

SSCP ANALİZİNDE ÇİFT İPLİKLİ DNA POLİMORFİZMİ

İncilay SİNİCİ¹, H.Asuman ÖZKARA¹

DOUBLE STRANDED DNA POLYMORPHISM IN SSCP ANALYSIS

Özet: SSCP (tek zincir konformasyon polimorfizmi) analizi, özellikle gen dizisi büyük olan proteinlerde mutasyon taramasında kullanılan bir elektroforez yöntemidir. Denatüre olarak tek zincir haline gelmiş DNA'lar zincir içi zayıf bağlarla konformasyon alarak stabil sekonder yapılar oluştururlar. Mutasyon sonucu değişen tek bir baz bile konformasyonu etkiler ve kontrol ile karşılaştırıldığında o bölgenin elektroforezdeki hareketinde bir kayma, farklılık gözlenir. SSCP analizi çift iplikli DNA'daki konformasyon değişikliklerini göstermeyen bir yöntemdir. Fakat elektroforezde daha hızlı hareket eden çift iplikli nativ DNA da görülebilir. Otozomal resesif kalıtılan, metabolik lizozomal depo hastalıklarından Tay-Sachs hastalığını Heksozaminidaz A izoenzimi α -altbirim genindeki mutasyonlar oluşturmaktadır. Yaptığımız çalışmada enzimatik analiz ile Tay-Sachs hastalığı tanısı almış bir hasta ve ailesinde SSCP yöntemi ile mutasyon taraması yaptık. Hasta ve ailesinde heksozaminidaz A enziminin α -altbirim geninin 14 eksonu ve ilişkili bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri 96°C'de 10 dakika tutularak denatüre edildi ve SSCP jeline uygulandı. SSCP analizi, hastada ve ailesinde ekson 10'da bir mutasyonun varlığını gösterdi. Jelimizde mutasyonun özelliği nedeniyle şimdiye kadar literatürde bir benzerine rastlamadığımız çift iplikli DNA bantları görüldü. Bunlar heterozigotlarda denatüre edildikten sonra renatüre olan bir kısım DNA'nın, mutant allellerinin kendi aralarında, normal allellerin kendi aralarında birleşmesi sonucu oluşan bantlardı. Sonuç olarak SSCP analizinin, bazı delesyon mutasyonlarında çift zincirli DNA'larda da muhtemel mutasyonu gösterebileceğini söyleyebiliriz. Bu tür mutasyonlarda DNA dizi analizinden önce NuSieve agaroz jel elektroforezi ile delesyonun büyüklüğünü saptamak mümkün olmaktadır.

Anahtar Kelimeler: SSCP, delesyon mutasyonu, çift zincir DNA polimorfizmi

Summary: SSCP (single stranded conformational polymorphism) analysis is an electrophoretic method that is used for screening of mutations in the large genomic sequences of proteins. Single strands of DNA, which are formed under denaturing conditions, get conformation by weak interstrand interactions and form stabile secondary structures. Even a single base alteration as a result of the mutation, affects the conformation and when compared with the control, a shift, a difference in the electrophoretic mobility is observed at that region. SSCP analysis is a method that doesn't demonstrate the conformational changes in the double stranded DNAs. But more rapidly moving double stranded native DNA may be seen in the electrophoresis. Tay-Sachs disease, an autosomal recessive lysosomal storage disease, results from the mutations in the alpha-subunit gene of hexosaminidase A. In this study, we screened a patient, who was diagnosed as a Tay-Sachs patient with the enzymatic assay, and his family for the mutation by using SSCP analysis. PCR products of 14 exons and flanking sequences of α -subunit gene of Hex A in the patient and his family were denatured by heating at 96°C for 10 min. and immediately loaded on a SSCP gel. SSCP analysis showed the presence of a mutation in the exon 10 at the patient and his family. Because of the characteristic of the mutation, we saw different double stranded DNA bands in the gel that was not seen in the literature to date. They were some reannealing DNAs after the denaturing in the heterozygotes. These bands were formed by renaturation of the some of the single strand DNAs following denaturation; the mutant alleles and the normal alleles make hybridization inside each group. As a result, we can say that in some deletion mutations SSCP can show the



mutation in the double stranded DNAs. In such type of mutations we can get knowledge about how big is the deletion mutation before DNA sequencing by using NuSieve agarose gel electrophoresis.

