksiyonu ile tek bir kalıp DNA'dan çok sayıda kopya elde edilir. Bu özelliği ile ϕ 29 DNA polimeraz, femtomolar seviyedeki ultra yüksek hassasiyeti ve tek bazı varyantları bile ayırt eden özgüllüğü moleküler tekniklerde kullanılmaktadır.

ϕ 29 DNA polimeraz RCA reaksiyonunu, bir dAMP molekülü terminal proteinin serbest bir molekülüne kovalent olarak bağlandığında başlatır. Tek iplikli DNA'da ϕ 29 DNA polimerazın bağlanması için sabit ve net DNA dizisi gerekliliği yoktur. ϕ 29 DNA polimerazın yeni zinciri verimli bir şekilde uzatması için en az iki nükleotidin bir terminal tekrarı gereklidir. Replikasyonda 3' terminal de dahil kalıp ipliğinin tamamı kopyalanır. ϕ 29 DNA polimerazın replikasyonu başlatmadan uzatma aşamasına geçişindeki bu özellik ile geri kayma modeli önerilmiştir. Bu özelliği ile terminal protein içeren DNA ipliklerinin kesintisiz replikasyonu gerçekleştirilmiş olur. (Mendez v.d., 1992)

2.3 Restriksiyon Endonükleazlar

1978'de W. Arber, H. Smith ve D. Nathans restriksiyon endonükleazların keşfi ile nobel ödülü almıştır. Günümüzde çok sayıda restriksiyon endonükleaz enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler bakteriler tarafından virüs istilasına karşı bir savunma mekanizmasını olarak sentezlenir. Restriksiyon endonükleazlar başta rekombinant DNA teknolojisi olmak üzere moleküler biyolojinin bir çok alanında kullanılırlar.

Restriksiyon endonükleazlar DNA'yı enzime özgü spesifik tanıma dizilerinden keser. İnsan genomu yaklaşık 3×10^6 nükleotid içerir. Restriksiyon enzimleri genomu, saflaştırılabilen, modifiye edilebilen fragmentlere ayırır. Fragmentlerin büyüklüğü, kullanılan restriksiyon endonükleazın DNA'yı ne kadar sıklıkla kestiğine göre hesaplanır. Fragmentin büyüklüğü hesaplanırken teorik olarak DNA'daki A=T ve G=C oranının eşit olduğu varsayılır. Örneğin; kesim tanıma dizisi AGCT olan *AluI* enzimi DNA'yı 256 baz çiftinde ($4^n = 4^4 = 256$) bir kesip çok sayıda küçük fragment oluşturacaktır.



Şekil 2.7 En sık kullanılan restriksiyon endonükleazlardan bazıları için tanıdığı diziler ve oluşturduğu uçlar (Klug v.d., 2011, s.459)

Restriksiyon enzimlerine bakıldığında 5'→3' ve 3'→5' yönünde aynı şekilde okunan, palindromik diziler olduğu görülür. Restriksiyon enzimleri DNA'yı keserken; simetrik, küt veya asimetrik, yapışkan uçlar oluşturur. Örneğin, *BalI* ve *AluI* ; DNA'yı tanıma dizisinin ortasından, basit, simetrik iki parçaya böler ve küt uçlar oluşturur. *EcoRI* ve

*Hind*III enzimlerinin kesiminde ise; iki DNA ipliği de aynı pozisyondan kesilmez, her bir uçtan bir veya birkaç nükleotid uzunluğunda tek zincirli kuyrukları olan, yapışkan uçlu fragmentler oluşur.

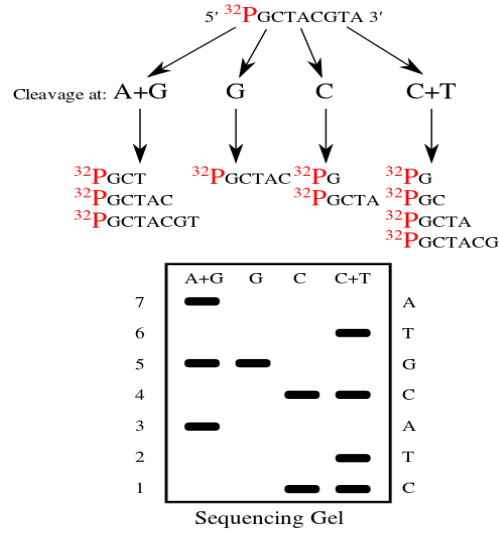
2.4 DNA Dizileme

DNA yapısı üzerine yapılan çalışmalardan, Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA'nın yapısını keşfetmesiyle ve diğer benzer araştırmalarla birlikte DNA'nın nükleotid dizisinin belirlenmesi üzerinde çalışmalar hız kazanmıştır. DNA'nın yapısının aydınlatılmasından 12 yıl sonra 1965 yılında ilk kez Holley ve ark. maya hücrelerinin 77 nükleotidlik alanin tRNA polinükleotidinin nükleotid dizisini ortaya koymuşlardır. Kullandıkları yöntem çok fazla iş gücü ve zamana ihtiyaç duysa da 10 yıl içerisinde 100'den fazla tRNA molekülünün nükleotid dizilemesi tamamlanmıştır. (Lilian T C França, 2002) Bu süreç DNA'yı oluşturan nükleotidlerin dizilenmesi için yeni yöntemlerin geliştirilmesine öncü olmuştur. (Kızmaz v.d, 2017)

DNA dizileme teknikleri; ilk olarak 1977'de, 2 farklı yöntemle kullanılmaya başlamıştır. İlerleyen süreçte, DNA'nın dizilenmesi için literatüre; gelişen bilimsel bilgi ve teknolojinin de etkisiyle otomatize sistemler, yeni nesil dizileme teknolojileri, 3. nesil dizileme teknolojileri gibi bir çok yöntem kazandırılmıştır.

2.4.1 Maxam-Gilbert Kimyasal Yıkım Yöntemi

Maxam ve Gilbert (1977) DNA'nın bazlara özgül kimyasallarla modifikasyonuna ve modifiye edilmiş DNA'nın elektroforezle ayırımına dayanan kimyasal ayrışım yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntem ile son nükleotidi bilinen zincirler elde edilir. Maxam-Gilbert metodunda başlangıç materyali; 5' ucu radyoaktif fosfor ile işaretlenmiş, çift zincirli DNA molekülüdür. Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek DNA 90 °C'de denature edilir. Denatüre edilen DNA elektroforeze tabi tutulur.

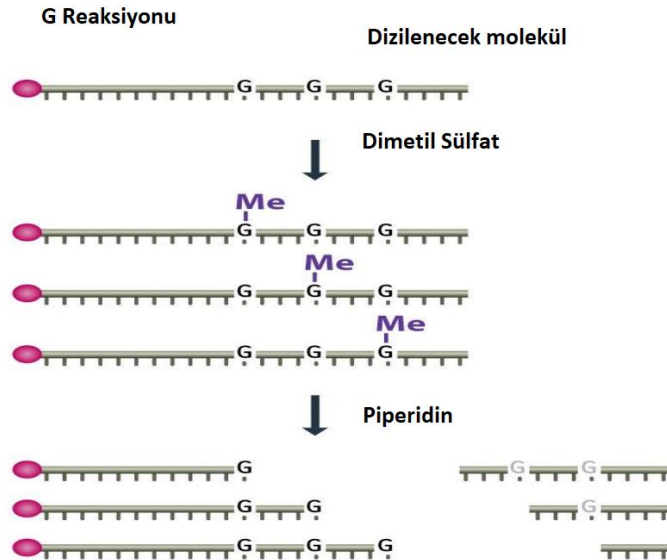


Şekil 2.8 Maxam-Gilbert radyoaktif fosfor işaretleme ile DNA dizileme yöntemi

Zincirlerden pürin nükleotidlerce zengin olan, daha ağır olduğundan jelde daha yavaş ilerler. Böylece iki zincir birbirinden ayrılmış olur. Zincirlerden bir tanesi jelden saflaştırılır. Saflaştırılan zincir; 4 farklı reaksiyonda, farklı ajanlarla muamele edilir.

G reaksiyonu:

DNA dimetilsülfat ile muamele edilir. Dimetilsülfat G bazının pürin halkasına bir CH₃ grubu ekler. Bir sonraki aşamada ortama eklenen piperidin; metillenmiş pürin halkasını uzaklaştırır ve DNA zincirini keser.



Şekil 2.9 Maxam-Gilbert yönteminde örnek G reaksiyonu

A ve T bazlarının kesim reaksiyonları için kimyasal geliştirmede problemler yaşandığından 4 baz için kimyasal reaksiyonlar; G, A+G, C ve C+T şeklinde

kurgulanmıştır. DNA zinciri; bazik ortamda G bazından kırılırken, asidik ortamda A bazından kırılır. Hidrazin; DNA zincirini hem C hem T bazından kırar. Ancak yüksek tuz derişimi ve bazik ortamda hidrazin ile muamele DNA'yı C bazından kırar.

Bu 4 farklı reaksiyon poliakrilamid jelin kuyularına ayrı ayrı yüklenerek oluşan bantlar ile DNA dizisi okunur.

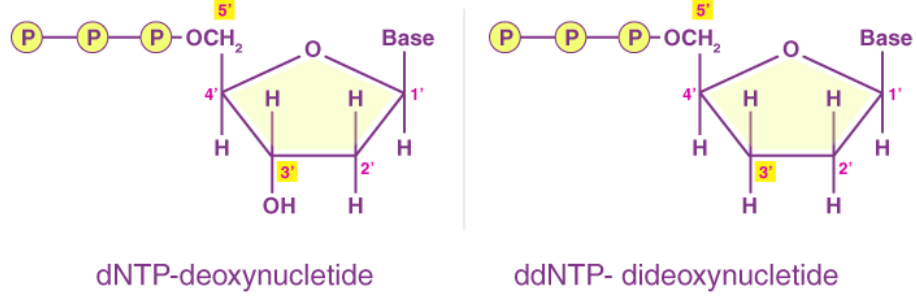
2.4.2 Sanger Dizileme

Zincir sonlanması metodu, 1977 yılında Fred Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu metod otomatize edildiği için kısa sürede çok yaygın kullanıma ulaşmıştır.



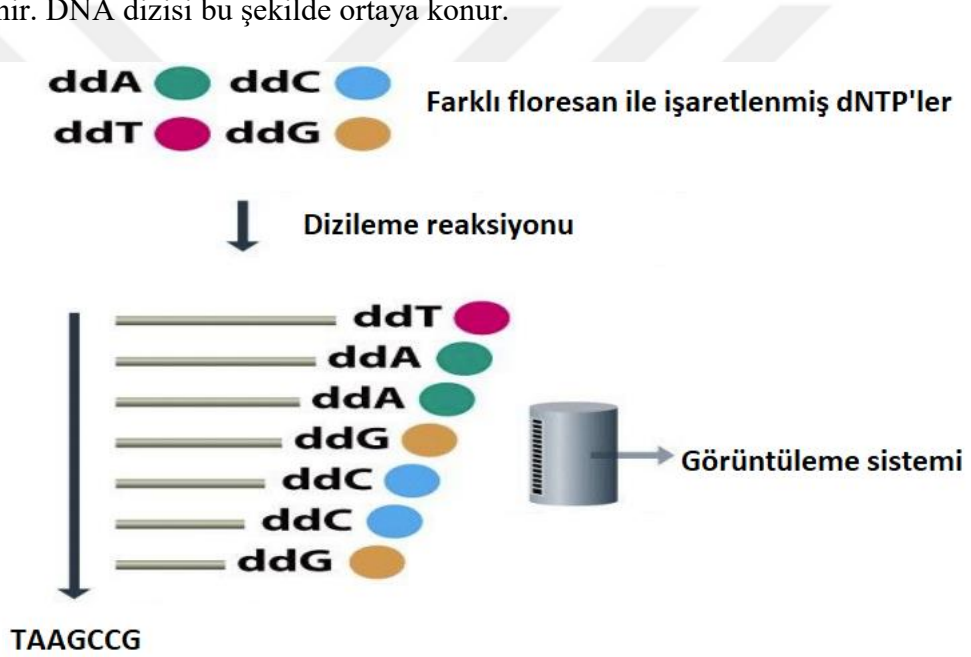
Şekil 2.10 Sanger dizileme cihazı

Başlangıç materyali; dizilenecek DNA'nın tek zincirli kopyalarıdır. İlk olarak her zincirin belirli bir noktasına komplementer, primer görevi göreceğ oligonükleotid dizileri bağlanır. Bir DNA polimeraz, çok sayıda dNTP ve az sayıda, farklı floresanlarla işaretlenmiş ddNTP'ler (dideoksi nükleotid) ile polimerizasyon reaksiyonu başlatılır. DNA polimeraz dNTP ve ddNTP arasında ayırım yapmaksızın reaksiyonu gerçekleştirir. ddNTP'ler 3' ucunda -OH grubu yerine -H bulundurdıklarından, kendisinden sonra gelen baz ile fosfodiester bağı kuramaz ve zincirin polimerizasyonunu sonlandırır.



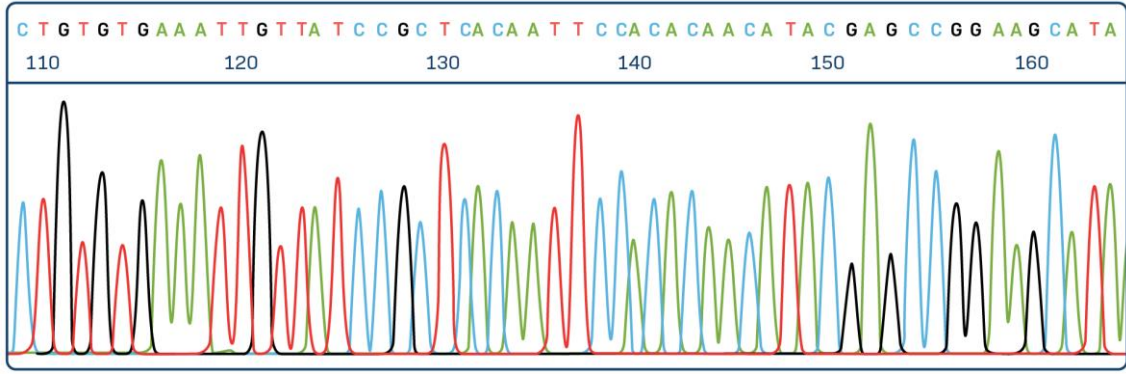
Şekil 2.11 dNTP ve ddNTP yapıları

Polimerizasyon reaksiyonu sonucu DNA karışımı poliakrilamid jele yüklenerek farklı uzunluktaki DNA moleküllerinin ayrımı sağlanır. Ayrımı yapılan parçalar bir floresan dedektöründen geçirilerek yapılan ışımının rengine göre zincirin sonundaki baz belirlenir. DNA dizisi bu şekilde ortaya konur.



Şekil 2.12 Sanger Dizileme

Teknolojik gelişmelerle birlikte zincir sonlanma metodu, kapiller elektroforez sistemi ile otomatize edilmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojisi ortaya çıkana kadar en yaygın kullanılan DNA dizileme yöntemi olmuştur. Günümüzde hala, yeni nesil dizileme teknolojisine alternatif olarak kullanıldığı durumlar vardır.



Şekil 2.13 Sanger dizileme çıktısı

2.4.3 Pirodizileme

1988 yılında Ronaghi ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Zincire tek nükleotid eklenmesi yöntemi ile dizi analizi yapılmaktadır. Kalıp DNA zinciri çoğaltılırken yapıya eklenen nükleotidler belirlenebildiğinden real-time sekans okumayı sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem fragman ayrımı gerektirmediğinden; zincir sonlanma ve zincir yıkımı yöntemlerinden daha hızlıdır.



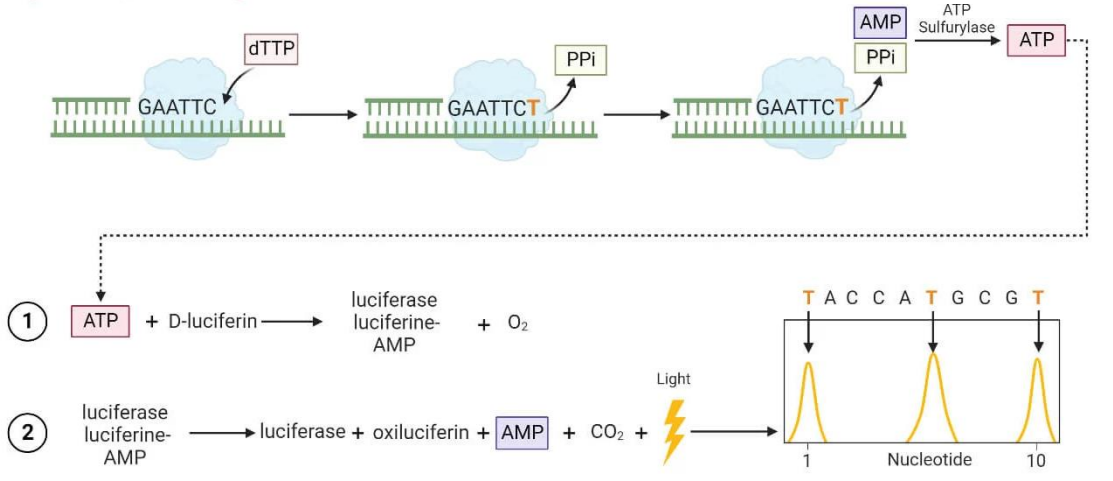
Şekil 2.14 Pirodizileme cihazı

Dizileme reaksiyon, PCR ile çoğaltılmış kalıp DNA'nın tek zincirli (ssDNA) yapıya dönüştürülmesi ile başlar. ssDNA'ya sekans primeri hibridize olur. Dizileme DNA polimeraz, lusiferaz, apiraz ve ATP sülfürlaz enzimleri kullanılır.

