



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SİĞIRLARDA SENTETİK DNA İLE BARKOD YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Gülseren EKER

VETERİNERLİK GENETİĞİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Nüket BİLGİN

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SIĞIRLARDA SENTETİK DNA İLE BARKOD
YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Gülseren EKER

**VETERİNERLİK GENETİĞİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Nüket BİLGİN**

Bu araştırma TÜBİTAK 120O855 proje numarası ile desteklenmiştir

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sığırlarda Sentetik DNA İle Barkod Yönteminin Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gülseren EKER

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında Gülseren
Eker tarafından hazırlanan

“Sığırlarda Sentetik DNA İle Barkod Yönteminin Geliştirilmesi”

adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak

OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:16.08.2022

İmza

Doç. Dr. Urartu Özgür Şafak ŞEKER

Bilkent Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Doç. Dr. Nüket BİLGİN

Ankara Üniversitesi

Raportör/ Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kimliklendirmede Kullanılan Yöntemler	3
1.1.1. Sıcak Demir Uygulaması	4
1.1.2. Kostikle Damgalama	4
1.1.3. Dondurarak İşaretleme	5
1.1.4. Boya ile Damgalama	5
1.1.5. Kulak Çentiği	5
1.1.6. Dövme	6
1.1.7. Kulak Küpesi	6
1.1.8. Elektronik Kimliklendirme (Radyo Frekansı ile Tanımlama Teknolojisi/ RFID)	6
1.1.8.1. Enjekte Edilebilir Kimlikleyiciler	7
1.1.8.2. Elektronik Küpe	7
1.1.8.3. Bolus	8
1.1.9. Retinal Görüntüleme ile Kimliklendirme	9
1.1.10. Burun Baskıları	9
1.1.11. DNA Polimorfizmi ile Kimliklendirme	9
1.1.12. Nükleer Olmayan DNA Barkodlama	10
1.1.13. Sentetik Rastgele DNA Dizileri ile Kimliklendirme	10
1.2. Sentetik DNA	10
1.2.1. Kolon Bazlı Oligonükleotit Sentezi	11
1.2.2. Mikroarray Bazlı Oligonükleotit Sentezi	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Rastgele DNA Dizisi Üretilmesi	13
2.2. Rastgele Üretilen Dizilerin Genomlarda Taranmasında Yararlanılan Veri Bankaları	14
2.2.1. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Bankası (National Center for Biotechnology Information, NCBI)	14
2.2.2. Ensembl	15
2.2.3. Kaliforniya Santa Cruz Üniversitesi (University of California Santa Cruz, UCSC) Genom Sağlayıcısı	16
2.3. Rastgele Üretilen Dizilerin Genomlarda Taranması	17
2.4. Örneklem	18

2.5. Temel Kimlik Bilgilerinin DNA Dizi Formatına Çevrilmesi	19
2.6. DNAidCode	19
2.7. Plazmite DNA Dizilerinin Kodlanması	21
2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	22
2.8.1. Primerlerin Sulandırılması ve Kullanım Primerleri Hazırlanması	23
2.9. Plazmitlerin Sulandırılması	23
2.10. Plazmitlerin Bakterilere Klonlanması	24
2.11. Kompetan Hücre Yapımı ve Transformasyon	24
2.11.1. Kompetan Hücrelerin Ampisilin İçeren Sıvı Besi Yerine Ekimi	25
2.12. PZR Kurulması	26
2.13. DNA İzolasyonu	27
2.14. Plazmit ve Biyolojik Materyallerin Karışım Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	30
2.15. Plazmit İzolasyonu	30
2.16. Agaroz jel elektroforez görüntüleme	31
3. BULGULAR	34
3.1. Rastgele DNA Dizileri	34
3.2. Rastgele DNA Dizilerinin Veri Tabanlarında Karşılaştırılması	35
3.2.1. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Bankası (National Center for Biotechnology Information, NCBI) Kullanılarak Karşılaştırma	35
3.2.2. Ensembl Kullanılarak Karşılaştırma	35
3.2.3. Kaliforniya Santa Cruz Üniversitesi (University of California Santa Cruz, UCSC) Genom Sağlayıcısı Kullanılarak Karşılaştırma	36
3.3. Karşılaştırma Sonucunda Sığır Genomunda Eşleşme Olmayan Diziler	37
3.4. Örnekleme ait bilgilerin DNA dizisine dönüştürülmesi	38
3.5. DNAidCode'ların Oluşturulması	39
3.6. Plazmit Vektörlerin Sulandırılması ve Kandan Genomik DNA İzolasyonu	41
3.6.1. Sulandırılan Plazmitlerin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	41
3.6.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu	42
3.6.3. Agaroz Jelde Farklı Konsantrasyonlarda Sulandırılmış Plazmitin Elektroforezi	43
3.7. Plazmit Vektörlerin DNAidCode dizisi PZR ürünlerinin Agaroz Jelde Elektroforezi	43
3.8. Sığır Kanından Genomik DNA İzolasyonu	44
3.8.1. Ticari kit ile genomik DNA izolasyonu	44
3.8.2. Fenol, Kloroform, İzamil Alkol (FKİ) İle DNA İzolasyonu	45
3.9. Sıvı Besi Yerine Ekimi Yapılan Plazmitlerin İzolasyonu	45
3.9.1. Sıvı Besi Yerine Ekimi Yapılan Plazmitlerin İzolasyonunun Agaroz Jelde Görüntülenmesi	46
3.10. Stok Plazmit DNA'ları ve 100 ng/μl sulandırılan plazmitlerle ile PZR Yapılması	47
3.11. DNA İzolasyonunun Ürünlerinin DNAidCode'la Karışımının ve Sığır DNA'larının DNAidCode Primerleri ile PZR'ı	48

4. TARTIŞMA	49
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	55
ÖZET	57
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	59
EKLER	63
Ek-1 Etik Kurul Kararı	63
Ek-2 Rastgele Olarak Hazırlanan Diziler	64
Ek-3 DNAidCode'lar	68
ÖZGEÇMİŞ	69



ÖNSÖZ

Bu çalışmada hayvanlara ait temel kimlik bilgileri DNA dizisi formatına dönüştürölüp sentetik olarak sentezletilmiş ve plazmit vektöre aktarılaraq bilginin geri kazanımı ve biyolojik materyal ile saklanabilirliği araştırılarak, yöntem optimizasyonu yapılmıştır.

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütölmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, kendisine ne zaman danışsam kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Nüket Bilgen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Genetik Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Bengi Çınar Kul'a katkıları için teşekkür ederim.

Bütün Genetik Anabilim Dalı öğretim elemanları, arkadaşlarıma yardımları ve katkıları için çok teşekkür ederim.

TÜBİTAK'a tezim için sağladığı imkanlar ve destekler için teşekkür ederim.

Anneme, babama ve kardeşime her şey için çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

μl	Mikrolitre
10XBuffer, 10xB	10mM Tris , 50 mM Potasyum klorür (KCl)'den oluşan tampon çözelti
2X lizis buffer	2 litrelik lizis tamponu
A	Adenin nükleotit
A_{260}/A_{230}	260 nanometre ve 230 nanometredeki absorbans oranı
A_{260}/A_{280}	260 nanometre ve 280 nanometredeki absorbans oranı
BLAST	Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool)
BLASTN	Nükleotit Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
Blat	Hizalama aracı
BOLD	Barcode of Life Data Systems
Buffer	Tampon çözelti
Buffer BB	Bağlama tamponu (Binding buffer)
C	Sitozin nükleotit
ddH ₂ O	Deiyonize distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAcode	Rastgele olarak üretilen sığır genomunda olmayan 40 bazlı DNA dizisi
DNAidCode	Bireye ait cinsiyet, ırk, tür, konum gibi temel bilgilerini içeren DNA baz dizisi
DNAidCodeCattleSPS	Sığırlara özgü barkod bölgesi
DNase I	deoksiribonükleaz
dNTP	deoksinükleotit trifosfatlar
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBI	Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit

FKİ	Fenol, kloroform, izoamil alkol
FMD	Sıgırlarda bulunan bulaşıcı Şap hastalığı
<i>g</i> (rcf)	Bağıl merkezkaç kuvveti (Relative Centrifugal Force)
G	Guanin nükleotit
H ₂ O	Su
HCl	Hidroklorik asit
İzopropanol	İzopropil alkol
Kb	Kilobaz
KHz	Kilohertz
Ladder	DNA merdiveni
LB	Luria Broth, Lysogeny broth, sıvı besi
M	Molar
M ₁ ve M ₂	Molarite
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
NIH	National Institutes of Health
NLM	National Library of Medicine
°C	Santigrat derece
pH	Hidrojenin gücü (Power of Hydrogen)
Pikomol	Pmol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RFID	Radyo Frekansı ile Tanımlama
RNase	Ribonükleaz
Rpm	Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
rtPZR	Real time polimeraz zincir reaksiyonu

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphisms)
T	Timin nükleotit
Taq DNA polimeraz	DNA polimeraz enzimi
TBE	Tris bazı, Borik asit ve Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi
Tm	Erime noktası
Tris	Hidroksimetil (Aminometan)
UCSC	University of California Santa Cruz
V ₁ ve V ₂	Hacim
vb.	ve benzeri
V	Volt

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Açık erişim rastgele dizi tasarlama sayfası.	13
Şekil 2.2. NCBI'da Kullanılan Parametreler.	15
Şekil 2.3. Ensembl'da Kullanılan Parametreler.	16
Şekil 2.4. UCSC'de Kullanılan Parametreler.	17
Şekil.2.5. Code1'i içeren pUC57 plazmit vektör.	22
Şekil 3.1. Simple DNA Writer sitesi.	38
Şekil 3.2. Klonlanan diziyi içeren plazmit vektörün jel elektroforezinde 1Kb'lik DNA merdiveni beklenen baz aralığı (solda) ve Code1'i içeren plazmit vektörün %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.	41
Şekil 3.3. Sulandırılan Plazmitlerin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi 1Kb'lik DNA merdiveni ile görüntülenmesi.	42
Şekil 3.4. %1'lik Agaroz Jelde Farklı Konsantrasyonlarda Sulandırılmış Plazmitin 1Kb'lik DNA merdiveni ile Elektroforez Görüntüsü.	43
Şekil 3.5. Gradient PZR ürünlerinin %2'lik Agaroz Jel Elektroforezinin Görüntüsü.	44
Şekil 3.6. Plazmit izolasyonunun %2'lik agaroz jel görüntülenmesi.	47
Şekil 3.7. Stok plazmit DNA'ları ve 100ng/ul sulandırılan plazmitlerle yapılan PZR'ın 100bp'lik DNA merdiveni ile elektroforez agaroz jel görüntüsü. Her code için birinci örnek 100ng/μl ikinci örnekler 50ng/μl konsantrasyonunda plazmidlerle yapılmıştır.	47
Şekil 3.8. DNA izolasyonunun ürünlerinin DNAidCode'la karışımının ve sığır DNA'larının DNAidCode primerleri ile yapılan PZR'ın jel görüntüsü (100bp'lik ladder).	48

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Rastgele dizilerin veri tabanlarında taranırken kullanılan parametreler.	18
Çizelge 2.2. Temel kimlik bilgileri çevirisinde kullanılan DNA kodları.	19
Çizelge 2.3. DNAidCode içindeki bölgeler ve dizilerin özellikleri.	20
Çizelge 2.4. DNAidCode dizileri PZR birleşenleri oranları.	26
Çizelge 2.5. DNAidCode dizileri PZR optimizasyonu için kullanılan için uygulanan ısı döngü sıcaklıkları ve süreleri.	27
Çizelge 2.6. Fenol-kloroform-izoamil alkol (FKİ) yönteminde kullanılan kimyasallar.	29
Çizelge 3.1. Farklı uzunlukta ve 0,50 GC oranına sahip örnek rastgele diziler.	34
Çizelge 3.2. Rastgele DNA dizilerinin NCBI Bos taurus (taxid:9913) BLAST sonuçları.	35
Çizelge 3.3. Rastgele DNA dizilerinin Ensembl BLAST sonuçları.	36
Çizelge 3.4. Rastgele DNA dizilerinin UCSC BLAT sonuçları.	36
Çizelge 3.5. Sığır genomu ile eşleşmeyen rastgele diziler.	37
Çizelge 3.6. Kulak küpe numaraların DNA baz formatına çevrimi.	38
Çizelge 3.7. TR171172835 kulak küpe numaralı sığırın örnek DNAidCode bilgileri.	39
Çizelge 3.8. DNAidCode için kullanılan sığır genomunda olmayan diziler (DNAcode).	40
Çizelge 3.9. TR171172835 nolu örneğin DNA izolasyon sonuçları.	42
Çizelge 3.10. Sığır kanından genomik DNA izolasyonunun nanodrop ile ölçüm sonucu.	44
Çizelge 3.11. TR451518010 kulak küpe numaralı örneğin farklı dilüsyonlarının nanodrop sonuçları.	45
Çizelge 3.12. DNAidCode2, DNAidCode5, DNAidCode4 örneklerinin nanodrop sonuçları.	46

1. GİRİŞ

Büyükbaş hayvancılık sektörü Dünya’da ve ülkemizde önemli bir yere sahiptir. Sığırlar et ve süt gibi gıda kaynağı, derileri (Akman ve ark., 2013) ile tekstil malzemesi gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Gıda güvenliği için hayvansal gıda üreticileri, bu ürünleri işleyen tesisler ve bu ürünleri satan marketlerin çiftlikten sofraya gıda güvenliği takibinde kullanılabilecek güvenilir ve kolay belirlenebilir yöntemlere ihtiyaç duymaktadır.

Hayvanların işaretlenmesi, yetiştiriciler tarafından Neolitik Çağ’dan bu yana hayvan sürülerinin kimliklendirilmesi için kullanılmaktadır (Landais, 2001). Hayvan sahipleri hayvanlarını hırsızlık gibi durumlarda bulabilmek için veya sosyokültürel inanış ve gelenekleri doğrultusunda hayvan kimliklendirme yöntemleriyle ilgilenmişlerdir (Blancou, 2001 ve Landais, 2001). Bu amaçla hayvanları ayırt etmeye yarayan vücut üstüne yapılan iz ve damgalar, hayvanların deri boynuz, toynak gibi bölgelerine atılan basit çentikler ve tasma, küpe gibi kimliklendirme yöntemleri kullanılmıştır.

Hayvanların ıslahla alakalı kayıtlarının tutulduğu soy kütüğü çalışmalarına 1822 yılında başlanmıştır ancak yüzyıldan fazla bir zaman sonra farklı ülkelerde hayvan sağlığı programı özelinde kimliklendirme çalışmaları başlamıştır (Wismans, 1999). Türkiye’de ise 2001 yılında sığırlar kaydedilmeye ve kimliklendirilmeye başlamıştır. Ardından hayvan mevcudunun kayıt altına alınması ve kaçak hayvan hareketlerinin önlenmesi amacıyla Avrupa Birliği (AB) mevzuatına (1760/2000) uyumlu olarak “Sığır Cinsi Hayvanların Tanımlanması, Tescili ve İzlenmesi Yönetmeliği” hazırlanmış ve 2002 yılında uygulamaya sokulmuştur (Aydın, 2007).

Ardından 28130 sayılı resmî gazetede yayınlanarak 2011 yılında güncellenen yönetmelikte hayvanların kimliklendirilmesinde kullanılacak “Tanımlama araçları: Hayvanların tanımlanmasında kullanılan plastik kulak küpesi, elektronik kulak küpesi, mikroçip, bolus veya bileklik” olarak verilmiştir (Resmî Gazete, 2011).

Sıklıkla kullanılan kulak küpesi yöntemi uygulama sırasında hem hayvan refahını olumsuz etkileyen hem de yaşanabilecek yanlış uygulama, kulakta nekroz oluşturmaları gibi komplikasyonların yanında kolayca düşebilen ve değiştirilebilen bir kimlik sistemidir. Uygulama sırasında hayvan refahını olumsuz etkileyen diğer kimliklendirme yöntemleri de bulunmaktadır. Moleküler teknikleri de yeni bir boyuta taşıyan teknolojilerle bu olumsuzlukların önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

Birden fazla örneğe ait genetik materyalin çalışıldığı merkezlerde örneklerin depolanması, işlenmesi ve ayırım yapılabilmesi için kimliklendirme, numaralandırma örneklerin karışmaması için gereklidir. Özellikle genom dizileme merkezlerinde, cihazların da etkin kullanımı için aynı anda çok sayıda örnek çalışılmaktadır. Bu nedenle de sekanslama teknolojileri ile de dizilenebilen ve doğru bir kimliklendirme süreci olmalıdır. Bu amaçla dizileme veya genotiplemeyle, biyoinformatik karşılaştırmalar yapmak için numunelerin optik barkodu kullanılarak numune kimliğini doğrulamak için çeşitli çözümler uygulanmıştır. Ancak bu yaklaşımlar optimal değildir (Moore ve ark., 2019) ve bu yöntemler yüzünden genetik analiz sonuçları karışabilmektedir.

Sunulan yüksek lisans tez çalışmasında sığırlarda kimliklendirmede kullanılabilecek sentetik DNA temelli yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntem hayvanlara ait temel bilgilerin DNA dizisi formatına dönüştürülmesi ve sentetik olarak sentezlenmesini içermektedir. Sentezlenen DNA fragmentleri plasmid vektöre klonlanmıştır. Ardından bu klonlar *E.coli*'ye aktararak çoğaltılmıştır. Klonlardan elde edilen plazmitler dizi analizi kontrolünden geçirilmiştir. Plazmitler

farklı konsantrasyonlarında sulandırılarak sığırlardan alınan farklı örneklere ve farklı konsantrasyonlarda izole edilmiş DNA'ya eklenmiştir. Son olarak plazmitlerin PZR ve geleneksel dizileme yöntemleri ile numune kimliğini doğrulamak ve çapraz kontaminasyon seviyelerini belirlemek için kullanılabilirliği belirlenmiştir. DNAidCode adı verilen ve patent başvuruları tamamlanmış olan (Doç. Dr. Nüket Bilgen) bu kimliklendirmenin hayvandan elde edilen her türlü biyolojik materyalle birlikte saklanabilecek özellikte olması hedeflenmektedir.

1.1. Kimliklendirmede Kullanılan Yöntemler

Büyükbaş hayvan yetiştiriciliği denildiğinde genellikle sığır yetiştiriciliği anlaşılır. Sığır dünyanın birçok yerinde yetiştirilmekte olup süt ve et üretiminde önemli bir yere sahiptir. Türkiye’de büyükbaş hayvancılık sektörü ekonomi ve tarım sektörü içerisinde önemli bir yere sahiptir. Sığırlar gıda kaynağı olmasının dışında, köylerde iş gücü, deri sanayisinde ham madde, ilaç sanayisinde ham madde kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Akman ve ark., 2013).

