

## Mutasyon Tarama Yöntemleri

### Mutation Scanning Methods

H. Asuman Özkara

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

#### ÖZET

Mutasyonları belirlemek için kullanılan tarama yöntemleri, özellikle kalıtsal hastalıklar ve kanserle ilgili araştırma ve tanıda önemli rol oynarlar. Bilinmeyen mutasyonları saptamak için çok sayıda teknik tanımlanmıştır. Bu derlemede, bilinmeyen nokta mutasyonları, küçük delesyonlar ve insersiyonları saptamak için sıklıkla kullanılan Ribonükleaz Parçalama, Denature Edici Gradient Jel Elektroforezi, Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi, Heterodupleks Analizi, Kimyasal ve Enzimatik Parçalama, Protein Trunkasyon Testi ve DNA çipleri gibi yöntemler özetlenmiştir. Her yöntemin esası, hangi tip mutasyonu saptayabildiği, hangi büyüklükte DNA parçasını analiz edebildiği, avantajları ve dezavantajları belirtilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Mutasyon saptama, bilinmeyen mutasyonlar, mutasyon tarama

#### ABSTRACT

Scanning methods for mutation detection are important especially for research and diagnosis of inherited metabolic diseases and cancer. Many techniques were described for detection of unknown mutations. In the present review, current methods such as Ribonuclease cleavage, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Single Stranded Conformational Polymorphism, Heteroduplex Analysis, Chemical and Enzymatic Cleavage, Protein Truncation Test and DNA Chips, for the detection of unknown point mutations, small deletions and insertions are overviewed. Principles, type of the mutation that can be detected, size of the DNA fragment that can be analyzed, advantages and disadvantages are specified for each method.

**Key Words:** Mutation detection, unknown mutations, mutation scanning

#### GİRİŞ

DNA teknolojisindeki gelişme, kalıtsal hastalıklar ve kanserde etkilenen genlerin belirlenmesi ve karakterize edilmesini hızlandırmıştır. Mutasyon tarama yöntemlerinin etkin kullanımı sayesinde hastalığa neden olduğu belirlenen mutasyonların sayısı da her geçen gün artmaktadır.

Mutasyonlar fiziksel, kimyasal ve/veya enzimatik yollarla tanımlanabilirler. Kullanılan yöntemlerin hemen hemen tamamı hedef

DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmasını gerektirir. Çoğaltılmış DNA'da ek analizlerle mutasyonlar belirlenebilir. Mutasyon saptama yöntemleri iki gruba ayrılır. a) Bilinmeyen mutasyonları saptama yöntemleri, b) Bilinen mutasyonları saptama yöntemleri. Bilinmeyen mutasyonları saptama yöntemlerine mutasyon tarama yöntemleri de denilmektedir. Bunlar bilinen mutasyonları belirlemek için kullanılan yöntemlere göre daha uzun zaman alan, daha zor olanlardır. Bu yöntemlerin bazıları ile DNA

dizisi üzerinde mutasyonun olduğu gen bölgesi, bazıları ile de mutant baz tespit edilebilir. Mutasyonun olduğu baz/bazlar DNA dizi analizi ile belirlenir veya doğrulanır. Tarama yöntemleri yerine direk DNA dizi analizinin tercih edilmemesinin nedenleri: a) dizi analizinin çoğu laboratuvarlar için rutin olmaması, b) dizi analizi ile heterozigot mutasyonları belirlemenin güç olabilmesi, c) dizi analizinin pahalı bir yöntem olması ve tarama yöntemleri ile %75 tasarruf sağlanabilmesidir. Büyük genlerde tüm bir genin direk DNA dizi analizi yerine, tarama yöntemleri ile yeri belirlenmiş mutasyon için sadece birkaç yüz bazlık bir bölgenin DNA dizi analizi yapılması daha ekonomiktir ve daha az iş yapılmasını sağlar. Buna rağmen bilinmeyen mutasyonlar için kullanılan yöntemlerin hiç biri ideal değildir. Bu nedenle değişik kombinasyonların denenmesi gerekebilir (1-3).