A,T,G ve C nükleotidleri ayrı ayrı reaksiyona tabi tutulur. dNTP'ler sırası ile reaksiyona eklenir. Eklenen dNTP kalıp zincire komplementer ise primerin 3' ucu ile fosfodiester bağı kurar. Bu reaksiyon sırasında açığa çıkan pirofosfat (Ppi) ortama salınır. Açığa çıkan Ppi, ATP sülfürlaz enziminin katalizlemesi ile ATP'ye çevrilir. ATP ise lusiferin → oksilusiferin dönüşümünü sağlar. ATP yardımıyla oluşan oksilusiferin, ATP miktarıyla

orantılı olarak ortama görünür bir ışın yayar. Bu ışın kızılötesi (CCD) kamera ile görüntülenir ve Pyrogram adı verilen arayüzde pik(tepecik) şeklinde kaydedilir. Pyrogramda oluşan piklerin boyları eklenen nükleotid sayısı ile orantılıdır.

Son aşamada ise apiraz enzimi ortamdaki ATP ve dNTP'leri yıkarak eklenecek olan nükleotidin reaksiyonuna olanak sağlar.



Şekil 2.15 Pirodizileme yöntemi

2.4.4 Yeni Nesil Dizileme (NGS)

Sanger dizileme yöntemi; insan genomu, belirli hayvan genomları ve bitkilerin tüm genom dizilenmesine olanak sağlamıştır. Sanger dizileme yüksek güvenilirlik ile uzun dizilerin okunmasına olanak tanır. Ancak daha kapsamlı bir dizileme yapılmak istendiğinde; yüksek maliyet ve uzun bir zaman gerektirir. 1990 yılında başlayan İnsan Genom Projesinde karşılaşılan zorluklar nedeniyle; bilim insanları, kısa sürede daha fazla bölgenin dizilemesini yapabilen, daha düşük maliyetli ve doğruluk oranı daha yüksek yeni yöntemler üretmeye ihtiyaç duymuşlardır. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda yapılan çalışmalar sonucunda Sanger dizileme yöntemi yerini Yeni Nesil Dizileme (NGS) olarak adlandırılan daha gelişmiş yöntemlere bırakmıştır. NGS teknolojisi; DNA parçalarının klonlanmasına ihtiyaç duyulmadan amplifiye edilmiş tek zincirli DNA'nın dizilenmesine olanak sağlamış ve 25-500 baz aralığında değişen kısa DNA dizileri oluşturularak, birkaç yüz milyon ile birkaç milyar aralığında bazın okunmasını gerçekleştirilebilmiştir. NGS teknolojisinin temelinde dizilenecek DNA, restriksiyon endonükleazlar ile fragmanlara ayrılır, bu fragmanların ucuna bağlanan adaptör dizileriyle genomik kütüphaneler oluşturulur. Oluşturulan kütüphaneler amplifiye edilir ve kullanılacak teknolojiye göre

dizilenir. Son on yılda NGS teknolojisi kapasitesini 100-1000 kat arttırmış ve günümüzde hala arttırmaya devam etmektedir. (Kircher v.d., 2010)

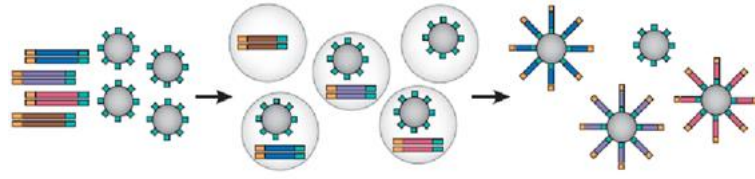
Yeni nesil dizileme yöntemleri; sentez yoluyla dizileme, ligasyon yoluyla dizileme ve tek molekül dizileme olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Bu yöntemsel farklılıklar; okuma uzunluğu, verim, hata oranı gibi parametrelerde değişiklik göstermektedir.

2.4.4.1 Sentez Yoluyla Dizileme

Sentez yoluyla dizileme prensibinde, uygun büyüklükteki DNA fragmentlerine dizisi bilinen oligonükleotidler (adaptör dizileri) bağlanır. Adaptör bağlanan bu fragmanlar, dizilemede floresan sinyali arttırmak için amplifiye edilir. Amplifiye edilen kütüphane, flow cell adı verilen katı bir membrana sabitlenerek dizileme işlemi başlatılır. DNA dizileme sırasında yeni ipliğin sentezi için DNA polimeraz kullanılır. Sentez yoluyla dizileme prensibine dayanan fakat; DNA fragmanlarını okuma uzunluğu, fragmanların amplifikasyonu ve flow celle ligasyonu açısından farklılık gösteren üç farklı metod vardır. Bunlar 454 GS20 pirodizileme, İllumina ve İon Torrent metodlarıdır. Sentez yoluyla dizileme metodu; döngüsel tersinir sonlandırma(CRT) ve tek nükleotid ekleme(SNA) yöntemlerini temel alır.

- **Roche 454 GS (Pyrodizileme)**

Roche firmasının çıkardığı 454 GS genom dizileme cihazı; SNA yöntemine dayalı, 2005 yılında piyasaya sürülen ilk NGS platformu olarak bilinir. 1988 yılında Ronaghi ve arkadaşlarının DNA sentezi sırasında serbest kalan pirofosfat ile DNA dizileme stratejisi olan pirodizilemeyi temel alan bir yöntemdir. Bu platformda; NGS için kütüphane hazırlamanın ilk basamağı olarak DNA restriksiyon enzimleriyle fragmente edilir, uçlarına dizileri bilinen oligonükleotidler eklenir ve denature edilir. 454 teknolojisinde hazırlanan bu kalıp DNA fragmanları streptavidin beadlere tutturularak emülsiyon PCR tekniği kullanılır. Emülsiyon PCR'da hep streptavidin beadi ayrı bir emülsiyon damlacığı tarafından tutulur. Amplifikasyon işlemi bir bead üzerine tutunan DNA fragmanlarının tamamını kapsar. Bu sayede bir bead üzerinde 10^7 klonal kopya üretilir. (Dönmez v.d., 2017) Çok sayıda DNA kopyası içeren bu beadler pikotiter plate üzerine bağlanır. Dizileme işleme pirodizileme mantığı ile bu plateler üzerinde, eş zamanlı olarak gerçekleşir. Roche 454 700 bç uzunluğunda okumalar yapabilir.

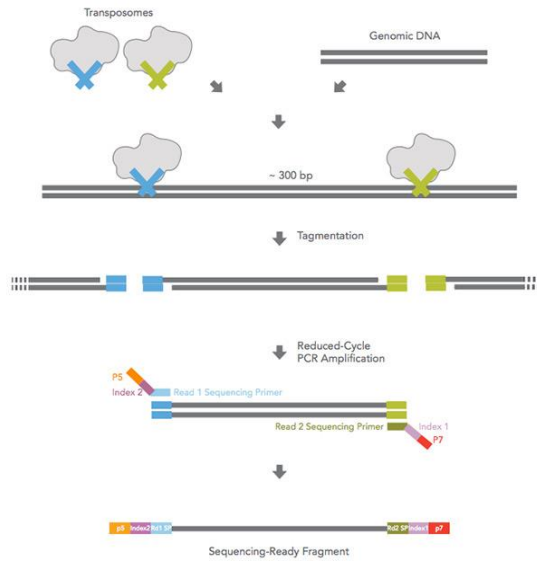


Şekil 2.16 Emülsiyon PCR (Ivone U. S. Leong, 2014)

- **İllumina**

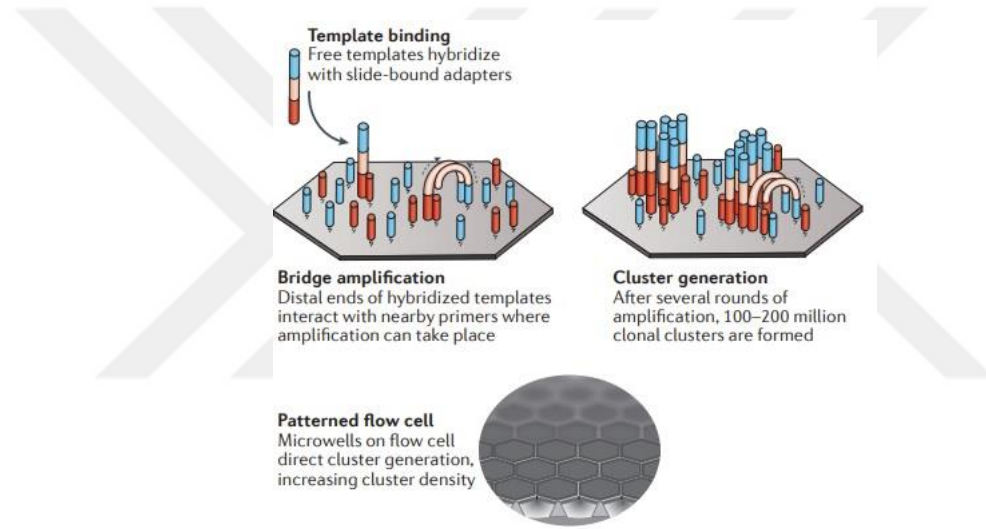
CRT yöntemiyle DNA dizilemeye olanak sağlayan Illumina sistemi, 2006 yılında ticarileştirilerek NGS platformları arasına girmiştir. Günümüzde de NGS alanında önemli bir pazar payına sahiptir. (Goodwin v.d., 2016)

İllumina teknolojisinde kütüphane hazırlamada ilk adım, dizilenecek DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesidir. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası oluşan çift iplikli DNA fragmanlarının uçlarına dizisi bilinen oligonükleotidler (adaptör) eklenir. Ardından çift iplikli ve adaptörlerle işaretlenmiş DNA fragmanları denatüre edilerek tek iplikli hale getirilir. Oluşturulan kütüphane; üzerinde çok sayıda oligonükleotid dizisi sabitlenmiş, flow cell adı verilen katı bir membran üzerine yüklenir. Tek iplikli DNA fragmanlarının uçlarındaki adaptör dizileri, flow cell üzerindeki komplementer oligonükleotid dizisi ile hibridize olur. Daha sonra hibridizasyonu gerçekleştirmeyen DNA fragmanları uzaklaştırılır.

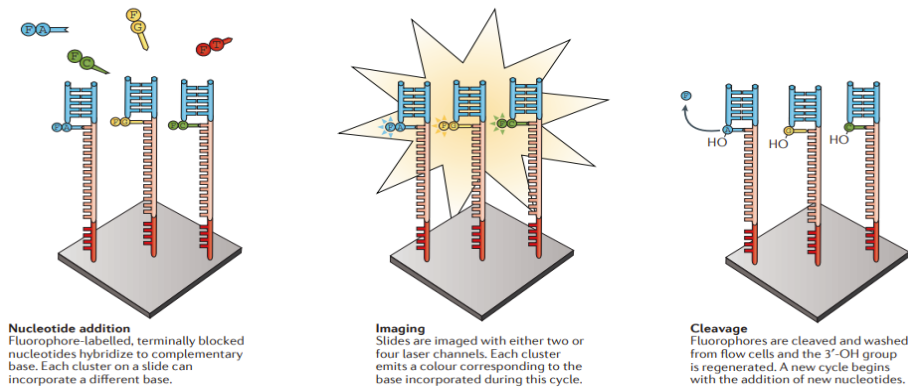


Şekil 2.17 Illumina kütüphane hazırlama aşamaları

Sekans işleminden önceki son aşamada, dizileme sırasında bir fragmandan alınacak sinyali arttırmak için flow cell üzerine bağlanan DNA dizilerinin köprü amplifikasyonu adı verilen teknik ile amplifikasyonu gerçekleştirilir. Flow cell üzerinde köprü amplifikasyonu ile oluşturulan koloniler her bir kalıp DNA'nın yaklaşık 1000 adet kopyasını içerir. Koloniler sentez-dizileme yaklaşımı ile kitlesel paralel biçimde, modifiye DNA polimerazlar ile dizilenir. Dizileme işleminde kullanılan modifiye DNA polimerazlar adaptör dizilerine bağlanarak polimerizasyonu başlatır. Her döngüde flow cell, 4 farklı floresanla işaretlenen ve 3'OH ucuna bloke edici grup eklenen dNTP karışımı ile muamele edilir. Her kolonide sentezlenen yeni zincire dNTP'ler eklendikten sonra eklenen dNTP'nin tayini için flow cellin görüntüsü alınır. Floresan ve bloke edici grup çıkarılarak bir sonraki döngü başlar.



Şekil 2.18 Illumina köprü amplifikasyonu (Goodwin v.d., 2016)

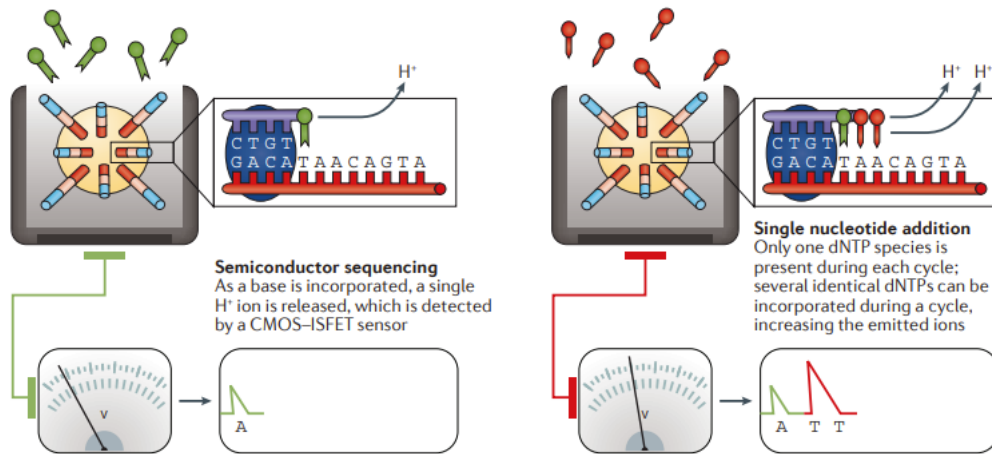


Şekil 2.19 Illumina dizileme aşamaları (Goodwin v.d., 2016)

- **İon Torrent**

İon Torrent, optik bir okumaya sahip olmayan NGS platformudur. Temeli tek nükleotid amplifikasyonu ile sentez-dizileme metoduna dayanır. Bu sistemde dizileme için gerekli olan sinyal, DNA'nın yeni ipliğinin sentezi sırasında ortaya ortaya çıkan H⁺ iyonlarından sağlanır.

Roche 454 GS teknolojisindeki gibi streptavidin bead bazlı DNA kütüphanesi hazırlığının ardından; hazırlanan her bir bead, sekansın gerçekleşeceği platein ayrı ayrı mikrokuyularına yerleştirilir. Her bir mikrokuyuya tek çeşit dNTP'ler eklenir ve standart bir sentez reaksiyonu gerçekleşir. Sentezlenen yeni zincire her dNTP eklendiğinde, ortama tek bir H⁺ iyonu salınır. Her bir H⁺ iyonu salınımı, dizileme sistemine entegre edilen bir tamamlayıcı metal oksit yarı iletken (CMOS) ve iyona duyarlı transistör (ISFET) tarafından tespit edilen, pH'ta 0,02 birimlik bir değişiklikle sonuçlanır. Yeni sentezlenen zincire eklenen her bir dNTP'den sinyal alındıktan sonra mikrokuyular yıkanarak ortama bir sonraki dNTP gönderilir. Hipersensitif iyon sensörleri tarafından tespit edilen pH değişikliği, bağlanan nükleotidlerin sayısı ile tam orantılı değildir. Bu nedenle homopolimer bölgelerin dizilenmesinde İon Torrent sistemi kısıtlı doğruluk sağlar.



Şekil 2.20 İon Torrent ile DNA dizileme (Goodwin v.d., 2016)

2.4.4.2 Ligasyon Yoluyla Dizileme

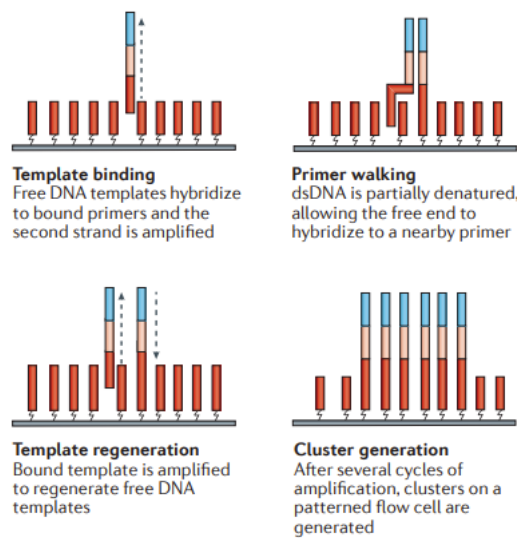
Ligasyon ile dizileme metodunda, floresan ile işaretlenmiş, değişken uzunluktaki oligonükleotid dizileri (prob-çapa yapısı) kullanılır. Prob-çapa yapısındaki proplar; bir veya iki bilinen baz ve kalan kısmı dejenere baz kodlar. Çapa kısmı ise kütüphane

hazırlanırken kullanılan adaptör dizilerine komplementer, bilinen bir diziyi kodlar. Restriksiyon enzimleriyle kalıp DNA'dan meydana gelen fragmanlar prob-çapa yapısına hibridize olabilecek, komplementer dizili adaptörler ile işaretlenir. Flow celle yüklenen kütüphane, DNAligaz varlığında prob-çapa yapısının çapa kısmı ile adaptör dizisi hibridize olur. 4 farklı bilinen baz içeren prob farklı floresan ile işaretlenmiştir. Kalıp DNA'ya sırasıyla bağlanan problemlerin yaptığı ışımaların optik sistem tarafından algılanarak bu döngü farklı prob setleri kullanılarak tekrarlanır. Böylece dizilenmek istenen DNA'nın dizisi belirlenir.

