

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARS YÖRESİNDE YETİŞTİRİLEN SIĞIR
IRKLARINDAKİ DNA POLİMORFİZMİNİN RAPD-PCR
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Arş. Gör. Alparslan Kadir DEVRİM

Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Necati KAYA

2005-KARS

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

I

ŞEKİLLER DİZİNİ

II

TABLolar DİZİNİ

III

ÖNSÖZ

IV

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1

1.1. NÜKLEİK ASİTLER ve YAPILARI

2

1.1.1. Purinler ve Pirimidinler

2

1.1.2. DNA

4

1.1.3. RNA

6

1.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

8

1.2.1. PCR'in Tanımı

8

1.2.2. PCR'in Tarihçesi

11

1.2.3. PCR'in Kullanım Alanları

12

1.2.3.1. Tanı

12

1.2.3.2. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitki veya Mikroorganizmaların Saptanması.

12

1.2.3.3. Moleküler Klonlama (DNA klonlaması)

13

1.2.3.4. DNA Baz Dizilişlerinin Belirlenmesi

14

1.2.3.5. Genetik Akrabalıkların Belirlenmesi ve Adli Tıp Vakalarının Aydınlatılması

15

1.2.4. PCR'in Mekanizması

15

1.2.5. PCR'in Basamakları

16

1.2.5.1. Denaturasyon

16

1.2.5.2. Primer Yapışması (Annealing)

18

1.2.5.3. Zincirin Uzaması (Extension)

18

1.2.6. PCR Temel Bileşenleri

19

1.2.6.1. Primerler (Oligonükleotidler)

20

1.2.6.2. Deoksiribonükleozid Trifosfatlar (dNTP)

21

1.2.6.3. Kalıp DNA

21

1.2.6.4. Taq DNA Polimeraz	21
1.2.6.5. Mg ²⁺ Derişimi	22
1.2.6.6. PCR Tamponu	23
1.3. GENETİK ÇEŞİTLİLİK ve POPULASYON GENETİĞİ	24
1.3.1. Polimorfizm	24
1.3.2. Hastalığa Neden Olan Gen Değişiklikleri	25
1.3.3. Genetik Çeşitliliğin İncelenmesi	26
1.3.3.1. Polimorfizm Çeşitleri	30
1.3.3.1.1. Morfolojik Polimorfizm	30
1.3.3.1.2. Sitokrom P450 Polimorfizmi	31
1.3.3.1.3 İmmunolojik Polimorfizm	32
1.3.3.1.4 Protein Polimorfizmi	33
1.3.3.1.5 DNA Dizi Polimorfizmi	34
1.3.3.1.5.1. Restriksiyon Enzimlerince Kesilmiş DNA Parçalarındaki Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	35
1.3.3.1.5.2. Ardışık Tekrarların Değişkenliği (VNTRs)	36
1.3.3.1.5.3. Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)	37
1.4. KARS YÖRESİNDE YETİŞTİRİLEN SIĞIR IRKLARI	41
1.5. ÇALIŞMANIN AMACI	47
2. MATERYAL VE METOT	48
2.1. HAYVAN MATERYALI	48
2.2. DNA İZOLASYONU	49
2.2.1. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması	50
2.3. PRİMERLERİN SEÇİMİ	51
2.4. PCR	52
2.4.1. PCR'da Kullanılan Reaktifler	52
2.4.2. Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayısı	53
2.5. ELEKTROFOREZ TEKNİĞİ	56
2.5.1. Elektroforez Çözeltisi	56
2.5.2. Jelin Hazırlanması	56
2.5.3. Jelin Dökülmesi	57

2.5.4. Örneklerin Kuyucuklara Yüklenmesi	57
2.5.5. Örneklerin Elektroforez İşlemi	57
2.6. RAPD BANTLARININ GÖZLENMESİ	58
2.7. RAPD BANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ ve İSTATİSTİKİ ANALİZLER	59
2.7.1. RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi	59
2.7.2. İstatistiki Analizler	60
3. BULGULAR	61
3.1. RAPD BANTLARININ GÖZLENMESİ	61
3.2. RAPD BANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ ve İSTATİSTİK ANALİZLER	72
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	77
4.1. DNA ÖRNEKLERİ ve DNA İZOLASYONU	77
4.2. PRIMERLER	79
4.3. PCR TEKNİĞİ	80
4.4. ELEKTROFOREZ	82
4.5. RAPD BANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ ve İSTATİSTİK ANALİZLER	83
5. ÖZET	91
6. SUMMARY	93
7. KAYNAKLAR	95
8. ÖZGEÇMİŞ	108

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Dünya nüfusunun hızlı artışıyla birlikte, besin ihtiyacının da artması çiftlik hayvanlarının verimlerinin geliştirilmesini kaçınılmaz kılmaktadır. Ekonomik olarak önem taşıyan karakterler üzerinde yapılan seleksiyon o ırkın sahip olduğu genetik varyasyonu azaltmakta ve gen kaynaklarının hızla kaybolmasına neden olmaktadır.

20. yüzyılın ortalarında çeki hayvanı veya et ya da süt üreten olarak birbirinden ayrılan yaklaşık 800 sığır ırkının varlığı tahmin edilmekteydi. İkinci dünya savaşından sonra üretim üzerine yoğun bir ilgi oluşmuş ve ırkların özelleşmesi birkaç ırkın prevalansını artırmıştır. Suni tohumlama, damızlıkların bölgeler arasında değiştirilmesi ve yeni reproduksiyon tekniklerinin keşfi ile bu süreç hızlanmıştır. Bu nedenle genetik farklılığın azalması; soyların ve ırkların kaybolması tarzında ortaya çıkmıştır. 1980'lerden itibaren yürütülen koruma çabalarıyla sığırların genetik farklılıkları korunmaya çalışılmıştır (80).

Korunma altına alınması gereken gen kaynaklarının tamamının süresiz olarak elde tutulması ekonomik olarak güçtür. Bu sebeple korunmasına öncelik verilecek olan ırkların genetik yapılarının ve bu ırklar arası genetik ilişkilerin incelenmesi gerekir. Koruma altına alınacak popülasyonların seçimi ve uygun tekniklerin belirlenmesi ile daha etkin bir koruma yapılabilir (35).

Bir ırkın tanımlanabilmesi ve sahip olduğu özelliklerin belirlenebilmesi için, ırk içi ve ırklar arasında kolaylıkla ölçülebilecek parametrelerin bilinmesine gereksinim vardır (35, 79). Yüzyıllardır sığır ve koyun yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Kars yöresinde yetiştirilmekte olan ırkların genetik yapıları henüz tam olarak bilinmemektedir. Bunun için ilk aşamada bu ırkların genetik

yönden incelenmesi ve genetik varyanslarının ne düzeyde olduğunu belirlenmesi gerekmektedir.

1.1. Nükleik Asitler ve Yapıları

Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) genetik bilginin transferi ve muhafazasından sorumlu, hücreye yerleşmiş zincir şeklindeki makromoleküllerdir. Bunlar tüm hücrelerin ana bileşeni olup, kuru ağırlığın %5 ile 15'ini oluştururlar. Nükleik asit adı, DNA'nın ilk kez nükleustan izole edilmesinden kaynaklanmaktadır.