Seleksiyonu ve yetiştiriciliği yapılacak olan sağlıklı hayvanların kimliklendirilmiş olması önemlidir. Bu canlılardan elde edilecek et ve süt gibi hayvansal gıdaların güvenilir yerlerden temin edilmiş olması gerekir (Kumar ve ark., 2018). Sığırlarda bulunan bulaşıcı Şap hastalığı (Foot and Mouth Disease, FMD) gibi hastalık salgınlarının (Marchant, 2002), tüketici talepleri, ihracatın gereklilikleri ve hırsızlıkların önüne geçebilmek için doğru ve uygun bir kimliklendirme yapılması gereklidir (Daştan, 2010). Yetiştirilme amacına göre ırkı, verim özellikleri göz önünde bulundurularak seçilecek hayvanların kimliklendirilmesi için çeşitli yöntemler mevcuttur. Fakat tek bir kimliklendirme yöntemi bazen yeterli gelmemektedir (Daştan, 2010). Kullanılan kimliklendirme yöntemlerinden örneğin kulak küpeleri

değiştirilebilir, kopup düşebilir, çipler yer değiştirebilir, çıkartılabilir olduğundan dolayı yeni yöntemlere ihtiyaç vardır.

Hayvanların kimliklendirme yoluyla tanınması için kullanılan geleneksel yöntemler, elektronik kimliklendirme ve biyometrik metodlar olmak üzere temel olarak 3 yöntem vardır (Daştan, 2010 ve Marchant, 2002). Hayvanların kimliklendirilmesinde kullanılan sıcak dağlama, kostikle işaretleme, soğuk dağlama, boya ile damgalama, kulak çentiği ve dövme gibi teknikler geleneksel yöntemlerdir.

1.1.1. Sıcak Demir Uygulaması

Hayvanın derisinde görünür ve temiz bölgeye sıcak demir kullanılarak fazla basınç uygulanmadan damgalama yapılması yöntemidir. Bu uygulamayla sığırlar, atlar, koyunlar ve mandalar geleneksel olarak işaretlenebilmektedir (Daşkan, 2010). Bu yöntem uygulandığı deride yara oluşumuna neden olur, deri bütünlüğü bozulur. Yöntem hayvan refahını olumsuz etkilediği için uygulanmamalıdır.

1.1.2. Kostikle Damgalama

Sıcak demir uygulamasına alternatif olarak önerilen bu yöntemde ateş yerine kostik türü kimyasallar (koroziy kostik, kostik soda vb.) kullanılır. Uygulaması daha zor (Caja ve ark., 2004) olan bu yöntem de deride yara oluşumuna neden olur, deri bütünlüğü bozulur. Yöntem hayvan refahını olumsuz etkilediği için uygulanmamalıdır.

1.1.3. Dondurarak İşaretleme

Ateş ve kostik kimyasal yerine düşük sıcaklıkta tutulmuş, uçları numaralı damgalama demirlerinin hayvanların koyu renkli derilerinin üzerine bastırılması işlemidir. Uygulamanın yapıldığı bölgede pigmentasyonu sağlayan deri hücrelerinin dondurularak tahrip edilmesi ile işaretleme yapılan bölgede beyaz tüylerin çıkmasını sağlayan kalıcı bir numaralama yöntemidir (Tümer, 2004).

1.1.4. Boya ile Damgalama

Genellikle koyunlar için uygulanan geçici bir yöntemdir. Zararsız ve yün değerini etkilemeyen mavi, kırmızı gibi renkler kullanılır (Neary ve Yager, 2002).

1.1.5. Kulak Çentiği

Mülkiyeti gösteren, kalıcı ve ucuz bir yöntemdir (Stanford ve ark., 2001). Ancak kulak yarası nekrozları, kıkırdak kırılmaları ve sineklerin yaralara yumurtalarını bırakması sonucu miasis riski olan, kulağa atılacak başka bir çentikle eski işaretlemenin kolayca bozulabileceği bir yöntemdir (Neary ve Yager, 2002).

1.1.6. Dövmе

Yaygın olarak kullanılan ve kalıcı olan bir yöntemdir. Hayvan derisine silinmeyen bir mürekkep ile kimlik numarasının yazılmasına dayanır. Dövmе yapımında kullanılan aletlerin uygun temizlik işlemlerinin yapılmaması hastalıkların bulaşmasına neden olabilmektedir (Neary ve Yager, 2002). Dövmeler zamanla silikleşebilmekte, uygulama tekrarı uygulaması gerektirebilmektedir.

1.1.7. Kulak Kүpeleri

Sahada en sık kullanılan kimliklendirme yöntemidir. Kulak kүpeleri metal veya plastik malzemeden üretilebilir. Hayvan türüne göre farklı şekil veya boyutlarda kullanılabilir. Kullanılacak kүpenin malzemesi (metal, plastik) çevresel koşullar göz önüne alınarak tercih edilmelidir (Daşkan, 2010). Ayrıca kulak kүpeleri düşebilir, değiştirilebilir olduğu için hileye açıktır.

1.1.8. Elektronik Kimliklendirme (Radyo Frekansı ile Tanımlama Teknolojisi/ RFID)

Düşük frekans bandında radyo frekans dalgaları kullanılan ve dokulara zarar vermeyen bir yöntemdir. Kimliklendirmede kullanılan modüllerin yaydığı elektromanyetik dalgaların özellikleri uluslararası standartlar tarafından belirlenmiştir. Bu standartlara göre kullanılan RFID modüllerinin çalışma frekansı 134,2 KHz'dir. Bu frekans değeri düşük frekans sınıfında yer aldığından insan ve hayvan sağlığına herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır (Ayvetsan, 2021). Ayrıca elektronik

kimliklendirme, enjekte edilebilir mikroçipler, elektronik küpe ve bolus şeklinde yapılabilmektedir.

1.1.8.1. Enjekte Edilebilir Kimlikleyiciler

Yaklaşık 12-15 mm uzunluğunda ve 2 mm çapında olan (Taşkın ve ark., 2016) çok küçük boyutlu, geçirgen olmayan ve canlı dokuyla uyumlu bir kapsül ile çevrilidir. Hayvanların vücuduna invaziv bir yöntem olan enjeksiyon ile nakledilir. Sığır, koyun ve keçiler gibi eti tüketilen hayvanların kimliklendirilmesinde kullanılamamaktadır (Daşkan, 2010). Enjekte edilen kimlikleyiciler, enjekte edildiği bölgede sabit kalmamasından dolayı enjekte edilen kimlikleyicinin, kesimi yapılacak hayvandan geri kazanımının zordur. Bu yönüyle tüketici için tehlike oluşturmaktadır (IDEA, 2006).

1.1.8.2. Elektronik Küpe

Genellikle hayvanın sol kulağının üst kısmına takılan küpe ile kimliklendirme yöntemidir. Kullanılan malzemenin, insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkilemeyen bir plastikten yapılması gerekmektedir. Elektronik küpeler hayvanın kulağına kilitlendikten sonra tekrar kullanıma uygun değildir (IDEA, 2006).

1.1.8.3. Bolus

Geviş getiren hayvanların işkembe kısmına kapsül ile yerleştirilen ve canlının yaşamı boyunca aynı yerde kalan bir kimliklendirmedir. Yerleştirme işlemi mekanik bir aplikatör yardımıyla ağız yolundan yapılmaktadır. Bu kimliklendirme yönteminin uygulanacağı hayvanın yaşına ve kilosuna göre bir bolus seçimi yapılmalıdır (IDEA, 2006).

Elektronik kimliklendirmenin klasik yani görsel kimliklendirmeye karşı olan üstünlüğü klasik yöntemlerde kullanılan barkod numarası gibi doğrudan görüş (optik temas) gerektirmeden hayvanın kimlik numarasının okunabilmesi olarak ifade edilebilir. Hayvanların kulak küpesinde bulunan barkodun okunabilmesi için hayvanın sabit durması, barkod üzerinde kir, toz veya dışkı ile bulaşık olmaması küpenin barkod bulunan kısmının okuyucuya dönük durması, barkodun herhangi bir dış etken nedeniyle okunabilirliğini yitirmemiş olması gerekmektedir. Ancak elektronik kimliklendirmede hızlı okuma işlemi için bu koşulların hiçbirinin sağlanması gerekmez. Hayvanlar hareketli iken, küpenin konumundan ve dış etkenlerden bağımsız olarak barkodlu küpelere oranla hızla hayvanların bireysel kimlik numaraları sistemlere tarafından tanınabilir (Ayvetsan, 2021).

Gelişen teknolojilerle birlikte ortaya çıkan biyometrik metotlar ise doku bütünlüğünü bozmadan ve hayvan refahını ön plana çıkartarak kimliklendirme yapmayı amaçlamaktadır (Marchant, 2002). Ancak bu yöntemlerin uygulama deneyimi gerektirmektedir. Ayrıca biyometrik metotlar ile yapılan kimliklendirme ve bununla ilişkili sonuçların uzmanlar tarafından analiz edilmesi de gerekmektedir.

1.1.9. Retinal Görüntüleme ile Kimliklendirme

Hayvanın yaşamı boyunca değişmeden kalan ve her hayvanın kendine özgü olan retinaya ait damarların görüntülenmesi esasına dayanır (Daşkan, 2010). Deneyimli kişiler tarafından yapılması gerekmektedir (Çelikyürek ve Karakuş, 2017). Kesim, parçalama gibi işlemlerden zarar görmüş damarlar için kullanımı uygun değildir.

1.1.10. Burun Baskıları

Biyometrik kimliklendirmede kullanılabilen stabil bir yapı olduğu ve uzun süre değişmeden kalan bir yapıda olan burnun “Muzzle” adı verilen bölgenin baskısının alınması yöntemidir (Çelikyürek ve Karakuş, 2017). Stampa ve kâğıt kullanılan ucuz ve basit bir yöntemdir. Baskı işlemi yapılırken hayvanın sabit tutulması zordur. Bu sebeple düzgün bir burun baskısı her zaman elde edilememektedir.

1.1.11. DNA Polimorfizmi ile Kimliklendirme

DNA’daki polimorfik bölgelerin tespit edilmesi ve bu temelde bireyin kimliklendirilmesinde kullanılabilir (Daşkan, 2010). DNA’daki polimorfik bölgeler Tek Nükleotit Polimorfizmi (TNP, Single Nucleotide Polymorphisms, SNP), microsatellitler (Kısa Rastgele Tekrarlar, Short Tandem Repeats, STR), bazı spesifik gen bölgeleri gibi DNA temelli belirteçler evcil hayvanların genotiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Caja ve ark., 2004; Ciftcioglu ve ark., 2009 ve Cunningham ve Meghen, 2001). DNA örnekleme ile kimliklendirme yapmak pahalı ve uzmanlık gerektiren bir uygulamadır (Caja ve ark., 2004).

1.1.12. Nükleer Olmayan DNA Barkodlama

DNA barkodlama yöntemi ile çalışılmak istenilen canlı türüne bağlı olarak kloroplast, mitokondri gibi organellerin ilgili bölgelerinin 600-700 baz uzunluğundaki sekanslarının (Bayram, 2020), Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information, NCBI) GenBank ve BOLD (Barcode of Life Data Systems) gibi veri tabanlarında DNA sekanslarının karşılaştırılmasıyla tanımlanmaları sağlanmaktadır.

1.1.13. Sentetik Rastgele DNA Dizileri ile Kimliklendirme

Özgün ve tekil rastgele DNA dizilerinin sentezlenmesini ve vektörlere aktarılmasını kapsayan bir kimliklendirme yöntemidir. Bu yöntem DNA dizilerini insanlar için denenmiş ve kanser araştırmaları genom merkezinde kullanılmıştır (Moore ve ark., 2019).

1.2. Sentetik DNA

Moleküler araştırma tekniklerinin gelişmesi DNA'nın sekanslanması ve sentezlenmesi ile biyolojik sistemlerin anlaşılması ve tasarlanmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır. Bu ilerlemeler ile biyolojik sistemlerin ve hatta tüm organizmaların manipülasyonuna izin veren metabolik yolların tasarımı, DNA'nın tasarımı ve bir araya getirilmesi (Hugges ve Ellington, 2017), yapay moleküller oluşturabilme, rekombinant DNA teknolojisi gibi gelişmelere imkân sağlamıştır. Farklı biyolojik kaynaklardan alınan DNA moleküllerinin birleştirilmesi ile elde edilen

yeni DNA molekülüne rekombinant DNA denilmektedir (Firidin, 2010). Rekombinant DNA teknikleri ile belirli bir gen bölgesinin izolasyonu yapıp istenilen bir başka canlıya bu gen bölgesi aktarılabilir (Altıntaş ve ark., 2017).

Oligonükleotitler, DNA bazlarını (adenin, guanin, sitozin ve timin) veya RNA bazlarını (adenin, guanin, sitozin ve urasil) içeren kısa ve sentetik dizilerdir. Sentetik oligonükleotitler, genellikle kolon bazlı oligonükleotit sentezi veya mikro dizge bazlı oligonükleotit sentezi ile oluşturulabilmektedir (Hugges ve Ellington, 2017).

1.2.1. Kolon Bazlı Oligonükleotit Sentezi

Çoğunlukla sentetik oligonükleotitlerin hazırlanmasında fosforamidit kimyasal yöntemi kullanılır. Bu yöntem dört aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, genellikle bir sentez kolonu içinde bulunan katı desteğe bağlı dimetoksitritil (DMT), trikloroasetik asit ilavesiyle aktive edilir. Bu işlem bir sonraki fosforamidit monomeri ile zincir uzaması için desteğe bağlı fosforamiditi aktive eder. İkinci aşamada, dizideki bir sonraki baz, DMT korumalı bir fosforamidit formunda eklenir ve bir fosfit trialteri oluşturan dizide önceki nükleozid fosforamiditin 5-hidroksil grubuna bağlanır. Üçüncüsü, herhangi bir reaksiyona girmemiş 5-hidroksil grubu, zincir uzatma döngüsünün sonraki turlarında herhangi bir uzatılmamış diziyi eylemsiz kılmak ve böylece tamamlanmış oligonükleotit dizilerindeki silme hatalarını azaltmak için açılma ile kapatılır. Dördüncü adımda, monomerler, iyot çözeltisi ile oksidasyon yoluyla bir fosfat bağına dönüştürülür. İstenilen dizi sentezlendikten sonra, oligonükleotid katı sentez desteğinden kimyasal olarak ayrılır. Yüksek verimli bir yöntemdir fakat oligonükleotit dizinin uzunluğu arttıkça verim azalmaktadır (Hugges ve Ellington, 2017).

1.2.2. Mikroarray Bazlı Oligonükleotit Sentezi

Kolon bazlı oligonükleotit sentezinin daha ucuz maliyetli bir alternatifi olarak ortaya çıkmıştır. Bu sentezin ilk versiyonlarında, fosforamidit sentez işleminin bir modifikasyonu kullanılarak bir mikroçip yüzeyine bağlı oligonükleotitler sentezlenmiştir (Hugges ve Ellington, 2017).

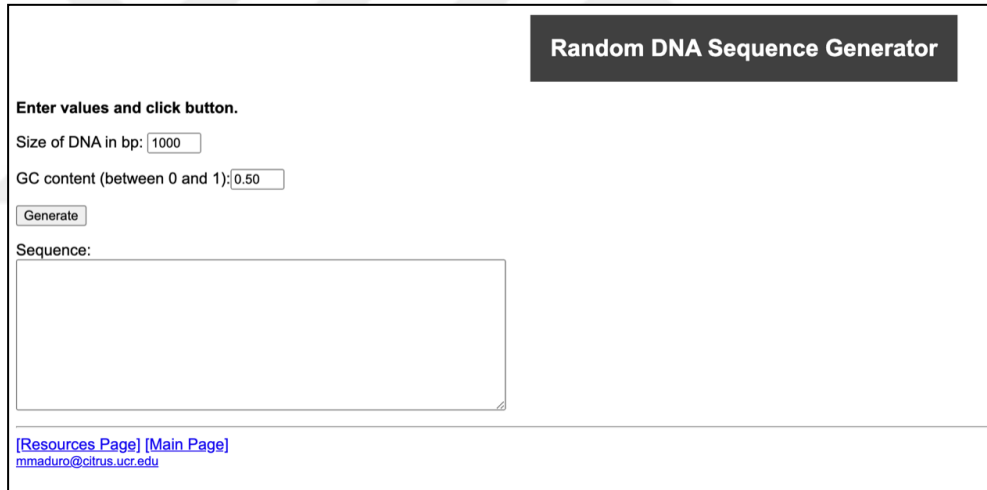
Kimyasal olarak oluşturulan, Xeno nükleik asitler yani XNA'lar doğal olarak oluşmayan nükleik asit olarak sınıflandırılan sentetik polimerlerdir. DNA'da bulunan deoksiriboz şekeri ve RNA'da bulunan riboz şekeri yerine Xeno nükleik asitler farklı şeker birimlerinden oluşabilmektedirler (Ekmekçi, 2016). Xeno nükleik asitler kendileriyle veya DNA ya da RNA ile çift sarmallı bir yapı oluşturabilmektedirler (Anasova ve ark., 2016). Xeno nükleik asitler sentetik bir şekilde oluşturulduğu için istenilen genetik bilgiyi depolayabilir, bu bilgiyi kullanabilir ve aktarabilir (Ekmekçi, 2016). Buna örnek olarak kendisini kalıp DNA olarak kullanıp kopyasını çıkartan FANA (Fluoroarabino nükleik asit) verilebilir (Pinheiro ve ark., 2012).

Hazırlanan bu tezde sığır genomunda olmayan 251 baz uzunluğunda olan DNA dizileri (DNAidCode) hizmet alım yoluyla sentetik bir DNA olarak sentezletilmiştir. Oluşturulan bu sentetik DNA fragmenti plazmit vektöre klonlanmış ve sığır türünden hayvanlardan alınan biyolojik materyallerde kimliklendirmede kullanımı araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Rastgele DNA Dizisi Üretilmesi

İstenilen, belirli baz uzunluklarında, Guanin (G) ve Sitozin (C) içeriğine sahip diziler hazırlamak için, rastgele DNA dizisi üretimine yarayan, kullanıma açık web tabanlı (Şekil 2.1) bir uygulama ile (Random DNA Sequence Generator, 2021) farklı uzunluklarda rastgele 100 adet DNA dizisi üretilmiştir. Diziler üretilirken tekrar eden bazların oranları incelenmiş ve ardından türetilen dizinin sığır genomunda eşleniği olup olmadığı araştırılmıştır.



The screenshot shows a web application titled "Random DNA Sequence Generator". It has a dark header bar with the title in white. Below the header, there is a section with the text "Enter values and click button." followed by two input fields: "Size of DNA in bp:" with a value of "1000" and "GC content (between 0 and 1):" with a value of "0.50". Below these fields is a "Generate" button. Underneath the button is a label "Sequence:" followed by a large, empty text area for the generated sequence. At the bottom of the page, there are two links: "[Resources Page]" and "[Main Page]", and an email address "mmaduro@citrus.ucr.edu".

Şekil 2.1. Açık erişim rastgele dizi tasarlama sayfası.