Key Words: SSCP, deletion mutation, double strand DNA polymorphism

GİRİŞ

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) analizi, bilinmeyen mutasyonların saptanması için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na (PCR) bağlı bir mutasyon tarama yöntemidir. Bu yöntem, nokta mutasyonları, küçük insersiyon ve delesyon mutasyonlarının saptanmasında tercih edilmektedir. Özellikle gen dizisi büyük olan proteinlerde dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak amacı ile genin taranmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir ve altın standart olan DNA dizi analizine iyi bir alternatiftir. Mutasyon saptama oranı %80 ile 90 arasında değişmektedir (1). Bu analiz restriksiyon enzim analizini, 'blotting'i, proplar ile hibridizasyonu gerektirmediğinden hızlı ve pratik bir yöntemdir (2).

Bu yöntemde PCR ürünleri denatüre edilir ve denatüre edici olmayan poliakrilamid jele uygulanır. Denatüre edilerek tek zincir haline getirilmiş DNA'ların zincir içi zayıf bağlarla kazandıkları yeni ikincil yapıları mutasyon sonucu değişebilir. Mutasyon sonucu oluşan bu ikincil yapıdaki konformasyon farkı o bölgenin elektroforezdeki hareketinde normal kontrol ile karşılaştırıldığında bir kaymaya, farklılığa neden olur. SSCP analizi genellikle tek iplikli DNA'daki konformasyon değişikliklerinden yararlanılarak mutasyonun varlığını tahmin etmede kullanılmaktadır. Çift iplikli DNA'daki değişiklikleri göstermeyen bir yöntemdir.

Her SSCP analizi için optimal koşulların belirlenmesi gerekmektedir. Analiz edilecek DNA parçasının büyüklüğü, jelin özellikleri (kullanılan poliakrilamid ve gliserol konsantrasyonu, denatüran ajan varlığı), elektroforez sırasında tercih edilen sıcaklık, elektroforez zamanı, PCR ürünlerinin denatürasyon yöntemi, mutasyonun tipi ve bulunduğu yer performansı etkiler(3). Optimal koşullar sağlandığında elektrofo-

retik hızı tek zincirli nükleik asitlerin büyüklükleri ve dizileri etkiler (1).

SSCP analizinde en iyi sonuç, DNA 150-200 baz çifti uzunluğunda olduğu zaman elde edilir(1). Uzunluğu 150 baz çifti altında olan DNA fragmanlarında ikincil yapının oluşmasındaki güçlük nedeniyle SSCP analizinin duyarlılığı azalmaktadır. İkiyüz baz çiftinin üzerindeki büyüklüğe sahip DNA'larda ise tek baz değişikliği ile daha az konformasyon değişikliği oluşacağı için bunun jelde görülmesi güçleşmekte ve büyük parçaların analizinde tespit edilebilen mutasyonların sayısı düşmektedir(1,4,5). Daha büyük parçalar için duyarlılık RNA-SSCP analizi ile başarılabilir(6,7). DNA moleküllerine göre RNA molekülleri daha fazla sayıda farklı ikincil yapılar oluşturabilmektedir. Bu analizde PCR ürünlerinden RNA oluşturacak ek bir in vitro transkripsiyon basamağına ihtiyaç vardır (7). Fakat bu yöntem erken dur kodonu yaratan veya 'splice site' mutasyonlarını göstermede yetersiz kalır (8).

Tek zincirli DNA'nın konformasyonu sıcaklığa hassastır(3). 17°C'nin altı ve 23°C'nin üzerindeki sıcaklıklar tek zincirli DNA'nın yarı stabil şekillerini bozabilmektedir. En iyi rezolüsyonu elde edebilmek için farklı sıcaklıklar (4°C, 10°C, oda sıcaklığı) denenmiştir(9,10). En çok tercih edilen oda sıcaklığıdır. Elektroforez sırasında jellerin ısıtılması önlenmelidir. 5 V/cm voltajda ve 4 watt'ta ortalama 22°C'de elektroforez yapıldığında jel fazla ısınmamakta ve jelin ısınma miktarı önemsiz olmaktadır. İçinden sıvı sirkülasyonu olan elektroforez sistemleri pahalı olmakla birlikte sıcaklığı standardize ettikleri için uygun sistemlerdir (8,10). İyi bir sonuç için yeterli hava konveksiyonu da gereklidir (3).