Bu derlemede, kullanımda olan mutasyon saptama yöntemleri, prensipleri, avantajları ve dezavantajları özetlenmiştir. Bu yöntemler içinde en sık tercih edileni olan Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) ile ilgili daha ayrıntılı bilgi verilmiştir.

### **Tarama yöntemleri**

Bilinmeyen mutasyonları saptamak için kullanılan mutasyon tarama yöntemleri ikiye ayrılır: a) mutasyon nedeni ile normal ve mutant DNA arasında oluşan elektroforetik özelliklerdeki değişikliklerden yararlanarak, mutasyonun bulunduğu bölgeyi birkaç yüz baz uzunluktaki DNA'da saptayan basit yöntemler, b) kilobaz (kb) uzunluktaki DNA'yı analiz edebilen ve mutasyonun yerini 10 baz içinde sınırlayabilen parçalama yöntemleri (2). Mutasyon tarama yöntemleri ve özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

### **Ribonükleaz (RNaz) parçalama yöntemi**

En eski tarama yöntemlerinden biridir. Belirlenmiş koşullar altında RNA:RNA çifti veya RNA:DNA heterodupleksi arasında oluşmuş yanlış eşler RNaz A ile parçalanır. Basit ve tek basamaklı bir reaksiyondur. Parçalanma-

dan sonra işaretli parçalar denature edici jel elektroforezi ile saptanabilir. Ancak purin bazlarındaki değişiklikleri saptamaya çok duyarlı bir yöntem değildir. Bu nedenle RNA:DNA heterodupleksleri kullanıldığında mutasyon saptama oranı sadece %30-40, hem "sense", hem de "antisense" DNA kullanıldığında mutasyon saptama oranı %70'dir. En fazla 1000 baz çifti (bç) büyüklükteki RNA'yı analiz edebilir. Mutasyon saptama oranı diğer yöntemlere göre daha düşük olduğu için az kullanılan bir yöntemdir (4).

### **Denature Edici Gradient Jel Elektroforez i Yöntemi (DGGE)**

Çift iplikli DNA üre veya formamid gibi denature edici bir ajanın artan konsantrasyonlarında ve 60°C'de elektroforeze uygulanır. Erime sıcaklığına göre DNA'da bulunan domainler ayrılır. DNA'daki 1 baz değişikliği bile erime sıcaklığını 1°C veya daha fazla değiştirir ve zincirlerin ayrılması için gerekli denatüran konsantrasyonunu değiştirir. Domainlerdeki ipliklerin ayrılması DNA'nın elektroforezdeki hızını azaltır. Heteroduplekslerde bazların yanlış eşlenmeleri elektroforezde homoduplekslerle aralarında 6°C'ye kadar farklılık yaratır. Bu nedenle nokta mutasyonlarını analiz etmek için sıklıkla normal ve mutant DNA'lardan oluşan heterodupleksler kullanılır. DGGE ile en fazla 1000 bç büyüklükteki DNA analiz edilebilir. PCR primerlerine GC bazlarından oluşan dizilerin eklenmesi, hem "sense" hem de "antisense" dizilerde heteroduplekslerin oluşturulması ile nokta mutasyonlarının %100'ü saptanabilir. Özel bir elektroforez aleti gerektirir. Son zamanlarda kapiller elektroforeze uygulanmış şekli, farklı denatüran kullanılanları, iki yönlü elektroforezde iki gradient ve denatüranla uygulanan şekilleri de kullanılmaktadır (5,6).