Diziler üretilirken DNA büyüklükleri 20-30-40-50 baz uzunluğunda sınırlandırılmış, üretilen dizinin G ve C içeriği 0,50 olarak belirlenmiştir. Her bir uzunluktan 25'er adet dizi üretilmiştir. Bu rastgele üretilen dizilere ek olarak 43-44-46 baz uzunluğunda 0,50 GC içeriğine sahip, 42-45 baz uzunluğunda 0,30 GC içeriğine sahip ve 41-47 baz uzunluğunda 0,20 GC içeriğine sahip rastgele DNA dizileri de aynı web tabanlı uygulama kullanılarak üretilmiştir.

Diziler farklı veri tabanlarında bulunan sığır referans genomlarında Temel Yerel Hizalama Aracı (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) kullanılarak incelenmiştir. BLAST, biyolojik diziler arasındaki benzerlik bölgelerini bulmaya yarayan araçtır. Bu program ile nükleotid dizilerini veri tabanlarıyla karşılaştırılarak ve karşılaştırmanın istatistiksel önemi hesaplanabilmektedir.

2.2. Rastgele Üretilen Dizilerin Genomlarda Taranmasında Yararlanılan Veri Tabanları

BLAST algoritmasının olduğu ve referans genomların yer aldığı üç ana çevirim içi veri tabanı kullanılmıştır.

2.2.1. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Bankası (National Center for Biotechnology Information, NCBI)

Birleşik Devletler Ulusal Tıp Kütüphanesi'ne (National Library of Medicine, NLM) bağlı olarak 4 Kasım 1988'de Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Bankası (National Center for Biotechnology Information, NCBI) kurulmuştur.

NCBI genom verilerini analiz etmek için matematiksel ve bilişimsel yöntemler temelli yazılım araçları geliştiren ve kullanan herkesin erişimine açık çok geniş bir veri bankasıdır. NCBI internet adresinden makale, gen, protein, nükleotid, genom gibi farklı verilere ulaşılabilir. Bu veri tabanında dizilerin karşılaştırmasında kullanılan BLAST algoritması da çevirim içi olarak yer almaktadır.

Rastgele üretilen DNA dizilerinin sığır genomunda varlığının araştırılması için NCBI veri tabanında, BLAST ve daha sonra “Nucleotide BLAST” sayfalarına gidildi. Karşılaştırılmak istenen rastgele dizi “Enter Query Sequence” kısmına yazıldı. “Choose Search Set” başlığının altında olan, “Organism” kısmında Bos taurus (taxid:9913) seçildi. BLAST algoritma parametreleri NCBI’da varsayılan olarak kullanıldı (Şekil 2.2.).

— Algorithm parameters

General Parameters

Max target sequences: 100 (Select the maximum number of aligned sequences to display ?)

Short queries: ☒ Automatically adjust parameters for short input sequences ?

Expect threshold: 0.05 ?

Word size: 28 ?

Max matches in a query range: 0 ?

Scoring Parameters

Match/Mismatch Scores: 1,-2 ?

Gap Costs: Linear ?

Filters and Masking

Filter: ☒ Low complexity regions ?
☐ Species-specific repeats for: Homo sapiens (Human) ?

Mask: ☒ Mask for lookup table only ?
☐ Mask lower case letters ?

Şekil 2.2. NCBI’da Kullanılan Parametreler.

2.2.2. Ensembl

Ensembl, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü (European Bioinformatic Institute, EBI) tarafından oluşturulmuştur. Ensembl, omurgalı genomlarının karşılaştırmalı genomik, evrimsel analizler, dizi varyasyonu ve transkripsiyon regülasyonu araştırmalarını destekleyen bir genom tarayıcısıdır. Ensembl veri tabanında genlerin anotasyonunu, çoklu hizalamaların istatistiksel hesapları ve regülatör işlev tahminleri yapılabilir. Ayrıca hastalıkların genetik ve fenotipik bilgilerinin toplandığı bir veri

tabanıdır. Ensembl'a kayıtlı tüm türler için BLAST, BLAT, BioMart ve Varyant Etki Tahmin Edici (Variant Effect Predictor, VEP) araçları kullanılabilir.

Rastgele üretilen DNA dizilerinin sığır genomunda varlığının araştırılması için Ensembl veri tabanında, “BLAT/BLAST” sayfasına gidildi. Karşılaştırılmak istenen rastgele dizi “Search against” kısmına “Cow” yazıldı ve BLASTN seçilerek varsayılan Ensembl algoritmasına göre karşılaştırma yapıldı. (Şekil 2.3.).

General options	
Maximum number of hits to report:	100
Maximum E-value for reported alignments:	10
Word size for seeding alignments:	11
Scoring options	
Match/Mismatch scores:	1,-3
Gap penalties:	Opening: 2, Extension: 2
Disallow gaps in Alignment:	☐
Filters and masking options	
Filter low complexity regions:	☒
Filter query sequences using RepeatMasker:	☒

Şekil 2.3. Ensembl'da Kullanılan Parametreler.

2.2.3. Kaliforniya Santa Cruz Üniversitesi (University of California Santa Cruz, UCSC) Genom Sağlayıcısı

Kaliforniya Santa Cruz Üniversitesi ve Uluslararası İnsan Genomu Projesi Konsorsiyumu'nun diğer üyeleri 22 Haziran 2000'de, insan genomunun ilk taslağını tamamlayarak genoma ücretsiz erişim imkânı sağlamış ve birkaç hafta sonra, 7 Temmuz 2000'de, UCSC Genom Sağlayıcısı internet adresinde yayınlanmıştır. Yıllar içinde ilgisi internet sayfası verileri görüntüleme, analiz etme ve verilerin indirilmesini sağlayacak şekilde geliştirilmiştir. Ayrıca omurgalı türler ve model organizmalara ait veriler koleksiyonda yer almaktadır. UCSC veri tabanında bulunan araçlardan Temel

Yerel Hizalama Aracı (Basic Local Alignment Tool, BLAT) uzunluğu 25 veya daha fazla bazlık DNA parçalarını %95 üstünde benzerliğe sahip dizileri hızlı bir şekilde bulmak için tasarlanmıştır. %95'ten büyük farklılık taşıyan ve kısa diziler hizalama testinde kaçırılabilir (Kent, 2002).

Rastgele üretilen DNA dizilerinin sığır genomunda varlığının araştırılması için UCSC Genom Sağlayıcı veri tabanında, “BLAT” sayfasına gidildi. Açılan sayfada genom bilgisinde “cow” ve en güncel genom versiyonu (Apr.18; ARS-UCD1.2/bos.Tau9) seçildi. Sonuçların tümünün listelenmesi için “All Results (no minimum matches)” işaretlendi (Şekil 2.4.). Rastgele üretilen DNA dizileri karşılaştırma kutucuğuna yazıldı ve BLAT başlatıldı.

BLAT Search Genome

Genome: ☐ Search all Assembly: Apr. 2018 (ARS-UCD1.2/bosTau9) Query type: BLAT's guess Sort output: query.score Output type: hyperlink

☒ All Results (no minimum matches)

Submit I'm feeling lucky Clear

Paste in a query sequence to find its location in the the genome. Multiple sequences may be searched if separated by lines starting with '>' followed by the sequence name.

Şekil 2.4. UCSC'de Kullanılan Parametreler.

2.3. Rastgele Üretilen Dizilerin Genomlarda Taranması

Rastgele olarak üretilen DNA dizileri, NCBI, Ensembl ve UCSC veri tabanlarında taranmıştır. NCBI veri tabanı için *Bos taurus* (taxid:9913), Ensembl veri tabanı ve UCSC Genom Sağlayıcısında ARS-UCD1.2/bos.Tau9 genom versiyonlarında taranmıştır. Veri tabanı taranmasında aşağıdaki parametreler kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Rastgele dizilerin veri tabanlarında taranırken kullanılan parametreler.

	NCBI	Ensembl	UCSC Genom Sağlayıcı
Sorgu türü	BLASTN	BLASTN	BLAT's guess
Sequence	Fasta	Fasta	Fasta
Database	Standart database/ Nucleotide collection	DNA Database/ Genomic sequence	Genome
Organizma adı	Bos taurus (taxid:9913)	Cow	Cow/Apr.18 (ARS-UCD1.2/bos.Tau9)
Optimize for/ Search sensitivitiy	Highly similar sequences (megablast)	Normal	All Results (no minimum matches)
Max target sequences	100	100	25 ve üzeri
Match/Mismatch Scores	1-2	1,-3	query, score
Gap Costs	Lineer	Opening:2, Extension:2	Hyperlink

Sequence: Sekans; Database: Veri tabanı; Optimize for/ Search sensitivitiy: Taramanın hassasiyeti; Max target sequences: En yüksek hedef baz içeriği; Match/Mismatch Scores: Eşleşme ve eşleşmeme puanı
Gap Costs: Eşleşmedeki boşluk oranı

2.4. Örneklem

Üretilen rastgele DNA dizilerinin kimliklendirmede kullanılacağı hayvanların örnekleme Ata Fen Veteriner Malzemeleri Hayvancılık Pazarlama Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne bağlı Ege Vet dondurulmuş sığır sperması üretim tesislerinde yapılmış ve 2019-2020 yılları arasında sperma satışı en fazla olan hayvanlar seçilmiştir (n=5). Hayvanların kulak küpe numaraları kaydedilmiş, fotoğrafları çekilmiş, burun izi örnekleri alınmış ve *V. Jugularis*'ten steril iğnelerle girilerek K₃EDTA'lı tüplere 9ml kan toplanmıştır. Bu işlem için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (06/01/2021 tarihli, 2021-1-1 numaralı karar) (Ek-1).

2.5. Temel Kimlik Bilgilerinin DNA Dizi Formatına Çevrilmesi

Bilgilerin DNA dizisi formatına çevrilmesi için bir harf ve karakterleri içeren bir çeviri tablosu gerekmektedir. Temel kimlik bilgilerinin DNA dizisi formatına çevirmek için çevirim içi kullanıma açık olan bir sayfadan yararlanılmıştır (Simple DNA Writer, 2021). Sığır türü için temel kimlik bilgileri kulak küpe numarası, cinsiyet, ırk, konum bilgisi olarak belirlenmiştir. Bu bilgiler “Simple DNA Writer” çeviri tablosu (Çizelge 2.2.) kullanılarak ilgili bilgileri içeren karakterler DNA dizisi formuna dönüştürülmüştür.

Çizelge 2.2. Temel kimlik bilgileri çevirisinde kullanılan DNA kodları.

Karakter	Kod	Karakter	Kod	Karakter	Kod
0	ATA	C	TCA	Q	TAT
1	TCT	D	TAC	R	CAC
2	GCG	E	CTA	S	TGA
3	GTG	F	GCT	T	TAG
4	AGA	G	GTC	U	GAT
5	CGC	H	CGT	V	GTA
6	ATT	I	CTG	W	ATG
7	ACC	J	TGC	X	AGT
8	AGG	K	TCG	Y	GAC
9	CAA	L	ATC	Z	GCA
Start	TTG	M	ACA		AGC
Stop	TAA	N	CTC	.	ACG
A	ACT	O	TGT		
B	CAT	P	GAG		

2.6. DNAidCode

Bireye ait cinsiyet, ırk, tür, konum gibi temel bilgilerini içeren DNA baz dizisi formatında olan özgün sentetik DNA dizilerine DNAidCode ismi verilmektedir

(Bilgen, Patent başvuru no:2020/07204). Tek zincirli özgün oligonükleotitlerden oluşacak DNAidCode’larda her bir sığır için ileri (forward) primer, kulak küpe numarası, DNAidCodeCattleSPS, cinsiyet, ırk bilgisi, koordinat bilgisi, enzim kesim bölgesi, rastgele olarak üretilen sığır genomunda olmayan 40 bazlı DNA dizisi ve ileri (reverse) primer bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölgelerden kulak küpe numarası, cinsiyet, ırk bilgisi ve koordinat bilgisi Çizelge 2.2.’de verilen “Simple DNA Writer” karakter kodlarına göre türetilmiştir. Bölgelerin özellikleri Çizelge 2.3.’de açıklanmıştır örnek diziler Ek3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3. DNAidCode içindeki bölgeler ve dizilerin özellikleri.

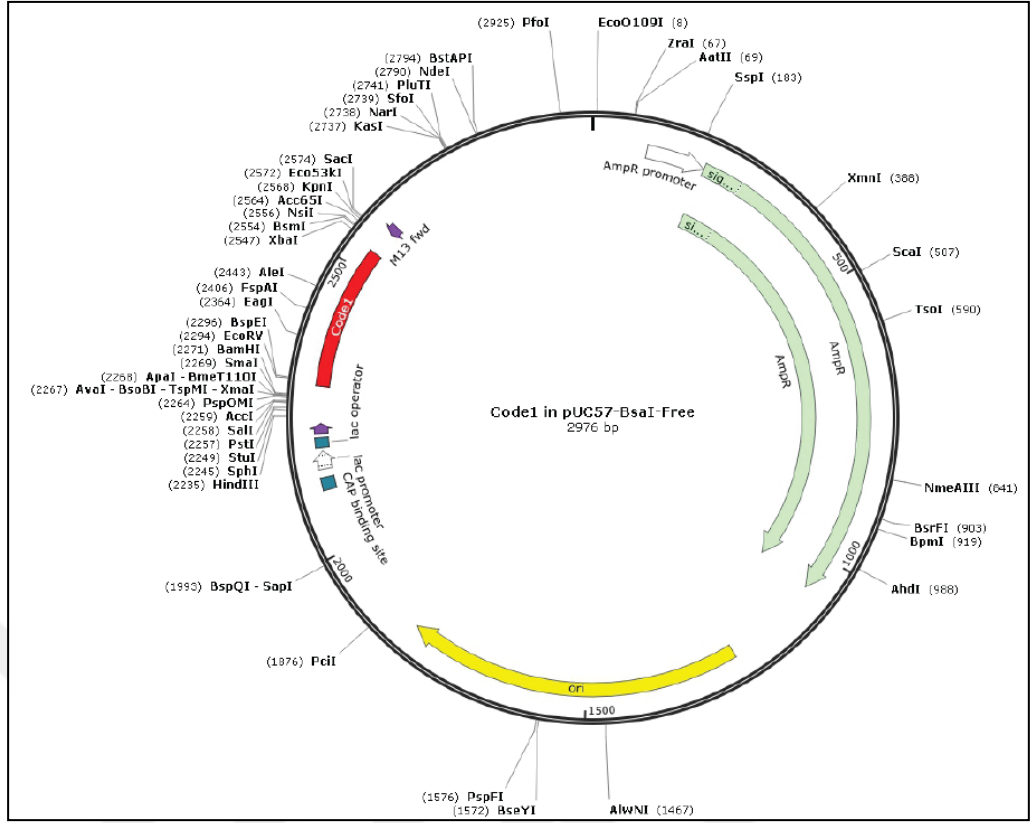
Bölge no	Bölge adı	Özelligi
1	İleri yönlü primer	PZR ve sekans analizlerinde kullanılabilir, sisteme özgü ve tüm dizilerde yer alacak 21 baz uzunlukta sığır genomunda olmayan primer dizileri
2	Kulak küpe numarası	Kulak küpe numarasının simple DNA write ile DNA dizisine dönüştürülmüş formatı
3	Enzim kesim bölgesi	Karakter bilgileri gibi bilgilerin eklenebilmesi için küt ya da açık uç oluşturacak enzim kesiminde kullanılacak 6 baz uzunluğunda olan bir dizi
4	Cinsiyet	Dişi cinsiyet için Female’nin F ‘si, erkek cinsiyet için Male’nin M’si simple DNA write ile DNA dizisine dönüştürülmüş 3 baz uzunluğunda dizi
5	Koordinat	Koordinat bilgisinin simple DNA write ile DNA dizisine dönüştürülmüş şekli (enlem ve boylam sırasıyla verilecektir).
6	İrk	İrk isiminin ilk üç harfinin (Holstein için HOL, Simmental için SİM) simple DNA write ile DNA dizisine dönüştürülmüş 9 baz uzunluğundaki dizi
7	Geri yönlü primer	PZR ve sekans analizlerinde kullanılabilir, sisteme özgü ve tüm dizilerde yer alacak dizilerde yer alacak sığır genomunda olmayan primer dizileri 21 baz uzunlukta primer dizileri
8	DNAidCode	DNAidCode kelimesinin simple DNA write ile DNA dizisine dönüştürülmüş 27 baz uzunluğundaki dizi
9	DNAcode	Sığır genomunda olmayan 40 baz uzunluğundaki dizi
10	DNAidCodeCattleSPS	Sığır genomunda olmayan 40 baz uzunluğundaki dizi

2.7. Plazmite DNA Dizilerinin Kodlanması

Bir genin klonlanmasında bakteriler, plazmitler, mayalar vektör olarak kullanılabilir (Brown, 1990). Plazmitler, konak hücreden bağımsız bir şekilde çoğalabilen küçük, halkasal yapıli kromozom dışında bulunan DNA'larıdır (Brown, 1990 ve Sambrook, 1989). Klonlamanın temeli organizma genomundan elde edilen DNA parçasının vektöre yerleştirilmesidir (Kuk ve Erensoy, 2008). Bu şekilde oluşan moleküle rekombinant DNA denilmektedir.

DNA'yı spesifik yerlerden kesen enzimlere restriksiyon enzimleri denir. Bu enzimler DNA'nın manipölasyonları için çok önemlidir. Restriksiyon enzimleriyle kesilen gen, plazmitle DNA ligaz enzimiyle belirli sıcaklık ve reaksiyonlar ile birleştirilmektedir. Bu sıcaklık ve reaksiyon kullanılan materyalin üretildiğı firmalara göre değışkenlik göstermektedir (Kuk ve Erensoy, 2008).

Oluşturulan 251 baz uzunluğuna sahip diziler ticari olarak gen sentezi yapan bir firmada sentezletilmiş (Gene Universal, ABD), çift sarmallı DNA fragmenti haline getirilmiştir. DNA fragmentleri pUC57-BsaI-Free plazmit vektöre (Şekil 2.5.) firma tarafından klonlanmıştır. Kullanılan plazmit vektör 2976 baz çifti uzunluğunda olup plazmiti oluşturan bütün dizi bilinmektedir. Plazmitler liyofilize şekilde teslim edilmiştir.



Şekil.2.5. Code1'i içeren pUC57 plazmit vektör.

2.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Moleküler araştırmalarda sıklıkla kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PZR) nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltma işlemi olarak tanımlanabilir (Yıldırım ve ark., 2011). PZR, yüksek ısı ile iki zincir arasındaki bağların açılmasıyla oluşan denatürasyon, çoğaltılmak istenilen bölgeye özgül sentetik olarak üretilen oligonükleotitlerin kalıp DNA'ya bağlanması ve deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler) ile uzamayla bu üç aşamaların belirli sayıda tekrarlanan döngülerinden meydana gelmektedir. PZR'de kullanılan ana bileşenler; kalıp DNA, oligonükleotitler (ileri ve geri yönlü primerler), dNTP, taq DNA polimeraz enzimi, tampon çözelti (10XBuffer) ve magnezyum klorürdür ($MgCl_2$). DNAidCode dizileri

içinde yer alan ileri ve geri yönlü oligonükleotitler kullanılarak optimizasyon PZR'ı kurulmuştur.