Ligasyon yoluyla dizilemede ABI/SOLID ve Complete Genomics'in temelini oluşturduğu DNB sekanslama teknolojileri mevcuttur.

- **ABI/SOLID**

Life Technologies'in 2008 yılında piyasaya sürdüğü SOLID (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) dizileme tekniği; emülsiyon PCR ile hazırlanan kütüphanede kalıp DNA'ya komplementer diziyi uzatmak için bir dizi prob-çapa ligasyonu, görüntüleme ve bölünme döngülerinden oluşur.



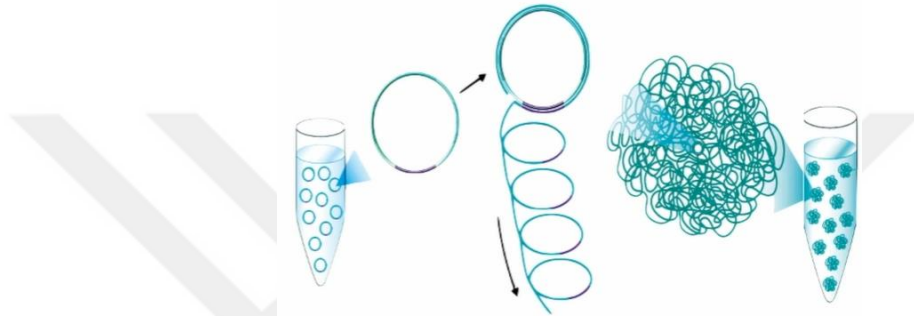
Şekil 2.21 ABI/SOLID teknolojisi ile DNA dizileme (Goodwin v.d., 2016)

Emülsiyon PCR ile hazırlanan kütüphane flow cell üzerine aktarılır. Bu sistemde her floresan 4 dinükleotidi işaretlemek koşuluyla, 4 farklı floresan ile işaretli, toplamda 16 farklı dinükleotid kombinasyonu kullanılır. Flow cell üzerinde, beadlere bağlı amplifiye edilmiş kalıp DNA'ya bu problemlerin ligasyonu ile yapılan ışımaya optik sistem tarafından algılanır. Her bir ligasyon sinyali, datanın analizinde birkaç olası dinükleotide karşılık

gelir. Bu sebeple ham data bilinen bir nükleotidin eklenmesiyle doğrudan ilişkili değildir. Dizi analizindeki nükleotidlerin identifikasyonu ard arda gerçekleşen iki ligasyon reaksiyonunun renk analizine göre yapılır.

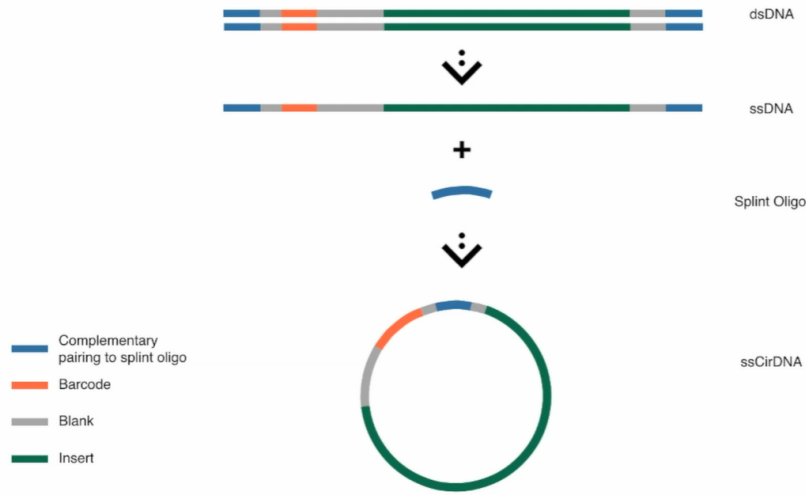
- **Complete Genomics, BGI, MGI (DNB Teknolojisi)**

2006 yılında kurulan Complete Genomics, 2013 yılında Çin'in en büyük biyoteknoloji şirketi olan BGI tarafından satın alınmıştır. Complete Genomics, BGI veya BGI'nin alt kuruluşu olup Türkiye pazarında son 3 yıldır var olan MGI firmalarına ait dizileme cihazları, dizilemede DNA'yı son olarak nanoball (DNB) formuna getirir.



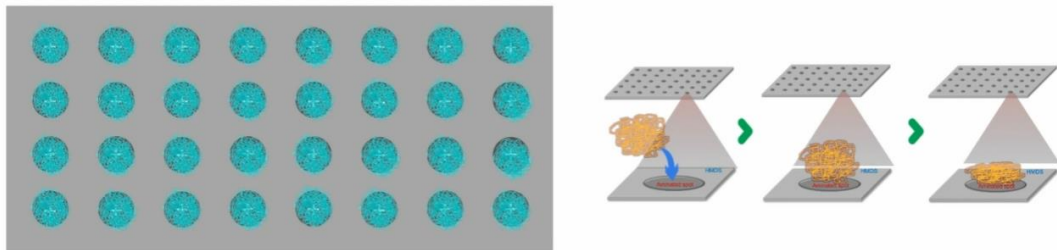
Şekil 2.22 DNA'nın nanoball (DNB) formu

Kütüphane hazırlamada ilk olarak DNA restriksiyon endonükleazlarla istenilen boyda fragmanlara ayrılır. Oluşturulan bu fragmanların ucuna dizisi bilinen oligonükleotidler (adaptörler) eklenerek kütüphane amplifiye edilir. Ardından, çift iplikli ve lineer DNA fragmanları; tek iplikli ve sirküler (ss-cirDNA) forma getirilir. Oluşturulan her ss-cirDNA kalıp olarak kullanılarak, dizileme sırasında her bazdan alınan sinyali arttırmak için; 350-500 bp'den oluşan tek iplikli ve sirküler yapıdaki DNA fragmanları, RCA ile DNB formuna dönüştürülür.



Şekil 2.23 ss-cir DNA yapısı

Oluşturulan DNB'ler, üzerindeki (+) yüklü spotlara yerleşmek üzere flow celle yüklenir. Kombinasyonel prob-çapa ligasyonu (cPAL) veya kombinasyonel prob-çapa sentezi (cPAS) yoluyla dizileme gerçekleştirilir. 4 farklı baz için, 4 farklı florofor ile işaretli bilinen tek bir baz ve dejenere bazlardan oluşan proplar kullanılır. Dizileme sırasında uygun proplar, çapa diye adlandırılan bölgeleri sayesinde, kütüphanedeki adaptör dizilerini tanıyarak ligasyon ile birleşirler. Hibridize olan proplar floresan bir ışımaya yapar. Bu sebeple her döngüde yüksek çözünürlüklü kameralar ile flow cellin görüntüsü alınır. Ardından prob ve çapa yapısı çıkarılır ve bir sonraki döngü başlar. DNB teknolojisinde dizileme, dizileme stratejisine göre tek ve çift yönlü olarak yapılabilir. Aynı zamanda DNB teknolojisi ile dizileme 50 bp ile 400 bp aralığındaki okumalara olanak sağlar.



Şekil 2.24 DNB'lerin Flow Cell üzerindeki bağlanma noktaları

2.4.4.3 Tek Molekül Dizileme (PacBio, Oxford Nanopore)

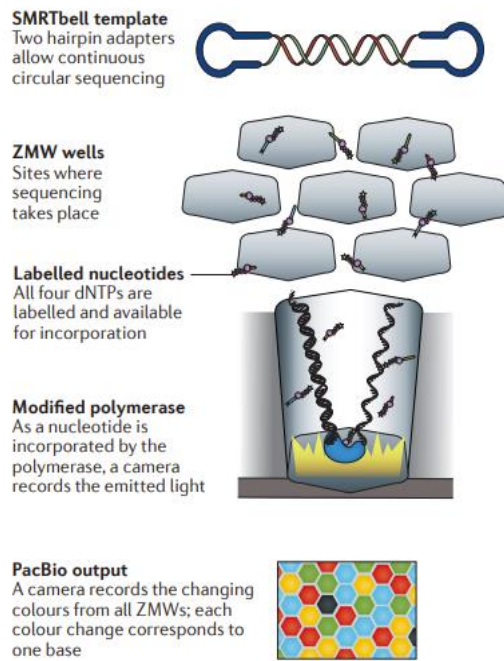
Tek molekül dizileme teknolojisi 'üçüncü nesil dizileme' olarak da adlandırılır. NGS teknolojisinde çift yönlü, kısa okumalar genomların uzun tekrar bölgeleri, kopya sayısı değişikliklerinin analizinde yetersiz kalmıştır. Bu teknolojidaki yöntemler, tek bir DNA

molekülünden yeni ipliğin sentezinde kimyasal lüminisans yoluyla sinyal belirlenerek DNA dizisini çıktı olarak verir. Tek molekül dizileme teknolojisi, diğer NGS platformlarına göre daha düşük miktarda başlangıç materyali ile daha kolay örnek hazırlamaya olanak sağlar.

Tek molekül dizileme teknolojisi birkaç kilobazdan fazla bölgenin dizilenmesine olanak sağlar. Uzun okumalar aynı zamanda transkriptomik araştırmalar için de kullanılır.

- **Pacific Bioscience**

Tek molekül dizileme platformlarından en yaygın kullanılan, 2010 yılında Pacific Bioscience tarafından geliştirilen, gerçek zamanlı dizileme (SMRT) teknolojisidir. Bu teknolojiye binlerce pikolitre kuyusu olan özel bir akış hücresi kullanılır (zero-mode waveguide ZMW). PacBio teknolojisinde DNA polimeraz ZMW içerisinde sabitlenmiştir. DNA dizilemesi için kalıp DNA polimeraz ile bağlanır. 4 farklı floresanla işaretli dNTP ile yeni zincirin sentezi gerçekleştirilir. Yeni ipliğin sentezi sırasında her bir dNTP eklendiğinde yayılan ışığın rengini ve süresini kaydeden lazer ve kamera sistemi ile anlık olarak kaydedilerek gerçek zamanlı olarak görselleştirilir.

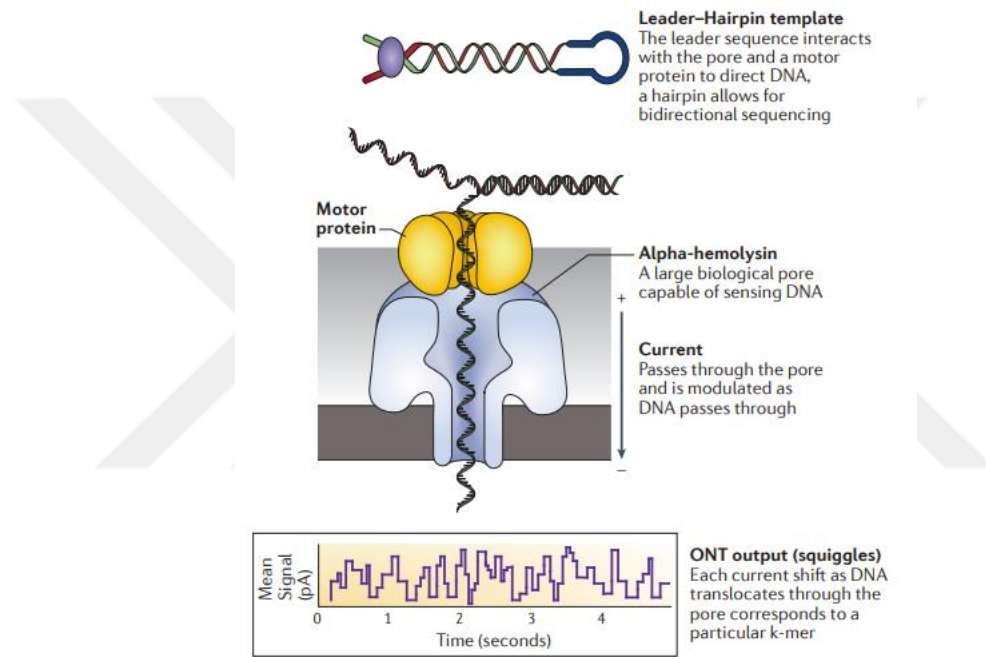


Şekil 2.25 Pasific Bioscience yöntemi ile DNA dizileme (Goodwin v.d., 2016)

- **Oxford Nanopore**

Oxford Nanopore teknolojisi ilk olarak 2014 yılında piyasaya sürülmüştür. Diğer dizileme platformlarından farklı olarak; bir kalıp DNA dizisinin komplementer dizisini

okuyan nükleotidlerin birleşmesini veya problemlerin hibridizasyonunu içermez. Diğer platformlar bir sinyal olarak; ışık, renk veya pH kullanırken nanopor dizileyciler tek bir ssDNA molekülünün α -heptamerik (α HL) por boyunca dizisini doğrudan tespit eder. α HL por 100 mV'ın üzerindeki voltajı tolere edebilir özelliğe sahiptir. DNA başlangıçta 8–10 kb'ye parçalanır. Ardından elektrik akım altında nanopordan geçirilir. DNA nanopor boyunca yer değiştirirken, voltajda karakteristik bir kayma gözlemlenir. Kaymanın büyüklüğü ve süresi dahil olmak üzere çeşitli parametreler kaydedilir ve belirli bir k-mer dizisi olarak yorumlanabilir. Bir sonraki baz nanopora geçerken, yeni bir k-mer voltajı modüle eder ve tanımlanır.



Şekil 2.26 Oxford Nanopore tekniği ile DNA dizileme (Goodwin v.d., 2016)

2.5 NGS İle Üretilen Dataların Kalite Değerlendirmeleri

Yüksek verimli yeni nesil dizileme cihazları, fastq dosya formatında ham data oluşturur. Oluşturulan bu ham data, biyoinformatik tekniklerle işlenerek analize hazır hale getirilir. Dizileme sırasında; kimyasal reaksiyonda, cihazın mekaniğinde veya kütüphane hazırlama sürecinde laboratuvar kısmında meydana gelebilecek hatalar dataların kalitesini doğrudan etkiler. Bu süreçte biyoinformatik analizlerin her bir basamağından sonra dataların kalite değerlendirmesi yapıp, yeterli kalitede olmayan datalar için bir sonraki aşamaya geçilmemelidir. NGS ham datalarının doğru analiz edilmesi,

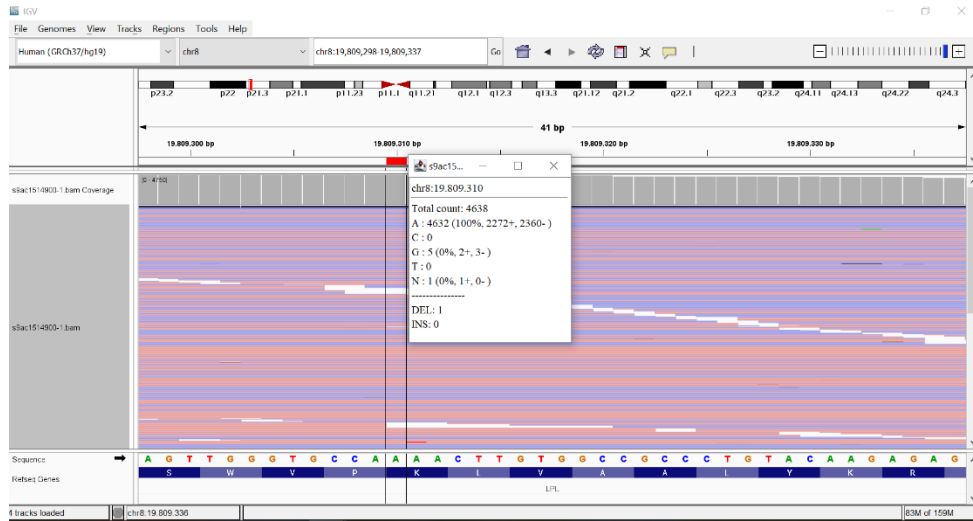
biyoinformatik süreciyle doğrudan bağlantılı olduğundan biyoinformatik süreçte dataların kaliteleri iyi değerlendirilmelidir.

2.5.1 Data Boyutu

Dizileme sonrası NGS platformunun ürettiği data boyutu (GB cinsinden) birebir ilişkili olmasa da, datanın kalitesiyle alakalı bir fikir vermektedir. Data boyutunun birebir kalite ile ilişkisi olmasa da laboratuvar deneyimiyle birlikte datanın kalitesi hakkında fikir yürütülebilir. Örneğin; FFPE (parafine gömülü doku) numunesinden yapılan bir dizilemede data boyutunun beklenenden fazla olması, datanın duplikasyon oranının fazla olduğunu gösterir. Bu da analiz sırasında yanlış değerlendirmelere sebep olabilir.