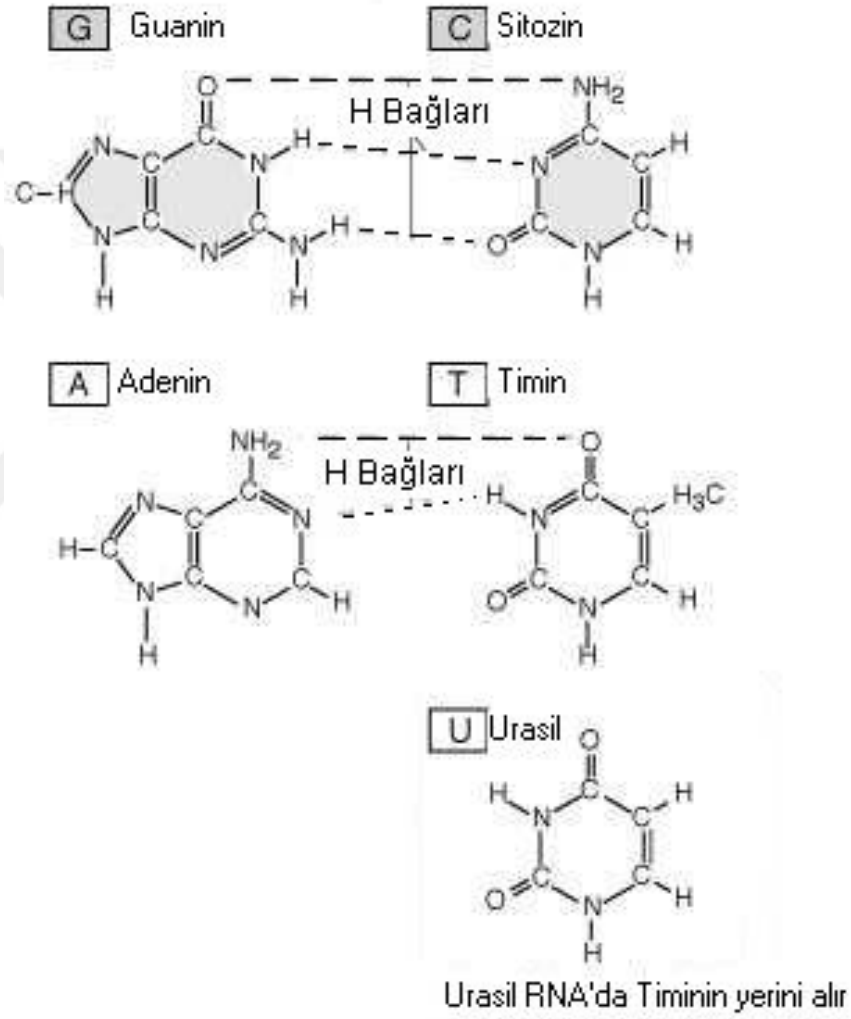
Tıpkı amino asitlerin, polipeptidlerin yapıtaşı olması gibi nükleotidler de nükleik asitlerin yapıtaşları olup, bir nükleotid monomeri karakteristik olarak heterosiklik baz, fosforik asit ve pentoz molekülünü içermektedir.

DNA'nın karakteristik bazları; purin türevi olan adenin ve guanin ile pirimidin türevi olan sitozin ve timin'dir. RNA'nın purin bazları; adenin ve guanin, pirimidin bazları ise sitozin ve urasil'dir. Diğer bir ifade ile; 5-metilurasil olan timin DNA'da, urasil ise RNA'da bulunmaktadır. Bu iki nükleik asit arasındaki diğer bileşim farkı ise, deoksiribonükleotidlerin pentoz bileşeni olarak 2-deoksi-D-ribozu, ribonükleotidlerin ise D-ribozu içermesidir. Her iki şeker de nükleotidlerde furanoz yapıda bulunur. Pentoz şeker, baza β -N-glikozil bağı ile bağlanır. Nükleotidlerin fosfat grubu ise, pentozun karbon atomuyla ester bağı yapar. Nükleotidlerin fosfat gruplarının hidrolizle uzaklaştırılmasıyla oluşan yapıya da nükleozid adı verilmektedir (57). Şekil 1.1.'de nükleik asitlerin yapısındaki azotlu bazların formülleri gösterilmektedir.

1.1.1. Purinler ve Pirimidinler

Nükleotidlerde bulunan azotlu bazların ana bileşeni, heterosiklik bileşikler olan ve aromatik karakteri belirleyen purin ve pirimidindir. Purin, pirimidin

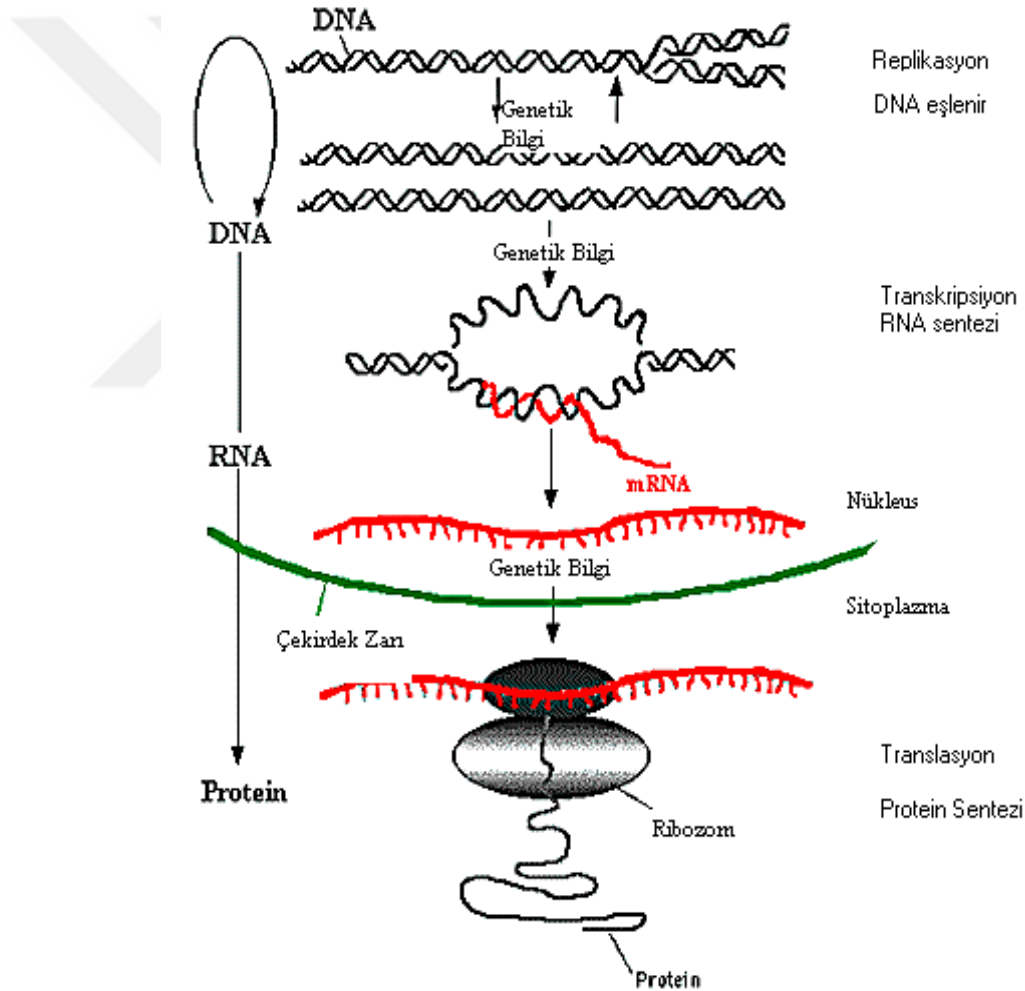
türevi olup, bir pirimidin, bir de imidazol halkasının birleşmesiyle oluşur. Pirimidin türevleri olan urasil, timin ve sitozin ile purin türevleri olan adenin ve guanin, nükleotidlerin temel azotlu bazlarını teşkil eder. Birçok hücrede bu bazların serbest formları nükleik asitlerin enzimatik hidrolizi sonrasında eser miktarda ortaya çıkar (57).