### **Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi Yöntemi (SSCP)**

Bu yöntemde PCR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jel elektroforezine uygulanır. Bu durumda DNA'nın tek zinciri nükleotid içeriğine bağlı olarak

**Tablo I.** Mutasyon tarama yöntemlerinin özellikleri.

Yöntem	Maksimum parça büyüklüğü (kb)	Mutasyon saptama oranı	Görüntüleme yöntemi	Standardizasyon ve otomasyon potansiyeli	Mutasyonun olduğu pozisyonu belirleme	En önemli avantajı	En önemli dezavantajı
RNAaz	1	%30-40 ek deneylerle %70	Radyoaktif, etidyum bromür, gümüş boyama	Hayır	Hayır	Agaroz jelde de parçaların gösterilebilmesi	RNA elde edilmek zorundadır
DGGE	1	%100'e yakın	Radyoaktif, etidyum bromür, gümüş boyama	Sınırlı	Hayır	%100'e yakın saptama	Özel primerler ve alet
SSCP	0.2	%80-90	Radyoaktif, gümüş boyama	Sınırlı	Hayır	Basit, ucuz	Bazı mutasyonlar için özel koşullar
HET	0.9	%80	Radyoaktif, etidyum bromür, gümüş boyama	Sınırlı	Hayır	Basit, ucuz	Düşük saptama oranı
CCM	2	Özel koşullarla %100	Radyoaktif, fluoresan işaretleme, etidyum bromür, gümüş boyama	Sınırlı	Evet	%100 mutasyonu saptama	Toksik kimyasallar, modifikasyonlar
ECM	1,5	%90-95	Radyoaktif, etidyum bromür, gümüş boyama	Sınırlı	Evet	Basit	Pahalı enzim kullanımı
PTT	4-5	Sadece dur kodonu mutasyonları	Radyoaktif, protein boyaları	Sınırlı	Evet	Dur kodonuna spesifik	Düşük saptama oranı, çok basamaklı işlemler
DNA çipleri	Değişken	%85	Fluoresan işaretleme	Yüksek	Evet	Kısa sürede çok analiz	Pahalı alet gereksinimi, Düşük saptama oranı

sulu ortamda yeni bir konformasyona sahip olacaktır. Bu konformasyon, esas olarak zincir içi baz çiftleşmelerine bağlı olarak oluşan ikincil yapıdır. Teorik olarak, dizideki herhangi bir baz değişikliği bu konformasyonda değişikliğe neden olabilecektir. Çoğu konformasyonlar, mutant dizi aynı yüke sahip olsa bile fiziksel şekil veya büyüklüğü yeterince değiştirirler ve akrilamid gibi bir matriks ile yapılan elektroforezde hareket farklılığına neden olurlar. Elektroforezdeki farklı hareket, tek zincirli DNA parçalarının ikincil yapılarında değişik şekillerin oluşumuna bağlıdır (7).

Optimal bir SSCP stratejisi belirlemek için beş önemli parametrenin düzenlenmesi gereklidir: bunlar, analiz edilecek DNA parçasının uzunluğu, elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, PCR denatürasyon yöntemi, jelin özellikleri (jel matriksi, iyon konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı) ile mutasyonun tipi ve bulunduğu yerdir.

**Analizi yapılacak dizinin uzunluğu:** SSCP analizinde en iyi sonuç, DNA 150-200 baz uzunlukta olduğu zaman elde edilmektedir. Dizinin boyu küçüldükçe, mutant dizilerin görülme şansı artmaktadır. 183 baz çiftlik bir DNA parçasında tek baz değişikliklerinin

%83'ü, 307 baz çiftlik bir parçada %58'i saptanabilmiştir. Bir başka çalışmada, 200 bç ve altındaki büyüklüklerde tek baz değişiklikleri daha yüksek duyarlılıkla saptanabilmiştir, örneğin 212 bç'lik 2 globün geni parçasında tek baz değişikliği yaklaşık %70 oranında bulunurken, 600 bç'lik bir parçada 29 mutasyondan sadece biri saptanabilmiştir. 155 bç'lik parçalarda da %97 ve %96 oranlarında tek baz değişikliği gösterilmiştir. 150 bç'nin altındaki parçalarda SSCP analizinin duyarlılığı küçük DNA parçalarının ikincil yapı oluşturmalarındaki güçlükler nedeniyle azalmaktadır. 200 bç'nin üzerindeki büyüklüğe sahip DNA'larda da tek baz değişikliği ile daha az konformasyonel değişiklik oluşmaktadır ve bunun jelde görülmesi güçleşmektedir (8,9). Optimal koşullar altında mutasyon saptama oranı %80-90'dır

**Elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık:** On yedi derecenin altı ve 23°C'nin üzerindeki sıcaklıklar DNA tek ipliğinin yarı stabil şekillerini bozabilmektedir. Fakat farklı mutasyonlara göre farklı sıcaklıklar denenmiştir (4°C, 10°C, oda sıcaklığı), en çok tercih edileni oda sıcaklığıdır. Beş V/cm voltajda ve 4 watt'ta ortalama 22°C (minimum 20, maksimum 25)'de elektroforez yapıldığı zaman, jel fazla ısınmamakta ve jelin ısınma miktarı önemsiz olmaktadır. İçinden sıvı sirkülasyonu olan elektroforez sistemleri pahalı olmakla beraber, sıcaklığı standardize ettikleri için uygun sistemlerdir (10).

**PCR ürün denatürasyonu:** SSCP için PCR ürününün temiz ve spesifik olması gereklidir. PCR ürünü, jelden saflaştırılmadan SSCP için kullanılabilir. Ancak kullanılmamış primerlerin varlığı ve spesifik olmayan PCR amplifikasyonu, jelden PCR ürününü saflaştırmayı gerektirebilir. SSCP için radyoaktif PCR kullanıldığı zaman, siklus sayısı 20'ye düşürülebilir, örnekte 10-30 kat sulandırılabilir. Böylece tek ipliklerin primerler ile bağlanmaları yada kendi kendileri ile çift iplik oluşturmaları en aza indirilmiş olur. Daha az duyarlı saptama yöntemlerinin kullanıldığı durumlarda, daha az sulandırma yapılabilir. Örneğe

daha güçlü denatüranın eklenmesi yardımcı olabilir. Bu amaçla, formamid, sodyum hidroksit, üre ve metil merkürük hidroksit kullanılmaktadır. Metil merkürük hidroksit toksiktir ve çeker ocak kullanımı gerektirir, ama en etkili olanıdır. Pek çok yöntemde örneği 95°C'de ısıtarak denatüre etmek ve sonra hızla buz içinde tutmak ve hızla jele uygulamak yöntemi kullanılır. Yükleme sırasında denatüre edilmiş DNA örneği sulandırılmış olmasına rağmen, jele yüklendiği yerde konsantre olacağından, yeniden çift iplikli DNA'lar oluşur. Sonuçta, her zaman çift iplikli DNA, tek iplikliden daha güçlü bant verir. Bu nedenle DNA'nın mümkün olduğunca sulandırılmış olması gereklidir. Düşük konsantrasyonlar kullanıldığında ince jellerde radyoaktif yöntem, gümüş boyama ve etidyum bromide üstünlük sağlar (11,12).

**Elektroforez jelinin özellikleri:** SSCP analizinde DNA parçalarını ayırmak için sıklıkla kullanılan matriks akrilamiddir. Akrilamid/bisakrilamid oranı ve toplam akrilamid yüzdesi, jelin ayırma özelliğini belirler. Tampon içeriği ve konsantrasyonu SSCP hareketine yansır, jel sıcaklığı ve jele eklenen gliserol gibi diğer maddeler de bunu etkiler. Bu farkı koşullar, farklı dizilerdeki SSCP'leri tanımlamakta kullanılmıştır. En fazla tercih edileni, düşük çapraz bağlayıcı oranı ve 50-100 ml/l gliseroldür. Bazı SSCP'ler için yüksek yüzdeli jellerin kullanılması önerilmiştir. Hidrolink isimli jel, TEMED ve amonyum persülfat ile polimerize edilmiş akrilamid benzeri bir matrikstir; daha tektip gözenek büyüklüğüne sahip olduğu ve akrilamidden daha iyi rezolüyon sağladığı belirtilmiştir. SSCP'nin iyi gözlenebilmesi için elektroforez jeli boyutlarının uzun olması (yaklaşık 30x40 cm) ve elektroforez işlemlerinin düşük voltajda, uzun sürede yapılması gereklidir. Uzun ve büyük elektroforez cihazı, daha karmaşık düzenlemeler ve sıcaklık kontrolü gerektirmesi bu yöntemin dezavantajıdır (13-15).