2.5.2 Datanın Derinliği

Derinlik (coverage), bir pozisyondaki nükleotidin toplam okunma sayısını ifade eder. Ortalama derinlik değeri ise, okunan her bir nükleotidin toplam hedef dizinin uzunluğuna bölünmesiyle bulunur. Datanın derinliği 'x' olarak belirtilir. Dizilerin derinliği biyoinformatik analizlerle belirlenebileceği gibi, dizilemede elde edilen verilerin görüntülenmesi amacıyla geliştirilmiş IGV (integrative genome viewer) programında da görülebilir.



Şekil 2.27 DNA dizileme sonucu elde edilen bir datanın IGV görüntüsü

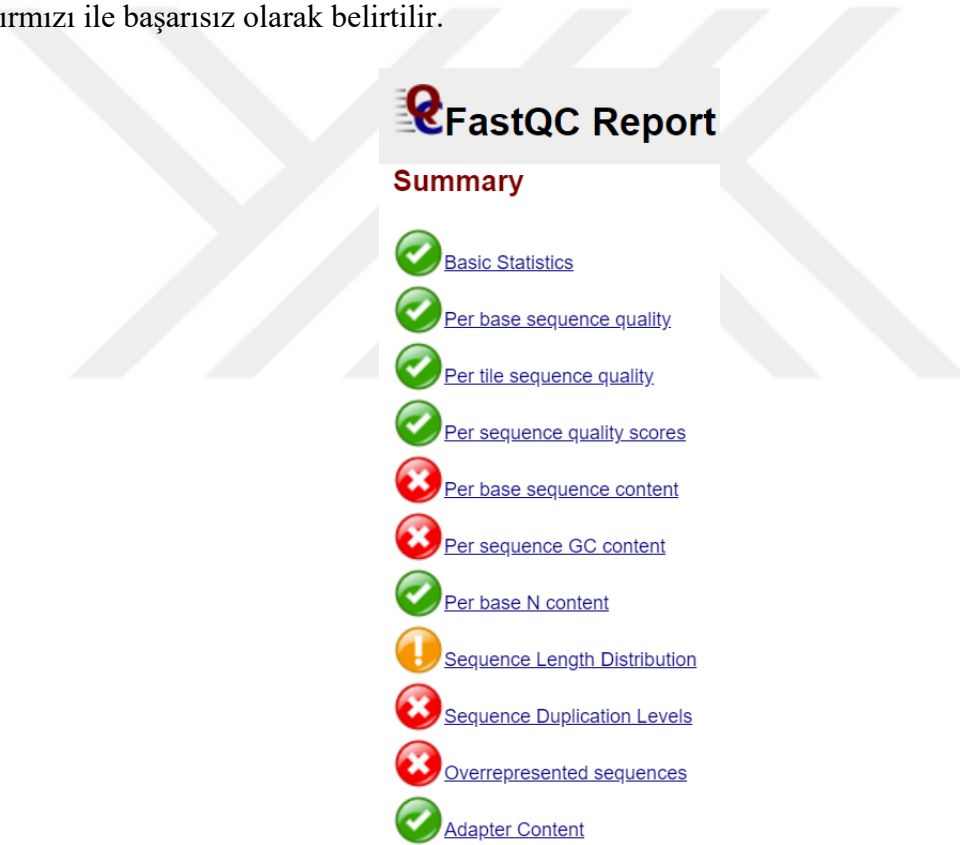
Şekil 2.27’ de insan genomunun 8. kromozomunun, 19.809.310 koordinatında A bazının okunma sayısı, derinliği 4638x olarak IGV’de gösterilmiştir.

2.5.3 FastQC

Fastq dosyalarının kalitelerinin değerlendirilmesi için birçok algoritma geliştirilmiştir. Yapılacak analizin özelliğine göre farklı algoritmalar (FaQCs, FastQC, FASTX-Toolkit ve PRINSEQ-lite) kullanılsa da, insan gDNA'sının gen kodlayan bölgelerinin analizinde en çok FastQC algoritması tercih edilir.

FastQC, yüksek verimli yeni nesil dizileme verilerindeki potansiyel sorunları tespit etmek için tasarlanmış bir algoritmadır. FastQC, bir ya da birden fazla fastq dosyası üzerinde bir dizi analiz çalıştırarak, dizilemenin kalitesini gösteren sonuçları özetleyen bir rapor üretir.

FastQC, dataların temel kalite kontrolünü 10 farklı kriter üzerinden yapar. Her parametre, referans değerlerinden sapma oranına bağlı olarak yeşil ile başarılı, turuncu ile uyarı veya kırmızı ile başarısız olarak belirtilir.

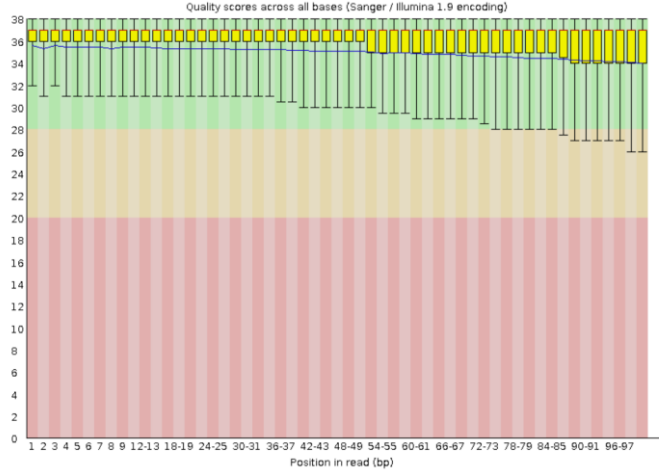


Şekil 2.28 Örnek bir FastQC raporu

FastQC raporunda analizi yapılan kalite parametreleri aşağıda belirtildiği gibidir:

- **Her Bazın Sekans Kalitesi**

Bu parametre, dizileme verisindeki tüm pozisyonları içerir. Dizideki her bazın kalite değerleri aralığına genel bir bakış sağlar. Her pozisyon için bir kutu grafiği şeklinde görselleştirilmiştir.



Şekil 2.29 Örnek bir her bazın sekans kalitesi raporu

Grafiğin x eksenini bp cinsinden pozisyonu belirtir. y eksenini ise; çok kaliteli okumalar (yeşil), makul kalitede okumalar (turuncu) ve kalitesiz okumalar (kırmızı) olmak üzere 3 bölgeye ayrılarak datanın kalite puanını gösterir.

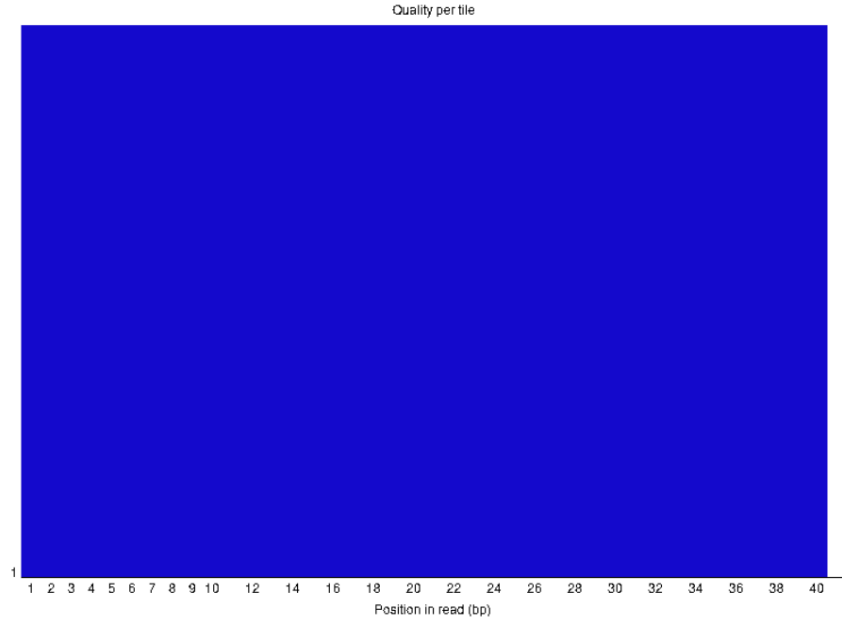
Her NGS platformunda dataların kalitesi okunan fragmanın sonuna doğru bir düşüş gösterir. Bu sebeple grafiğin sonlarında turuncu alana doğru görülen düşüşler direkt olarak datanın toplam kalitesiyle ilişkilendirilemez.

- **Flow Cellin Koordinatlarına Göre Sekans Kalitesi**

Bu parametre, dizileme sırasında flow cellin fotoğrafı çekilen her bir koordinatının (FOV) kalitesini gösterir. Şekil x ve y grafiklerine bakılarak flow cellin belirli bir bölgesinde kalite kaybı olup olmadığı anlaşılabilir.

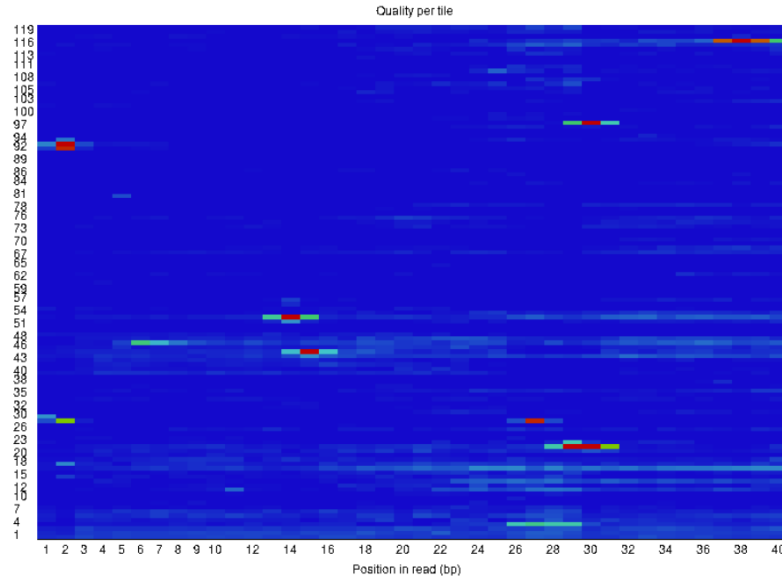
Grafikteki y eksenini; flow cellin FOV numarasını, x eksenini ; okumaların konumunu gösterir.

✓ Per tile sequence quality



Şekil 2.30 Flow Cellin koordinatlarına göre sekans kalitesi iyi bir dataya örnek grafik

✗ Per tile sequence quality



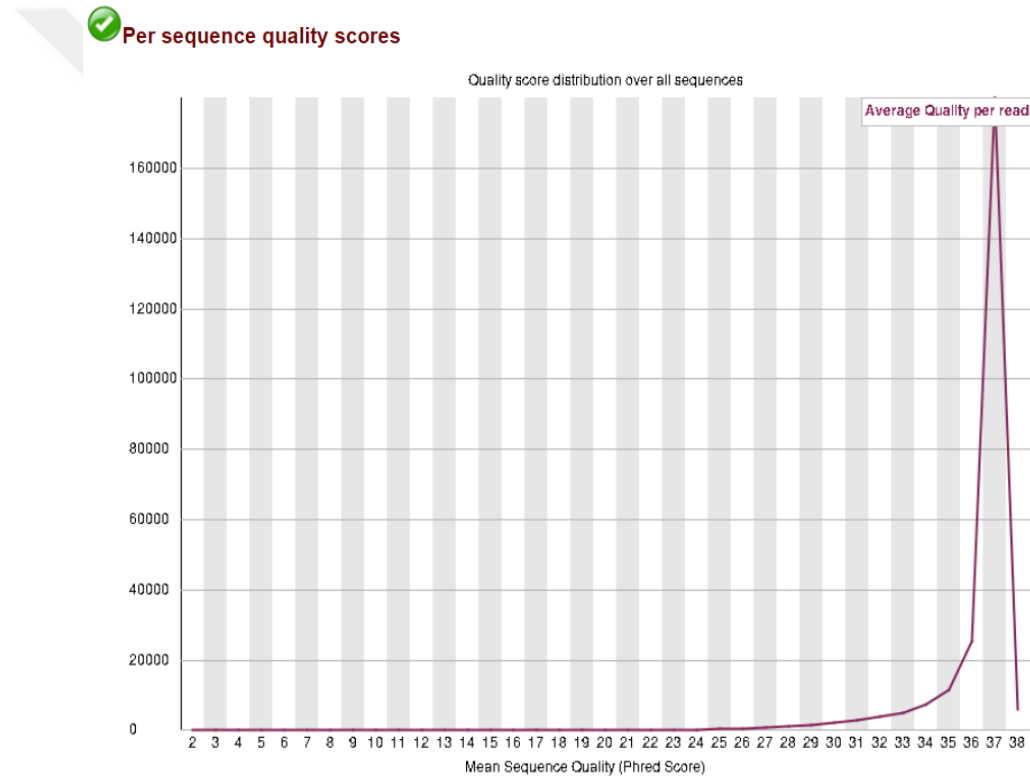
Şekil 2.31 Flow Cellin koordinatlarına göre sekans kalitesi kötü bir dataya örnek grafik

Grafikteki gösterim, her karo için ortalama kaliteden sapmayı ifade eder. Grafikteki renkler kaliteyi belirtir. Mavi, ortalama kaliteyi gösterirken mavi dışındaki renkler o konumdaki dizileme kalitesinin ortalamadan farklı olduğunu temsil eder.

Bu grafikte verilen uyarı veya hatalar; flow cell üzerinden geçen reaktiflerde oluşan kabarcıklar gibi geçici sorunlardan kaynaklanabilirken, flow cellin belirli koordinatlarında oluşan kimyasal birikintiler veya çok yüksek yoğunlukta sinyaller gibi kalıcı sebepler de olabilir.

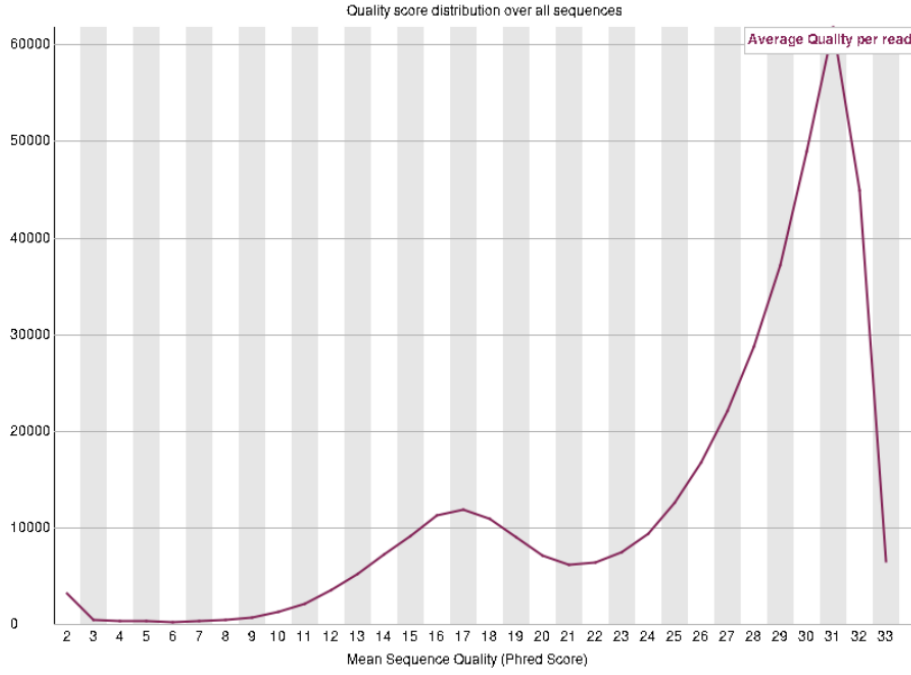
- **Dizi Başına Kalite Puanı**

Dizi başına kalite puanı raporunda; her bir konumun ayrı ayrı kalitesini göstermek yerine, her okumanın ortalama Phred puanı kümülatif bir grafik üzerinden gösterilir. Grafikte x eksenini; okuma sayısını, y eksenini; ortalama Phred puanını gösterir. Bu parametre dizinin ortalama kalitesi 27'nin altındaysa (%0,2'lik hata oranı) uyarı, 20'nin altındaysa (%1'lik hata oranı) hata verir.



Şekil 2.32 Dizi başına kalite puanı iyi bir dataya örnek grafik

Per sequence quality scores



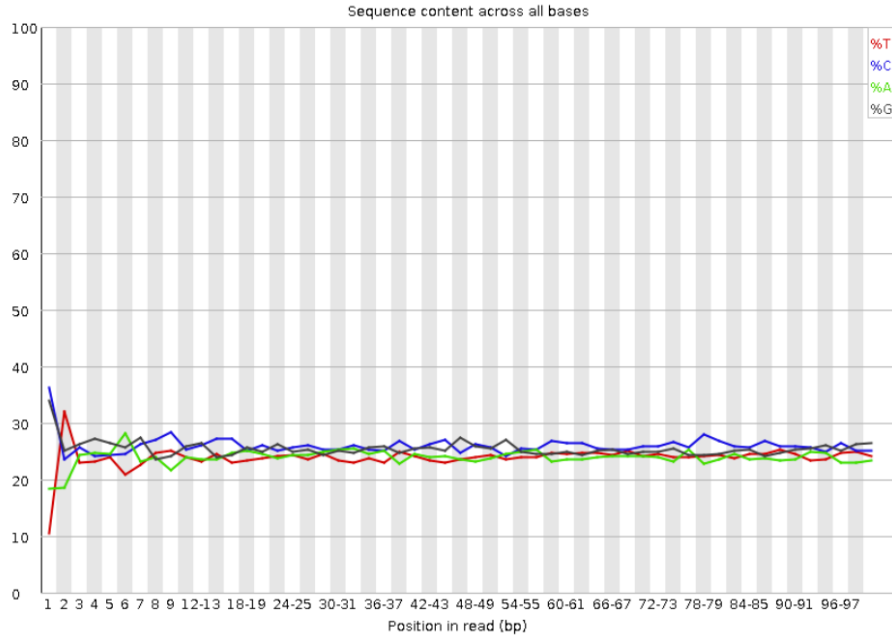
Şekil 2.33 Dizi başına kalite puanı kötü bir dataya örnek grafik

- **Her Sekanstaki Baz İçerikleri**

Bu grafik, her dizideki A,G,T,C baz içeriklerini gösterir. Her baz farklı bir renk ile ifade edilir. Grafikteki y eksenini; bazların yüzdesini, x eksenini; okumadaki konumu gösterir. Standart kaliteli bir dizilemede, grafikteki her bazı ifade eden 4 farklı çizginin birbirine paralel olması beklenir.