Şekil 1.1. Nükleik Asitlerin Yapısındaki Azotlu Bazlar (106)

1.1.2. DNA

DNA, 1869’ da başlayan yoğun çalışmalar sonucu, ilk kez Friedrich Miescher tarafından irindeki hücrelerden ve alabalık sperminden izole edilmiştir. Miescher elde ettiği izolata, hücre çekirdeğinde yer almasından dolayı ‘nüklein’ adını vermiştir. Takip eden 70 yıl boyunca yapılan çalışmalar nükleik asitlerin ana iskelet yapısını ve temel yapıtaşlarını ortaya koymuştur (57). Şekil 1.2.’de genetik bilginin aktarımı gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Genetik Bilginin Aktarımı (106)

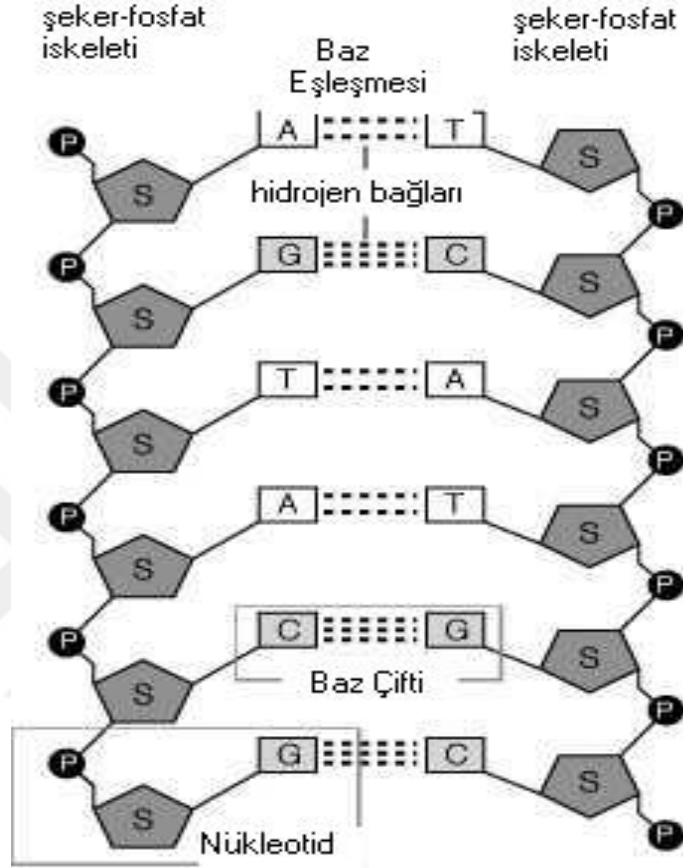
DNA'lar yüksek molekül ağırlıklı polinükleotidlerdir. Çok sayıda nükleotidin, fosfodiester bağlarıyla bağlanmaları sonucu oluşmuşlardır. Fosforik asidin bağlanma yeri 3' ve 5' karbonlarına bağlı -OH gruplarıdır. DNA molekülü, pentoz fosfat zinciri dış tarafta ve nükleobazlar iç tarafta olmak üzere birbirine helezon şeklinde dolanmış iki polinükleotid zincirinden meydana gelmiştir. Şekil 1.3.'te DNA molekülünün yapısı ve baz eşleşmesi gösterilmektedir.

Her iki zincirin terminal fosfat grupları zıt yönlerdeki uçlarda bulunduklarından, bu zincirler birbirine karşıt yönlerde uzanırlar. Bu nedenle her bir zincirdeki nükleotidler arası bağlanmalarda fosfat birimleri bir nükleotid biriminde bulunan deoksipentozun C-3' atomundan sonra gelen nükleotiddeki pentozun C-5' atomuna, diğer zincirde ise C-5' atomundan C-3' atomuna olacak şekilde devam eder (54).

DNA'ların yapısında adenin, guanin, sitozin ve timin nükleobazları bulunur. Kantitatif analizler, DNA'larda adenin ile timinin ve guanin ile sitozinin mol oranının 1/1 olduğunu göstermiştir. DNA molekülünün yapısındaki iki polinükleotid zincirinden birinin pirimidin bazı diğerinin pirimidin bazıyla hidrojen bağı yapacak kadar yakın değildir. İki purin bazı ise helezon içine sığmaz. Bu nedenle bir polinükleotid zincirinin pirimidin bazı diğer polinükleotid zincirinin purin bazına hidrojen bağı ile bağlanabilir. Böylece, adenin-timin ve guanin-sitozin baz çiftleri meydana gelmiş olur (54, 57).

DNA'lar genetik bilgiyi içeren biyomoleküller olup, protein sentezinde amino asit dizisini belirlerler. Bu bilgi aktarımı, aracı madde olan haberci RNA (mRNA) tarafından yapılır. DNA sadece yüksek organizmaların ve bakterilerin değil, virusların da genetik materyalidir. Ancak DNA miktarı, dolayısıyla bilgi içeriği; yüksek organizmalar, bakteriler ve viruslarda farklılık gösterir. Bakterilerde kromozom yanında, plazmid denen küçük DNA molekülüleri de bulunur. Yüksek organizmalarda hücre çekirdeğindeki DNA'nın yanı sıra, mitokondrilerde de DNA vardır. Genler sadece proteinler için

bilgi taşımaz. Transfer RNA (tRNA) ve ribozomal RNA (rRNA)'nın zincir sırası da DNA tarafından kodlanır (54).



Şekil 1.3. DNA'daki Baz Eşleşmesi (106)

1.1.3. RNA

Ribonükleotidlerin oluşturduğu bir polinükleotid olup, sentezi DNA'ninkine çok benzer. 3' ve 5' -OH grupları üzerinden, fosforik asitle birbirine bağlanmış çok sayıda nükleozidden oluşur. Biyofonksiyonlarına göre üç çeşit RNA vardır. Bunlar; tRNA, rRNA ve mRNA' dır.

Bu üç RNA çeşidinin molekül büyüklükleri de farklıdır. En küçük molekül (75-90 nükleotid) RNA' lar tRNA' lar olup, hücre RNA' nın %10-20'sini oluşturur. tRNA adı, protein biyosentezinde amino asit taşıyıcısı olmalarından dolayı verilmiştir. Peptid bağı sentezinde bir amino asit ile mRNA arasındaki uyumu sağlarlar. Protein yapısına giren 20 amino asitten her biri için spesifik, en azından bir tRNA molekülü vardır.