SSCP analizinde DNA parçalarını ayırmak için sıklıkla kullanılan matriks akrilamiddir. Akrilamid/

bisakrilamid oranı, toplam akrilamid ve gliserol yüzdesi, tampon içeriği jelin ayırma özelliğini belirler. En fazla tercih edileni, düşük çapraz bağlayıcı oranı ve %10 gliseroldür (11). Bazı SSCP'ler için yüksek yüzdeli jellerin kullanılması önerilmiştir (12). N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TEMED) ve amonyum persülfat ile polimerize edilmiş akrilamid benzeri Hidrolink isimli jelin tek bir tipte gözenek büyüklüğüne sahip olduğu ve akrilamidden daha iyi rezolüsyon sağladığı belirtilmiştir (11-13). Yüksek rezolüsyon için ticari olarak bir çok özel jel matrisleri mevcuttur (14).

Şimdiye kadar rapor edilmiş jel uzunlukları 5 ile 50 cm arasında değişmektedir (8). SSCP analizinde sonuçlar görsel değerlendirildiğinden iyi bir rezolüsyonun sağlanabilmesi için jelin boyutlarının uzun olması (yaklaşık 30x40 cm), elektroforez işlemlerinin düşük voltajda, uzun sürede yapılması ve ince bir jelin kullanılması gereklidir (2,11-13). Son yıllarda yapılan bir çok uygulamada standart sekans jelleri yerine mini jeller kullanılmıştır (15,16). Kısa jellerde keskin bant farklılıklarının gözlemlendiği bildirildiği halde %0.5'lik kayma farklılığının gözlenebilmesi için uzun elektroforezler tercih edilmelidir. Mini jellerdeki rezolüsyonun sekans jellerindeki rezolüsyon kadar yüksek olup olmadığı hakkında kesin bir bilgi mevcut değildir. Uzun ve büyük elektroforez cihazı, karmaşık düzenlemeler ve sıcaklık kontrolü gerektirdiği, daha fazla emek isteyen bir uygulama olduğu için mini jeller tercih edilmiştir (2).

SSCP analizi için PCR ürünlerinin temiz ve spesifik olması gereklidir. Spesifik olmayan PCR ürünleri, kullanılmamış primerlerin varlığı, PCR siklus sayısının fazlalığı yanlış yorumlanabilecek bantlara neden olabilir(17). Genel olarak PCR ürünleri 96°C'de ısıtılarak denatüre edilir. Tek zincir haline gelmiş DNA'lar hemen buz içine konular ve hızla jele uygulanır. Örneğe güçlü denatüranların eklenmesi veya örneklerin 10-30 kat seyreltilmesi tek zincirlerin kendi kendine çift zincir oluşturmalarını en aza indirir. Denatüran olarak formamid, sodyum hidroksit, üre ve

metil merkürük hidroksit kullanılabilir. Metil merkürük hidroksit toksiktir ama en etkili denatürandır. Özellikle ince jeller kullanıldığında denatüre edilmiş dilüe PCR ürünleri jele uygulandıkları noktada konsantrasyon olurlar ve bir miktar renatürasyon gerçekleşir. Bu nedenle her zaman çift zincir DNA bantları tek zincir DNA bantlarından daha güçlü gözlenir. Tek zincir DNA bantlarının daha iyi gözlenebilmesi için DNA'nın mümkün olduğunca sulandırılması gerekir (8). İnce jeller kullanıldığında tek zincir DNA'ların gözlenmesinde radyoaktif işaretleme, gümüş boyama ve etidyum bromide üstünlük sağlar (17,18).

Mutasyonun tipi ve bulunduğu yer SSCP analizinin duyarlılığını etkilemektedir. Mutasyon ikincil yapıya katılıyorsa SSCP analizinde mutasyon kolaylıkla saptanabilecektir. Eğer mutasyonun ikincil yapıyı oluşturmada rolü yoksa, mutasyon saptanamayabilir. Pürin içeriğinin daha fazla olduğu DNA tek zinciri jelde daha hızlı yürümekte ve daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Buna bağlı olarak DNA'nın bazen esas, bazen de tamamlayıcı zinciri mutasyonu diğerinden daha iyi göstermektedir. G'nin T'ye transversiyonu haricinde herhangi bir baz değişikliğinin sensitivite üzerine belirgin etkisi yoktur (1).