Bu parametre; herhangi bir pozisyonda A ile T veya C ile G arasındaki fark %10'dan fazlaysa uyarı, %20'den fazlaysa hata verir.

! Per base sequence content



Şekil 2.34 Her sekanstaki baz içeriğine örnek bir grafik

Şekil 1.34'te nispeten kaliteli bir dataya ait grafiğe yer verilmiştir. Grafiğin başındaki 10-15 bp aralığındaki dalgalanma barkod dizilerinin okunmasından kaynaklanmaktadır.

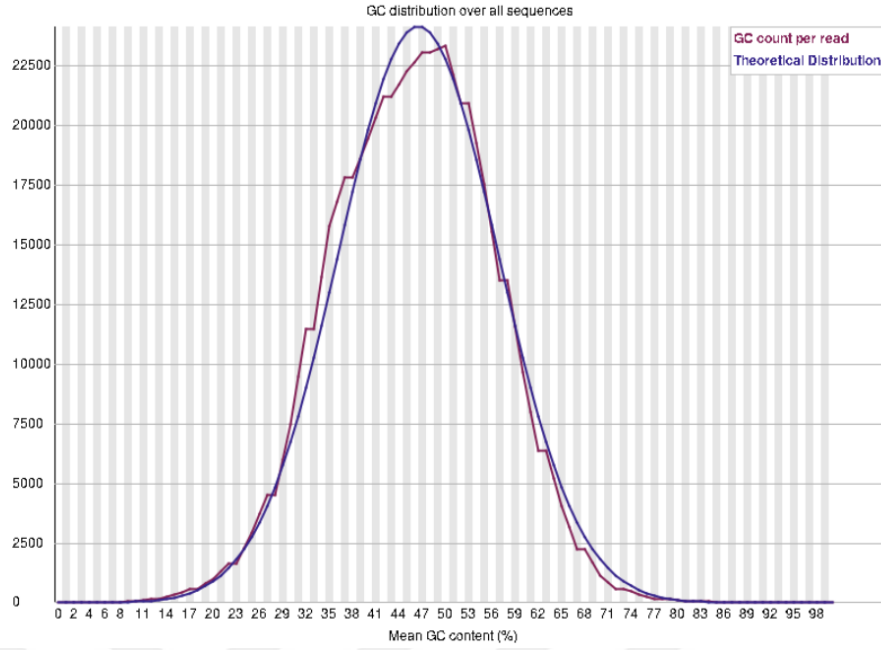
- **Her Sekanstaki GC İçeriği**

Bu parametrede grafik üzerinde, dizileme sırasında oluşturulan GC içeriği oranı ile rastgele bir dizileme çalışmasında teorik olarak çizilen GC oranı karşılaştırılır.

Grafikte x eksen; okuma sayısını, y eksen; ortamala % cinsinden GC içeriğini belirtir.

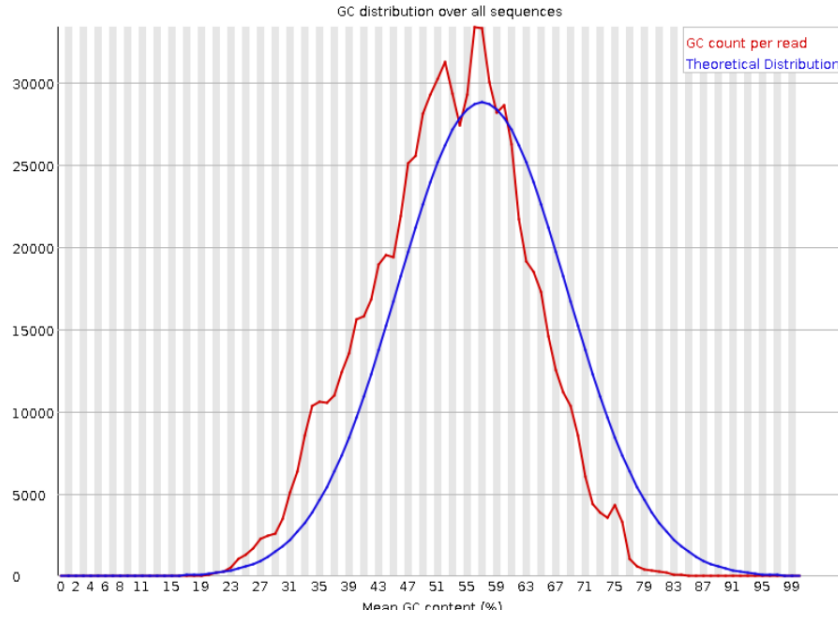
Bu parametre bir dizinin GC içeriğinin oranı normal dağılımdan %15 fazla saptığında uyarı, %30'dan fazla saptığında hata verir.

✓ Per sequence GC content



Şekil 2.35 GC içeriği açısından kaliteli dataya örnek bir grafik

✗ Per sequence GC content



Şekil 2.36 GC içeriği açısından kalitesi kötü dataya örnek bir grafik

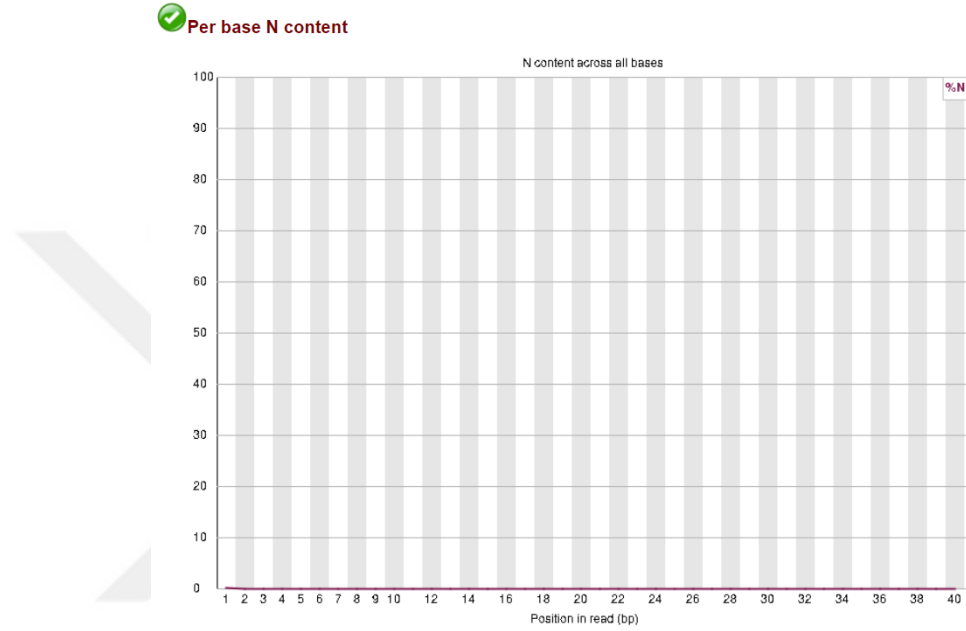
- Her Bir Bazın N İçeriği

Yeni nesil dizileme teknolojilerinde dizileme sırasında baz tayini yapabilmek için alınan sinyalin kalitesinin düşük kaldığı, cihazın baz tayini yapamadığı durumlarda diziye N adı

verilen bir bileşen atanır. Bu parametre, her bir pozisyondaki N yüzdesini grafiksel olarak gösterir.

Bu parametre; herhangi bir konumun N içeriği %5'ten fazla ise uyarı, %20'den fazla ise hata verir.

Okumaların başlarında ve sonlarında grafikte görülebilecek dalgalanmalar normal olarak kabul edilir.



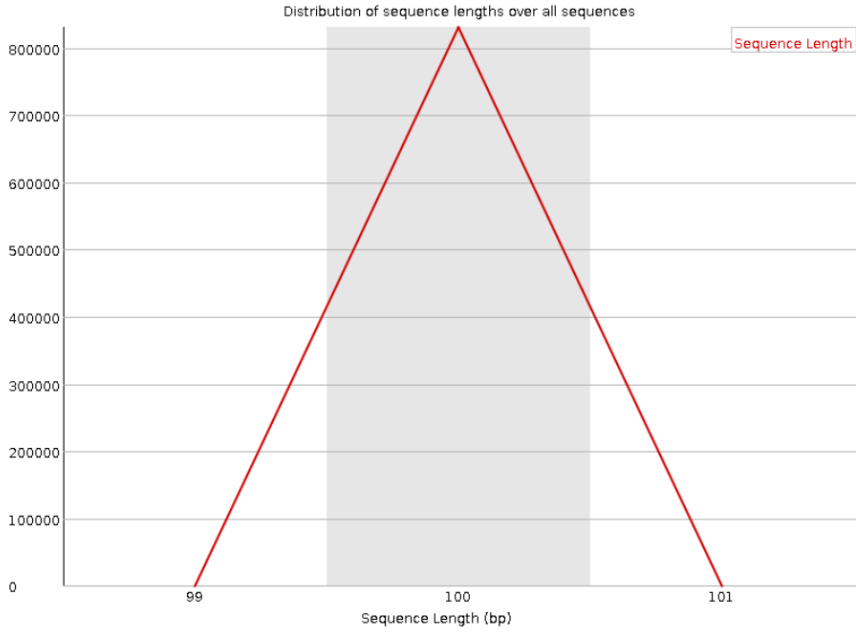
Şekil 2.37 Her bazın N içeriği parametresi açısından kaliteli dataya örnek bir grafik

- **Dizi Uzunluklarının Tüm Dizilere Dağılımı**

Bu parametre, analiz edilen fastq dosyasında dizilenen fragman boyutlarının dağılımını gösteren bir grafik oluşturur. Grafikte x eksenini; okuma sayısını, y eksenini ; okuma uzunluğunu bp cinsinden gösterir.

Dizilenen tüm fragmanlar aynı uzunlukta değilse bu parametre uyarı verir. Grafikte dizilerden biri sıfır uzunluğuna sahipse hata verir.

Sequence Length Distribution



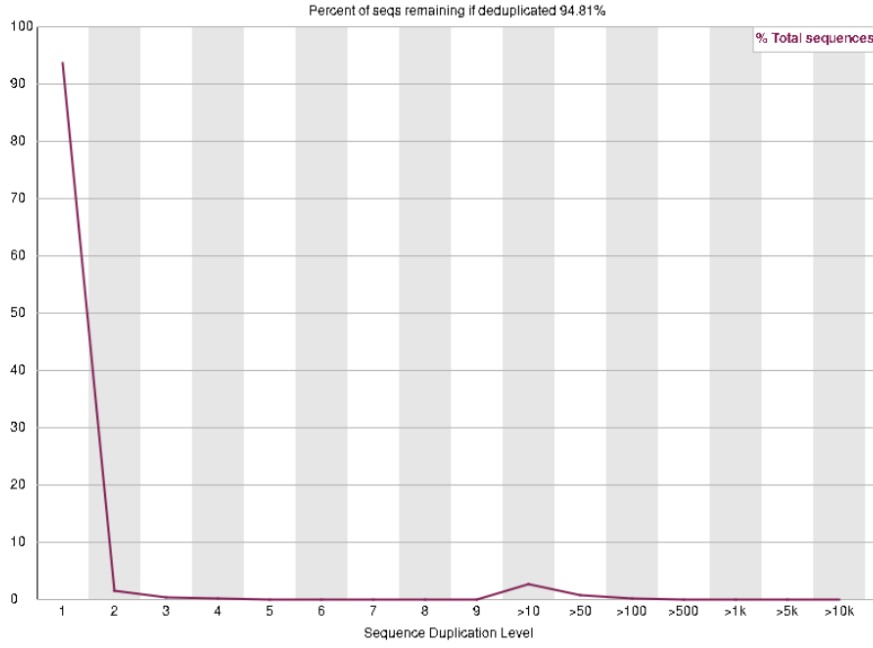
Şekil 2.38 Dizi uzunluklarının tüm dizilere dağılımı açısından kaliteli dataya ait örnek bir grafik

- **Sekans Duplikasyon Oranı**

Bu parametrede, her okuma için yineleme derecesi sayılarak, farklı yineleme dereceleriyle okuma sayısını gösteren bir grafik oluşturulur. Bu grafikte dizileme sırasında üretilen datanın kalitesini belirleyebilmek için kütüphane hazırlığındaki amplifikasyon aşamasında oluşan duplikasyonlar gösterilir. Grafikteki x eksen; duplikasyon yüzdesini, y eksen; duplikasyon seviyesini gösterir. Mavi çizgi, amplifiye edilen tüm dizilerin sayısını belirtir. Yüzdesi toplam okuma sayısına göre hesaplanır. Kırmızı çizgi ise, amplifiye edilen farklı dizilerin sayısını ifade eder. Yüzdesi, datadaki farklı dizilerin toplam sayısına göre hesaplanır.

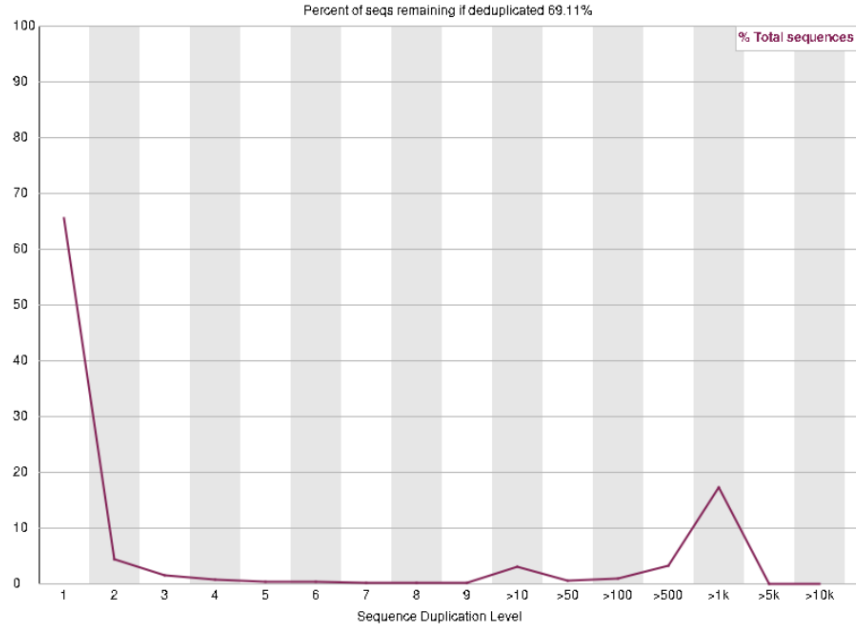
Bu parametre duplike diziler toplamın%20'sinden fazlaysa uyarı, %50'sinden fazlaysa hata verir.

Sequence Duplication Levels



Şekil 2.39 Sekans duplikasyon oranı açısından kaliteli dataya ait örnek bir grafik

Sequence Duplication Levels



Şekil 2.40 Sekans duplikasyon oranı açısından kalitesi kötü dataya ait örnek bir grafik

- **Yinelenen Diziler**

Normal bir dizileme datusında çok sayıda, çeşitli dizilerin olması beklenir. Datada 20 bp veya daha uzun bir dizinin çok sayıda tekrarının bulunması; adaptör dimerlerinin veya

kontaminasyonun varlığına işaret eder. Bu parametrede, toplam dizilerin %0,1'inden fazlasını oluşturan tüm diziler listelenir.



Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
AGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTAACACTTTC	2065	0.5224039181558763	No Hit
GATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATG	2047	0.5178502762542754	No Hit
ATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGA	2014	0.5095019327680071	No Hit
CGATAAAAATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTAT	1913	0.4839509420979134	No Hit
GTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGA	1879	0.47534961850600066	No Hit
AAAAATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCT	1846	0.4670012750197325	No Hit
TGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCAT	1841	0.46573637449150995	No Hit
AACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTAA	1836	0.46447147396328753	No Hit
GATAAAAATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATC	1831	0.4632065734350651	No Hit
ATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCA	1779	0.45005160794155147	No Hit
AAATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTC	1779	0.45005160794155147	No Hit
AATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCC	1760	0.4452449859343061	No Hit
AAAAATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTT	1729	0.4374026026593269	No Hit
CGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAG	1713	0.43335492096901496	No Hit
ATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAG	1708	0.43209002044079253	No Hit
CAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTAACACTTT	1684	0.42601849790532476	No Hit
TGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTAACACT	1668	0.4219708162150128	No Hit
CAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTA	1668	0.4219708162150128	No Hit
TATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAA	1630	0.4123575722005221	No Hit
GTATGGAAGCGATAAAACTCTGCAGGTTGGATACGCCAA	1620	0.40982777114407726	No Hit
AACTTCTGCGTATGGAAGCGATAAAACTCTGCAGGTTGG	1616	0.4088158507214993	No Hit
GCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTAACACTT	1580	0.39970856691829754	No Hit
TGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACG	1569	0.3969257857562082	No Hit
GGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGC	1542	0.39009532290380683	No Hit
ATAAAAATGATTGGCGTATCCAACCTGCAGAGTTTTATCG	1481	0.37466353645949285	No Hit
ACCTGCAGAGTTTTATCGCTTCCATGACGCGAGAAGTTAAC	1479	0.37415757624820384	No Hit
ATGGAAGCGATAAAACTCTGCAGGTTGGATACGCCAATCA	1452	0.3673271133958026	No Hit
GATAAACTCTGCAGGTTGGATACGCCAATCATTTTTATC	1420	0.35923175001517876	No Hit
CGTCATGGAAGCGATAAAACTCTGCAGGTTGGATACGCCA	1412	0.3572079091700229	No Hit
ACTTCTGCGTATGGAAGCGATAAAACTCTGCAGGTTGGA	1368	0.34607678452166524	No Hit

Şekil 2.41 FastQC raporundan örnek yinelenen dizilerin listesi

3.1 Materyal-Metod

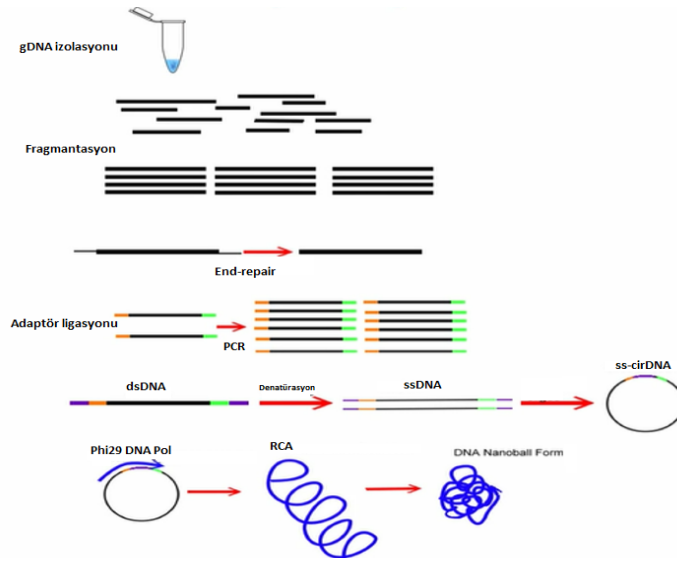
48 adet periferik kan örneğinden Promega Maxwell® 48 otomatize sistemi ile genomik DNA'lar izole edildi. DNA'ların miktar tayini için, Invitrogen'in Qubit 4 Fluorometer cihazı ile Promega'nın dsDNA System ölçüm kiti kullanıldı. Florometrik ölçüm ile DNA'ların konsantrasyonlarının, 8 ile 50 ng/μl arasında olduğu belirlendi.

Dizilenmek istenen genlerin ekzonik bölgelerine uygun dizayn edilen forward ve reverse primerler ile genler amplifiye edildi. Amplikonlar; aynı amplikondan bir havuzda olmayacak şekilde 24 çift olarak pool edildi.

100-280 amplikon içeren poolların MGI DNB Seq-G400 ve Illumina-Miniseq cihazlarında dizilenmesi için iki ayrı protokol izlendi.

3.1.1 MGI DNB Seq G400 ile In-House Dizileme

24 adet gen poolunun konsantrasyonları Qubit 4 Fluorometer cihazı ile belirlendi. MGI Easy Fs DNA Library Prep Kit kullanılarak aşağıda belirtilen aşamaların takibi sonucunda, dizileme için kütüphane hazırlandı.



Şekil 3.1 MGI DNB Seq G400 ile dizileme iş akışı

3.1.1.1 Fragmantasyon

Reaksiyon başlangıcı için; Z adet pooldan, 50 ng olacak hacimde ürün 0,2 mL'lik PCR tüpüne aktarılır. 45 µl olarak belirlenen başlangıç hacmine ulaşabilmek için; hacimce eksik kalan tüplerin üzerine dilüsyon bufferı eklenir. 45 µl – 50 ng olarak standardize edilen ürünler Tablo 3.1'de belirtilen miktarla hazırlanan fragmantasyon mixi ile karıştırılır.

Tablo 3.1 Fragmantasyon reaksiyonu

Reaktif	Miktar
Frag Buffer II	10 µl
Frag Enzyme II	5 µl
Toplam	15 µl

Tablo 3.2'de belirtilen thermal cycler programı başlatılır.

Tablo 3.2 Fragmantasyon programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
4 °C	∞
30 °C	14 dk
65 °C	15 dk
4 °C	∞

Fragmantasyon reaksiyonunun ardından fragmantasyon ile hedef bölgesinin altında (150 bp) kalan DNA parçaları aşağıdaki pürifikasyon ile manyetik beadler yardımıyla uzaklaştırılır.

İlk olarak fragmantasyon ürününün tamamı (60 µl), 54 µl DNA Clean Bead ile pipetaj yardımıyla 1,5 mL ependorfta karıştırılır.

Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyonun ardından manyetik standda alınır.

Manyetik standda manyetik beadler toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk) dikkatlice, hiç bead çekmemek üzere süpernatantın tamamı uzaklaştırılır.

Manyetik beadlerin üzerine 200 µl taze hazırlanmış, %80'lik etanol eklenerek 30 sn inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak, alkolle yıkama işlemi tekrarlanır.

2. yıkamanın ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak bead üzerinde ve tüpün çeperindeki alkolün tamamen buharlaşması için oda sıcaklığında kontrollü inkübasyon yapılır. Bu aşamada beadlerin aşırı kuruyup çatlamamasına özen gösterilir.

Tamamen kuruyan beadler 44 µl TE Buffer ile pipetaj yapılarak çözülür ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından tüpler manyetik standda alınır, beadler ependorfun çeperinde toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk), 41 µl supernatant dikkatlice yeni 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

3.1.1.2 End-Repair, A Tailing

40 µl fragmantasyon ürününe, Tablo 3.3' de belirtilen miktarlara göre hazırlanan ERAT mixi eklenir. 3 sn, 3 kere vortekslendikten sonra; kısa bir spin atılarak ürünün tamamı tüpün dibinde toplanır.

Tablo 3.3 ERAT reaksiyonu

Reaktif	Miktar
ERAT Buffer	7,1 µl
ERAT Enzyme Mix	2,9 µl
Toplam	10 µl

ERAT mixi ile karıştırılan fragmantasyon ürünü Tablo 3.4'deki thermal cyler programına tabi tutulur.

Tablo 3.4 ERAT programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
37 °C	30 dk
65 °C	15 dk
4 °C	∞

3.1.1.3 Adaptör Ligasyonu

ERAT reaksiyonunun ardından her pool farklı bir adaptörle işaretlenmek üzere; 5 µl MGI Easy Adaptörleri eklenerek Tablo 3.5' de belirtilen miktarlara göre hazırlanan Ligasyon mixi ile karıştırılır.

Tablo 3.5 Ligasyon reaksiyonu

Reaktif	Miktar
Ligation Buffer	23,4 µl
DNA Ligase	1,6 µl
Toplam	25 µl

Tablo 3.6' daki thermal cycler programı ligasyon reaksiyonu için başlatılır.

Tablo 3.6 Ligasyon programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
23 °C	30 dk
4 °C	∞

Reaksiyonun sonunda örnekler thermal cyclerden alınarak üzerlerine 20 µl TE Buffer eklenir. Ligasyon aşamasından sonra bead yardımıyla bir pürifikasyon daha yapılır.

50 µl DNA Clean Bead bulunan 1,5 ml'lik ependorf içine 100 µl ligasyon ürünü eklenerek, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.

Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyonun ardından manyetik standda alınır.

Manyetik standda manyetik beadler toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk) dikkatlice, hiç bead çekmemek üzere süpernatantın tamamı uzaklaştırılır.

Manyetik beadlerin üzerine 200 µl taze hazırlanmış, %80'lik etanol eklenerek 30 sn inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak, alkolle yıkama işlemi tekrarlanır.

2. yıkamanın ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak bead üzerinde ve tüpün çeperindeki alkolün tamamen buharlaşması için oda sıcaklığında kontrollü inkübasyon yapılır. Bu aşamada beadlerin aşırı kuruyup çatlamamasına özen gösterilir.

Tamamen kuruyan beadler 21 µl TE Buffer ile pipetaj yapılarak çözülür ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından tüpler manyetik standda alınır, beadler ependorfun çeperinde toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk), 19 µl süpernatant dikkatlice yeni 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

3.1.1.4 PCR

Ligasyon ürünleri, Tablo 3.7' ye göre hazırlanan PCR mixi ile karıştırılır.

Tablo 3.7 PCR reaksiyonu

Reaktif	Miktar
PCR Enzyme Mix	25 µl
PCR Primer Mix	6 µl
Toplam	31 µl

Kütüphanenin amplifikasyonu için ürünler, Tablo 3.8' deki thermal cyler programına tabi tutulur.

Tablo 3.8 PCR programı

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık	
95 °C	3 dk	x 1
98 °C	20 sn	x 12
60 °C	15 sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	10 dk	x 1
4 °C	∞	

PCR tamamlandıktan sonra manyetik bead yardımı ile pürifikasyon yapılır.

PCR ürünlerinin tamamı; 50 µl DNA Clean Bead bulunan 1,5 ml'lik ependorf içinde, tamamen homojen oluncaya kadar pipetaj ile karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk ünkübe edilir.

Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyonun ardından manyetik standı alınır.

Manyetik standda manyetik beadler toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk) dikkatlice, hiç bead çekmemek üzere süpernatantın tamamı uzaklaştırılır.

Manyetik beadlerin üzerine 200 µl taze hazırlanmış, %80'lik etanol eklenerek 30 sn inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak, alkolle yıkama işlemi tekrarlanır.

2. yıkamanın ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak bead üzerinde ve tüpün çeperindeki alkolün tamamen buharlaşması için oda sıcaklığında kontrollü inkübasyon yapılır. Bu aşamada beadlerin aşırı kuruyup çatlamamasına özen gösterilir.

Tamamen kuruyan beadler 32 µl TE Buffer ile pipetaj yapılarak çözülür ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından tüpler manyetik standı alınır, beadler ependorfun çeperinde toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk), 30 µl supernatant dikkatlice yeni 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

Pürifikasyonun ardından PCR ürünlerinin; Qubit 4 Fluorometer kullanılarak ng/µl cinsinden miktar tayini yapılır.

3.1.1.5 ss-cir

Son aşamada PCR ile çoğaltılan çift iplikli (dsDNA) ve lineer DNA kütüphanesini; tek iplikli ve sirküler (ss-cirDNA) forma getirebilmek için başlangıç dsDNA miktarının ng cinsinden değeri, 1 pmol olmak üzere aşağıdaki formüle göre belirlenir.

1 pmol PCR ürününe karşılık gelen DNA miktarı (ng) = DNA Fragman Boyu (bp) / 1000 x 660 (ng)

Formülde; oluşturulan dsDNA kütüphanesinin fragman boyu (364 bp) yerine koyulduğunda, her dsDNA kütüphanesinden 240,24 ng PCR ürünü ile reaksiyonun başlayacağı belirlenir.

240,24 ng olacak şekilde PCR ürünleri, yeni 0,2 ml'lik PCR tüplerine aktararak reaksiyon hacmi TE Buffer ile 48 µl'ye tamamlanır. Ardından 98 °C'de 3 dk denatüre edilir. (Tablo 3.9)

Tablo 3.9 Denatürasyon programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
95 °C	3 dk

Denatürasyonun ardından ürünler -20 °C'de 2 dk bekletilir. Sürenin sonunda tüplere kısa bir spin atılarak Tablo 3.10'da belirtilen miktarlara göre hazırlanan mix ile 3 sn, 3 defa vortekslenip spin atılarak Tablo 3.11'de belirtilen thermal cycles programına koyulur.

Tablo 3.10 ss-cirDNA reaksiyonu

Reaktif	Miktar
Splint Buffer	11,6 µl
DNA Rapid Ligase	0,5 µl
Toplam	12,1 µl

Tablo 3.11 ss-cirDNA programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
37 °C	30 dk
4 °C	∞

Reaksiyon tamamlandığında, tüpler buz üzerine alınarak hızlıca enzimatik digestion (parçalama) reaksiyonuna geçilir. Tablo 3.12'deki belirtilen miktarlara uygun hazırlanan reaksiyon mixi tüplere dağıtılarak 3 sn, 3 defa vorteklenir.

Tablo 3.12 Enzimatik parçalama reaksiyonu

Reaktif	Miktar
Digestion Buffer	1,4 µl
Digestion Enzyme	2,6 µl
Toplam	4 µl

Kısa bir spinin ardından ürünler Tablo 3.13'deki thermal cycler programına koyulur.

Tablo 3.13 Enzimatik parçalama programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
37 °C	30 dk
4 °C	∞

30 dk'nın sonunda ürünlerin içersine 7,5 µl Digestion Stop Buffer eklenerek ss-cirDNA reaksiyonu tamamlanmış olur. Ardından ss-cirDNA formunda olmayan DNA'ları uzaklaştırmak için pürifikasyon yapılır.

ss-cirDNA reaksiyon ürünlerinin tamamı; 170 µl DNA Clean Bead bulunan 1,5 ml'lik ependorf içinde, tamamen homojen oluncaya kadar pipetaj ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dk ünkübe edilir.

Oda sıcaklığında 10 dk inkübasyonun ardından manyetik standı alınır.

Manyetik standda manyetik beadler toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk) dikkatlice, hiç bead çekmemek üzere süpernatantın tamamı uzaklaştırılır.

Manyetik beadlerin üzerine 500 µl taze hazırlanmış, %80'lik etanol eklenerek 30 sn inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak, alkolle yıkama işlemi tekrarlanır.

2. yıkamanın ardından alkolün tamamı uzaklaştırılarak bead üzerinde ve tüpün çeperindeki alkolün tamamen buharlaşması için oda sıcaklığında kontrollü inkübasyon yapılır. Bu aşamada beadlerin aşırı kuruyup çatlamamasına özen gösterilir.

Tamamen kuruyan beadler 32 µl TE Buffer ile pipetaj yapılarak çözülür ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından tüpler manyetik standda alınır, beadler ependorfun çeperinde toplandıktan sonra (yaklaşık 2-5 dk), 30 µl supernatant dikkatlice yeni 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

Pürifikasyonun ardından ss-cir kütüphane ürünlerinin; Qubit® ssDNA Assay Kit kullanılarak ng/µl cinsinden miktar tayini yapılır.

3.1.1.6 DNB

DNB reaksiyonu için gerekli ss-cirDNA kitaplığı hacmi, gerekli kitaplık miktarı; 1 lanedeki içeriklerin toplamı 40 fmol olacak şekilde, her ss-cirDNA kitaplığı için z fmol olacak şekilde hesap edilerek belirlenir.

DNB reaksiyonu için gereken ss-cirDNA kitaplığı hacmi şu şekilde hesaplanır:

$$\text{ss-cirDNA miktarı } (\mu\text{L}) = 364 \times 330 \times z \text{ fmol} / \text{ss-cirDNA konsantrasyonu } (\text{ng} / \mu\text{L}) \times 10^6$$

DNB reaksiyonu için gerekli ss-cirDNA kitaplıklarının miktarı belirlendikten sonra; Tablo 3.14'te belirtilen miktarlar ile karıştırılır.

Tablo 3.14 DNB-1 reaksiyonu

Reaktif	Miktar
ss-cirDNA	V µl
Low TE Buffer	20-V µl
Make DNB Buffer	20 µl
Toplam	40 µl

Yukarıdaki tabloda belirtilen miktarlar karıştırılarak vortex spin yapılır ve primerlerin hibridizasyonu için Tablo 3.15'teki thermal cycler programına koyularak DNB-1 reaksiyonu gerçekleştirilir.

Tablo 3.15 DNB-1 programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (105 °C)	Açık
95 °C	1 dk
65 °C	1 dk
40 °C	1 dk
4 °C	∞

DNB-1 reaksiyonu tamamlandıktan sonra tüplere spin atılarak DNB-2 reaksiyonu için Tablo 3.16'daki miktarlara göre, buz üzerinde mix hazırlanır.

Tablo 3.16 DNB-2 reaksiyonu

Reaktif	Miktar
Make DNB Enzyme Mix I	40 µl
Make DNB Enzyme Mix II(LC)	4 µl

Hazırlanan mix, DNB-1 reaksiyonunun ürünü ile karıştırılır. Tablo 3.17'deki thermal cycler programına koyularak DNB-2 reaksiyonu gerçekleştirilir.

Tablo 3.17 DNB-2 programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (35 °C)	Açık
30 °C	25 dk
4 °C	∞

DNB-2 reaksiyonu bittiğinde hızlıca 20 µl Stop DNB Reaction Buffer eklenerek; kesik, geniş uçlu (wide bore tips) pipet ucuyla 8-10 kere yavaş yavaş karıştırılır.