Toplam hücre RNA'sının büyük bir kısmını rRNA'lar oluşturur. Hatta bazı bakterilerde bu miktar %80 kadardır. rRNA'lar doğrudan doğruya ribozomal proteinlerle ilgili olup, bu yapıların kuru ağırlığının yaklaşık %40-50'sini oluşturur.

Çok sayıda büyük molekülden meydana gelen mRNA'lar, hücre çekirdeğindeki ön maddelerden sentez edilirler. mRNA'lar, sentez edilecek özel proteinin peptid zincirindeki amino asitlerin diziliş sırasına ait genetik bilgiyi, nükleusdan sitoplazmaya taşırlar. Bu nedenle haberci RNA olarak adlandırılırlar (54).

1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR)

1.2.1. PCR' in Tanımı

PCR, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş, bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlar altında, kimyasal olarak sentezlenmiş olan oligonükleotid primerler ve saflaştırılarak elde edilmiş olan *Taq* polimeraz enzimleri kullanılarak bir otomatik 'thermocycle' sistem yardımıyla çoğaltılma metodudur (2, 92).

DNA'nın *in vitro* koşullarda çoğaltılmasının başlıca amaçları; özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması, genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde edilerek gen aktarımı için kullanılması ve ekonomik özellikleri ifade eden genlerin tespit edilmesidir.

DNA, hücrelerde replikasyon ile çoğalır. DNA çift sarmalından ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Böylece, hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere tüm genler aynen geçer. Her yeni hücre jenerasyonunda genlerin kopya sayılarının iki katına çıkması nedeniyle, jenerasyonlar boyunca DNA miktarı başlangıca göre üssel olarak artar. Örneğin 30 jenerasyon sonra hücre ve gen sayısında milyarlarca kez artış olur. *In vitro* koşullarda istenilen bir genin ya da DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA klonlanmasına ek olarak, 1980'li yıllardan itibaren PCR da kullanılmaya başlamıştır (25, 37, 98).

PCR ile istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. Aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi PCR, replikasyon sürecini taklit ederek seçilmiş bir DNA dizisinin yaklaşık milyar katını kopyalar (2, 98).

PCR'da amaç, dizilimi bilinen iki bölge arasında bulunan bir DNA parçasını çoğaltmaktır. Bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimenin primeri olarak, iki oligonükleotid kullanılır. Bu oligonükleotidler tipik olarak farklı dizilere sahiptir. Yine bu oligonükleotidler, kalıp DNA'nın karşı dizilerinde uzanan ve amplifiye olacak DNA'nın parçası yanında bulunan dizilere eştirler. Kalıp DNA ilk önce primer ve deoksiribonükleozid trifosfatların (dNTP) varlığında ısıyla denatüre edilir. Daha sonra tepkime karışımının ısısı, oligonükleotid primerlerinin kalıp dizilere yapışmasına olanak verecek şekilde düşürülür. Primerler yapıştıktan sonra belirlenen uzama ısısına çıkarılarak DNA polimeraz ile uzatılır. Denatürasyon, yapışma (annealing) ve DNA sentezi döngüleri sonradan birçok kez tekrarlanır. Amplifikasyonun bir döngüsünün ürünleri sonraki için kalıp işlevi gördüğünden, her bir başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar (2, 26).

Bu tepkimede üssel olarak artan temel ürün, terminal ucun oligonükleotidin 5' ucu tarafından belirlendiği ve uzunluğunun primerler arasındaki mesafe tarafından oluşturulduğu, çift zincirli bir DNA parçasıdır. Tepkime sırasında daha uzun DNA molekülleri oluşturulur. Örneğin, amplifikasyonun ilk basamağının ürünleri heterojen büyüklükteki DNA molekülleri. Bu DNA moleküllerinin uzunlukları, iki primerin bağlanma bölgeleri arasındaki mesafeyi aşabilir. Bu moleküller amplifikasyonun ilerleyen aşamalarında; üssel tarzda birikmiş, tepkimenin baskın ürünlerini oluşturmuş ve belirlenmiş uzunluğa sahip DNA'ları oluştururlar. PCR'da, yapışmış oligonükleotid primerlerinin, uzama reaksiyonlarının katalizlenmesinde, *E. coli* DNA polimeraz I kullanılmıştır. Bu enzim, DNA'yı denatüre etmek için ihtiyaç duyulan ısılarda etkisizleştirdiğinden dolayı, sentezin her döngüsünde yeniden enzim eklenmesini gerektirmiştir. Bu tepkimeler genellikle DNA'nın küçük parçalarının (<200 bp) amplifikasyonu için iyi çalışmakla beraber, daha büyük kalıp dizilerinde beklenen sonucu vermemiştir. Oligonükleotidlerin enzimatik uzama safhalarında, uygulanan ısılardan dolayı hatalı dizilimler gözlenmiştir.

Bu sebeple PCR verimi zayıf, ürünler ise heterojen büyüklüklerde olmuştur (39, 43, 45).

Termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan saflaştırılan, ısıya dayanıklı bir DNA polimerazının kullanımıyla, anılan problemler ortadan kaldırılmıştır. 95°C'lık inkübasyonda canlı kalabilen bu enzim, denatürasyon basamağındaki ısıyla etkisizleşmemekte ve amplifikasyon döngüsünün her aşamasında tepkimeye yeniden eklenme ihtiyacını göstermemektedir. Elde edilen başka bir avantaj ise; oligonükleotidlerin yapışma ve uzaması için gerekli yüksek ısılarda ortaya çıkan hatalı dizilimin büyük oranda azalmasıdır. Böylece, amplifikasyon tepkimesinin veriminde, özgünlüğünde ve amplifiye olmuş ürünün büyüklüğünde önemli iyileşmeler olmuştur (39, 45).

Hedef dizilerin üssel amplifikasyonu sınırsız bir işlem değildir. Normal tepkime koşullarında *Taq* DNA polimerazının miktarı, amplifikasyonun 25-30 döngüsünden, yani yaklaşık olarak 10^6 kezlik bir amplifikasyon düzeyine ulaştırıldıktan sonra giderek kısıtlanır. Daha ileri bir amplifikasyon gerekirse, amplifiye olmuş DNA örneği 1.000-10.000 kez sulandırılarak taze polimeraz zincir tepkimesinde, sentezin daha ileri döngüleri için, kalıp olarak kullanılabilir (39, 45, 46).