SSCP analizi özel bir ekipmana ihtiyaç göstermeyen bir yöntem olduğu için basit ve hızlı bir tarama yöntemidir. SSCP analizinde mobilite farklılıkları görsel olarak değerlendirilir. Bu yüzden standardizasyonu kısıtlı ve otomasyona geçirilmesi de zordur. Optimal koşullar büyük oranda ampirik olarak tanımlanmıştır. Bir fragmanın farklı koşullarda analiz edilmesi mutasyonların tespit edilebilme olasılığını artırır (3).

Otozomal resesif kalıtılan, metabolik lizozomal depo hastalıklarından Tay-Sachs hastalığını Heksozaminidaz A izoenzimi α -altbirim genindeki mutasyonlar oluşturmaktadır. Yaptığımız çalışmada enzimatik analiz ile Tay-Sachs hastalığı tanısı almış bir hasta ve ailesinde SSCP yöntemi kullanarak mutasyon taraması yaptık.



GEREÇ VE YÖNTEM

Tam Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu 'salting out' yöntemi kullanılarak Stratagene DNA izolasyon kitindeki basamaklara uygun şekilde yapıldı.

DNA Miktar Tayini

Örnekteki DNA miktarı, 260nm'de 50µg DNA'nın 1 optik dansite okuma vermesinden yararlanılarak hesaplandı (19).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hasta ve ailesinin HexA geninin 14 adet eksonu ve çevresindeki dizileri özgül primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı (20). Herbir PCR tüpünde toplam hacim 50µl olacak şekilde 0.5µg DNA; 0.5µg/ml primer A; 0.5 µg/ml primer B (Stratagene, ABD); herbiri 10mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Sigma, ABD), 5µl inkübasyon karışımı (1.5 mM MgCl₂, 10mM Tris HCl, 50 mM KCl, %1 Triton X 100, 0.2mg/ml BSA veya jelatin) (Appligene Oncor, ABD); 0.25 ünite Taq DNA polimeraz (Appligene Oncor, ABD) konuldu. Her örnek 'Thermolyne Temptronic Thermal Cycler'da 94°C'de 30sn. Denatürasyon, her eksona göre değişen 59-60°C'lerde 30sn. 'annealing', 72°C'de 90sn. 'extention' basamaklarını içeren 30 sıklıya tabi tutuldu.

Agaroz Jel Elektrofrez

Hasta ve ailesinin Hex A geninin 14 eksonunun PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel elektrofrezine uygulanarak amplifikasyon ve kontaminasyon açısından kontrol edildi (19).

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Stranded Conformational Polymorphism) (SSCP)

Tüm örneklerde Hex A geninin 14 adet eksonu 96°C'de 10 dakika tutularak denatüre edildi ve 33cm x 39cm x 0.4mm boyutlarında %10 gliserol içeren %6'lık poliakrilamid jele uygulandı. Oda sıcaklığında 400V'da 15mA'de 16-20 saat süresince elektrofrez yapıldı.

Gümüş Boyama

DNA bantlarının poliakrilamid jelde görülebilmesi için gümüş boyama yöntemi kullanıldı (21). Jel, %100 etanol, %100 asetik asit içeren çözelti ile yıkandı. %0.1'lik AgNO₃ ile boyandı. %1.5 NaOH, %0.01 NaBH₄ ve formaldehit içeren çözelti ile jel yıkanarak bantlar görünür hale getirildi. %0.75'lik Na₂CO₃ ile boyanan bantlar fikse edildi.

NuSieve Agaroz Jel Elektrofrez

SSCP analizinden sonra hasta ve ailesinde Hex A geninin 10. eksonu için %3'lük NuSieve agaroz jel elektrofrez yapıldı.

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi Sanger dideoksi zincir sonlanması yöntemi kullanılarak Bonn Friedrich Wilhelm Üniversitesi'nde gerçekleştirildi (22).