DNB reaksiyonları tamamlandığında, Qubit® ssDNA Assay Kit kullanılarak DNB konsantrasyonları (ng/µl) belirlenir. Ölçüm sonucunda, DNB miktarı minimum 8 ng/µl, maksimum 40 ng/µl olmalıdır. DNB miktarı 8 ng/µl'nin altında ölçülürse, DNB reaksiyonları ss-cirDNA kütüphaneleriyle tekrarlanmalıdır. 40 ng/µl'nin üzerinde ölçülürse DNB Load Buffer I ile 20 ng/µl olacak şekilde dilüe edilmelidir.

Hazırlanan DNB'ler +4 °C'de maksimum 48 saat muhafaza edilebilir.

3.1.1.7 Dizileme

Dizileme için kullanılan NGS platformlarından ilki, MGI DNBSeg-G400'dır.

Miktar tayini yapıp, uygun sınırlar arasında kalan DNB'ler Tablo 3.18'deki miktarlara uygun hazırlanan DNB yükleme mixi ile; kesik, geniş uçlu pipet ucu yardımıyla yavaşça 8-10 defa karıştırılır.

Tablo 3.18 DNB yükleme reaksiyonu

Reaktif	Miktar
DNB Load Buffer II	8 µl
Make DNB Enzyme Mix II (LC)	0,25 µl
DNB	25 µl
Toplam	33,25 µl

Hazırlanan DNB karışımı; Portable DNB Loader üzerinde, geniş uçlu pipet ucu ile flow cell üzerine 30 µl yüklenir. DNB yüklenen flow cell, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir.

Flow cellin inkübasyonu sırasında sekans kartuşu Tablo 3.19'da belirtilen miktarlara göre hazırlanır.

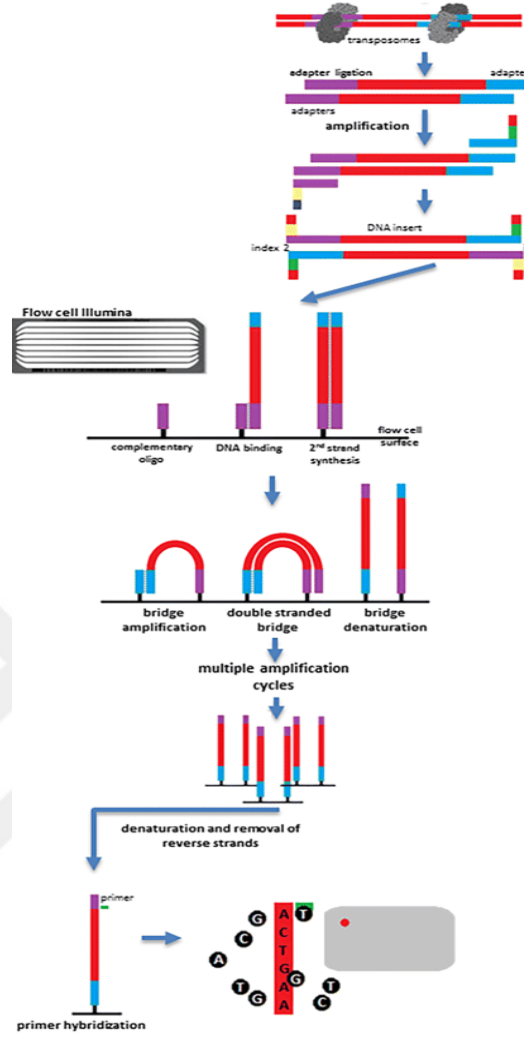
Tablo 3.19 PE100 Sekans kartuşu hazırlama

Kuyu Numarası	Eklenen Reaktif	Miktar
1	dNTP Mix	1800 µl
	Sequencing Enzyme Mix	1800 µl
2	dNTP Mix II	1500 µl
	Sequencing Enzyme Mix	1500 µl
15	MDA Reagent	3500 µl
	MDA Enzyme Mix	500 µl

Flow cell inkübasyonunun ardından hazırlanan sekans kartuşu ve flow cell, MGI DNBSeg-G400 cihazına yerleştirilir. Cihazda PE100 okuması için gerekli bilgiler girilerek run başlatılır.

3.1.2 Illumina Miniseq ile In-House Dizileme

24 adet gen poolunun konsantrasyonları Qubit 4 Fluorometer ile belirlendi. Illumina DNA Prep Kit kullanılarak aşağıda belirtilen aşamaların takibi sonucunda, dizileme için kütüphane hazırlandı.



Şekil 3.2 Illumina Miniseq ile dizileme iş akışı

3.1.2.1 Tagment Genomik DNA

Başlangıç DNA miktarı 100-500 ng olacak şekilde 2-30 µl arasında örnekler; 0,2 ml'lik PCR tüplerine aktarılır. Eğer örnek miktarı 30 µl'den az olursa, hacim nükleaz-free su ile 30 µl'ye tamamlanır.

Tablo 3.20 Fragmantasyon reaksiyonu

Reaktif	Miktar
BLT (Bead ile bağlı transposon)	11 µl
Tagmentation Buffer 1	11 µl

Tablo 3.20’de belirtilen miktarlarda hazırlanan mixlerden 20 µl’si 30 µl örnek ile karıştırılır ve Tablo 3.21’de belirtilen thermal cyclus programına tabi tutulur.

Tablo 3.21 Fragmentasyon programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (100 °C)	Açık
55 °C	15 dk
10 °C	∞

3.1.2.2 Pürifikasyon

Reaksiyonun ardından, tüplere 10 µl Tagment Stop Buffer eklenerek, pipetaj ile beadler homojenize edilir. Tablo 3.22’deki thermal cyclus programına tabi tutulur.

Tablo 3.22 Pürifikasyon programı

Sıcaklık	Zaman
Kapak Sıcaklığı (100 °C)	Açık
37 °C	15 dk
10 °C	∞

PCR tüpleri manyetik standda koyularak sıvı temiz olana kadar (~3 dk) inkübe edilir.

Süpernatantın tamamı uzaklaştırılır.

PCR tüpü manyetik standdan alınarak; tüpün çeperinde toplanan bead, 100 µl Tagment Wash Buffer ile yavaş yavaş pipetaj yapılarak çözülür. Ardından tüp tekrar manyetik standda alınır ve yaklaşık 3 dk sonunda süpernatant uzaklaştırılır.

Yıkama işlemi bir kere daha tekrarlanır.

3.1.2.3 PCR

Bu aşamada, adaptör dizileri ile etiketlenmiş DNA sınırlı döngülü bir PCR programı kullanarak amplifiye edilir. PCR adımı Index1 (i7) ve Index2 (i5) adaptörlerini ekler.

Tablo 3.23 PCR reaksiyonu

Reaktif	Miktar
Enhanced PCR Mix	22 µl
Nükleaz-free su	22 µl

Tablo 3.23'de belirtilen master mix'in 40 µl'si manyetik standda bekleyen bead ile homojen olana kadar karıştırılır. Ardından i5 ve i7 adaptörlerinden 5'er µl eklenir ve Tablo 3.24'te belirtilen thermal cyclus programına koyulur.

Tablo 3.24 PCR programı

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Kapak Sıcaklığı (100 °C)	Açık	
68 °C	3 dk	x 1
98 °C	3 dk	x 1
98 °C	45 sn	x 12
62 °C	30 sn	
68 °C	2 dk	
68 °C	1 dk	x 1
4 °C	∞	

3.1.2.4 Pürifikasyon

PCR ürünleri manyetik standda alınarak oda sıcaklığında ~5 dk inkübe edilir. 5 dk sonunda tamamen berraklaşan süpernatantın 45 µl'si yeni bir 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

45 µl PCR ürününün üzerine 40 µl nükleas-free su ve 45 µl Sample Purification Bead (SPB) eklenerek pipetaj ile homojenize edilir.

Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyonun ardından, manyetik standda ~5 dk inkübe edilir. Süpernatanttan alınan 125 µl ürün, 15 µl SPB ile yeni bir 0,2 ml'lik PCR tüpünde karıştırılır. Üzerine 81 µl SPB eklenerek oda sıcaklığında 5dk ve ardından manyetik standda 5dk inkübe edilir.

İnkübasyonun ardından tamamen temizlenen süpernatantın tamamı uzaklaştırılır ve yıkama işlemine başlanır.

Tüpün çeperindeki bead üzerine; taze hazırlanmış, %80'lik etanol eklenir. 30 sn inkübasyonun ardından süpernatantın tamamı uzaklaştırılır.

Aynı yıkama işlemi bir kere daha tekrarlanır. Ardından bead kurumaya bırakılır. Alkolden tamamen arandıktan sonra 32 µl Resuspension Buffer eklenerek; oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilir. Oda sıcaklığında inkübasyonu tamamlandıktan sonra manyetik standda alınarak 2 dk kadar bekletilir. 2 dk'nın sonunda 30 µl süpernatant yeni bir 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

Pürifikasyonun sonunda hazırlanan kütüphanenin miktar tayini, Qubit 4 Fluorometer ile yapılır.

3.1.2.5 Dizileme

Hazırlanan kütüphanenin Illumina MiniSeq cihazında dizilenmesi için ilk olarak 'MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide' prosedürü takip edilerek, kütüphane 1,4 pM konsantrasyonuna dilüe edilip denatüre edilmelidir.

Kütüphaneler, kütüphane hazırlama protokollerinde önerilen standart miktar tayini ve kalite kontrol prosedürleri kullanılarak normalleştirilir.

Küme(cluster) üretimi için kitaplıkları denatüre etmek üzere her zaman taze seyreltilmiş 1N NaOH (pH > 12,5) hazırlanır. Bu adım, denatürasyon işlemi için gereklidir.

İlk olarak 1ml ve 0,1 N NaOH (900 µl dH₂O + 100 µl 1N NaOH) hazırlanır. Her kütüphaneden 10 µl alınarak yeni bir 0,2 ml'lik PCR tüpüne aktarılır.

Her kütüphaneyi RSB ile 10 nM'ye seyreltmek için aşağıdaki denklemi kullanılır:

$$x (\mu\text{l}) = [10 (\mu\text{l}) * y (\text{nM}) / 10 \text{nM}] - 10 \mu\text{l}$$

Bu denklemde; x, RSB miktarını; y ise kütüphanenin konsantrasyonunu belirtir. Her kütüphanenin konsantrasyonuna bağlı olarak nihai hacim, 10 µl ile 400 µl arasında değişebilir.

Hazırlanan 10 nM'lik kütüphane; RSB ile 1 nM olacak şekilde dilüe edilir.

Sekans başlatılmadan önceki son adım, denatürasyondur. 1 nM kütüphane (5 µl), 1N NaOH (5 µl) ile karıştırılır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra üzerine; 5 µl 200 mM Tris-HCl (pH 7.0) eklenerek denatüre edilir. Tipik olarak, nihai çözelti Hibridizasyon Tamponu ile seyreltikten sonra 1 mM'den fazla NaOH içeremez. Bununla birlikte, 200 mM Tris-HCl eklenmesi, NaOH'in nihai çözeltide tamamen hidrolize olmasını sağladığından; şablon hibridizasyonu, nihai NaOH konsantrasyonu 1 mM'den büyük olduğunda bile etkilenmez.

Denatüre edilen kütüphanenin üzerine, 985 µl Hibridizasyon Buffer'ı eklenerek 1 ml, 5 pM olarak hazırlanmış olur. Yükleme için konsantrasyonu 1,4 pM'e Tablo 3.25'deki miktarlarla dilüe edilir.

Tablo 3.25 Kütüphane dilüsyon reaksiyonu

	Miktar
5 pM Denatüre Kütüphane	140 µl
Hibridizasyon Buffer	360 µl
Son konsantrasyon	1 pM

Bir sonraki adımda 1,4 pM ve 500 µl olarak dilüe ve denatüre edilen kütüphanenin tamamı MiniSeq sekans kartuşunun 16. kuyusuna aktarılır. Flow cell ve kartuş cihaza yerleştirildikten sonra, run için uygun parametreler seçilerek dizileme işlemi başlatılır.



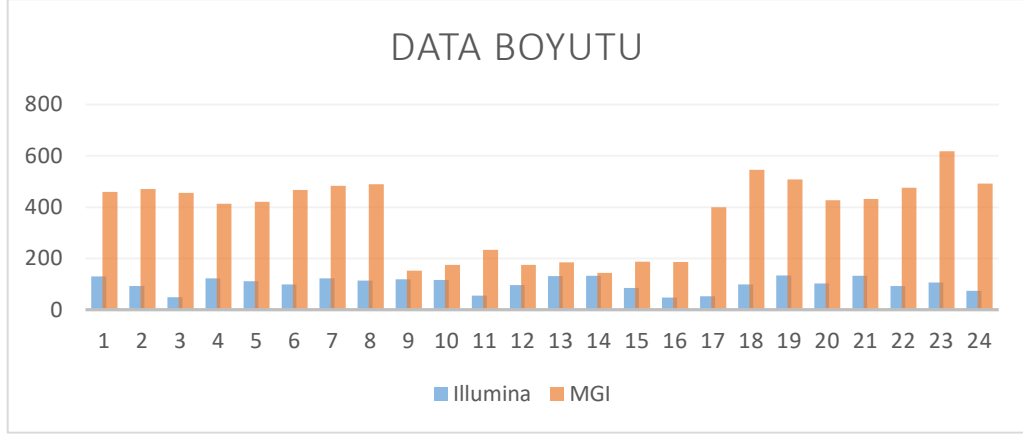
4.1 Bulgular

4.1.1 Data Boyutu

Illumina MiniSeq ve MGI DNB Seq-G400 cihazlarında dizilenen 24 adet gen havuzuna ait ampikon sayıları ve data miktarları Tablo 4.1’de belirtilmiştir.

Tablo 4.1 MGI ve Illumina’da dizilenen pollara ait ampikon sayıları ve elde edilen data boyutları

Ampikon Sayısı		Data Boyutu (GB)	
Illumina	MGI	Illumina	MGI
268	163	0,13	0,45
259	123	0,09	0,46
252	113	0,05	0,45
242	173	0,12	0,40
239	119	0,11	0,41
237	98	0,10	0,46
216	117	0,12	0,47
204	107	0,11	0,48
229	126	0,12	0,15
236	163	0,11	0,17
237	142	0,05	0,23
241	106	0,09	0,17
275	150	0,13	0,18
257	126	0,13	0,14
237	108	0,08	0,18
233	137	0,05	0,18
243	164	0,05	0,39
255	154	0,10	0,53
247	136	0,13	0,50
231	140	0,10	0,42
232	124	0,13	0,42
260	109	0,09	0,47
241	115	0,10	0,60
241	126	0,07	0,48



Şekil 4.1 MGI ve Illumina datalarının boyutları (MB cinsinden)

4.1.2 Ortalama Derinlik

Illumina MiniSeq ve MGI DNB Seq-G400 cihazlarında dizilenen 24 adet gen havuzuna ait dizilerin ortalama derinlik miktarları x cinsinden Tablo 4.2’de belirtilmiştir.

Tablo 4.2 MGI ve Illumina’da dizilenen pollara ait dataların ortalama derinlik miktarları (x cinsinden)

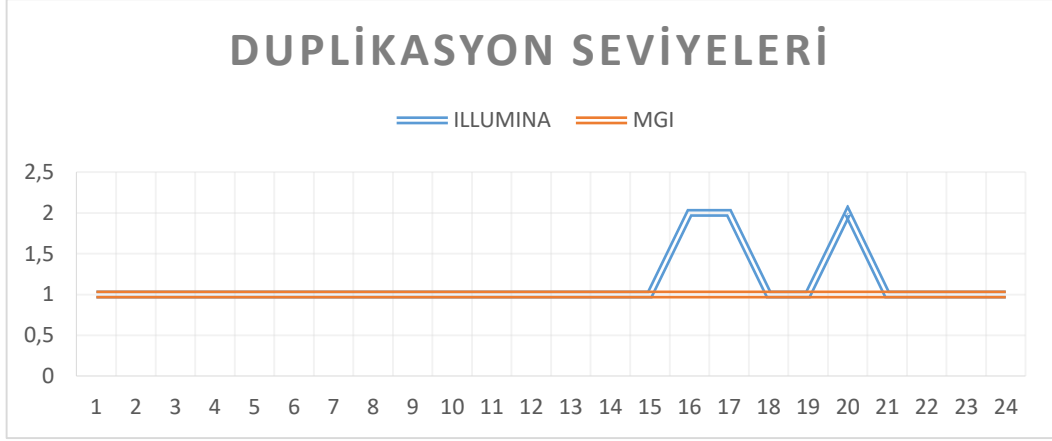
Ortalama Derinlik (x)	
Illumina	MGI
5047	8036
3056	1990
2233	1990
3657	11
3906	6446
2155	10594
1264	3078
1599	4197
3037	3324
193	4009
52	5735
513	3219
621	2202
1071	2188
1859	5351
736	4293
1371	5693
2148	8551
688	6262
180	3135
179	8751
1317	8410
2229	4671
2783	6752

4.1.4 Her Sekansın GC İçeriği

Illumina MiniSeq ve MGI DNB Seq-G400 cihazlarında dizilenen 24 adet gen havuzuna ait dizilerin Fastqc raporlarından ‘her sekansın GC içeriği’ parametresi kalite değeri olarak belirtilen renkler cinsinden; kırmızı, turuncu ve yeşil olacak şekilde GC yüzdeleriyle birlikte Tablo 4.4’de belirtilmiştir.