PCR'ın etkinliği, onun özgünlüğü, verimliliği ve doğruluğu ile ölçülür. Yüksek oranda özgün bir PCR, tasarlanmış hedef dizisini içeren bir amplifikasyon ürününü oluşturmalıdır. Verimli bir amplifikasyon ise birkaç döngüyle daha çok ürün oluşturandır. Yüksek oranda doğru bir PCR, ürününde DNA polimerazdan kaynaklanmış hataların önemsiz bir miktarını içerir. İdeal bir PCR, yüksek özgünlük, verim ve doğruluğa sahip olmalıdır. Bu üç değişkenin her biri, tampon şartları, PCR döngü rejimi (örneğin her bir basamağın ısı ve süresi) ve DNA polimerazı gibi çeşitli PCR bileşenleri tarafından etkilenir. Maksimum özgünlük için ayarlanan koşullar, yüksek verimle uyumlu olmayabilir. Keza PCR'ın doğruluğu için koşulların en uygun hale getirilmesi, azalmış verimlilik ile sonuçlanabilir. Böylece bir PCR kurulacağı zaman bu üç

değişkenden hangisinin tasarlanan uygulama için en önemli olduğu bilinmeli ve ona göre PCR koşulları en iyi duruma getirilmelidir. Örneğin, homojen bir hücre topluluğunun direkt dizi analizi için PCR verimi ve özgünlüğü, doğruluğundan daha önemlidir. Diğer taraftan, bireysel DNA molekülleri ya da heterojen bir popülasyondaki nadir mutasyon çalışmaları için PCR'in doğruluğu yaşamsaldır (101).

1.2.2. PCR'in Tarihçesi

Günümüzde PCR olarak anılan, üssel *in vitro* DNA amplifikasyonunun prensibi ilk kez 1974'te kimyasal gen sentezine bir alternatif olarak Panet ve Khorana tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem adını, Cetus adlı şirkette çalışan ve 1985'te tek kopya genlerinin çoğaltılmasını tanımlayan, Mullis ve yardımcılarının almıştır (92, 97). PCR ilk defa 1985 yılında Saiki ve çalışma arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin teşhisi amacıyla geliştirilmiş ve kullanılmış bir tekniktir. 1988 yılında *Thermus aquaticus* adlı bakteriden yüksek sıcaklıklara dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enziminin izole edilmesi ve bu enzimin DNA amplifikasyonu için kullanıma sunulması, PCR' in uygulama alan ve amaçlarını genişletmiştir. Daha sonraki yıllarda çeşitli amaçlarla kullanılan bu metot sayesinde tıp, veteriner hekimlik, biyoloji ve genetik ile ilgili bilim dallarında çok sayıda yeni buluşlar ve gelişmeler olmuştur (14, 23, 24, 92, 101).

1980'li yılların ortalarında, Cetus firması araştırmacıları tarafından geliştirilmesinin ardından, mikrobiyolojik çalışmalarda, temel moleküler biyolojik araştırmalarda (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrosis, 'fragileX' sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta, hızla kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından, spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilebilir hale gelmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur (1, 9, 28, 96, 98).

1.2.3. PCR'ın Kullanım Alanları

1.2.3.1. Tanı

Tıp ve veteriner hekimlik sahalarında, birçok bakteriyel hastalığın teşhisinde PCR'dan yararlanılmaktadır (51, 73). *Mycobacterium tuberculosis* ve *M.bovis*'in farklılıklarını değişik PCR yöntemleri ile araştıran bazı çalışmalar bunlara örnek olarak verilebilir (9, 40, 72, 100). Artroplasti sonrası ortaya çıkan enfeksiyonların, deniz suyundaki mikrobiyal kirliliğin ve kanatlı sağlığını tehdit eden insan patojenlerinin belirlenmelerinde de PCR'dan yararlanılmaktadır (60, 61, 76). Subklinik Jonne's hastalığının ve Leptospirosisin prevalansını araştıran bazı çalışmalarda bakteri kültürü yöntemine göre PCR, uygulanabilirlik olarak daha basit ve hızlı bulunmuştur (23, 24).

PCR birçok viral etkenin tanısında da kullanılmaktadır. Örnek olarak; 'malignant catarrhal fever' adlı viral hastalığın sığır, geyik ve bufalodaki teşhisi PCR ile gerçekleştirilmiştir (99).

Paraziter etkenlerin tanısında da PCR kullanımı yaygınlaşmaktadır. Örnek olarak; Avustralya'da yapılan bir çalışmada *Babesia bovis* parazitlerinin genotipi belirlenmiştir (14). Yine PCR tekniği kullanılarak, maya türleri olan *Saccharomyces cerevisiae* PTH 281 ile nativ DBY 947 karşılaştırılmıştır (1).

1.2.3.2. Genetik Yapısı Değiştirilmiş Bitki veya Mikroorganizmaların Saptanması

Genetik yapısı değiştirilmiş bitki ve mikroorganizmaları fenotipik özelliklerine göre doğal ebeveynlerinden ayırmak mümkün değildir. Bu tür bitki, mikroorganizma veya onların ürünlerinin saptanması için PCR tekniğinden faydalanılmaktadır (48, 92).

Klonlanan genlerin baz dizilişleri bilindiği için, istenirse bu genlere spesifik olan oligonükleotid primerler düzenlenebilir ve test edilmek istenen materyalin klonlanmış bir gen içerip içermediği saptanabilir. Nitekim karantinaya tabi transgenik ürünlerin, ülkeler arasında transferini engellemek amacıyla PCR tekniği kullanılmaktadır (92).

1.2.3.3. Moleküler Klonlama (DNA klonlaması)

PCR kullanımı, tüm moleküler biyoloji sahasında yaygınlaşmıştır. Bu alanlardan biri de moleküler klonlamadır (78). Bir canlı hücre içerisindeki genetik materyal (DNA veya RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin, sınırsız miktarda ve saf olarak çoğaltılmasına moleküler klonlama veya DNA klonlaması denir. Bu amaçla takip edilen metot kısaca şöyle özetlenebilir: İlk önce çalışılmak istenen genetik materyal saf olarak izole edilir ve restriksiyon enzimleriyle kesilir (25, 92). Elde edilen küçük DNA parçaları vektör kromozomlara (plazmid veya kozmid) aktarılır. Bu işlem klonlama olarak adlandırılır.

Bu yöntem için oldukça fazla miktarda saf olarak izole edilmiş genetik materyal ve yoğun iş gücü gereklidir. PCR metodu geliştirildikten sonra, DNA klonlaması, oldukça kolay ve pratik olmuştur. Bunun için sadece, DNA üzerinde klonlanması arzu edilen bölgenin baz dizisi hakkında ön bilgiye ihtiyaç vardır. Bu bilgiye dayanarak sentezlenen oligonükleotid primerler kullanılarak, DNA üzerinde istenilen bölgeler amplifiye edilir. Nitekim, kalıp DNA üzerindeki spesifik bir bölgenin PCR ile amplifiye edilmesi sonucu ortaya çıkan kopyaların her birisi bir DNA klonudur. Eğer PCR’da kullanılan primerler, kalıp DNA üzerinde bilinen bir genin tamamını amplifiye ediyorsa, klonlanmış DNA parçası bir klon olarak vektörlere transfer edilerek, *in-vivo* şartlarda ekspresyonu sağlanabilir. Son yıllarda özellikle izole edilen mRNA ya da virus ve viroid RNA’larından elde edilen DNA’ların klonlanmasında, PCR metodu tercih edilmektedir (58, 92).

1.2.3.4. DNA Baz Dizilişlerinin Belirlenmesi

Klonlanmış DNA'ların baz dizilerinin belirlenmesine ilk defa 1960'lı yıllarda başlanılmıştır (92). 1977'de teknik daha da gelişerek insan mitokondriyal genomunun dizi analizine, 1982'de ise Lambda bakteriyofaj genomunun dizi analizine olanak vermiştir (90). Bugün gerek genomik DNA ve gerekse mRNA'ların PCR ile amplifiye edildikten sonra elde edilen DNA parçacıklarının baz dizileri, gen dizilimini belirleyen cihazlarla (Gene Sequencer) otomatik olarak belirlenebilmektedir (87, 92).