2.8.1. Primerlerin Sulandırılması ve Kullanım Primerleri Hazırlanması

DNAidCode dizilere spesifik olarak üretilen ileri primer ve geri primer kullanmak için üretici firmanın önerileri doğrultusunda sulandırıldı. İleri primere 388 µl ddH₂O, geri primere 548 µl ddH₂O eklenerek 100 pikomol/µl son hacim elde edildi ve primerler -20 °C'ye kaldırıldı.

Bir gece -20 °C'de bekleyen primerlerden kullanım primerleri hazırlandı. Başlangıç hacmi 100 pikomol/µl olan stoktan 10 pikomol/µl olacak şekilde, 5 µl primer ile 45 µl ddH₂O kullanılarak 50 µl son hacimde kullanım primerleri hazırlandı.

2.9. Plazmitlerin Sulandırılması

TR171172835, TR171172847, TR353200163, TR451518010 ve TR451563243 küpe numaralı hayvanlar için hazırlanmış DNAidCode, forward primer, DNAidCodeCattleSPS, kulak küpe numarası, cinsiyet, ırk bilgisi, koordinat bilgisi, enzim kesim bölgesi, DNACode, reverse primeri içeren liyofilize plazmit vektörler kullanılmak için sulandırıldı. Bunun için;

- Kapakta plazmit kalmış olabileceği için plazmit liyofilize haldeyken 1-2 saniye short spin (kısa dönüş) santrifüj yapıldı.

- 50 µl DNase ve RNase olmayan su (DEPC treated water) plazmit içeren tüplere eklendi.
- Vortex (merkez çevresinde dönme) ve short spin yapıldı.
- 100 ng/µl lik son konsantrasyon elde edilmiş olup, %1'lik agaroz jelde görüntülendi ve -20 °C'ye daha sonra kullanılmak üzere kaldırıldı.

2.10. Plazmitlerin Bakterilere Klonlanması

Rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine sokulmasına transformasyon denilmektedir. Bu işlem kimyasal yollarla veya elektroporasyon metodu ile gerçekleştirilebilir (Kuk ve Erensoy, 2008). Rekombinant DNA molekülünün bakteriyel hücrelere transformasyonu ile bakterilerin bölünmesiyle klon kopyalar oluşur. Klonlanmanın varlığı transforme olan hücrelerden saflaştırma işlemi ile teyit edilmektedir (Sambrook, 1989).

2.11. Kompetan Hücre Yapımı ve Transformasyon

Sentezlenen plazmitleri çoğaltmak için kompetan hücre (Abm, Amerika) kullanılarak DNAidCode içeren plazmitler aktarıldı.

- -80 °C'den alınan alınan kompetan hücreler buz dolu bir köpüğün içinde erimeye bırakıldı.
- Önceden sulandırılmış 100 ng/µl DNAidCode1, 100 ng/µl DNAidCode2, 100 ng/µl DNAidCode3, 100 ng/µl DNAidCode4, 100 ng/µl DNAidCode5 için eppendorf tüp hazırlandı.

- 100 ng/μl DNAidCode1, 100 ng/μl DNAidCode2, 100 ng/μl DNAidCode3, 100 ng/μl DNAidCode4, 100 ng/μl DNAidCode5 -20 °C'den çıkarılıp buz üstüne konuldu.
- Kompetan hücreden 60 μl her tüpe koyuldu.
- 100 ng/μl'lik code'lardan 1 μl çekip kompetan hücrenin olduğu tüpe koyuldu.
- 100 ng/μl DNAidCode1, 100 ng/μl DNAidCode2, 100 ng/μl DNAidCode3, 100 ng/μl DNAidCode4, 100 ng/μl DNAidCode5 -20 °C'ye ve hazırlanan örnek (60 μl kompetan hücre ve DNAidCode içeren 1 μl plazmit) +4 °C 'ye kaldırıldı.
- 30 dakika için zamanlayıcı açıldı. İnkübatör 42 °C'ye ayarlandı.
- 30 dakika bitince DNAidCode1, DNAidCode2, DNAidCode3, DNAidCode4, DNAidCode5 45 saniye için inkübatöre alındı.
- İnkübatörden alınıp 2 dakika süre buzda bekletildi. Böylelikle (ısı şoku ile) kompetan hücrenin porları açıldı ve plazmitleri alması sağlandı.
- 150 μl LB sıvı besi yeri her tüpe eklendi. Örnekler buzdan alındı.
- Örnekler 210 rpm'de 1 saat 37 °C'de sallamalı inkübatöre yerleştirildi.
- 1 saat sonunda nutrient (besin) katı besi yerine plastik öze ile code'ların ekimi yapıldı (ateş varlığında).
- 37 °C'de etüvde 1 gece bekletildi.

1 gece beklemenin sonucunda kompetan hücreler katı besi yerinde çoğaldı.

2.11.1. Kompetan Hücrelerin Ampisilin İçeren Sıvı Besi Yerine Ekimi

Kompetan hücrelerin seçilebilmesi için ampisilin içeren sıvı besi yerine ekimi yapıldı. Normal bakteride ampisilin direnç geni olmadığı için transforme bakterilerin üremesine imkân sağlandı.

- Katı nutrient besi yerinden plastik öze ile kompetan hücreler alınarak ampisilin içeren sıvı besi yerine ekildi. Her code için 2 tane ampisilin içeren sıvı besi yeri kullanıldı.
- 100 rpm’de sallamalı inkübatöre 24 saat için 37 °C’ye bırakıldı.

LB ampisilinli sıvı besi yerine ekim yapılan plazmit içeren kompetan hücrelerden code’ları içeren plazmitlerin izolasyonu için P₁, P₂, P₃ solüsyonları kullanıldı. Kuruyan ependorf içindeki örnekler için 50 µl elution buffer ile çözüldü.

2.12. PZR Kurulması

PZR optimizasyonu için kullanılan kimyasalların oranları Çizelge 2.4.’de verilmiştir.

Çizelge 2.4. DNAidCode dizileri PZR birleşenleri oranları.

PZR Bileşeni	Miktar
ddH ₂ O	13,3 µl
10xB	2,5 µl
MgCl ₂	5 µl
dNTP	0,5 µl
ileri primer	0,5 µl
geri primer	0,5 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
Kalıp DNA (DNAidCode1, DNAidCode2, DNAidCode3, DNAidCode4, DNAidCode5)	2,5 µl
Son hacim	25 µl

Malzemeler -20 °C’den alınıp kapalı kabin içine konuldu. PZR tüplerine DNAidCode1, DNAidCode2, DNAidCode3, DNAidCode4, DNAidCode5’i ayrı ayrı içeren plazmit vektörlerden 2,5 µl sırasıyla tüplere konuldu. Plazmit vektörler tekrar hızlı bir şekilde -20 °C’ye kaldırıldı.

Verilen oranlara göre yüksek hacimde olandan başlanarak master mix (ana karışım) hazırlandı. Bileşenler karışıma eklenmeden önce vortex ve short spin santrifüj yapıldı. Kullanılan malzemeler işlem tamamlandıktan sonra -20 °C'ye kaldırıldı.

PZR tüpleri her kuyucuğa farklı sıcaklık uygulayabilen gradient PZR (Biorad C100), cihazda primerlerin TM değerlerine göre 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C ve 60 °C sıcaklıklara yerleştirildi (Çizelge 2.5.).

Çizelge 2.5. DNAidCode dizileri PZR optimizasyonu için kullanılan için uygulanan ısı döngü sıcaklıkları ve süreleri.

Sıcaklık	Süre	
94 °C	1 dk	
94 °C	30 sn	
55-60 °C	30 sn	X40
72 °C	30 sn	
72 °C	5 dk	

2.13. DNA İzolasyonu

DNA molekülüne zarar vermeden çeşitli yöntemler kullanılarak makro moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması (Güler ve ark., 2018) işlemine DNA izolasyonu denir. DNA izolasyonu yapmak için çokça yöntem ve ticari kitler geliştirilmiştir (Asghar ve ark., 2015 ve Wingfield ve Klein, 2012). Kullanılan kit veya yöntem elde edilen DNA'nın kalitesini etkilediği için kullanılan (Güler ve ark., 2018) yöntem veya kit doğru ve çalışmanın amacına uygun bir şekilde seçilmelidir. Bu tez çalışmasında da kandan Plazmit DNA'yı ve genomik DNA'yı aynı anda izole edebilmek için ticari bir nükleik asit ekstraksiyon kiti (Vivantis, lot: 40149-20) ve fenol, kloroform, izoamil alkol (FKİ, 24:23:1) olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır, yöntemlerin başarısı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

DNA izolasyonu için kullanılan nükleik asit ekstraksiyon kitinin (Vivantis, lot: 40149-20) protokolüne göre aşağıdaki adımlar izlenmiştir.

- 200 µl buffer BB ile 200 µl sıgır kan örneğine eklenerek, vortex ve short spin santrifüj yapıldı.
- 20 µl Proteinaz K eklenip, vortex ve short spin santrifüj yapıldı.
- Çalkalamalı inkübatörde 65 °C' de 10 dakika inkübe edildi.
- Toplam hacim eppendorftan alınıp kolonlu tüplere aktarıldı. 5000 g (rcf) 'de +4 °C' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon çıkarılıp altta kalan sıvı boşaltıldı.
- 200 µl %100 etanol (-20 °C' de) eklendi. 5000 g (rcf) 'de +4 °C' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolon çıkarılıp altta kalan sıvı boşaltıldı.
- 500 µl wash buffer1 kolonlara eklendi. 6000 g (rcf)' de +4 °C' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Dipte kalan sıvı kısım boşaltıldı.
- 500 µl wash buffer2 kolonlara eklendi. 6000 g (rcf)' de +4 °C' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Dipte kalan sıvı kısım boşaltıldı.
- 500 µl wash buffer2 kolonlara eklendi. 14000 g (rcf)' de +4 °C' de 3 dakika santrifüj yapıldı. Dipte kalan sıvı kısım boşaltıldı. Ağzı açık bir şekilde kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan kolonlar yeni eppendorflara alındı.
- 100 µl elution buffer (65 °C' de) kolonların üstüne eklendi. 2 dakika beklenildi.
- 5000 g (rcf)' de +4 °C' de 1 dakika santrifüj yapıldı.
- Kolonlar atıldı. DNA kolondan eppendorf tüpe geçti.

Kandan genomik DNA'yı izole edebilmek için kullanılan bir diğer yöntem olan fenol, kloroform, izoamil alkol (FKİ, 24:23:1) yöntemi için Çizelge 2.6.'daki kimyasallar kullanılmıştır.

Çizelge 2.6. Fenol-kloroform-izoamil alkol (FKİ) yönteminde kullanılan kimyasallar.

Kullanılan kimyasallar
Salt/EDTA: 75mM NaCl, 25 mM EDTA 25:24:1 oranında 15 ml fenol, kloroform, izoamil alkol (FKİ): 7,5 ml fenol (pH 8), 7,2 ml kloroform, 0,3 ml izoamil alkol 24:1 oranında 15 ml kloroform, izoamil alkol (Kİ): 14,4 ml kloroform, 0,6 ml izoamil alkol 2X lizis buffer Proteinaz K %10 SDS solüsyonu Etil alkol (%70' lik ve -20 °C'den alınmalıdır)

FKİ yönteminde kullanılan protokol;

- Örneklerin bulunduğu falkon tüplere 160 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0) eklendi.
- 2X lizis buffer ile 15 µl'ye tamamlandı. Tüpler nazikçe alt üst edilerek iyice karıştırıldı.
- Tüpler 30 dakika buzda bekletildi.
- Tüpler 10 dakika 3000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak kalan pelete 1ml salt/EDTA eklendi.
- 100 µl %10 SDS solusyonu ve 50 µl proteinaz K eklendi. Örnekler 55 °C'de 3 saat etüvde bekletildi.
- Etüvde bekletilme sonunda 1 ml fenol (pH 8,0) her tüpe eklendi. Tüpler 20 saniye sert bir şekilde çalkalanıp, 5 dakika da yumuşak bir şekilde karıştırıcıda ters yüz edildi.
- Tüpler 10 dakika 3000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant kısım isimlendirilen doğru tüplere alındı. Üzerine 1 ml FKİ karışımından her tüpe eklendi.
- Tüpler 5 dakika 3000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant kısım isimlendirilen doğru eppendorflara alındı. Hacmin iki katı -20 °C'de etanol eklendi. Bir gece beklemeye bırakıldı.
- 1 gece -20 °C de etil alkol içinde bekletilen DNA, ertesi gün 5 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi.
- Alkol dikkatlice döküldü, kalan alkol pipetle alınarak atıldı. DNA ağzı açık olarak 1 saat laminair flowda (kabin) kurutulmaya bırakıldı.

- 50 µl ddH₂O ile sulandırıldı.

2.14. Plazmit ve Biyolojik Materyallerin Karışım Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

DNAidCode'u içeren plazmit vektörlerin biyolojik materyallerden genomik DNA ile izole edilebilmesi, plazmidin biyolojik materyaller içindeki stabilizasyonunun ölçülmesi için farklı konsantrasyonlarda plazmit vektörler ile sığır kan örnekleri karıştırıldı. Bunun için 10 ng/µl, 25 ng/µl, 50 ng/µl olmak üzere plazmit vektörler hazırlandı ve 100 µl sığır kanı ile karıştırıldı.

Ayrıca DNA/plazmit oranının ve DNA materyali ile plazmit stabilitesinin belirlenmesi amacıyla üç farklı konsantrasyonda hazırlanan plazmitlerin her biri 50 ng/µl oranında sığır DNA'sı ile karıştırılarak saklandı.

2.15. Plazmit İzolasyonu

Plazmit ve kan içeren karışımlardan plazmit edlesi için ticarileşme aşamasında olan bir kit kullanılmıştır (P₁, P₂, P₃; Diagen, Türkiye). P₁, P₂, P₃ içeriği ve kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir;

- P₁ solüsyonu; 61 gr. Tris, 3,7 gr. EDTA-2H₂O, pH 8,0 w/HCl/1 litre, 100 ng/ml RNase'a gerektiğinde genellikle 100 ml'ye 10 mg RNase eklenebilir.
- P₂ solüsyonu; 8,0 gr. Sodyum hidroksit (NaOH) 900 ml H₂O'nun içinde çözdürülür, 100 ml %10'luk SDS eklenerek hacim 1 litreye tamamlanır.

•P₃ solüsyonu; 294 gr. Asetat, 500 ml H₂O, pH 5,5'e asetik asit ile (yaklaşık 110 ml) ayarlanır, toplam hacim 1 litreye tamamlanır.

•700 µl İzopropanol (%100' lük).

•100 µl Etanol (%70' lik ve -20 °C'den alınmalıdır).

Plazmit izolasyonu için;

- 200 µl örneğe 250 µl P₁ pipetleme yaparak eklendi.
- 250 µl P₂ eklenip, ependorflar 4-6 kez alt üst edildi. 5 dakika bekletildi.
- 350 µl P₃ eklenip, ependorflar 4-6 kez alt üst edildi.
- 16000 g (rcf)' de 10 dakika +4 °C' de santrifüj yapıldı. Santrifüj devam ederken 700 µl izopropanol boş bir ependorf ile buz içine konuldu.
- Santrifüjden çıkan örneklerin sıvı kısmından 700 µl çekip izopropanol olaran ependorflara eklendi. 15 dakika beklenildi.
- 16000 g (rcf)' de 10 dakika +4 °C' de santrifüj yapıldı.
- Sıvı kısım boşaltıldı. Ağız açık şekilde kurumaya bırakıldı.
- 50 µl ddH₂O ile sulandırıldı.

2.16. Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleme

Tris Borik asit EDTA (TBE) hazırlanması: 5 kat yoğunlukta TBE için; 54 gr. Tris (Amresco, lot:2349B102, Amerika), 27,5 gr. Borik asit (Fisher BioReagents, lot:107964, Birleşik Krallık) ölçülüp cam şişeye koyuldu. Üstüne 800 ml distile su eklendi. İçine balık atılıp manyetik çeviricide birleşenler çözünene kadar yaklaşık 30 dakika beklendi. Çözünme tamamlanınca 20 ml EDTA (Vivantis lot:SH2008227) eklenip çalkalandı. Manyetik çeviricide 30 dakika daha çözünmesi için beklendi.

Toplamda 1 litrelik 5X TBE hazırlandı. 5X TBE ‘den 1X yoğunlukta TBE yapmak için;

$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ ’e göre 5 X TBE ‘den 200 ml alınıp üstüne distile su eklenerek 1 litreye tamamlandı.

%1 yoğunlukta Agaroz Jel için; 1 gr. Agaroz (Biomax, EU) ölçülüp şişeye konuldu, 100 ml 1X TBE eklenip, ağzı kapatıldı ve mikrodalgada ara ara kaldırmadan çevirerek agarozun çözünmesi sağlandı. Agaroz eriyince 5 µl safeview (jel boyası) (Abm, lot: RG81554501, Amerika) boya eklendi, hafifçe çevrilerek boya dağıtıldı. Jel yavaşça baloncuk kalmadan kasete döküldü. Taraklar yerleştirilerek jelin katılaşması beklendi. Jel katılaştınca taraklar jele zarar vermeden çıkarıldı. Jel kaset ile cihaza yerleştirildi. Üstüne 1X TBE eklenerek jelin tamamının bu sıvı içinde kalması sağlandı.

Bu tez çalışması kapsamında Plazmit bütünlüğünün kontrolü, yapılan DNA izolasyonu, PZR ve plazmit izolasyon sonuçlarını görüntülemek amacıyla %1 ve %2’lik agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme yapıldı.

Plazmit görüntüleme için 10 ng/µl, 25 ng/µl, 50 ng/µl sulandırılmış plazmitlerin her birinden 2 µl bioline boya ile pipetleme yapılarak %1’lik agaroz jele sırasıyla kuyucuklara taşmayacak şekilde yüklendi, 1kb DNA merdiveni kullanıldı 100V elektrik akımı altında yürütüldü.

DNA izolasyon sonuçlarından 2 µl örnek 2 µl bioline boya ile pipetleme yapılarak %1’lik agaroz jele sırasıyla kuyucuklara taşmayacak şekilde yüklendi, 1kb DNA merdiveni kullanıldı, 100V elektrik akımı altında yürütüldü.

PZR sonuçlarından 4 µl örnek 2 µl bioline boya ile pipetleme yapılarak sırasıyla %2'lik agaroz jele kuyucuklara taşmayacak şekilde yüklendi, 100bp DNA merdiveni kullanıldı 120V elektrik akımı altında yürütüldü.

Plazmit izolasyon sonuçlarından 3 µl örnek 2 µl bioline boya ile pipetleme yapılarak sırasıyla %2'lik agaroz jele kuyucuklara taşmayacak şekilde yüklendi. 1kb DNA merdiveni kullanıldı 100V elektrik akımı altında yürütüldü.

Elektroforez işlemini takiben Ultra Viole (Kodak Gel Logic 200) ışık altında görüntülendi.