**Mutasyonun tipi ve bulunduğu yer :** Analizi yapılan DNA parçasının hangi bölgesinde mutasyon olduğu, nükleotid değişikliğinin özelliği (transizyon ya da tranversiyon) ve

DNA parçasının nükleotid içeriği de SSCP analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Bu faktörlerin herbirinin DNA molekülünde ikincil yapıyı etkilemesi beklenmektedir. SSCP'nin duyarlılığı, transversiyon yada transizyonlar için farklı bulunmamıştır. İkisi de benzer sıklıkta saptanabilmektedir: sırasıyla %76 ve %81. Yalnız G T transversiyonları, tamamlayıcı dizideki C A transversiyonlarından daha düşük sıklıkta saptanabilmektedir, sırasıyla %57, %82. Eksonların yan bölgelerindeki değişik nokta mutasyonlarını saptamak için yapılan çalışmada mutasyonlar farklı oranlar da duyarlılık ile tayin edilmiştir. Eğer mutasyon içeren yan bölge ikincil yapıya katılıyorsa, mutasyon bu bölgeyi bozmuş olacağından SSCP ile saptanması kolaylaşmaktadır. Eğer mutant bölgenin ikincil yapıyı oluşturmada rolü yoksa, mutasyon saptanamaz. Ayrıca pürin içeriğinin daha fazla olduğu DNA tek zinciri jelde daha hızlı yürümekte ve daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Buna bağlı olarak da DNA'nın bazen esas, bazen de tamamlayıcı zinciri mutasyonu diğerinden daha iyi göstermektedir (8).

SSCP'nin kapiller elektroforeze uyarlanmış şekli, daha uzun dizileri analiz edebilmek için restriksiyon enzim kesimi de kullanılmaktadır.

### **Heterodupleks Analizi (HET)**

Heterodupleks analizi basit bir yöntemdir. Normal ve mutant DNA'lar arasında heterodupleksler oluşturulur. Mutasyonun olduğu bölgede DNA yanlış eşlenme nedeni ile bükülür veya balonlaşır. Denaturan içermeyen poliakrilamid jellerde homodupleksler ve heterodupleksler farklı hareket ederler. Rezolüsyonu artırmak için poliakrilamid jel yerine özel jeller (ör; MDE jel), üre gibi denaturan ajanlar kullanılabilir. Bu yöntemle analiz edilebilecek DNA büyüklüğü 200-600 bp'dir. Bazı çalışmalarda 900 bp büyüklüğündeki DNA analiz edilebilmiştir. Mutasyon saptama oranı %80'dir. Bu oranı daha fazla artırmak amacı ile değişik kombinasyonlar denenmiştir. Bunlardan biri SSCP ile beraber kullanılmasıdır. İkincisi fluoresan dizi analizö-

rüne adaptasyondur. Üçüncüsü ise, denature edici yüksek performanslı sıvı kromatografisine (DHPLC) uygulanmasıdır. Bu modifikasyonda heterodupleksler kolonlarda ayrılır. Mutasyon saptama oranı da %90-95'e çıkarılabilir. Ancak bu alet çok pahalıdır (16).