PCR, DNA'daki en ufak değışikliğı kolayca tespit edebilir. Bu şekilde sadece kalıtsal hastalıklar değil, aynı zamanda sonradan meydana gelen mutasyonları da teşhis etmek mümkündür. Etkinleşmiş onkojen mutasyonlarının analizi (örnek olarak; kronik myelojenik lösemide BCR/abl ve p53 tümör süpressör genleri) PCR ile yapılabilmektedir (75).

Bunun için öncelikle mutasyonun meydana geldiğı DNA bölgesi PCR ile amplifiye edilir. Sonra amplifiye edilen DNA bölgesinin baz dizilişı saptanarak mutasyon noktaları taranır. Buna ilave olarak, amplifiye edilmiş DNA parçacıklarının endonükleazlar ile kesilmesini takiben, agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılan DNA bant profillerine göre de mutasyonun analizi yapılabilir (92). Bunun yanında PCR kullanılarak memeli genomunun haritalanması da yapılmaktadır (74, 84, 89, 105, 108). PCR sayesinde 300 bp'lik bölgelerdeki kromozomal proteinlerin bile hızlı ve duyarlı bir şekilde haritalandırılması, ırka, popülasyona ve cinsiyete özgü DNA bantlarının tanımlanması da mümkün olmaktadır (42, 52, 64, 69, 102).

Prenatal tanıda da PCR genişçe kullanılmaktadır. Bazı kalıtsal hastalıkların teşhisi ve fötusun kan grubunun belirlenmesi doğum öncesinde PCR ile gerçekleştirilebilir. Özellikle β -talasemi ve Duchenne musküler distrofisi gibi hastalıkların gebelik sürerken teşhisi yapıp, genetik danışmanlıkla birlikte annenin izni alınarak terminasyona gidilebilir ve böylece sakat doğumların

önüne geçilebilir (88, 92). Yine sık rastlanan ve tedavi edilebilir bir genetik hastalık olan venöz tromboemboli olgularının erken teşhisinde de PCR uygulamalarından yararlanılmaktadır (77). MSS ve immun sistem gibi kompleks heterogenöz dokuların gen analizi de PCR ile yapılabilmektedir (27).

1.2.3.5. Genetik Akrabalıkların Belirlenmesi ve Adli Tıp Vakalarının Aydınlatılması

Bugün genetik akrabalıkların belirlenmesinde ve adli tıp vakalarının aydınlatılmasında PCR yaygın olarak kullanılmaktadır. Adli tıp olaylarında suç işlenen mekanlarda, suçluya ait olduğuna inanılarak toplanan doku veya hücrelerden (kıl, kan vb.) DNA izole edilir. Bu DNA örneği ile suç zanlısı olarak kabul edilen kişilerden alınan DNA örnekleri, PCR yöntemi ile karşılaştırılarak gerçek suçlu saptanır. Aynı metot farklı bireyler arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesinde de kullanılır. Sitoplazma ile taşınan mitokondriyal genlerin PCR ile amplifikasyonu ise ebeveyn testlerinde kullanılan bir başka genetik analiz yöntemidir (92).

1.2.4. PCR'ın Mekanizması

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da adlandırılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle melezlenirler. Primerlerin, spesifik olan hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir.

DNA polimeraz, uygun tampon ve dört çeşit dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı

olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Şekil 1.4.'te PCR amplifikasyonunun safhaları gösterilmektedir.

Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ard arda tekrarlanan denatürasyon, primerin bağlanması ve uzaması evreleriyle DNA parçacıkları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde, diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır. Potansiyel olarak her döngünün %100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucu 2^{20} kat ürün meydana gelir.

PCR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimerazdır. Normalde reaksiyona eklenen enzim, 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Verimliliği azaltan bir diğer faktör de derişimi artan hedef dizilerin, primer ile bağlanma yarışdır (68, 98).

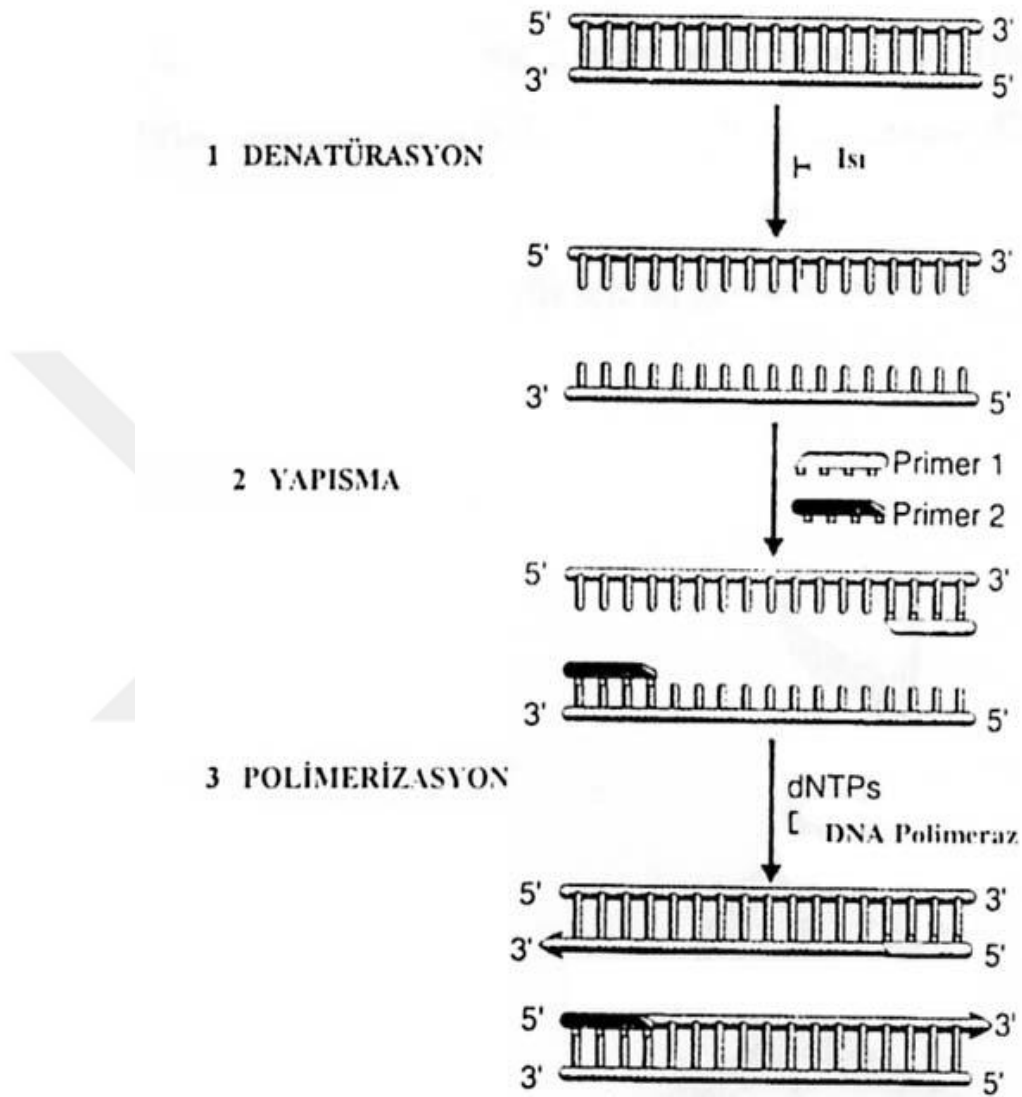
1.2.5. PCR'ın Basamakları

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsü aşağıda belirtilen 3 basamakta cereyan eder:

1.2.5.1. Denatürasyon

Denatürasyon, çift zincirli DNA moleküllerinin sıcaklıkla açılmasıdır. G+C'ce zengin dizilerde daha yüksek ısı gerekebilir. Denatürasyonun tam olmaması halinde verim düşer. DNA'nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise *Taq* DNA polimeraz aktivitesini düşürür. Bundan dolayı DNA denatüre edilirken dikkatli olunmalıdır. *Taq* DNA polimerazın yarı ömrü 92,5°C'de 2

saatten fazla, 95°C'de 40 dakika, 97°C'de ise 5 dakika olması nedeniyle yüksek ısı gereksiz aktivite kayıplarına neden olabilir (92, 101).



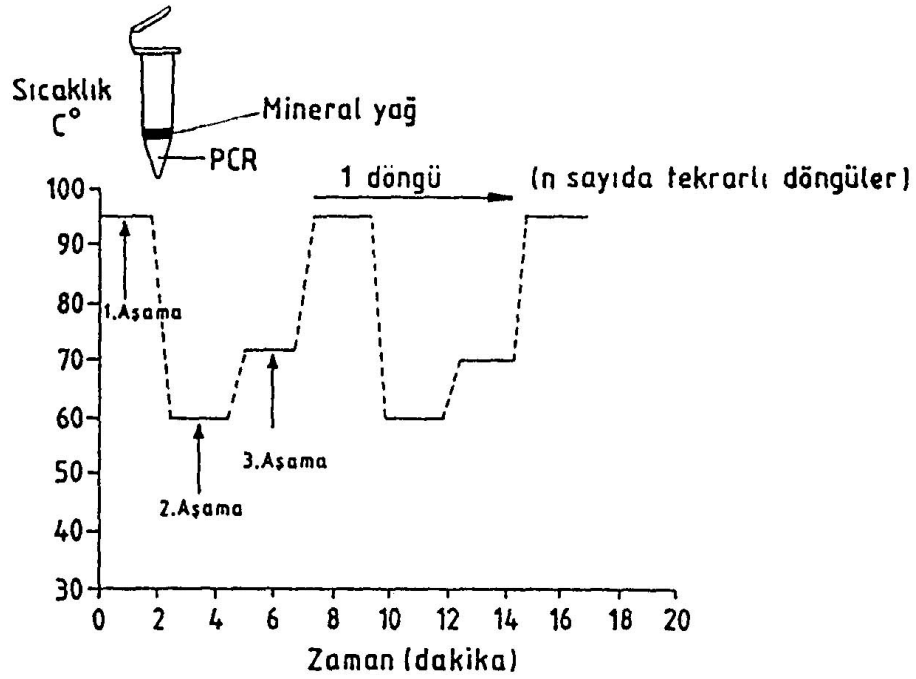
Şekil 1.4. PCR Amplifikasyonu (94)

1.2.5.2. Primer Yapışması (Annealing)

Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu ve uygulanacak ısı, primerlerin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağıdır. *Taq* DNA polimeraz, ısıların sınır aralıkları üzerinde etkin olduğundan; primer uzaması yapışma basamağını da kapsayan düşük ısılarda oluşacaktır. Tipik primer derişiminde (0.2 μ M) yapışma yalnızca birkaç saniye sürmektedir. Yapışma ısısının artırılması, yanlış olarak yapışmış primerlere karşı ayırt etme yetisini artırır ve primerlerin 3' ucundaki yanlış nükleotidlerin hatalı uzamasını azaltır. Bundan dolayı özellikle birkaç döngü sırasındaki yüksek yapışma ısıları, özgünlüğün artırılmasına yardımcı olacaktır. Yüksek dNTP derişimleri ile birlikte düşük uzama ısıları, hatalı birleşmiş nükleotidlere ve primerlerin hatalı uzamasına neden olur (62, 101).

1.2.5.3. Zincirin Uzaması (Extension)

Zincir uzaması 5'→3' yönünde olup, uzama hızı 35-100 nükleotid/saniyedir. Uzama zamanı; hedef dizinin derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağıdır. Genellikle uzama süresi 72°C'de 1 dakikadır. Döngü sayısı, başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA'nın derişimine bağıdır. Çok döngü, hatalara yol açarak spesifik olmayan arka plan ürünlerini oluşturur. İstenilen ürünün 0,3-1 pmol civarına ulaşması ile birlikte oluşan ürünün üssel olarak azalmasına, plato etkisi denir. Bunun nedeni; substrat kullanımının azalması, enzimin kararsız hale gelmesi, son ürün inhibisyonu, spesifik olmayan ürün veya primer-dimer yapışması ve ürünün tam olarak denatüre olmamasıdır (92). Aşağıdaki şekilde PCR sıcaklık döngüleri gösterilmektedir.



Şekil 1.5. PCR Sıcaklık Döngüleri: 1.Aşama: Denatürasyon, 2. Aşama: Primerin Bağlanması, 3.Aşama: Sentez (98)

1.2.6. PCR Temel Bileşenleri

PCR reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli maddeler; kalıp DNA, primerler (oligonükleotidler), dNTP karışımı, *Taq* DNA polimeraz, Mg^{+2} ve PCR tamponudur (43, 45, 92, 98).

PCR'ın kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı; numune, amplifiye olacak bölgenin uzunluğu ve primerlerin dizilimi tarafından belirlenir. 20 döngü, kalıbın 1.000.000 kez amplifikasyonuna neden olur. Tepkimelerin etkinliğini bozan nedenler; primerlerin numune DNA'sının hedef olmayan bölgelerine yapışması, yüksek ısıda polimerazın derece derece etkisizleşmesi, hazırlanmış kalıbın tam olmayan uzaması olarak özetlenebilir. Tepkime koşulları değişken olup, en yüksek duyarlılık için dikkatlice yönetilmeye ve en verimli hale getirilmeye gereksinim duyar. Bu nedenle en

uygun koşullar aşağıda açıklanan PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır (43, 46, 101).