Tablo 4.4 MGI ve Illumina’ya ait dataların GC içerikleri (% cinsinden)

Her Sekanstaki GC İçeriği (%)	
Illumina	MGI
50	52
55	53
55	50
54	50
50	53
50	54
47	51
46	57
52	51
51	51
58	52
56	49
46	51
47	54
47	52
52	56
51	50
55	46
42	47
43	52
57	52
56	49
55	50
54	51



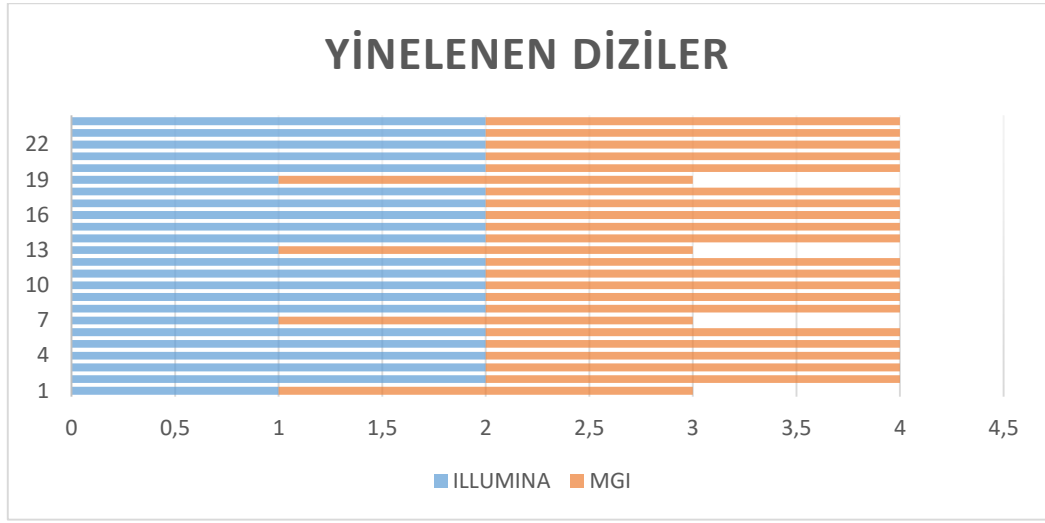
Şekil 4.4 MGI ve Illumina'ya ait dataların duplikasyon seviyeleri

4.1.6 Sekanstaki Yinelenen Diziler

Illumina MiniSeq ve MGI DNB Seq-G400 cihazlarında dizilenen 24 adet gen havuzuna ait dizilerin Fastqc raporlarından 'sekanstaki yinelenen diziler' parametresi kalite değeri olarak belirtilen renkler cinsinden; kırmızı, turuncu ve yeşil olacak şekilde Tablo 4.6'da belirtilmiştir.

Tablo 4.6 MGI ve Illumina'ya ait dataların yinelenen dizi miktarları

Yinelenen Diziler	
Illumina	MGI
1	2
2	2
2	2
2	2
2	2
2	2
1	2
2	2
2	2
2	2
2	2
2	2
1	2
2	2
2	2
2	2
2	2
2	2
1	2
2	2
2	2
2	2
2	2
2	2



Şekil 4.5 MGI ve Illumina'ya ait dataların yinelenen dizi miktarları

4.2 Tartışma

Literatüre bakıldığında MGI firmasının kullandığı teknoloji Illumina'ya göre nispeten daha yeni olduğundan iki platformun karşılaştırılması ile alakalı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Literatürde iki platformun data kaliteleri; ortalama derinlik, data boyutu, datanın GC içeriği, varyant tespitleri gibi parametreler ile karşılaştırılmış olup bizim çalışmamızda da bu çalışmalara paralel olarak data boyutu, ortalama derinlikleri ve FastQC raporlarından kalite parametreleri karşılaştırılmıştır.

Guoqiang Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 4 ayrı genomik DNA örneğinden SureSelect-Hiseq ve Targetseq-Proton kitlerini kullanarak oluşturulan tüm ekzom dizileme (WES) kütüphaneleri Ion Torrent ve Illumina Hiseq 2000 cihazlarında dizilenmiş. Bu datalarda varyant lokusları, saptanan SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmi), ve Indel'ler (küçük ekleme ve silmeler) ile 1x, 5x, 10x ve 20x için her iki kitin kapsam yüzdesi karşılaştırılmıştır. Her iki kitteki ortak ekzonik bölgeler ele alındığında varyant lokusları arasında %99 oranında tutarlılık gözlemlenirken, SNP ve Indel'lerin saptanmasında Illumina Hiseq 2000 cihazının daha başarılı olduğunu ortaya koymuşlardır. (Zhang v.d, 2015) Bizim çalışmamızda ticari bir kit ile genomdaki tüm ekzonik bölgeleri dizilemek yerine in house dizileme yöntemi ile genomdaki dizilemek istediğimiz spesifik ekzonik bölgelere özgü primerler dizayn ederek amplifiye ettiğimiz bölgeler dizilendi. Ekzonik bölgelerin kapsamının karşılaştırılması çalışmanın verimini

değerlendirme için bir kriter olsa da bizim çalışmamız kapsam karşılaştırılmasına uygun değildir.

Jidong Lang ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada; 204 örnekten elde edilen gDNA'lardan, Illumina NextSeq500 ve MGI DNB Seq-G400 cihazlarında aynı hotspot kanser paneli kiti ile hedef bölge dizilemesi gerçekleştirmişlerdir. Illumina için dizayn edilen panel kiti kullanıldığında MGI ile dizilenen datalarda 101-133 bp kayıp olduğunu saptamışlar. Bu kaybın yöntemsel farklılıktan (Illumina'ya uyumlu kütüphane hazırlama kitinin fragman yapısı MGI'da DNB formunun oluşturulmasına engel olmuştur) kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca data kalite parametrelerinden Q20, GC içeriği, ortalama derinliği ve kullanılan kitin hedef kapsamını da karşılaştırmışlar. Kullanılan kitin hedef kapsamı için datadaki mutasyonları karşılaştırdıklarında yüksek ölçüde tutarlılık gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Kalite parametrelerine uyguladıkları çift yönlü t testi sonucunda iki platform arasında önemli ölçüde farklılık olduğunu belirtmişler. Illumina'dan elde edilen dataların GC oranının daha yüksek olmasını; Illumina NextSeq500 cihazının dizileme sırasında tanımlanamayan bazıları 'G' olarak, MGI DNB Seq G400 cihazı ise 'N' olarak ataması ile ilişkilendirmişlerdir. Bunun dışında iki platform arasındaki farklılığın sebebi olarak; dizileme ilkeleri, baz tanımda kullanılan algoritmalar ve dizileme platform özelliklerini göstermişlerdir. (Lang v.d, 2021) Bizim çalışmamızda ise her iki platformdan elde edilen dataların GC içerikleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur.

Yu Xu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise; 4 örnek üzerinde tüm ekzom sekanslama işlemi MGI ile aynı yöntemi kullanan BGISeq-500 (DNB teknolojisi) ve Illumina Hiseq4000 cihazlarında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Her iki platformdan elde edilen datalar incelendiğinde varyant tespitindeki kabiliyetlerinin benzer olduğu bulunmuştur. Ayrıca okuma derinliğinin varyant tespiti üzerindeki etkisinin önemine vurgu yaparak; aynı okuma derinliğine ulaşabilmek için BGISeq-500 cihazının Illumina Hiseq4000 cihazından %25 daha az data üretmesinin yeterli olduğunu ortaya koymuşlardır. Üretilen gb başına data maliyeti düşünüldüğünde; BGISeq-500'ün daha avantajlı olduğunu belirtmişlerdir. (Xu v.d., 2019) Bizim çalışmamızda da MGI DNB Seq G400'den Illumina Miniseq'e göre daha fazla data elde edildi.

Dmitriy Korostin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 1 genomik DNA'nın MGI DNB Seq G400 ve Illumina Hiseq 2500 cihazlarında tüm genom dizilemesi (WGS) yapılmış. Elde edilen dataların kaliteleri FastQC algoritması yardımıyla karşılaştırılmış. Aynı

örneğin Illumina Hiseq 2500 datalarındaki okumaların başında GC içeriğinden bir sapma gözlemlendiğini, bunun sebebinin kütüphane hazırlama aşamasındaki enzimatik fragmantasyondan kaynaklanabileceğini belirtmişler. Her bazın sekans kalitesi parametresinde ise, MGI'dan elde edilen değerlerin Hiseq 2500'e göre biraz daha düşük olduğunu, buna karşılık her iki platformun da birbirine yakın kalitede data ürettiğini belirtmişler. Elde edilen dataların ortalama derinlikleri karşılaştırıldığında; MGI'dan elde edilen dataların derinliğinin Hiseq 2500'e göre biraz daha fazla olduğunu bulmuşlar. Sonuç olarak MGI DNB Seq G400'ün Illumina Hiseq 2500 cihazının alternatifi olarak kullanılabilirliğini, iki platform arasında elde edilen farkların önemsiz olduğunu belirtmişler. (Korostin v.d, 2020) Bu çalışmanın bulgularından ortalama derinlik karşılaştırmaları bizim bulgularımızla da paralellik göstermektedir.

Jiayun Chen ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir çalışmada ise; NA12878 hücre hattından elde edilen DNA ile 4 farklı yeni nesil dizileme cihazında (MGI DNB Seq G400, BGISEQ500, Illumina NovaSeq, Illumina HiSeq4000) dizilenen WES, 5 farklı yeni nesil dizileme cihazında (MGI DNB Seq G400, Illumina NovaSeq, BGISEQ500, Illumina HiSeq X ve Illumina HiSeq4000) dizilenen WGS datalarının kaliteleri karşılaştırılmış. 10x'in altındaki okuma yüzdeleri WES datalarında sırasıyla; %0,25, %0,41, %2,25 ve %4,46 WGS datalarında sırasıyla; %0,21, %1,28, %1,76, %7,29 ve %8,25 olarak belirlenmiş. Ortalama derinlikleri karşılaştırıldığında, MGI DNB Seq G400'den elde edilen WES datasının derinliğinin 129,4x ile diğer platformlardan nispeten düşük kaldığı belirtilmiş. SNP tanımlama performanslarında ise BGISEQ500'ün diğerlerinden daha iyi olduğu belirtilmiş. (Chen v.d., 2019) WGS dizilemesi yapılan bu çalışmada MGI DNB Seq G400'ün ortalama derinliği diğer platformlardan düşük kalsa da, bizim çalışmamızda in house dizileme datalarında MGI'dan elde edilen ortalama derinliğin Illumina'dan elde edilen ortalama derinlikten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.3 Sonuç

Yeni nesil dizileme platformlarından iki farklı dizileme yöntemi kullanan MGI DNB Seq G400 ve Illumina Miniseq cihazlarında 24 çift gen poolu dizilenmiştir. Dizileme sonucunda elde edilen dataların analizlerinin güvenilir olması açısından kaliteleri; data boyutu, ortalama derinlik ile FastQC raporundan her sekanstaki baz içeriği, her sekansın

GC içeriği, dizilerin duplikasyon seviyeleri ve sekanstaki yinelenen diziler parametreleri açısından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan tüm kalite parametrelerine 2 uçlu t testi uygulanmıştır.

DNA dizilemedeki yöntemsel farklılıklarına bakılacak olursa; İllumina teknolojisinde dizileme sırasında köprü amplifikasyonu ile çoğaltılan lineer DNA kütüphanesi modifiye DNA polimeraz ve bloke edici gruplar kullanılarak dizilenmektedir. MGI teknolojisinde ise lineer DNA kütüphanesi tek iplikli ve halkasal forma getirildikten sonra, bakteriyel bir DNA polimeraz olan Phi29 DNA polimeraz kullanılarak bir reaksiyonda tek bir halkasal kalıp DNA'nın 300-500 kopyası DNB formunda elde edilir. Dolayısıyla PCR sırasında oluşabilecek DNA polimerazın hata oranı göz önünde bulundurulduğunda; tek bir kalıptan amplifikasyon gerçekleştirilmesi sebebiyle MGI DNB Seq teknolojisi ile üretilen datalardaki hata oranının İllumina'dan daha düşük olması beklenir.

Bunun yanında, MGI DNB Seq G400 cihazının data çıktısı, İllumina Miniseq cihazından fazla olduğu bilinmektedir. Bu sebeple MGI DNB Seq G400 cihazından pool başına ortalama 0,37 GB data elde edilirken; İllumina Miniseq cihazından pool başına ortalama 0,10 GB data elde edilmiştir. Data boyutları parametresine uygulanan t testi sonucunda ($p=5,5$; $p>0,05$) iki platformun data boyutları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

Data boyutlarıyla bağlantılı olarak ortalama derinliklerinin de MGI DNB Seq G400 cihazında ortalama 4954x, İllumina Miniseq cihazında ise ortalama 1746x olduğu gözlemlenmiştir. Dataların ortalama derinliklerine uygulanan t testi sonucunda ($p=1,58$; $p>0,05$) her iki platformun data derinlikleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir.

FastQC parametrelerine uygulanan t testi sonucunda; her iki platform için de her sekanstaki baz içeriği ($p=2,01$; $p>0,05$), dizilerin GC içeriği ($p=0,88$; $p>0,05$) ve duplikasyon oranları ($p=0,08$; $p>0,05$) arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Yinelenen diziler arasında ise MGI'dan üretilen dataların yinelenen dizi ortalaması daha düşük olup, her iki platform arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p=0,04$; $p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak in house dizilemede; dizilenecek gen sayısı, elde edilmek istenen data miktarı gibi koşullar göz önünde bulundurularak, amaca uygun her iki platform da verimli bir şekilde kullanılabilir.

4.4 Öneriler

Bu çalışmada kullandığımız cihazların data çıktıları arasında fark olduğundan, aradaki bu fark data boyutu, ortalama derinlik gibi parametreleri etkilemektedir. Aynı çalışma data kapasiteleri birbirine benzer olan iki cihaz ile yapılabilir.



KAYNAKÇA

- Banér, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M. & Landegren U. (1998). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9801302/>. *Nücleic Acids Research*, 26.
- Chen, J., Li, X., Zhong, H., Mheng, Y. & Du, H. (2019). Systematic comparison of germline variant calling pipelines cross multiple next-generation sequencers. *Scientific Reports*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45835-3>
- Comparative analysis of novel MGISEQ-2000 sequencing platform vs Illumina HiSeq 2500 for whole-genome sequencing. *PLOS Genetics*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230301>
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L. & Lasken, R. S. (2001). Rapid amplification of plasmid and phage. *Genome Research*, 11: 1095-1099.
- Dönmez, D., Şimşek, Ö. & Aka Kaçar, Y. (2017). Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojileri ve Bitkilerde Kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 30-37.
- França, L. T. C., Carrilho, E. & Kist, T. B. L. (2002, Mayıs). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12197303/>. doi:10.1017/s0033583502003797.
- Goodwin, S. McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351
- Kızmaz, M. Z., Paylan, İ. C. & Erkan, S. (2017). DNA Dizilemenin Tarihsel Gelişimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (GBAD)*, 6(2), 47-53.
- Kircher, M. & Kelso, J. (2010, Mayıs 18). *Bioessays*. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bies.200900181>
- Klug, W. S., Cummings, M. R. & Spencer, C. A. (2011). *Genetik Kavramlar (Sekizinci Baskı ed.)*. (P. D. Prof. Dr. Cihan Öner, Trans.) Ankara: Palme Yayıncılık.
- Korostin, D., Kulemin, N., Naumov, V., Belova, V., Kwon, D. & Gorbachev A. (2020).
- Lang, J., Zhu, R., Sun, X., Zhu, S., Li, T., Shi, X., Sun, Y., Yang, Z., Wang, W., Bing, P., He, B. & Tian, G. (2021). Evaluation of the MGISEQ-2000 Sequencing Platform for Illumina Target Capture Sequencing Libraries. *Frontiers in Genetics*. doi:10.3389/fgene.2021.730519

Leong, I. U. S., Skinner, J. R. & Love D.R., (2014). Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions. *Medical Sciences*, 98-126.

Li, X. Y., Du, Y. C., Zhang, Y. P. & Kong, D. M. (2017, Haziran 24). Dual functional Phi29 DNA polymerase-triggered exponential rolling circle amplification for sequence-specific detection of target DNA embedded in long-stranded genomic DNA. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/s41598-017-06594-1#citeas>:

Mendez, J., Blanco, L., Esteban, J. A., Bernad, A. & Salas, M. (1992). Initiation of 429 DNA replication occurs at the second 3' nucleotide. *Proc. Nati. Acad.*, 9579-958. Retrieved from <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.89.20.9579>

Sanger F, Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74.

Zhang, G., Wang, J., Yang, J., Li, W., Deng, Y., Li, J., Huang, J., Hu, S. & Zhang B. (2015). Comparison and evaluation of two exome capture kits and sequencing platforms for variant calling. *BMC Genomics*. doi:<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1796-6> <https://byjus.com/biology/difference-between-dntp-and-ddntp/>. (n.d.).

Xu, Y., Lin, Z., Tang, C., Tang, Y., Cai, Y., Zhong, H., Wang, X., Zhang, W., Xu, C., Wang, J., Wang, J., Yang, H., Yang, L. & Gao, Q. (2019). A new massively parallel nanoball sequencing platform for whole exome research. *BMC Bioinformatics*. doi:<https://doi.org/10.1186/s12859-019-2751-3>

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. Acar, T., Müslümanoğlu, M.H., (2023). "ILLUMINA VE DNB SEKANSLAMA TEKNOLOJİLERİ İLE ELDE EDİLEN IN HOUSE GEN DİZİLEME VERİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI", 10. INTERNATIONAL GAP SUMMIT SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS, Mart 17-18, 2023 Şanlıurfa, Türkiye