### **Yanlış Eşleri Kimyasal Maddelerle Parçalama Yöntemi (CCM)**

Bu yöntemde yanlış eşleşmiş C bazı hidrosilaminle, T bazı da osmiyumtetrosit veya potasyum permanganatla reaksiyona girerler. Reaksiyonun olduğu yerler piperidinle koparılır. Koparılan parçalar jel elektroforezi ile analiz edilebilir. Bantları görüntülemek için radyoaktif ve fluoresan işaretleme, gümüş boyama kullanılabilir. Eğer hem "sense" hem de "antisense" diziler bu yöntemle analiz edilirse tüm mutasyonlar saptanabilir. 2 kb büyüklüğe kadar DNA parçaları analiz edilebilir. En önemli dezavantajı modifikasyon için kullanılan maddelerin toksik olmasıdır (17).

### **Yanlış Eşleri Enzimle Parçalama Yöntemi (EMC)**

Normal ve mutant DNA'nın ısı denaturasyonu ve renaturasyonu sonucu oluşturulan heterodupleksler bakteriofaj T4 endonükleaz VII veya T7 endonükleaz I ile parçalanır. Ardından jel elektroforezi ile analiz edilir. 88-1.5 kb uzunluktaki DNA'larda mutasyon analizi yapılabilir. Bantları saptamak için radyoaktif işaretli primerler veya gümüş boyama kullanılabilir. Kullanılan enzimlerin pahalı olması ve homoduplekslerin yanlış kesilebilmesi dezavantajıdır. Mutasyon saptama oranı %90-95 tir.

### **Protein Trunkasyon Testi (PTT)**

Bu yöntemde PCR, transkripsiyon ve translasyon birarada kullanılır. Dur kodonu yapan mutasyonları saptamak için uygundur. Dur kodonu yaratan mutasyonların neden olduğu kısa sentezlenmiş proteinler sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile saptanabilir. T7 promoter ve ökar-yotik translasyon başlatma dizileri PCR primerine bağlanır. PCR'in ardından elde edilen

DNA transkripsiyon-translasyon reaksiyonlarına uygulanır. Translasyon ürünü proteinler jel elektroforezi ile analiz edilirler. Dur kodo nu oluşan proteinler, normal proteinlere göre daha küçük olarak saptanırlar. Bu yöntemle 4-5 kb büyüklüğündeki DNA'lar analiz edilebilir (19).

### **DNA çipleri**

Bir bazın dört değişik kombinasyonu bir çip üzerine yerleştirilerek bunun tek iplikli hasa DNA'sı ile hibridizasyonu sonucu mutasyon saptanabilir. 1000 bazlık bir bölge için 4000 değişik proba ihtiyaç vardır. Bu yöntemle bir anda binlerce farklı oligonükleotid probun analizi mümkün olabilmektedir. Mutasyon saptama oranı %85'tir. Pahalı bir alet gerektirir ve ekspresyon çalışmaları için daha uygundur (20).

### **TARTIŞMA**

Mutasyon tarama yöntemleri içinde SSCP ve HET en basit ve en fazla kullanılanlardır. SSCP analizinin duyarlılığını artırmak için koşulların değiştirilmesi gerekebilir. Bu SSCP'yi çok zaman harcamayı gerektiren eziyetli bir yöntem haline getirebilir. HET analizi elektroforez koşullarını değiştirmeyi gerektirmez. Bu iki yöntem de büyük genlerde geni parça parça analiz etmek için çok uygundur. Her ikisinin kullanımı ile %100'e varan oranda mutasyon saptamak mümkün olabilmektedir. DGGE'nin mutasyon saptama yüzdesi SSCP ve HET'e göre daha yüksek olan bir yöntem olmasına rağmen özel bir elektroforez sistemi gerektirmesi ve yapıma zorluğu nedeni ile SSCP çoğu zaman tercih edilmektedir. Kapiller elektroforeze uygulanmış şekilleri de SSCP'yi daha kolaylaştırmıştır. CCM yöntemi toksik kimyasalları ve deneyin gerektirmesi nedeni ile tercih edilmemektedir. DHPLC ve DNA çipleri hızlı analiz dışında diğer yöntemlere bir üstünlük sağlamışlardır. Her ikisi de SSCP ve HET'e yakın oranda mutasyon saptayabilmekte ve çok pahalı aletler gerektirmektedirler.