3. BULGULAR

3.1. Rastgele DNA Dizileri

Diziler 0,50 G ve C oranına sahip olacak şekilde 20-30-40-50 baz uzunluğunda her birinden 25 adet olacak şekilde hazırlandı. Otuz bazlı diziler grubunda bir adet 33 bazlık dizi de türetildi. Ayrıca bu dizilere ek olarak farklı G ve C oranına sahip 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 bazdan oluşan 5'er tane dizi hazırlandı (Çizelge 3.1). Toplamda 135 adet rastgele DNA dizisi hazırlandı (Ek-2).

Çizelge 3.1. Farklı uzunlukta ve 0,50 GC oranına sahip örnek rastgele diziler.

Uzunluk	Rastgele Dizi
20	GCGCAGGCTTGGGTCGAGAT
20	AAAATCTCCAGTGCCCAAGA
30	TTAACTGTTGATTGGTAGCACAAAAGTAAT
30	ATGGTCCTTGAAATTCGGCTCAGTTAGTTC
40	TCCATTACGGTCAGTGGGTCACAGCTAGTTGTGGATTGGA
40	AAATGTGGCTTCGCCTTTGCCACGCACCTGATCGCTCCT
50	GTCGGCGTCCCTTGGGTATTTTACGCTAGCATCAGGTAGGCTAGCATGTA
50	TCTTTCCTCCCAGGGGTATGCGGGTGCGTGGACAAATGAGCAGCAAACGT

3.2. Rastgele DNA Dizilerinin Veri Tabanlarında Karşılaştırılması

3.2.1. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Bankası (National Center for Biotechnology Information, NCBI) Kullanılarak Karşılaştırma

Kırk bazdan uzun olarak hazırlanan ve GC içeriği de 0,20-0,50 arasına çekilen dizilerde NCBI veri tabanında hiçbir eşleşme bulunamadı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Rastgele DNA dizilerinin NCBI Bos taurus (taxid:9913) BLAST sonuçları.

Uzunluk	GC içeriği	Eşleşme
20	0,50	Var
30	0,50	Var
40	0,50	Yok
42-50	0,20-0,30	Yok

3.2.2. Ensembl Kullanılarak Karşılaştırma

Uzunluklarına göre gruplandırılan diziler ve Ensembl veri tabanı eşleşme bulguları Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Rastgele DNA dizilerinin Ensembl BLAST sonuçları.

Uzunluk	GC içeriği	Eşleşme Var / Yok
20	0,5	24 / 1
30	0,5	21 / 4
40	0,5	19 / 6
50	0,5	22 / 3
43	0,5	4 / 1
44	0,5	3 / 2
46	0,5	5 / 0
42	0,3	5 / 0

3.2.3. Kaliforniya Santa Cruz Üniversitesi (University of California Santa Cruz, UCSC) Genom Sağlayıcısı Kullanılarak Karşılaştırma

Uzunluklarına göre gruplandırılan diziler ve UCSC veri tabanı eşleşme bulguları Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Rastgele DNA dizilerinin UCSC BLAT sonuçları.

Uzunluk	GC içeriği	Eşleşme Var / Yok
20	0,5	6 / 19
30	0,5	14 / 11
40	0,5	17 / 8
50	0,5	15 / 10
43	0,5	4 / 1
44	0,5	3 / 2
46	0,5	5 / 0
42	0,3	5 / 0
45	0,3	5 / 0
47	0,2	5 / 0
41	0,2	5 / 0

3.3. Karşılaştırma Sonucunda Sığır Genomunda Eşleşme Olmayan Diziler

Toplamda üretilen 135 tane rastgele DNA dizisi NCBI, Ensembl ve UCSC veri tabanlarında da sığır genomu verileri ile karşılaştırıldı. Bunun sonucunda 13 tane dizinin kullanılan üç veri tabanında da ortak olarak sığır genomunda karşılığı bulunmadığı belirlendi (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. Sığır genomu ile eşleşmeyen rastgele diziler.

30 BAZLI DİZİLER/33 BAZLI DİZİ GC:0,5
AAACATTCTCGACAATCAATCGAGCGAGTCGAT
40 BAZLI DİZİLER GC:0,5
TTGCCATTCTCCGAGTGTATTACCGTGACGGCCGCACGGG
TCAGGCCACATCGCTTCCTAGTTCCGCTGGGATCCATCGT
AGTTTATCCCTCGAAACTATAGACGTACAGGTCGAAATCT
GACTCCGGGAAGGGGTTTCGCAAGTCGCACCCTAAACGATG
ACCTACCCGTCACCGGCCAACAATGTGCGGATGGCGCCAC
ATCAGCTAACGTAACAGTTAGAGGCTCGCTAAATCGCACT
43 BAZLI DİZİLER GC:0,5
GCCTCTGGTTCATCCCGTGGGATATCAAGCTTCGTCTTGATAA
44 BAZLI DİZİLER GC:0,5
GAGCTAGCGAGTCAGCGAAAAGCATGACGCGCTTTCAAGCGTGG
50 BAZLI DİZİLER GC:0,5
GCCTGCATAAGGAGACCGGTGTAGCCAAGGACGAAGGCGACCCTAGGTTC
TCGTGGCGACGCTCGGATTACACGGCAAAGGTGCTTGTGTTCCGACAGGC
CAACAATAGGACGTAGCCTTGTAGTTAGTACGTAGCCTGGTCGCATAAGT

Üretilen bu rastgele diziler DNAidCode'ların bireye özgü kodunu oluşturacak aday diziler olarak saklandı.

3.4. Örnekleme ait bilgilerin DNA dizisine dönüştürülmesi

Örneklemin yapıldığı Ata Fen Veteriner Malzemeleri Hayvancılık Pazarlama Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'ne bağlı Ege Vet dondurulmuş sığır sperması üretim tesislerinden alınan hayvanların kulak küpe numarası simple DNA writer kullanılarak (Şekil 3.1) DNA baz formatına çevrimi yapılmıştır. DNA dizisine dönüştürülen kulak küpe numaraları Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

DNA Writer

Translate words into a sequence of DNA bases and convert them back again.

Translate text to base sequence

Enter text to translate: or

Include non-coding DNA: ☐

Show Color Sequence: ☐ ()

Output:

Translate base sequence to text

Enter Sequence:

Show Color Sequence: ☐

Output:

Şekil 3.1. Simple DNA Writer sitesi.

Çizelge 3.6. Kulak küpe numaraların DNA baz formatına çevrimi.

İrk bilgisi	Kulak Küpe Numarası	Örnek adı	Kulak Küpelerinin DNA çevrimi
Holstein	TR171172835	Uluova Erol	TAGCACTCTACCTCTTCTACCGCGAGGGTGCGC
Holstein	TR171172847	İhsan Uluova	TAGCACTCTACCTCTTCTACCGCGAGGAGAACC
Simental	TR353200163	Raichle Murat	TAGCACGTGCGCGTGGCGATAATATCTATTGTG
Simental	TR451518010	Francis Fatih	TAGCACAGACGCTCTCGCTCTAGGATATCTATA
Simental	TR451563243	İtala Aslan	TAGCACAGACGCTCTCGCATTGTGGCGAGAGTG

3.5. DNAidCode'ların Oluşturulması

Örneklemede kullanılan sığırları temsil eden sığırlara DNAidCode oluşturmak için; koordinat bilgisi için '3826NORTH2709WEST' konumu, ırk bilgisi için Holstein'in ilk üç hafi olan HOL veya Simmental'in ilk üç harfi olan SIM, cinsiyet için erkeği temsil eden (male) M, DNAidCode kelimesi ve kulak küpe numaraları simple DNA writer ile DNA dizi şekline dönüştürüldü. Bu bilgilere veri tabanlarında bulunan canlıların genomlarıyla homoloji göstermeyen DNAidCode dizileri için özel olarak üretilen ileri ve geri primerler, sığır türü genom verilerinde bulunmayan türe özgün bölge (DNAidCodeCattleSPS) ve EcorI enzim kesim bölgesi eklenmiştir. Ayrıca veri tabanlarında karşılaştırılarak sığır genomunda karşılığı olmadığı bulunan 40 baz uzunluğundaki DNACode dizileri her bir sığıra özgü olacak şekilde DNAidCode dizilerine eklenerek 5 sığır örneği için spesifik kodlar oluşturulmuştur (Çizelge 3.7) (Ek-3). Kullanılan primerler, DNAidCodeCattleSPS hazırlanan tüm DNAidCode'lar için aynı olup sığır genomu içinde bir karşılığı yoktur (Çizelge 3.8). Hazırlanan bu beş dizi 251 baz uzunluğundadır, G ve C oranı 47,8 ile 53,39 arasında değişkenlik göstermektedir.

Çizelge 3.7. TR171172835 kulak küpe numaralı sığırın örnek DNAidCode bilgileri.

Forward primer (bütün DNAidCode'lar için aynı)
TAACGATATCCGGAACCTTGCG
DNAidCodeCattleSPS (bütün DNAidCode'lar için aynı)
TTGCCATTCTCCGAGTGTATTACCGTGACGGCCGCACGGG
Enzim kesim bölgesi <ECORI> (bütün DNAidCode'lar için aynı)
GAATTC
Reverse primer (bütün DNAidCode'lar için aynı)
GTTGACCTGTCGCGAAGTTGC
DNAidCode'un DNA dizi formatına çevrilmiş şekli (bütün DNAidCode'lar için aynı)
TACCTCACTCTGTACTCATGTTACCTA
Kulak küpe numarasının DNA dizi formatına çevrilmiş şekli (TR171172835 kulak küpe numaralı, code1 için)
TAGCACTCTACCTCTTCTACCGCGAGGGTGCGC
Cinsiyet (TR171172835 kulak küpe numaralı, code1 için)
ACA
İrk (TR171172835 kulak küpe numaralı, code1 için)
CGTTGTATC

Çizelge 3.7. Devam. TR171172835 kulak küpe numaralı sığırın örnek DNAidCode bilgileri.

Kordinat (TR171172835 kulak küpe numaralı, code1 için)

GTGAGGGCGATTCTCTGTCACTAGCGTGCGACCATACAAATGCTATGATAG

DNAcode (TR171172835 kulak küpe numaralı, code1 için)

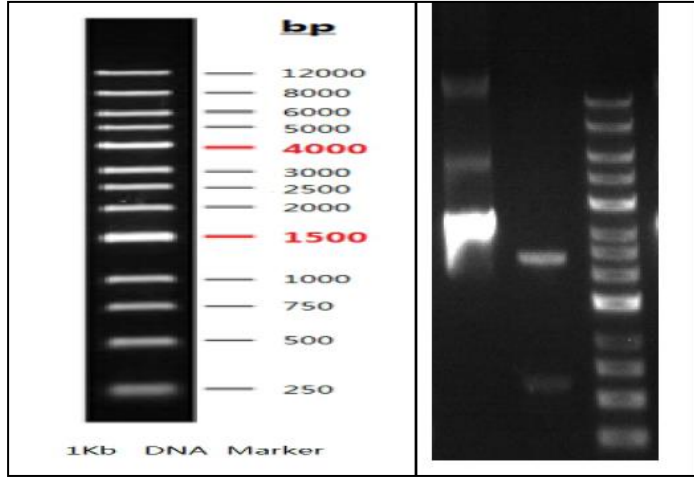
TTGCCATTCTCCGAGTGTATTACCGTGACGGCCGCACGGG

Çizelge 3.8. DNAidCode için kullanılan sığır genomunda olmayan diziler (DNAcode).

	Kulak küpe numarası	DNAidCode
Code1	TR171172835	TTGCCATTCTCCGAGTGTATTACCGTGACGGCCGCACGGG
Code2	TR171172847	TCAGGCCACATCGCTTCCTAGTTCCGCTGGGATCCATCGT
Code3	TR353200163	AGTTTATCCCTCGAAACTATAGACGTACAGGTCGAAATCT
Code4	TR451518010	GACTCCGGGAAGGGGTTCGCAAGTCGCACCCTAAACGATG
Code5	TR451563243	ACCTACCCGTACCGGCCAACAATGTGCGGATGGCGCCAC

DNAidCode’lar tasarımları gereği tek zincirli DNA dizilerinden oluşmaktadır. Ancak tamamlayıcı dizisi ile plazmit DNA içinde çift zincirli olduğunda DNA doğası gereği daha dayanıklı olacakları için plazmit DNA içine aktarılmıştır.

Plazmitin bütünlük analizi %2’lik agaroz jel elektroforezde Gene Universal şirketi tarafından yapılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Klonlanan diziyi içeren plazmit vektörün jel elektroforezinde 1Kb'lik DNA merdiveni beklenen baz aralığı (solda) ve Codel'i içeren plazmit vektörün %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

3.6. Plazmit Vektörlerin Sulandırılması ve Kandan Genomik DNA İzolasyonu

3.6.1. Sulandırılan Plazmitlerin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Plazmitin kendi üzerine katlanma özelliği ve halkasal yapının bulunduğu çözücü içinde alabileceği şekillerden dolayı plazmit görüntülemeye farklı büyüklüklerde bantlar görüntülenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Sulandırılan Plazmitlerin %1'lik Agaroz Jelde Görüntülenmesi 1Kb'lik DNA merdiveni ile görüntülenmesi.

3.6.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

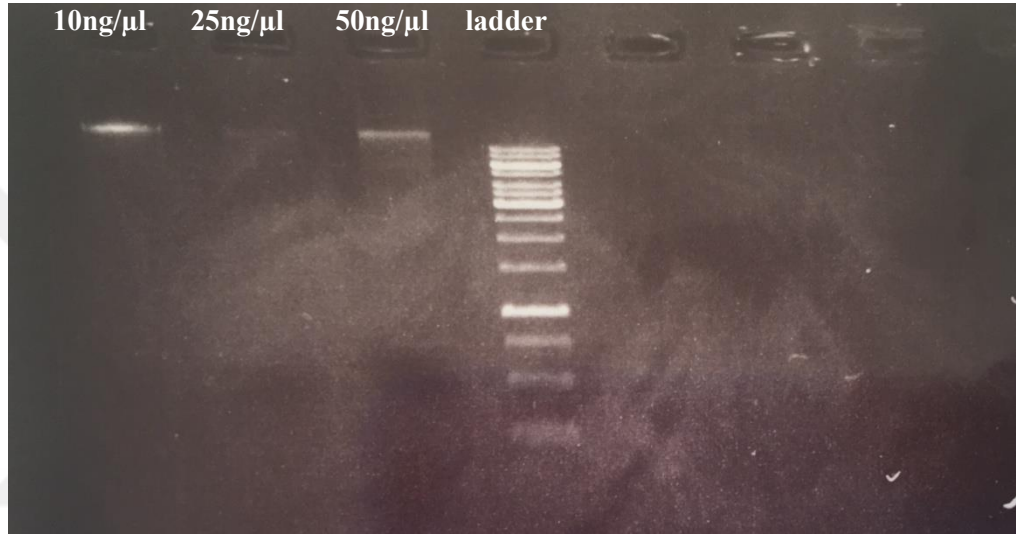
Atafen'den alınan sığır kan örneği ile sulandırılmış plazmitin farklı konsantrasyonlarda karıştırılmasıyla elde edilen örneklerden nükleik asit ekstraksiyon kiti ile genomik DNA izolasyonunun sonucu Thermo Scientific Nanodrop 2000 ile ölçüm yapılarak değerlendirildi (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.9. TR171172835 nolu örneğin DNA izolasyon sonuçları.

Örnek		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
10 ng/μl	14,5 ng/μl	1,90	0,60
25 ng/μl	5,5 ng/μl	1,61	0,64
50 ng/μl	5,5 ng/μl	1,97	0,89

3.6.3. Agaroz Jelde Farklı Konsantrasyonlarda Sulandırılmış Plazmitin Elektroforezi

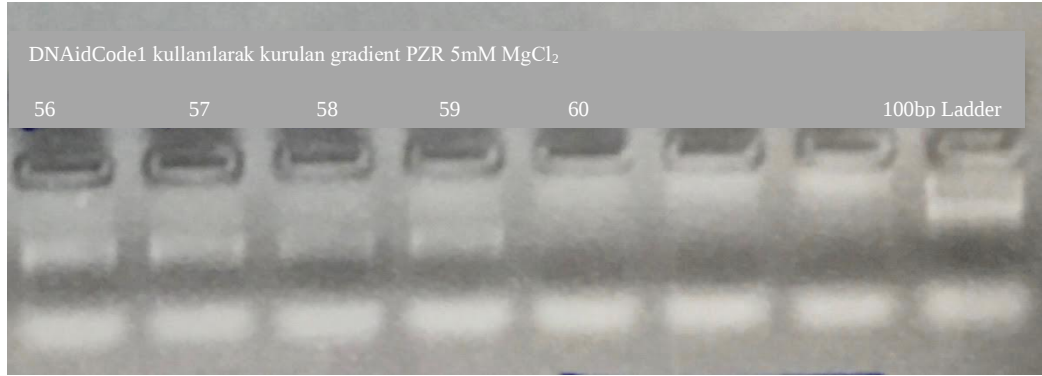
10 ng/μl, 25 ng/μl, 50 ng/μl konsantrasyonlarında sulandırılmış plazmit örneğinin (DNAidCode1), %1'lik agaroz jelde elektroforezi Ultra Viole ışık altında görüntülendi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. %1'lik Agaroz Jelde Farklı Konsantrasyonlarda Sulandırılmış Plazmitin 1Kb'lik DNA merdiveni ile Elektroforez Görüntüsü.

3.7. Plazmit Vektörlerin DNAidCode dizisi PZR ürünlerinin Agaroz Jelde Elektroforezi

DNAidCode dizileri için kurulan optimum koşullardaki gradient PZR sonuçları agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Optimizasyon PZR'ında 2mM-5mM MgCl₂ aralığında farklı konsantrasyonlar ve 55 °C, 56 °C, 57 °C, 58 °C ve 60 °C sıcaklıklarında yapılan PZR'ın ürünlerinin, %2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi sonucunda yoğun MgCl₂ (5mM) konsantrasyonu ile 58 °C sıcaklığın optimum olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Gradient PZR ürünlerinin %2'lik Agaroze Jel Elektroforezinin Görüntüsü.

3.8. Sığır Kanından Genomik DNA İzolasyonu

3.8.1. Ticari kit ile genomik DNA izolasyonu

Atafen'den alınan sığır kan örneklerinden ticari bir kit kullanılarak yapılan genomik DNA izolasyonu sonuçları spektrofotometrik (Nanodrop C1000, Thermo, ABD) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Sığır kanından genomik DNA izolasyonunun nanodrop ile ölçüm sonucu.

Örnek		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
TR451518010	48,9 ng/ μ l	0,71	0,11
TR451563243	20,7 ng/ μ l	0,96	0,17
TR171172835	16,4 ng/ μ l	1,62	0,62
TR171172847	22,2 ng/ μ l	1,78	0,99
TR353200163	7,1 ng/ μ l	2,00	1,42

3.8.2. Fenol, Kloroform, İzooamil Alkol (FKİ) İle DNA İzolasyonu

Atafen'den alınan sığır kan örnekleri ve TR451518010 kulak küpeli sığırın kanı ile fenol-kloroform-izooamil alkol (FKİ) kullanarak DNA izolasyonu yapıldı. TR451518010 kulak küpeli sığırın kanından 3 ml alınarak 30 µl DNAidCode4 plazmit vektör ile yine aynı sığırın kanından 3 ml alınarak 60 µl DNAidCode4 plazmit vektör ile karıştırıldı.