BULGULAR

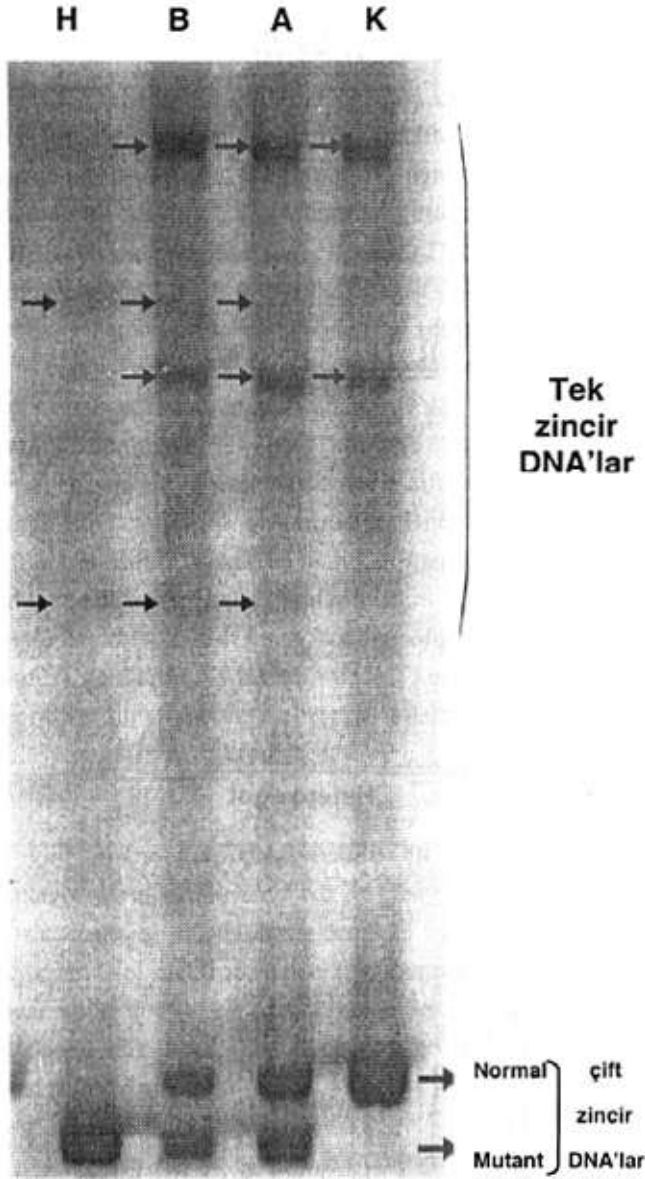
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi ile Hex A Geninin 14 Adet Eksonun Çoğaltılması

PCR ile çoğaltılan bölgenin büyüklüğünü ölçmek ve doğru bölgenin çoğaldığına karar verebilmek için 1000bp'lik DNA moleküler ağırlık belirleyicisi kullanıldı. Agaroz jel elektrofrezinde tüm bireylerde bütün ekson ve çevresindeki dizilerin tek bir bant halinde doğru olarak çoğaldığı gözlemlendi.

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) Analizi Bulguları

Poliakrilamid jel elektrofrezinde hastanın, annenin, babanın ekson 10 dışında diğer eksonlarının bantları, kardeşin ise tüm eksonlarının bantları kontrol bantları ile uygunluk gösterdi. Hastanın, annenin, babanın ekson 10 tek zincir konformasyonları, kontrol DNA'sından farklı bulundu. Hastada kontrole göre elektrofrezde farklı yürüyen 2 bant görülürken, anne ve babada 4 farklı bant görüldü. Tek zincir konformasyonlarını gösteren bu bantlardan 2 tanesi hastada görülen bantlara uygunluk gösterirken diğer 2'si kontrol DNA'sına ait bantlara uygunluk gösteriyordu.

Bu bulgular ışığında SSCP analizi, hastada ekson 10'da bir mutasyonun varlığını gösterdi.(Şekil 1)



ŞEKİL 1. *Hex A* geni 10. eksonun SSCP analizi H) Hasta B) Baba A) Anne K) Kontrol. Tek zincir DNA'lara ait bantlar ve çift zincir DNA'lara ait bantlar oklar ile gösterilmiştir.

Hastanın bu mutasyon açısından homozigot, annenin ve babanın heterozigot olduğu saptandı. Aynı elektroforezde denatüre olmamış çift iplikli DNA'lar da görüldü. Hasta ve kardeşinde ekson 10 çift iplikli DNA'ya ait tek bant görülürken annenin ve babanın ekson 10