Bu derlemede sunulan mutasyon tarama yöntemlerinin herbirinin avantajları ve deza-

vantajları vardır. Ancak en önemli sorun bu alanda ideal bir yöntemin henüz bulunamamış olmasıdır. Bu durumda yapılması gereken bütçemize, deneyimize ve ilgilendiğimiz gene göre uygun yöntemi belirlemek olmaktadır. Ayrıca tarama yöntemleri ile yeri belirlenen muhtemel mutasyonların hangi baz/bazlarda olduğunun mutlaka DNA dizi analizi ile gösterilmesi veya mutasyonun hangi bazda olduğunun belirlendiği yöntemlerde bunun yine DNA dizi analizi ile doğrulanması gerekmektedir.

Mutasyon tarama yöntemlerinin kullanımı önemlidir. Çünkü, bir sonraki basamakta a) bulunan mutasyonlar eğer bir topluma özgülse toplum taramalarında ve doğum öncesi tanıda kullanılabilir; aileye özgülse o aile için spesifik tanı ve doğum öncesi tanıyı sağlamada kullanılabilir. b) diğer kişilerin bu hastalıkla ilgili moleküler düzeyde bilgilenmesini sağlar. c) mutasyonların karakterizasyonları enzim proteinlerin fonksiyonel bölgelerinin ve yapılarının anlaşılmasına katkıda bulunabilir. d) mutasyona uğrayan gen bölgeleri, sıklıkla oluşan mutasyonlar hakkında istatistik bilgi edinmemize yolaçar. e) kanserden sorumlu mutasyonlar erken tanı ve taramada kullanılabilir (21,22).

Özetle, mutasyon çeşitli tarama yöntemleri ile saptanabilir. Bu yöntemlerden uygun olanı seçilebilir ve hiç biri de kolay değildir. Ancak üretilen bilgi çok işe yararlıdır.

### **KAYNAKLAR**

1. Cotton RG. Current methods of mutation detection Mutat Res 1993; 285: 125-144.
2. Nollau P, Christoph W. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. Clin Chem 1997; 43: 1114-1128.
3. Cotton RG. Methods in clinical molecular genetics. Eur J Pediatr 2000; 159(Suppl 3): S179-S182.
4. Myers RM, Larin Z, Maniatis T. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. Science 1985; 230:1242-1246.
5. Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T. Detection of single base substitutions in total genomic DNA. Nature 1985; 313:495-498.

6. Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 3111-3129.
7. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-879.
8. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16: 325-32.
9. Fan E, Levin DB, Glickman BW, Logan DM. Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res* 1993; 288:85-92.
10. Sekiya T. Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis. *Mutat Res* 1993; 288:79-83.
11. Cai Q-Q, Toitou I. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3909-3910.
12. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3637-3642.
13. Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4009.
14. Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6741-6742.
15. Keen J, Lester D, Inglebeam C, Curtis A, Bhattacharya S. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet* 1991; 7: 5.
16. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien JS, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics* 1992; 12: 301-306.
17. Mashal RD, Koontz J, Sklar J. Detection of mutations by cleavage of heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nature Genet* 1995; 9: 177-183.
18. Youil R, Kemper BW, Cotton RGH. Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T4 endonuclease VII. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 87-91.
19. Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1719-1721.
20. Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Krillov E, Kreindlin E, Ivanov I, Parinov S, Guschin D, Drobishev A, Dubiley S, Mirzabekov A. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:4913-4918.
21. Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 2000; 159(Suppl 3): S173-S178.
22. Ayme S. Bridging the gap between molecular genetics and metabolic medicine: access to genetic information. *Eur J Pediatr* 2000; 159(Suppl 3): S183-S185.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. H. Asuman Özkara  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara  
e-mail: ozkara@hacettepe.edu.tr

---