FKİ yöntemi ile elde edilen DNA'lar 50 µl elution buffer ile sulandırıldı. Nanodrop ile ölçüm yapıldı (Çizelge 3.11.).

Çizelge 3.11. TR451518010 kulak küpe numaralı örneğin farklı dilüsyonlarının nanodrop sonuçları.

Örnek		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
TR451518010 60	1260,8 ng/µl	1,65	1,31
TR451518010 60/1	45,9 ng/µl	1,62	0,28
TR451518010 60/2	167,4 ng/µl	1,73	0,58
TR451518010 30/1	91,1 ng/µl	1,46	0,31
TR451518010 30/2	263,6 ng/µl	1,61	0,75
TR451518010 30/3	68,2 ng/µl	1,45	0,33

PZR kurulması için izole edilen örneklerin her birinden 1µl alınıp başka bir mikrosantrifüj tüpe alındı. Üstüne 9 µl ddH₂O eklenerek konsantrasyonları seyreltilti.

3.9. Sıvı Besi Yerine Ekimi Yapılan Plazmitlerin İzolasyonu

LB ampisilinli sıvı besi yerine ekim yapılan plazmit içeren kompetan hücreler için yapılan plazmit izolasyonu sonucu Nanodrop ile ölçülerek değerlendirildi. Nanodrop sonucu Çizelge 3.12.'den incelenebilir. Santrifüj işlemi sırasında bazı tüpler kırıldığı için DNAidCode1, DNAidCode3 izole edilemedi.

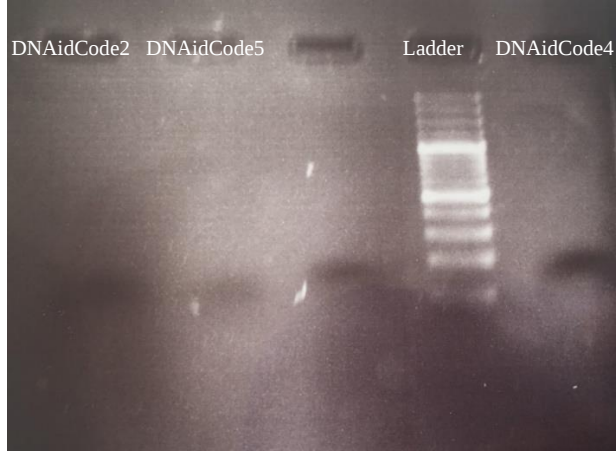
Çizelge 3.12. DNAidCode2, DNAidCode5, DNAidCode4 örneklerinin nanodrop sonuçları.

Örnek		A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
DNAidCode2	3,6 ng/ μ l	2,79	0,15
DNAidCode5	7,1 ng/ μ l	2,60	0,15
DNAidCode4	6,3 ng/ μ l	2,55	0,16

3.9.1. Sıvı Besi Yerine Ekimi Yapılan Plazmitlerin İzolasyonunun Agaroz Jelde Görüntülenmesi

LB sıvı besiyerine ekimi yapılan plazmitlerin izolasyonunun sonucunu görebilmek için 50 μ l elution buffer ile çözödürölen örnekler, %2'lik agaroz jel dökölerek görüntölendi.

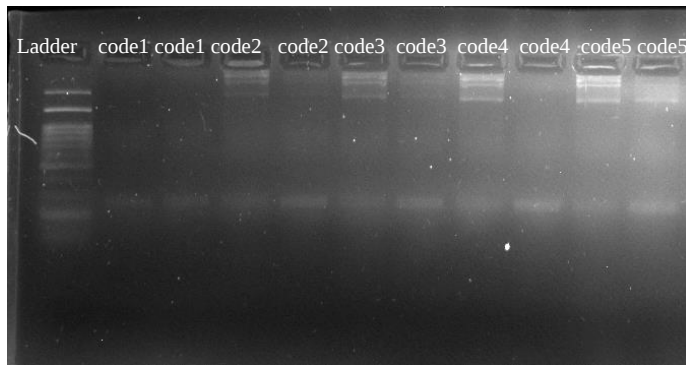
Örneölerin her birinin 10 μ l'si ile 10 μ l safeview boya pipetleme yapılarak kuyucuklara DNAidCode2, DNAidCode5, DNAidCode4 isimli örnekler sırasıyla yüklendi. 2 μ l 1000 kb'lık ladder ile 2 μ l safeview boya da pipetleme yapılarak dördüncü kuyucuöa yüklendi. Jel sonucunun incelenmesi sonucunda ladder haricinde örnekler düşük yoğunlukta olduöu için bant gözlenmedi.



Şekil 3.6. Plazmit izolasyonunun %2'lik agaroz jel görüntülenmesi.

3.10. Stok Plazmit DNA'ları ve 100 ng/µl sulandırılan plazmitlerle ile PZR Yapılması

DNAidCode1, DNAidCode2, DNAidCode3, DNAidCode4, DNAidCode5 içeren plazmit DNA'lar ile 50 ng/ µl ve 100 ng/µl olarak sulandırılan plazmitler kullanılarak optimum olarak belirlenen şartlarda (Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5) PZR yapıldı.

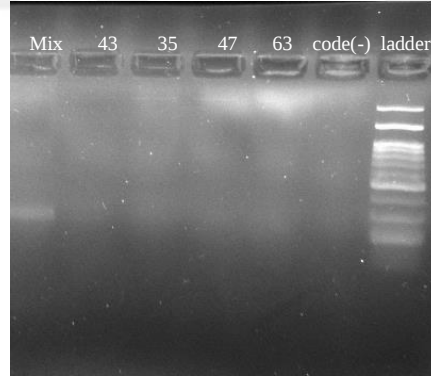


Şekil 3.7. Stok plazmit DNA'ları ve 100ng/ul sulandırılan plazmitlerle yapılan PZR'ın 100bp'lik DNA merdiveni ile elektroforez agaroz jel görüntüsü. Her code için birinci örnek 100ng/µl ikinci örnekler 50ng/µl konsantrasyonunda plazmitlerle yapılmıştır.

PZR sonucunda kullanılan plazmid yoğunluğunun fazla olmasından dolayı code1 dışında 100ng/μl yoğunluktaki örneklerde plazmid bandı da görülmüş, bu bandın görüldüğü örneklerde PZR bandının zayıf olduğu tespit edilmiştir. Ancak beklenen büyüklükte PZR bandı optimum koşullarda tüm örneklerde elde edilmiştir.

3.11. DNA İzolasyonunun Ürünlerinin DNAidCode'la Karışımının ve Sığır DNA'larının DNAidCode Primerleri ile PZR'ı

DNAidCode'a özgü primerlerin özgünlüğü, sığır genomunda özgün olmayan bağlanma olup olmadığını tespit etmek için ticari bir kit kullanılarak yapılan genomik DNA izolasyonu ürünleri ve DNAidCode dizisi ile karıştırılan bir DNA kullanılarak optimum şartlarda PZR yapılmıştır.



Şekil 3.8. DNA izolasyonunun ürünlerinin DNAidCode'la karışımının ve sığır DNA'larının DNAidCode primerleri ile yapılan PZR'ın jel görüntüsü (100bp'lik ladder).

Yapılan PZR sonucunda 43, 35, 47, 63, code dizisi ve DNA içermeyen örneklerde bant alınmamıştır. Sadece DNAidCode dizisi ile karıştırılmış Mix DNA'da bant elde edilmiştir. Bu sonuç DNAidCode primerlerinin sadece DNAidCode dizisine bağlandığı ve özgün olarak sadece bu dizilere bağlandığını göstermiştir.

4. TARTIŞMA

Yetiştiriciler yüksek verim hedefine ulaşmak için hayvanları doğal ortamlarından ayırmış ve yetiştirmişlerdir. Hayvanların doğal ortamlarından uzak ve refah içinde yaşaması için korku ve sıkıntı verecek, ağrı-acı duymalarına neden olacak etkilerden uzak olmalı, insancıl bir biçimde korunmalıdır. Hayvan refahı sürdürülebilirliğin sağlanması ve ekonomik olarak verimliliğin artırılması dikkate alınması gereken önemli bir etkidir (Sert ve Uzmay, 2017). Sürdürülebilirlik terimi ekonomik, ekolojik ve sosyal açıdan ele alınan bir kavramdır (McIvor, 2016). Sürdürülebilir bir sistemin çevreye duyarlı, ekonomik olarak mevcut şartlarda uygulanabilir ve sosyal yönden sorumlu olması gerekmektedir (Allen ve ark., 1991). Bu gereklilikler sebebiyle hayvan refahının bu sürecin ana unsuru olması kaçınılmazdır (Sert ve Uzmay, 2017). Güvenli hayvansal ürünler için artarak çoğalan taleplerin karşılanmasında sürdürülebilirliğin önemi son yıllarda anlaşılmıştır (M'hamdi ve ark., 2017). Çevre sağlığı, insan sağlığı ve hayvan sağlığı ve refahına duyarlı olunmasını kapsayan tek sağlık kavramı içinde önemli hedeflerden birisi de gıda güvenliğidir (Sert ve Uzmay, 2017). Bu yönüyle de tüketilen gıdanın izlenebilir olması, nereden geldiği bilinmesi tüketici açısından önemlidir. Hayvanların takibinde kullanılan kimliklendirme yöntemleri hayvan türleri, ırkları, yetiştirilme amaçlarına göre farklılık göstermektedir. Hayvanların izlenebilirliği için her bir hayvan için benzersiz ve bireysel bir kimlik kodu ile bunun doğrulanabileceği bir sistemin kullanımı gerekmektedir. Kullanılan kimliklendirme yöntemleri ve kimliklendirme araçları sadece tek bir yöntemin tamamen yeterli olmadığını da göstermektedir (Caja ve ark. 2004). Kimliklendirmede kullanılacak sistemlerin taşınması gereken özellikler kalıcı olması, bozulmadan kalabilmesi, uygulandığı hayvana ağrı/acı ve zarar vermemesi, basit bir şekilde uygulanabilir olması ve veriye hızlı bir şekilde ulaşılabilir olması olarak sıralanabilir (Aydın, 2007). Ayrıca oluşturulacak veri tabanları ile bilgiye istenildiğinde ulaşılabilir ve güvenli bir şekilde bu verinin iletilmesi sağlanabilmelidir (McGrann ve Wiseman, 2001).

Geçmişten günümüze kullanan kimliklendirme yöntemlerinden sıcak demir uygulaması deri bütünlüğünün bozulması ve uygulama alanının yanması ve yara oluşumuyla sonuçlanmakta, hayvanın ağrı/acı yaşamasıyla refahını olumsuz etkilemekte ve hayvan derisinin ürününün hasar görmesine neden olmaktadır (Aydın, 2007). Bu yöntemin alternatifi olarak sunulmuş kostik gibi kimyasal yakıcılar (Caja ve ark., 2004) yine aynı olumsuzluklarla sonuçlanmaktadır. Dondurarak işaretleme yöntemi ve sıcak demir uygulaması ile kimliklendirme yönteminde hayvanda oluşan deri hasarını ve hayvan refahını olumsuz etkileyen yaraların oluşmasını engellemek için tercih edilebilecek bir kimliklendirme yöntemi olsa da uygulamanın zaman alması ve açık renk derili hayvanlara uygulanmasındaki güçlük gibi dezavantajlarından bulunmaktadır. Hayvanın deri bütünlüğüne zarar vermeyen ve refahını olumsuz etkilemeyen boya ile damgalama yönteminde ise boyalar zamanla kalıcılığını yitirebilmektedir. Bu nedenle de kulak çentiği, dövme, kulak küpesi gibi ek yöntemler ile desteklenmesi gerekmektedir. Hayvan refahını olumsuz etkileyen kulak çentiği ile kimliklendirme yöntemi ise hayvan gelişimine paralel olarak zamanla değişime uğrayabilmekte ve uzun süreli bir şekilde kalıcılığı olmamaktadır. Yine ek olarak kullanılabilir dövme yönteminde kalıcılık problemi olmasa da tüylerin altında kaldığı için uygulandığı hayvandan okunması zor olmaktadır. Dışarıdan kolaylıkla okunabilen ve hayvanın vücut derisi bütünlüğüne zarar vermeden kulağa takılan kulak küpesi ile kimliklendirme ise en yaygın şekilde kullanılan bir yöntemdir. Fakat kulak küpelerinin hayvanın türüne, çevresel şartlara ve kullanılan materyale göre değişen sebeplerle kulaktan düşüp kaybolabilmektedir (Aydın, 2007).

Gelişen teknoloji etkisiyle kimliklendirme yöntemlerine alternatif yöntemler ortaya çıkmıştır. Elektronik kimliklendirme amacıyla kullanılan aracın markasına göre yöntemin etkinliği değişebilmektedir. Enjekte edilebilir kimlikleyicilerin hayvanlarda kullanımı, enjekte edilen kapsülün vücut içinde hareket etmesi ve geri çıkarılmasındaki sıkıntılar nedeniyle gıda zincirinde tehlike oluşturmaktadır. Bir diğer yöntem de biyometrik olarak kimliklendirmedir. Hayvanın doğumundan hayatı boyunca var olan ve değişmeden kalan retina ağız damar dokusunun görüntülenerek uygulanan bu yöntemde retina görüntülerini alınırken hayvanlarla temas edilmemesi

gerekmektedir (Aydın, 2007). Ayrıca bilgisayar alt yapısı ve uygun kamera sistemleri gerektirdiğinden uygulama güçlüğü bulunmaktadır. DNA temelli moleküler tanımlama yöntemi olan DNA barkodlama yöntemi morfolojik taksonomi ile başarılı bir şekilde kullanılabileceği ve bu entegrasyonunun biyoçeşitliliği tek başına geleneksel yöntemlerden daha hızlı ve daha güvenilir bir şekilde açıklayabileceği savunulmaktadır (Gutiérrez-Gutiérrez ve ark., 2013 ve Nekola ve Barthel, 2002). Tüm bu kimliklendirme yöntemlerine alternatif olarak Dr. Öğr. Üyesi Nüket Bilgen tarafından geliştirilen ve bireye ait bilgileri içeren, sığır genomunda bulunmayan rastgele dizileri içeren ve sentetik olarak üretilmiş sentetik DNA kodları ile kimliklendirme yöntemi kullanılmıştır. DNAidCode adı verilen sentetik kimlik dizileri oluşturularak bu canlıya ait bir çeşit barkod ve kimliklendirme yöntemi denenmiştir. Yöntemin bilinen kimliklendirme yöntemlerine göre hayvan refahını olumsuz etkilememek ve hayvanlardan elde edilen tüm ürünlerde kullanılabilecek güvenilirlikte ve dayanıklı olmasıdır.

Üretilen sentetik kodlar içindeki rastgele dizilerin boyutları ile ilgili olarak 10-20-30-40 bazlı diziler denenmiştir. Toplamda 135 tane rastgele DNA dizisi için üç veri tabanında da sığır genomu ile karşılaştırmalar yapıldı. Bu karşılaştırmalar sonucunda 13 tanesinin hiçbir veri tabanında sığır genomunda karşılığı bulunmadı. 20 bazlı rastgele DNA dizilerinin hepsi sığır genomuyla eşleşti. 30 bazlı ve 33 bazlı dizilerde 30 bazlı dizilerin hepsi sığır genomu ile eşleşti fakat 33 bazlı bir dizi de bir eşleşme tespit edilmedi. 40 bazlı olarak hazırlanan rastgele diziler, hazırlanan diğer dizilere göre daha az eşleşme gösterdi. Bu sebeple ek olarak 40-50 baz aralığında ve farklı GC oranına sahip 5'er tane 43, 44, 45 baz uzunluğunda 0,50 GC içeriğinde, 42, 45 baz uzunluğunda 0,30 GC içeriğine sahip ve 41, 47 baz uzunluğunda 0,20 GC içeriğine sahip rastgele DNA dizileri üretildi. Bu dizilerin karşılaştırılması sonucunda da 0,20 ve 0,30 guanin-sitozin içeriğine sahip olanlar sığır genomu ile eşleşti. Fakat 0,50 oranında GC içeriğine sahip olanlardan 43 bazlı rastgele DNA dizilerinden 1 tane ve 44 bazlı rastgele DNA dizilerinin 2 tanesinde eşleşme olmadı. 50 bazlı dizilerden 3 tanesi sığır genomu ile eşleşme göstermedi. 20, 30, 40 ve 50 baz uzunluğuna sahip rastgele olarak hazırlanan dizilerin veri tabanlarında sığır genomu için

karşılaştırılmasında 40 baz uzunluğuna sahip dizilerine genomda daha az rastlanılmıştır. 20 baz uzunluğuna sahip diziler, diğer dizilere göre kısa olması sebebiyle çalışılan veri tabanlarında sığır genomu için karşılaştırıldığında hepsinde rastlanılmıştır.

Araştırmacıdan kaynaklı hatalar gibi PZR’da kullanılan bileşenlerin miktarı, kalitesi, saklama koşulları yapılan polimeraz zincir reaksiyonunun sonucunu olumsuz olarak etkilemektedir. Yanıltıcı ve yanlış sonuçlar almamak için PZR optimizasyonu yapılarak en uygun koşullar belirlenmelidir. Kalıp DNA, $MgCl_2$, dNTP, primerlerin miktarları değiştirilip diğer bileşenler bu değişkenlere uygun olacak şekilde toplam hacim tamamlanarak kullanılmalıdır. Kullanılan kalıp DNA miktarı çok ise istenmeyen birleşmeler meydana gelmektedir. Miktarın az olması durumunda ise yetersiz seviyede ürün çoğaltımı olmaktadır. (Yıldırım ve ark., 2011). $MgCl_2$ konsantrasyonu primerlerin bağlanmasını, Taq DNA polimeraz enziminin çalışmasını etkilemektedir. Magnezyumun yeterli seviyede olmaması Taq DNA polimeraz enziminin inaktif olmasına sebep olurken; fazla miktarda olması durumunda ise enzim verimliliğini azaltmakta (Eckert ve Kunkel, 1990) ve kalıp DNA’da olduğu gibi istenmeyen birleşmeler meydana gelmektedir (Ellsworth ve ark., 1993 ve Williams, 1989). Plazmid DNA’da spesifik bölgelerin yükseltgenmesinde Jev ve ark. (2011) $MgCl_2$ içeren 10X enzim tamponu olan PZR kitleri kullanmıştır. Bu tampon içinde bulunan $MgCl_2$ konsantrasyonu 2mM’dır. Tez çalışması kapsamında yapılan PZR çalışmalarında 5mM olacak şekilde yoğun $MgCl_2$ ve 40 PZR döngüsü kullanılmıştır. Yoğun $MgCl_2$ oranı yüksek PZR döngüsü uygulamalarında tercih edilmesi önerilmektedir (Schmidt ve ark., 2014). Denenen farklı konsantrasyonlarda 40 döngü sayısı dışında bant elde edilememiş olması bu önerisi destekler niteliktedir. Aynı zamanda kalıp DNA’nın düşük T_m değerini de yüksek $MgCl_2$ konsantrasyonunun yükselttiği de düşünülmektedir. Primerlerin yüksek konsantrasyonda kullanılması spesifik olmayan bantların oluşmasına sebep vermektedir (Bock, 1997). Jel görüntüleme sonuçlarında primerlerin dimerleştiği görülmüştür bunun yanında yoğun kalıp DNA kullanımından kaynaklı plazmid bantları da jelde görüntülenmiştir.