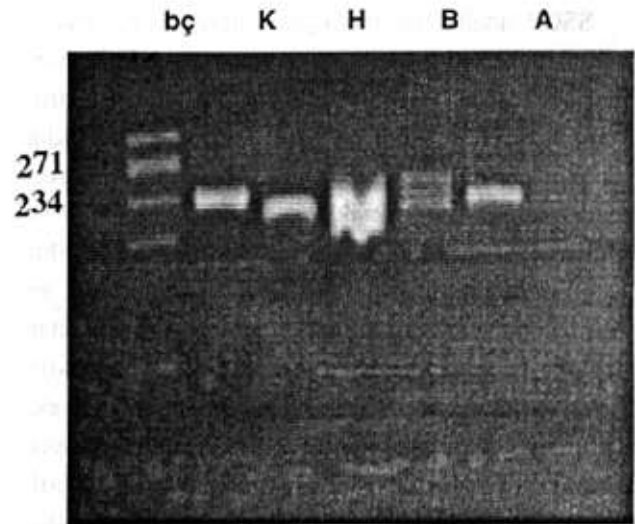
çift iplikli DNA'sına ait 2 bant görüldü. Bunlardan biri hastada görülen banda benzerken diğer bant kontrolün çift iplikli DNA'sına uygunluk gösteriyordu. Hasta ve kontrolün çift iplikli DNA'larına ait tek bantlarının birbirlerinden farklı yürümesi yine ekson 10'da bir mutasyonun varlığını gösterdi. Kardeşin ekson 10 bantlarının ise tamamen kontrol ekson 10 bantları ile aynı olduğu görüldü.

SSCP sonucuna göre hastanın ekson 10'da bir mutasyona sahip olduğu ve homozigot olduğu, annenin ve babanın aynı mutasyon açısından heterozigot olduğu, kardeşin ise bu mutasyonu taşımadığı bulundu.

NuSieve Agaroz Jel Bulguları

Tüm aile ve kontrolün ekson 10 PCR ürünleri %3'lük NuSieve agaroz jele uygulandı (Şekil 2).

Hastanın ekson 10 DNA'sının kontrole göre farklı yürüdüğü saptandı. Annenin ve babanın ekson 10'a ait bantları SSCP analizinde görüldüğü gibi biri hastanın bandı ile aynı mesafede diğeri kontrolün bandı ile aynı mesafede olmak üzere 2 bant halinde görüldü. Kardeşinde görülen bandın ise kontrolde görülen bantla aynı olduğu gözlemlendi. Ekson 10 bantlarının



ŞEKİL 2. *Hex A* geni 10. eksonun NuSieve agaroz jel elektroforezi bç) DNA marker'ı K) Kontrol B) Baba A) Anne Ka) Kardeş.



DNA molekül ağırlık markerının 271 bp ve 234 bp'lik bantlarının arasındaki mesafeye kadar yürüdüğü görüldü. SSCP analizi ile saptanan olası mutasyonun NuSieve agaroz jel elektroforezi ile görülebilir durumda olduğu saptandı.

DNA Dizi Analizi Bulguları

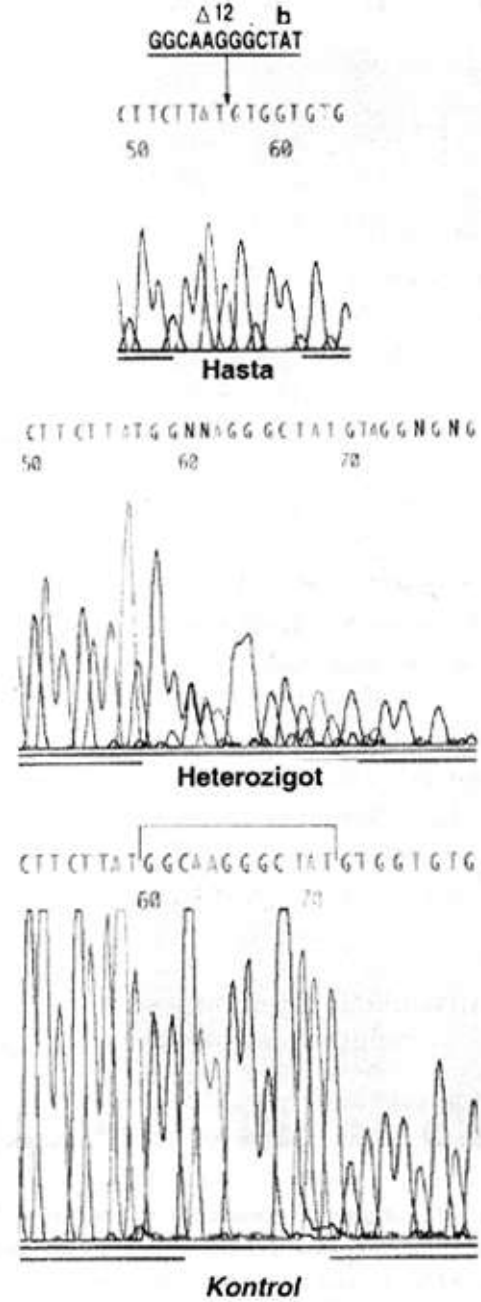
DNA dizi analizi sonucu hastada 12 bp'lik delesyon mutasyonu saptandı (5'-1096-1107 veya 1097-1108 veya 1098-1109 bp'leri arasında). Hasta homozigot, anne ve baba heterozigot olarak değerlendirildi. (Şekil 3) Kardeşin ise 10 bp'lik delesyon mutasyonuna sahip olmadığı görüldü.