Genomik DNA ve plazmit vektörü aynı anda elde etmeye yarayan bir kit, protokol veya kimyasal olmadığı için çeşitli izolasyon yöntemleri denenmiştir. Kan ile karıştırılan plazmit vektör sığır kanı içinde tespit edilebilir mi, bozulmadan stabilitesini koruyabilir mi gibi sorulara yanıt bulmak amacıyla izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için Vivantis lot: 40149-20 nükleik asit ekstraksiyon kiti ve fenol, kloroform, izoamil alkol (FKİ) yöntemi kullanılmıştır. Kan plazmasında eksojen ve endojen DNA'yı degrade edebilen deoksiribonükleaz-benzeri aktiviteye sahip enzimler bulunmaktadır. Kanda bulunan ve eksojen ve endojen DNA'yı %90 oranında hidrolize eden ana enzim deoxyribonuclease I (DNase I)'dır (Nadano ve ark., 1993). Ancak yine serumda bulunan inhibitörler sayesinde DNase I aktivitesi dengelenmektedir. Kandaki DNA hidrolize edebilen diğer enzimler DNase II, phosphodiesterase I, DNA-hydrolyzing autoantibodies ve lactoferin olarak sayılabilir (Shuster ve ark., 1992). Bu tez çalışmasında sığırlardan kanlar alındıktan sonra -20 °C'de tutulmuştur. Ancak DNase aktivitesinin ölçüldüğü çalışmalarda da plazmalar -20 °C'de tutulmuş ve ölçüm öncesi çözündürülerek kullanılmıştır. Bu nedenle kan ile karıştırılmış DNAidCode'ların genomik DNA ile izole edilemedikleri düşünülmektedir. Farklı yöntemlerle izole edilen genomik DNA miktarları arasında nanodrop ölçüm sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda FKİ yöntemiyle yapılan izolasyon sonucunda konsantrasyon diğer iki yönteme göre çok yüksek çıkmıştır. Nanodrop ile ölçüm sonucunda beklenen A_{260}/A_{280} oranı 1,8 ile 2,0 iki yöntemde de istenilen aralığa daha yakın çıkmıştır. Ticari ve FKİ yöntemlerinde kullanılan farklı miktarda kanın elde edilen DNA konsantrasyonu farklılığı için temel neden olarak değerlendirilmiştir.

Agaroz jel ile görüntülemeye agaroz jel konsantrasyonu, yüklemede kullanılan DNA merdiveni ve yükleme yapılacak örneklerin konsantrasyonları önemlidir. Yapılan çalışmada DNAidCode ve sığır kanı karışımı örnekleri 10 ng/μl, 25 ng/μl, 50 ng/μl oranında karıştırılmıştır. Ticari kit ile DNA izolasyonu aşamasından sonra yapılan jel elektroforezi sonucunda kullanılan üç oranda da istenilen seviyede bir bant gözlemlenemedi. Fakat diğerlerine göre daha yüksek konsantrasyonda olan 50 ng/μl daha iyi bir görüntü alınmıştır. Yüksek oranda DNAidCode ile sığır kanı karıştırılarak

yüksek plazmit konsantrasyonu elde edilerek, jelde daha net bant gözlemlenebildiği şeklinde yorumlanmıştır. Bu nedenle de kimliklendirilecek DNA konsantrasyonuna eşit oranda DNAidCode ile karıştırılmasının PZR temelli deteksiyon çalışmaları için uygun olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen bu bulgu Moore ve ark. (2019)'da insan için önerilen oranla aynı olması bulguları destekler niteliktedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kullanılan kimliklendirme yöntemleri uygulama sırasında hem hayvan refahını olumsuz etkileyen hem de yaşanabilecek yanlış yerleştirme gibi işlemler sonucunda oluşabilecek komplikasyonların yanında kolayca düşebilen ve değiştirilebilen bir kimlik sistemidir. Gelişen teknoloji ve bununla birlikte paralel bir şekilde ilerleyen biyoteknolojik teknikler ile kimliklendirmede yaşanan sorunların önüne geçilmesi ve yeni bir teknik geliştirilmesi için sığırlarda sentetik DNA ile barkod yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hayvanlara ait temel bilgileri içeren DNAidCode adında sentetik DNA'lar hazırlanmıştır.

DNAidCode'da yer alması için sığır genomunda olmayan bir dizi oluşturulabilmesi için toplamda 135 tane rastgele dizi hazırlandı (Ek-2). Hazırlanan bu dizilerden seçilenler (Çizelge 3.8.) ile sığıra ait bilgilerden oluşan diziler plazmit vektöre aktarılıp çoğaltılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda plazmit vektör de bulunan DNAidCode plazmitlerden PZR ile çoğaltılmış, sığır DNA'sı ile karışımlarda PZR ile belirlenmiştir. Yalnızca sığır genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PZR uygulamasında ise bant elde edilmemiştir. Bu durum PZR'da kullanılan primerlerin yüksek özgünlüğünü göstermektedir.

Sentezletilen 251 baz uzunluğunda olan DNAidCode, ileri (forward) primer, DNAidCodeCattleSPS, kulak küpe numarası, cinsiyet, ırk bilgisi, koordinat bilgisi, enzim kesim bölgesi, DNACode, geri (reverse) primerden oluşan plazmit vektörde bulunan dizi uzunluğu arttırılarak kırılmanın önüne geçilebilir. Bunun için hayvana özgül bilgilerin çeşitliliği arttırılabilir, rastgele olarak oluşturulan sığır genomunda bulunmayan 40 bazlı dizinin (DNACode) uzunluğu arttırılarak daha uzun bir dizi elde edilerek plazmit vektöre klonlanabilir. DNAidCode'un uzunluğunun arttırılmasının yanı sıra farklı bir plazmit vektör kullanılabilir. Oluşturulan bu dizilerin klonlatıldığı

plazmit vektör (pUC57) 2976 baz çifti uzunluğunda olup daha uzun bir plazmit vektör tercih edilebilir.

Sonuç olarak sunulan yüksek lisans tez çalışmasında yeni bir kimliklendirme yöntemi denenmiş ve kimlik dizilerinin PZR ile çoğaltılarak belirlenebilir olduğu ortaya konulmuştur.

Tez çalışmasının desteklendiği TÜBİTAK 120O855 kodlu proje kapsamında gelecekte de kullanılabilecek DNAidCode'lar için <https://dnaidcode.com/> sitesinde hayvanın temel bilgilerini içeren DNAidCode kütüphanesi ve yeni DNAidCode'lar üretmek üzere bölümleri içeren bir site tasarlanmıştır.

ÖZET

Sığırlarda Sentetik DNA ile Barkod Yönteminin Geliştirilmesi

Gelişen teknolojiler moleküler teknikleri yeni bir boyuta taşıdı. Sonsuz veri üretme kapasitesi ile genetik alanı artık Dijital Veri Çağının bir parçası haline geldi. Sunulan çalışmada, bireysel tanımlama için sentetik DNA bazlı bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Ekonomik önemlerinden dolayı sığırlar çalışma için seçilmiştir. Sığırların ayırt edici bireysel bilgileri ($n = 5$) DNA dizi formatına dönüştürüldü ve sentetik olarak sentezlendi. DNAidcode olarak isimlendirilen sentetik DNA dizileri, bireysel bilgilerin yanı sıra ileri ve geri oligonükleotitler, diziye özgü ve spesifik kodları içermektedir. Elde edilen 251 baz uzunluğundaki diziler çift sarmallı DNA'ya dönüştürüldü ve plazmit vektöre ayrı ayrı yerleştirilerek çoğaltıldı. DNAidCode bölgeleri, spesifik oligonükleotitler kullanılarak PZR ile yükseltildi, saflaştırıldı ve daha sonra sığırlardan izole edilen DNA ile karıştırıldı. DNAidCode ile saklanan bilgiler dizileme ile geri kazanım için hazır hale getirildi. Bu yöntemle, yeni sentetik DNA kimlikleri olan DNAidCode, meni, oosit, embriyo veya hücre gibi her türlü değerli biyolojik materyalle uzun vadeli, milyarlarca yıllık depolama için; gıda güvenliği, çiftlikten masaya izleme; genom dizilemesinde çapraz kontaminasyonun değerlendirilmesi, genom dizileme merkezlerinde verilerin korunması için kullanılabilir. DNAidCode dizilerini oluşturmak ve depolamak için DNAidentity yazılımı geliştirildi. "Sentetik DNA barkodu ile tanımlama" ulusal ve uluslararası düzeyde benzerine sahip değildir ve patenti alınmıştır. Bu yöntemin geliştirilmesi ve optimizasyonu, dünya için benzersiz ve kullanışlı bir model olarak önerilmektedir. Ayrıca, nicel özellik bilgisini veya istenen diğer bilgileri taşıyan DNAidCode + dizileri, DNAidCode temel alınarak oluşturulabilir.

Anahtar Sözcükler: DNAidCode, Kimliklendirme, Sığır.

SUMMARY

Development of Barcode Method with Synthetic DNA in Cattle

Developing technologies have carried molecular techniques to a new dimension. The field of genetics, with its endless data generation capacity, has now become a part of the Digital Data Age. In the presented study, it is aimed to develop a synthetic DNA-based method for individual identification. Due to their economic importance cattle were selected in the pilot study. Discriminative individual information of the bulls (n=5) was converted into DNA sequence format and synthesized synthetically. Beside individual information forward and reverse oligonucleotides, sequence specific and breed specific codes placed in the synthetic DNA identities, named DNAidCode. The resulting 251bp length sequences were converted into double-stranded DNA and inserted into the plasmid vector separately and replicated. DNAidCode regions, were amplified by PCR using specific oligonucleotides, purified, and then mixed with DNA which was extracted from the bulls. The information stored in DNAidCode was ready to be recovered by sequencing. With this method, DNAidCodes, the novel synthetic DNA identities, can be used for long term, billions of years, storage with all kinds of valuable biological materials like semen, oocyte, embryo, or cell; food security, farm-to-table tracing; assessing cross-contamination in genome sequencing; data protection of the genome sequencing centers. We have developed software, DNAidentity, to generate and store DNAidCode sequences. "Identification with a synthetic DNA barcode" has no analogs at the national and international level and has been patented. The development and optimization of this method are proposed as a unique and useful model for the world. Moreover, DNAidCode+ sequences, which carry the quantitative trait information or other wanted information, can be generated based on DNAidCode.

Keywords: Bovine, DNAidCode, Identification.

KAYNAKLAR

- AKMAN N, ÖZKÜTÜK K, KUMLU S, YENER SM (2013). Türkiye’de Sığır Yetiştiriciliği ve Sığır Yetiştiriciliğinin Geleceği. Erişim adresi: [http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/71c50ad1a156d72_ek.pdf?tipi=14?="](http://www.zmo.org.tr/resimler/ekler/71c50ad1a156d72_ek.pdf?tipi=14?=) . Erişim tarihi: 25/11/2021.
- ALLEN P, VAN DUSEN D, LUNDY J, GLİESSMAN S (1991). Integrating Social, Environmental, and Economic Issues in Sustainable Agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture*, **6(1)**:19-34.
- ALTINTAŞ L, ENVER H, TUTUN H (2017). Rekombinant DNA Teknolojisi ve Veteriner İlaç Geliştirmede Kullanımı, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **5(2)**: 193-204.
- ANASOVA I, KOWAL EA, DUNNM, CHAPUTJC, VAN HORNW D (2016). The structural diversity of artificial genetic polymers. *Nucleic Acid Research*, **44(3)**:1007-1021.
- ASGHAR U, MALİK MF, ANWAR F, JAVED A, RAZA A (2015). DNA Extraction from Insects by Using Different Techniques: A Review. *Advances in Entomology* **3**: 132–138.
- AYDIN A (2007). Avrupa Birliği ve Türkiye’de Hayvanların Kimliklendirilmesi ve Kayıt Altına Alınmasının Göreceli Karşılaştırılması, İzlenebilirlik. T.C. TARIM ve KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI Dış İlişkiler ve Avrupa Birliği Koordinasyon Dairesi Başkanlığı AB Uzmanlık Tezi.
- AYVETSAN. Erişim adresi: <http://www.ayvetsan.com/haber/hayvanlarin-elektronik-kimliklendirilmesi> . Erişim tarihi: 25/10/2021.
- BAYRAM S (2020). Ankara İli Geometridae Familyasına Ait Türlerin Moleküler Filogenetik Analizi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- BOCK R (1997). Biolistic Transformation of plants with anion-exchange-purified plasmid DNA. Institut für Biologie III, Universität Freiburg, Germany. *Qiagen News*. **5**.
- BROWN TA (1990). Gene Cloning Second Edition. London: *Chapman & Hall*, s: 3-11.
- BUGGE CE, BURKHARD J, DUGSTAD KS, ENGERT B, KASPRZYCKA M, KLEİNAUSKAS A, VETLESEN S (2011). Biometric methods of animal identification. Course notes, *Laboratory Animal Science at the Norwegian School of Veterinary Science*, p:1-6.
- CAJA G, GHİRARDİ JJ, HERNANDEZ M (2004). Diversity of animal identification techniques: from fire age to electronic age, Ed: Pauw R., Mack S., Maki J., Hokkonen J., ICAR Technical Series. Title of the Volume: Development of

Animal Identification and Recording Systems for Developing Countries,
ISSN:1563-2504, ISBN: 92-95014-05, 7: 21-37.

ÇİFTÇİOĞLU G, FIORE G, MARCHİ E, MARCACCİ M, CAMMA C, AZZİNİ I, PAGANO A, FERRİ N (2009). EID and DNA traceability of cattle, meat and milk in single, samples and mixed samples. 60th Annual Meeting of European Federation of Animal Science (EAAP). 24-27 August, Barcelona, Spain.

COSTA FO, CARVALHO GR (2007). The Barcode of Life Initiative: synopsis and prospective societal impacts of DNA barcoding of fish. *Genomics, Society and Policy*, **3(2)**.

CUNNINGHAM EP, MEGHEN C (2001). Biological identification systems: genetic markers. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20(2)**: 491-499.

CYWİNSKA A, HUNTER F, HEBERT PD (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Med Vet Entomol* **20(4)**: 413-424.

ÇELİKÜREK H, KARAKUŞ K (2017). Hayvansal Üretimde Biyometrik Kimliklendirme ve Kayıt. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi/ Journal of the Institute of Natural & Applied Sciences* **22 (2)**: 211-218.

DASTAN PB (2010). Et ve Et Ürünlerinin Çiftlikten Sofraya İzlenebilirliği ve Takip Edilmesinde Radyo Frekans Tanımlama Teknolojisinin Kullanılması. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

ECKERT KA, KUNTEL TA (1990). High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **18**: 3739-3744.

EKMEKÇİ A (2016). Xeno-Nukleik Asitler ve XNA Dünyası. *Gazi Medical Journal*, **27(3)**.

FİRİDİN Ş (2010). Rekombinant DNA Teknolojisi. *Yunus Araştırma Bülteni*, s.:16-18.

GUTİERREZ-GUTİERREZ C, CANTALAPIEDRA-NAVARRETE C, MONTES-BORREGO M, PALOMARES-RÍUS JE, CASTILLO P (2013). Molecular phylogeny of the nematode genus *Longidorus* (Nematoda: Longidoridae) with description of three new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **167(4)**: 473-500.

GÜLER M, TOKGÖZ F, KORKMAZ EM, BUDAK M (2018). Böcek Dokularından DNA İzolasyonu Yöntemlerinin Kalite, Verim ve Maliyet Açısından Karşılaştırılması. *S.Ü. Fen Fakültesi Fen Dergisi* **44 (2)**, 135-148.

HUGHES RA, ELLINGTON AD (2017). Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **9 (1)**.

IDEA JRC, (2006). Technical Guidelines For Council Regulation No. 21/2004 of 17/12/2003, Part 1: In-field aspects: application of identifiers, their reading and recovery, Document reference G07-TRVA/ TG part 1, Version no. 1.0 Issue: Final, Date of issue 10/07/2006.

- JEW L (2011). Troubleshooting the single-step PZR site-directed mutagenesis procedure intended to create a non-functional rop gene in the pBR322 plasmid. *J. Exp. Microbiol. Immunol*, **15**: 142-147.
- KENT WJ (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Research*, **12**(4): 64-656.
- KUK S, ERENŞOY A (2008). Gen Klonlama, Plazmit Seçimi ve Fasciola hepatica Cathepsin L1 Uygulamaları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **32** (1): 16-22.
- KUMAR S, SINGH SK, SINGH AK, TIWARI S, SINGH RS (2017). Privacy preserving security using biometrics in cloud computing. *Multimedia Tools and Applications*, **77**: 11017-11039.
- M'HAMDI N, DAREJ C, M'HAMDI H, ATTIA K, LANOUAR L, CHOUCHE R, SADKAOUİ G, ABBES A. (2017). Assessment of Sustainability of Smallholder Beef Cattle Farms in the North of Tunisia. *Journal of Animal Research and Nutrition*, **2**: 1-3.
- MARCHANT J (2002). Secure Animal Identification and Source Verification. JM Communications, UK. Copyright Optibrand Ltd., LLC.
- McGRANN J, WISEMAN H (2001). Animal traceability across national frontiers in the European Union. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20** (2): 406-412
- MCIVOR, S. (2016). Integrating the Welfare Interests of Humans and Animals. UFAW Animal Welfare Conference, 23rd June 2016.
- MOORE RA, ZENG T, DOCKING TR, BOSDET I, BUTTERFIELD YS, MUNRO S, Li I, SWANSON L, STARKS ER, TSE K, MUNGALL AJ, HOLT RA, KARSAN A (2020). Sample Tracking Using Unique Sequence Controls. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **22** (2).
- NADANO D, YASUDA T, KISHI K (1993). Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzymediffusion method. *Clin Chem.*, **39**:4484-4452.
- NCBI. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/about/mission/> . Erişim tarihi: 25/10/2021.
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> . Erişim tarihi: 22/11/2021.
- NEARY M, YAGER A (2002). Methods of Livestock Identification Farm Animal Management Purdue. AS-556-W. Purdue University, Department of Animal Sciences. Erişim adresi: <http://www.extension.purdue.edu/extmedia/AS/AS-556-W.pdf> . Erişim tarihi: 22/11/2021.
- NEKOLA JC, BARTHEL M (2002). Morphometric analysis of the genus Carychium in the Great Lakes region of North America, *Journal of Conchology*, **37**: 515-532.
- PACKER L, GIBBS J, SHEFFIELD C, HANNER R (2009). DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 42-50.

- PİNHEIRO VB, TAYLOR AI, COZENS C, ABRAMOV M, RENDERS M, ZHANG S (2012). Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science*, **336**: 341–344.
- RANDOM DNA SEQUENCE GENERATOR, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, RIVERSIDE. Erişim adresi: <http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/random.htm> . Erişim tarihi: 22/11/2021.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989). IN MOLECULAR CLONING: A Laboratory Manual Second Edition. New York. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, s: 1-86.
- SCHMIDT G, STIVERSON J, ANGEN Ø, YU Z (2014). Number of PZR cycles and magnesium chloride concentration affect detection of tet genes encoding ribosomal protection proteins in Swine manure. *Advances in Microbiology*, **4** (12).
- SHUSTER AM, GOLOBOY GV, KYASHUK OA, BOGOMOLOVA AE, SMIRNOV IV, GABIBOV AG (1992). DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science*, **256**:665-667.
- SIMPLE DNA WRITER. Erişim adresi: <https://earthsciweb.org/js/bio/dna-writer/> . Erişim tarihi: 22/11/2021.
- STANFORD K, STITT J, KELLAR JA, McALLISTER TA (2001). Traceability in cattle and small ruminants in Canada. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **20** (2): 510-522.
- T.C. Resmî Gazete. Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111202.htm> . Erişim tarihi: 02/12/2021.
- TAŞKIN T, AKBAŞ Y, KOYUNCU M, KANDEMİR Ç, TEKİN AB, KOŞUM N (2016). Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinde Elektronik Tanımlama Sistemlerinin Önemi ve Kullanımı Olanakları. *Hayvansal Üretim* **57** (2): 42-56.
- TÜMER S (2004). Sığırlarda Numaralama-2. Çiftçi Broşürü no 110. ETAE Matbaası. Erişim adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/etae/Belgeler/EgitimBrosur/110-ciftcibro.pdf> . Erişim tarihi: 02/12/2021.
- WEINING S, LANGRIDGE P (1991). Identification and Mapping of Polymorphism in Cereals Based on the Polymerase Chain Reaction. *Theor. Appl. Genet.*, **82**: 209-216.
- WILLIAMS JF (1989). Optimization Strategies for the Polymerase Chain Reaction. *Biotechniques*, **7**: 762-769.
- WINGFIELD MJ, KLEIN H (2012). DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources* **12**: 109–115.
- YILDIRIM A, KANDEMİR N, SÖNMEZOĞLU ÖA, GÜLEÇ T (2011). Buğdayda Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Olası Sorunların Optimizasyonu. *Anadolu Tarım Bilim. Derg.*, **26**(1):36-39.

EKLER

Ek-1 Etik Kurul Kararı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 06/01/2021
TOPLANTI NO : 2021-1
DOSYA NO : 2020-147
KARAR NO : 2021-1-1

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Nüket BİLGİN'in yaptığı; araştırmacı olarak Doç. Dr. Bengi ÇINAR KUL, Arş. Gör. Dr. Arzu GÖKDAĞ ve Gülseren EKER'in katıldığı "Sığırlarda Sentetik DNA Barkodu ile Kimliklendirme" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre izne tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 23/01/2021-23/07/2022

ASLININ AYNI DİR

Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı

Ek-2 Rastgele Olarak Hazırlanan Diziler

20 BAZLI DİZİLER GC:0,5

1. GCGCAGGCTTGGGTCGAGAT
2. AAAATCTCCAGTGCCCAAGA
3. CCACGGGCGCTCGGCGCCTT
4. GGCTAATCCCCGTACATGTT
5. GTTATAAATAATCAGTAGAA
6. AGTCTGTGTTAGAGGGTGGA
7. GTGACCATAAATCAAGGACG
8. ATATTAATCGGAAGGAGTAT
9. TCAACGTGATGAAGTCGCAG
10. GGTAAACGTGGAATGGTGC
11. TTCTGTCCTAACAGGTTAGG
12. GTATAATGCTGGAACCGTCC
13. CCCAAGCGTTCAGGGTGGGC
14. TTTGCTACGACTTCGAGTC
15. CAAAGACTCCCTGTTTTCGA
16. AATTTGCGCTCAAGGGCGAG
17. TATTGGACCTGGCTTACGCC
18. TTAGTACGTAGCAAGGTGAC
19. CCGCGTTTCCTATGTATCAA
20. GTTAGAAGTTATGGAATATA
21. ATAACATGTGGATGGCCAGT
22. GGTCGGTTGTTACACGCCTG
23. CCGCAACGTTGAAAGACCCG
24. GATTAGACTGGCAAGATCTA
25. TGGCGTGAGACCCGTTATGC

30 BAZLI DİZİLER GC:0,5

1. AAACATTCTCGACAATCAATCGAGCGAGTCGAT
2. TTAAGTGTGATTGGTAGCACAAAAGTAAT
3. ATGGTCCTTGAAATTCGGCTCAGTTAGTTC
4. CGTAATGTCACAAATGGCGCAGAACGGCAA
5. GTGTTTGACACTAGGTGGTGTTCAGTTCGG
6. CGGAGAGACTGTGCGGCATACTTAATTATA
7. TTGAAACGCGCCCAAGTGACGCTAGGCAAG
8. GAGCAGGTTCCTGTGTTAGCTTAAGGGTAA
9. TACAAGTCGATTGAAGATGGGTAGGGGGCT
10. ATTCGTCCAGCACTCTACGGTACCTCCGAG
11. GTATTGGCAGACATTGAGTGCCGAACAAGA
12. CCTGACCTAACGGTAAGAGAGTCTCATAAT
13. ACGTCCGGCCGCATGCGCAGGTATATTTG
14. GACAGTATCGAATGGACTCTGATGAACCTT

15. TACACCGATCTAGAAACGGGTGCGTGGATT
16. AGCCAGGTGCAAACCAAAAATCCTGGGCTA
17. CTTGATGTTTTGTGACGTTCTAAGAGTTGG
18. ACGAAATGTTTCGCGACCTAGGATGAGGTC
19. GCCCTAGAAAATAGATTTGTGCTACTCTCC
20. TCATAAGCAGTCCGGTGTATCGAAAAGTACA
21. AGACTAGCCTTGCTAGCAACCGGGGCTGG
22. GAGCCTAAGGTATCACTCAAGAAACAGGCT
23. CGGTAACATACGCTCTAGCTATCTGACTAT
24. CCCCTACGTCATATAGGGACCTATGTTATC
25. TCGTGTCCAACCTTAGGATTCACCTCAGC

40 BAZLI DİZİLER GC:0,5

1. TCCATTACGGTCAGTGGGTCACAGCTAGTTGTGGATTGGA
2. TTGCCATTCTCCGAGTGTATTACCGTGACGGCCGCACGGG
3. AAATGTGGCTTCGCCTTTGCCACGCACCTGATCGCTCCT
4. CGTTTGCTTTTAAGGACCGGACGAACCACAGAGCATTAGA
5. AGAATCTCTAGCTGCTTTACAAAGTGCTGGTTCCTTTTCC
6. AGCGGGATGTTTTATCTAAACGCAATGAGAGAGGTATTCC
7. TCAGGCCACATCGCTTCCTAGTTCCGCTGGGATCCATCGT
8. TGGCGGCCGAAGCCGCCATTCCATAGTGAGTTCTTCGTCT
9. GAGTCATTCTGTGCCAGATCGACTGACAGATAGCGGATCC
10. AGTTTATCCCTCGAAACTATAGACGTACAGGTCGAAATCT
11. TAAGTCAAATCGCGCTCTAGACTCAGCTCTATTTTAGTG
12. GTCATGGGTCTGGTCCCCCGAGCGGCGCAACCGATTAG
13. GACCATGTAGAACATTACTTATAAGTCATCTTTTAAACAC
14. AATCTTCCTGCTCAGTGGTACATGGTTTTCGCTATTGCTA
15. GCCAGCCTCATAAGTAACACCACTACTGCGACCCAAATGC
16. ACCCTTTCACGAACACAGGGTTGTCCGATCCTATATTAC
17. GACTCCGGGAAGGGGTTTCGCAAGTCGCACCCTAAACGATG
18. TTGAAGGCTCAGGATGCACAGGCACAAGTACAATATATAC
19. GTGTTCCGGCTCTTATCCTGCATCGAAAGCTCAATCATGC
20. ATCGTACCAGTGTGTTTCGTGTCATCTAGGAGGGGCGCGTA
21. GGATAAATAATTCAATTAAGATTACGTTATGCTACTGTAC
22. ACCTACCCGTCACCGGCCAACAATGTGCGGATGGCGCCAC
23. GACTTACTGGGCCTGATTCACCGCTTCTAATACCGCACA
24. CTGGGCAATACGAGGTCAAGCCAGTCACGCAGTAACGTTT
25. ATCAGCTAACGTAACAGTTAGAGGCTCGCTAAATCGCACT

41 BAZLI DİZLER GC:0,2

1. TTGACGTTTGAAATTAATAAAATCTATTATACTAATCAACT
2. TCAATATACTCTATAATAGGCATTTAACGAGAAGCCACAC
3. CAAGGAAATAAACTATTATATGTTGGGGATAGTAATAATTA

4. ATTAAATGTTTATCACAATAATAGTATTAAATTCGTATAA
5. AAAAAATATCTATATTTAGTAAATTAAAGCACGGCATCAG

42 BAZLI DİZLER GC:0,3

1. GTTAAGCATAAGGCTACATGCTATTTTATTACACCTACACTA
2. CTCAAAGTAAATATAGGAAGTGTGCGACCTGGCTTCAGGTGT
3. TTCGCATCATCATGTATTCGTTAATTGTTAATTGATGACACA
4. TAAATAATATTATAGTCTCTCAAATTCAGCTCAATTATCTTG
5. AGCGTTATGTCTTAAATGGCGTAGAACAGTATTGACTGTTTA

43 BAZLI DİZLER GC:0,5

1. CCAAGGGCACAATCGAGCTCCCATTGTATGTTCCGGCTAACTT
2. GTACCCAACCCCGAAGTTTAGCAGGTCGTGGGGTGTCATGGA
3. GCCTCTGGTTCATCCCGTGGGATATCAAGCTTCGTCTTGATAA
4. AGCTCCCCGCTCGGGTGTAGCAGAGAAGACGCCTACTGAATTG
5. TGCGATCCCTGCACCTCAGCTAAGGTAGCTACCAATATTTAGT

44 BAZLI DİZLER GC:0,5

1. TTCTAAGCCTTGCGACAGACCTCCCACCTTAGATTGCCACGCATA
2. GAGCTAGCGAGTCAGCGAAAAGCATGACGCGCTTCAAGCGTGG
3. CGAGTATGTGAACCAAGGCTTCGGACAGGACTATATACTTAGGT
4. TTGATCTCGCCCGAGAAGTGTAAACCTCAACATTTATAGATTA
5. TAAGGTTAGCCGAAAATGCACGTGGTGGCGCCCGCCGACTGCTC

45 BAZLI DİZLER GC:0,3

1. ATACTAATTAGTGTTCGGTTTGTAATGAAGAATCTATACGGCAA
2. TGTCAATTAATACATTTGAAATACGCTATATCGATACTGAACAAAT
3. TAATGCAAACCTCCATGTTAGAATAAAGATAAATATACAAGTCGA
4. TAGAAAATGGGTAGGGGCTTTTAATTCATTCAACACTCTACGACT
5. TCTTCAAGAATTAGTAGAGTATCCTGTAGTTGAAAAAGAAATTAT

46 BAZLI DİZLER GC:0,5

1. CCTGAGTGTGGCTCTTTGTTCTGTCAACGCCCGACCTTCATCGCGG
2. CCGATTCTTCTGCGGACCATGTCGTCTGATACTTTGGCCATGTT
3. TCCGTTGTAGGAGTGAAGCCACTTGCTTTGCGCCGTAGTTCCAAT
4. GAAAAACCTATGGACTTTGTTTAGGGTAGCATCAGGAATCTGAACC
5. CTCAGAAAGTGGGGATCCCGGGTATAGACCTTTATCTGCGGTTCAA

47 BAZLI DİZLER GC:0,2

1. TTCGTAAAATAAGTTCATACTGTTTTCTTGTA AAAAATTTAATATA
 2. ATAAAAAATTAGAATAATTTTAAATGATAATTATTAATTCTAATAAC
 3. GAAACATTATTTAAAGAATAAGTCTGATAAAGTATAACTCAATCAAT
 4. TATTTATTATTTGAACTAAGTGAAAGATTCCAGTATTTATGCATTTA
 5. ATCCTAAGACTTGACCCAATATATAAGCTTAGATTAAAGTGAAATTA
-

50 BAZLI DİZİLER GC:0,5

1. GTCGGCGTCCCTTGGGTATTTACGCTAGCATCAGGTAGGCTAGCATGTA
 2. TCTTTCCTCCAGGGGTATGCGGGTGCGTGACAAATGAGCAGCAAACGT
 3. AAATTCTCGGCGTGCTTGGTGCTCGTATTTCTCCTGGAGATCAAGGAAA
 4. GCCTGCATAAGGAGACCGGTGTAGCCAAGGACGAAGGCGACCCTAGGTTT
 5. TAACCGTCGACTTCGGCGGTAAGGTATCACTCAGGAAGCAGACACTGATA
 6. GACACGGTCTAGCAGATCGTTTGACGACTAGGTCAAATTGAGTGGTTTAA
 7. TATCGGCATGTCTGGCTTTAGAATTCAGTATAGTGCGCTGATCCGAGTCG
 8. AATTAAAAACACCAGTACCCAAAACCAGGCGGGCTCGCCACGTCGGCTAA
 9. TCCTGGTACATTTTGTAACAATGTTCTGAAGAAAATTTGTGAAAGAAGG
 10. ACGGGTCATCGCCTACTAATAGCAACAACGATCGGCCGCACCTTCCATTG
 11. TCGTGCGACGCTCGGATTACACGGCAAAGGTGCTTGTGTTCCGACAGGC
 12. TAGCATATAATCCTGAGGCGTTACCCCAATCGTTCACCGTCGGATTGCT
 13. ACAGCCCCTGAACGCTACATGTACGAAACCATGTTATGTATGCACTAGGC
 14. CAACAATAGGACGTAGCCTTGTAAGTAGTACGTAGCCTGGTCGCATAAGT
 15. ACAGTAGATCCTCCCCGCGCATCCTATTTATTAAGTTAATTCTACAGCAA
 16. AACGATCATATGCAGATCCGCGAGTGCCGGTAGACACACGTCCACCCCGC
 17. TGCTCTGTGACAGGGACTAAAGAGGCGAAGATTATCGTGTGTGCCCCGTT
 18. ATGGTCGAGTTTCGGTCAGAGCGTCATTGCGAGTAGTCGTTTGCTTTCTCG
 19. AATTCCGAGCGATTAAGCGTGACAGTCCCAGCGAACCACAAAACGTGAT
 20. CGCAGTCCATGCGATCATACGCAAGAAGGAAGGTCCCCATACACCGACGC
 21. ACCAGTTTACACGCCGTATGCATAAACGAGCTGCACAAACGAGAGTGCTT
 22. GAACTGGACCTCTAGTTCCTCTACAAAGAACAGGTTGACCTGTGCGGAAG
 23. TTGCCTTGCTAGATGCAATGTGCGACGTATTACTTTTGCTCAACGGCT
 24. CCTGCTTCGCTGAAACCCAAGACAGGCAACAGTAACCGCCTTTTGAAGG
 25. CGAGTCCTTCGTCTGTGACTAACTGTGCCAAATCGTCTTCCAAACTCCTA
-

Ek-3 DNAidCode'lar

5	4	3	2	1	ID
Simental	Simental	Simental	Holstein	Holstein	Breed
(22/40)	(17/40)	(10/40)	(7/40)	(2/40)	
TR451563243	TR451518010	TR353200163	TR171172847	TR171172835	Ear Tag
DNAidCode	DNAidCode	DNAidCode	DNAidCode	DNAidCode	DNAidCode
TACCTCACTCTGTACTC ATGTTACCTA	TACCTCACTCTGTACTC ATGTTACCTA	TACCTCACTCTGTACTC ATGTTACCTA	TACCTCACTCTGTACTC ATGTTACCTA	TACCTCACTCTGTACTC ATGTTACCTA	Forward primer
TAACGATATCCGGAAC TGCG	TAACGATATCCGGAAC TGCG	TAACGATATCCGGAAC TGCG	TAACGATATCCGGAAC TGCG	TAACGATATCCGGAAC TGCG	DNAidCodeCattleSPS
TTGCCATTCTCCGAGTG TATTACCGTGACGGCG CACGGG	TTGCCATTCTCCGAGTG TATTACCGTGACGGCG CACGGG	TTGCCATTCTCCGAGTG TATTACCGTGACGGCG CACGGG	TTGCCATTCTCCGAGTG TATTACCGTGACGGCG CACGGG	TTGCCATTCTCCGAGTG TATTACCGTGACGGCG CACGGG	EarTagDNAkod
TAGCACAGACGCTCTCG CAITGTGGGAGAGTG ACA	TAGCACAGACGCTCTCG CTCTAGGATATCTATA ACA	TAGCACGTCGCGTGCG GATAATATCTATTGT ACA	TAGCACCTACCTCTCTC TACCGCGAGGAGAAC ACA	TAGCACCTACCTCTCTC TACCGCGAGGAGTGCGC ACA	Gender
TGACTGACA	TGACTGACA	TGACTGACA	CGTTGTATC	CGTTGTATC	Breed
GTGAGGGCGATTCTCTG TCACTAGCGTGCGACCA TACAAATGCTATGATAG	GTGAGGGCGATTCTCTG TCACTAGCGTGCGACCA TACAAATGCTATGATAG	GTGAGGGCGATTCTCTG TCACTAGCGTGCGACCA TACAAATGCTATGATAG	GTGAGGGCGATTCTCTG TCACTAGCGTGCGACCA TACAAATGCTATGATAG	GTGAGGGCGATTCTCTG TCACTAGCGTGCGACCA TACAAATGCTATGATAG	Coordinates
GAATTC	GAATTC	GAATTC	GAATTC	GAATTC	EnzymeCut <ECOR> G/AATTC
ACCTACCCGTACCCGGC CAACAATGTGCGGATG GCGCCAC	GACTCCGGGAAGGGGT TCGCAAGTCGCACCCCTA AACGATG	AGTTTATCCCTCGAAAC TATAGACGTACAGGTCTG AAATCT	TCAGGGCACATCGCTTC CTAGTTCGGCTGGGATC CATCGT	TTGCCATTCTCCGAGTG TATTACCGTGACGGCGC CACGGG	DNAcode
GTTGACCTGTGCGGAAG TTGC	GTTGACCTGTGCGGAAG TTGC	GTTGACCTGTGCGGAAG TTGC	GTTGACCTGTGCGGAAG TTGC	GTTGACCTGTGCGGAAG TTGC	Reverse primer
251	251	251	251	251	Length (bp)
53,39	51	47,8	51,79	52,98	GC content (%)