TARTIŞMA

Hastamızda ve ailesinde hastalığa neden olan mutasyonu tanımlayabilmek için PCR-SSCP-DNA dizi analizi teknikleri sırası ile kullanılmıştır. SSCP analizi gen dizisi büyük olan proteinlerde dizi analizi yapılacak bölgeyi önceden saptamak amacı ile genin taranmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Hex A geni 35 kb büyüklüğünde 14 adet eksondan oluşmuş oldukça büyük bir gen olduğundan, hastalığa neden olan mutasyonun yerini belirleyebilmek için SSCP analizi tercih edilmiştir.

SSCP analizi ile mutasyona uğramış bir DNA, homozigotsa iki mutant bant, heterozigotsa iki normal, iki mutant olmak üzere dört bant verir. Elektroforez koşullarına göre bantların sayısında değişiklik olabilir. Aynı DNA tek zincirinin 'metastable conformers' denilen değişik ikincil yapıları oluşabilir ve bunlar jel üzerinde farklı bantlar şeklinde görülebilirler. Değerlendirmede dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, tek tek bantları açıklamaya çalışmaktan çok, hasta ve kontrol arasındaki farkı saptamaktır. Çalışmamızda hasta ve ailesinde Hex A geni 10. eksonu hariç diğer eksonların tek zincir konformasyonlarının oluşturdukları bantlar kontrol ile karşılaştırılmıştır ve herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Hastamızda Hex A geni 10. eksonda kontrole göre farklı tek zincir konformasyonunu gösteren 2 bant gözlenmiştir ve hastanın bu eksonda bir mutasyon

taşıdığı, bu mutasyon açısından homozigot olduğu saptanmıştır. Anne ve babanın 10. eksonunda iki



ŞEKİL 3. Hex A geni 10. eksonun DNA dizi analizi. Hastada bulunan 12 bazçiftlik delesyon ok ile gösterilmiştir (1096-1107 GGCAAGGGCTAT) (Try366-Gly-Lys-Gly369). Üstüste binmiş sinyaller heterozigot anne ve babada tespit edilmiştir. Kontrolün ilişkili dizi analizi de görülmektedir.

tanesi kontrolde gözlenen bantla uyumlu, diğer ikisi hastanın bantları ile uyumlu 4 bant gözlenmiştir ve anne ile babanın aynı mutasyon için heterozigot oldukları belirlenmiştir.

SSCP analizi çift iplikli DNA'daki konformasyon değişikliklerini göstermeyen bir yöntemdir. Çalışmamızda şimdiye kadar literatürde bir benzerine rastlamadığımız çift iplikli DNA bantları görülmüştür. Hex A geni 10. eksonda hastanın çift zincir DNA bandının kontrole göre farklı yürüdüğü tespit edilmiştir ve DNA çift ipliklerinin bu eksonda bir mutasyon varlığını bize göstermiştir. Heterozigot olarak düşündüğümüz anne ve babanın çift zincirli DNA'larına ait 2 bant gözlenmiştir. Bir bant kontrole ait çift zincir DNA bandı ile, diğeri hastaya ait çift zincir DNA bandı ile uygunluk göstermiştir. Bunlar denatüre edildikten sonra renatüre olan bir kısım DNA'nın, mutant allelerinin kendi aralarında, normal allelerin kendi aralarında birleşmesi sonucu oluşan hibridize olmuş bantlardır. Elektroforezde, kendi içlerinde hibridize olmuş mutant ve normal allele ait bantlar delesyonun büyüklüğü nedeniyle bu kadar iyi ayrışabilmiştir.

Çift zincir konformasyonunu etkileyen büyük mutasyonların NuSieve agaroz jel elektroforezinde de gözlenebileceği düşünülerek örnekler %3'lük NuSieve agaroz jel elektroforezine uygulanmıştır. Yapılan Nusieve agaroz jel elektroforezinde SSCP analizinde gözlenen çift zincir konformasyon polimorfizminin aynı patterni gözlenmiştir.

DNA dizi analizi sonucu hastamızda 10. eksonda 12bç'lik bir delesyon mutasyonu saptanmıştır ve bu mutasyon açısından hastanın homozigot, anne ve babanın heterozigot oldukları tespit edilmiştir. Büyük delesyon mutasyonlarında zincir uzunlukları arasındaki farklılıkların, yük değişiminin çift zincir DNA'ların konformasyonunda farklılığa neden olduğu düşünülerek, böyle büyük bir mutasyonun varlığının SSCP analizi ve NuSieve agaroz jel elektroforezi ile de tespit edilebileceği varsayılabilir.

Sonuç olarak SSCP analizinin, özellikle büyük delesyon mutasyonlarında çift zincirli DNA'larda da muhtemel mutasyonu gösterebileceğini söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Sheffield, V.C, Beck, J.S, Kwitek, A.E, Sandstrom, D.W, Stone, E.M. (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics*. 16,325-32.
2. Orita, M, Suzuki, Y, Sekiya, T, Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5,874-79.
3. Nollau, P, Wagener, C. (1997) Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clin Chem*. 43(7), 1114-28.
4. Sarkar, G, Yoon, H.S, Sommer, S.S. (1992) Dideoxy fingerprinting: a rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics*. 13,441-43.
5. Fan, E, Levin, D.B, Glickman, B.W, Logan, D.M. (1993) Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res*. 288,85-92.
6. Danenberg, P.V, Horikoshi, T, Volkenandt, M, et al. (1992) Detection of point mutations in human DNA analysis of RNA conformation polymorphism(s). *Nucleic Acids Res*. 20,573-9.
7. Sarkar, G, Yoon, H.S, Sommer, S.S. (1992) Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res*. 20,871-9.
8. Humphries, S.E, Gudnason, V, Whittall, R, Ian, N.M. (1997) Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem*. 43(3),427-35
9. Leren, T.P, Solberg, K, Rodningen, O.K, Rosby, O, Tonstad, S, Ose, L, et al. (1993) Screening for point mutations in exon 10 of the low density lipoprotein receptor gene by analysis of single-strand conformation polymorphisms: detection of a nonsense mutation-FH469→stop. *Hum Genet*. 92,6-10.
10. Sekiya, T. (1993) Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis. *Mutat Res*. 288,79-83.



11. Spinardi, L, Mazars, R, Theillet, C. (1991) Protocols for an improved detection point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res.* 19,4009.
12. Savov, A, Angelicheva, D, Jordanova, A, Eigel, A, Kalaydjieva, L. (1992) High percentage acrylamide gels improve rezolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res.* 20,6741-2.
13. Keen, J, Lester, D, Inglebearn, C, Curtis, A, Bhattachorya, S. (1991) Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on Hydrolink gels. *Trends Genet.* 7,5.
14. Soto, D, Sukumar, S. (1992) Improved detection of mutations in the p53 gene in human tumors as single-stranded conformation polymorphs and double-stranded heteroduplex DNA. *PCR Methods Appl.* 2,96-8.
15. Kurvinen, K, Hietanen, S, Syrjanen, K, Syrjanen, S. (1995) Rapid and effective detection of mutations in the p53 gene using nonradioactive single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique applied on PhastSystem. *J Virol Methods.* 51,43-53.
16. Iolascon, A, Parrella, T, Perrotta, S, et al. (1994) Rapid detection of medium chain acyl-CoA dehydrogenase gene mutations by non-radioactive , single-strand conformation polymorphism minigels. *J Med Genet.* 31,551-4.
17. Cai Q-Q, Touitou, I. (1993) Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucleic Acids Res.* 21,3909-10.
18. Hongyo, T, Buzard, G.S, Calvert, R.J, Weghorst, C.M. (1993) 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res.* 21,3637-42.
19. Maniatis, T, Fritsch, E.F, Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
20. Özkara, H.A, Navon, R. (1998) At least six different mutations in HEXA gene cause Tay-Sachs disease among the Turkish population. *Molecular Genetics and Metabolism.* 65,205-53.
21. Bassam, B, Caetano-Anolles, G, Gresshoff, P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 196,80-83.
22. Sanger, F, Nicklen, S, Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 74,5463-67.