1.2.6.1. Primerler (Oligonükleotidler)

Gen çoğaltılması dahil PCR'ın birçok uygulaması için, kalıp DNA'ya tamamen tamamlayıcı olan primerlere ihtiyaç vardır. Oligonükleotid primerler, primer sentezi yapan laboratuvarlardan elde edilebilirler. Primer tasarımı yapılırken, çoğaltılması istenen DNA dizisinin iki ucundaki dizisi bilinen kısımlar dikkate alınır. Bu bölgelere tamamlayıcı olan primerler tasarlanır. Primer tasarımı yapmak için bilgisayar programları da geliştirilmiş olmakla birlikte, çoğu zaman araştırmacılar ilgilendikleri genleri ya da DNA parçalarını çoğaltmak için kendileri primer tasarımı yapmak durumundadırlar. Tasarım yapılırken mümkün olduğunca dört bazın eşit sayıda kullanımına dikkat edilir. Sonucu olumsuz etkileyen koşulları en aza indirmek için önem verilmesi gereken bazı noktalar; primerlerin polipurin, polipirimidin ya da tekrarlı bölgeler içermemesi, primer çiftlerinin 3' uçlarının birbirine ya da primer içindeki bir bölgeye tamamlayıcı olmamasıdır (98).

PCR'da başarılı bir amplifikasyon için, oligonükleotid primerlerin doğru tasarlanması önemli bir faktördür. Primer tasarımı; PCR ürününün yerini ve büyüklüğünü tanımlamakla birlikte büyük oranda verimini de etkiler. Kötü olarak tasarlanmış primer kullanıldığında ya çok az ürün elde edilir, ya da hiç elde edilmez iken, doğru olarak tasarlanmış primerler tepkimenin üssel fazında kuramsal ürün birikim değerine yakın bir ürün miktarı oluşturur. Başarılı bir PCR amplifikasyonu için iyi bir primer tasarımına ilave olarak; tepkime koşullarının en uygun şekle getirilmesi (Mg^{+2} derişiminin ayarlanması gibi) ve özgün yardımcı çözücülerin (örneğin; dimetilsülfoksit, formamit, gliserol) kullanılması gerekebilir (81, 101).

1.2.6.2. Deoksiribonükleozid Trifosfatlar (dNTP)

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta, ya tek tek, ya da dÖrtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Düşük dNTP derişimlerinde (10-100 μ M), *Taq* DNA polimeraz kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 μ M dNTP derişimi ile gerçekleştirilir. Ayrıca optimal dNTP derişimi; reaksiyon koşullarına, PCR döngü sayısına, $MgCl_2$ ve primer derişimlerine ve çoğaltılmış ürünün boyuna bağlıdır. Uygulanacak PCR için en uygun dNTP derişimi deneysel olarak belirlenmelidir (98).

1.2.6.3. Kalıp DNA

PCR'da; genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir (98). Hedef dizileri içeren DNA, tek veya çift zincirli şekilde PCR karışımına eklenebilir. Kalıp DNA diğer doğrusal DNA'lardan çok, kapalı dairesel DNA'ları taşıyorsa daha az etkin olarak amplifiye edilir. Bundan dolayı, PCR'da plazmid DNA'larını kalıp olarak kullanmadan önce, doğrusal hale getirmek gerekir (101).

1.2.6.4. *Taq* DNA Polimeraz

Thermus aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Değişik türleri vardır. Enzim 5' $\rightarrow$ 3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir (92). DNA sentezinin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA iplikçığının polimerizasyonu sağlanır. DNA polimerazlar, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak dört çeşit dNTP'den uzun polinükleotid zincirin sentezini kataliz ederler. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) ihtiyaç duyarlar (98).

Taq DNA polimeraz yüksek derişimlerde spesifik olmayan ürünlere, düşük derişimlerde ise yetersiz ürün oluşmasına sebep olabilir. Önerilen miktar; 100µl 'lik bir hacim için 1-5 ünitelerdir. Bununla beraber amplifikasyon bölgesine göre bu miktar değişebilir (92).

Termostabil DNA polimerazın PCR'da kullanılmaya başlanması, araştırma ve klinik laboratuvarlarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Daha önce kullanılan ve *Escherichia coli*'den elde edilen DNA polimeraz I, sıcaklığa dayanıklı olmadığı için her PCR döngüsünde denatürasyon aşamasından sonra yeniden eklenme zorunluluğu göstermekteydi. Ancak günümüzde kullanılan termostabil DNA polimerazlarla bu sorun ortadan kaldırıldığından, enzimin amplifikasyondan önce tüplere konulması yeterli olmaktadır.

Termostabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*'tan elde edilen *Taq* DNA polimeraz'dır. Bunun dışında *T. aquaticus*'tan Amplitaq, *T. flavis*'ten HotTub ve Pyrotase, *T. thermophilus*'tan Tth, *Pyrococcus furiosus*'tan Pfu, *Thermococcus litoralis*'ten Vent gibi diğer termostabil enzimler de kullanılmaktadır. *Taq* DNA polimerazın bazı enzimatik özellikleri arasında; optimum sıcaklıkta (70-80°C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonunu yapması ve 5' → 3' ekzonükleaz aktivitesine sahip olması sayılabilir (98).

1.2.6.5. Mg⁺² Derişimi

Mg⁺² iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini uyarırlar ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini (çift iplikli nükleik asit moleküllerindeki baz çiftlerinin yarısının ortadan kalkmasına neden olan sıcaklığı) artırır. Ayrıca primer-kalıp etkileşimini sağlarlar. Bu nedenle MgCl₂'ün PCR'ın özgünlüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. MgCl₂'ün reaksiyon karışımındaki son derişimi değişebilmekle birlikte; genellikle 0,5-5,0 mM arasındaki değerler (Optimum 1,0-1,5 mM)

kullanılmaktadır. Düşük Mg^{+2} derişimi ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg^{+2} derişimi ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar. $MgCl_2$ içeren tamponlar kullanılıyorsa, ayrıca $MgCl_2$ kullanımına gerek yoktur (98).

1.2.6.6. PCR Tamponu

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında en çok kullanılanı Taq/Amplitaq enzimlerine özgü olan tampondur. Diğer enzimler için de benzer tamponlar bulunmakta ve bunlar çoğunlukla satın alınan enzimle birlikte 10 katı derişimde sağlanabilmektedir (98).

PCR için uygun tampon 10-50 mM arasında değişen Tris-HCl'dir. Tamponun pH' sı ise 8,3-8,8 arasında değişir. Bu tampona 50mM kadar KCl çözeltisinin eklenmesi primer yapışmasını kolaylaştırır. Ancak 50 mM'ın üzerindeki KCl ve NaCl çözeltilerinin eklenmesi, Taq DNA Polimeraz aktivitesini düşürür. %10 ve daha az derişimdeki dimetilsülfoksit de yararlıdır. Jelatin, sığır serum albumini (BSA), Tween-20 ve Laureth-12 gibi iyonik olmayan maddelerin enzim kararlılığına etkisi vardır, fakat mutlak zorunlu değildir (92).

1.3. Genetik Çeşitlilik ve Populasyon Genetiği

Varyasyon, diğer bir ifadeyle genetik çeşitlilik; ebeveynler ve yavrular arasındaki veya bir populasyondaki bireyler arasındaki farklılıklar olarak tanımlanmakta ve normal gen değişiklikleri (polimorfizm) veya hastalığa neden olan gen değişiklikleri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu bakımdan populasyon genetiği; genetik varyasyonun tanımı ve bu varyasyonun zaman ve mekanla nasıl değiştiğinin deneysel ve teorik olarak gösterilmesiyle uğraşmaktadır.

Populasyon genetiğinin amacı; bir populasyonun genetik kompozisyonunu anlamak ve bu kompozisyonu belirleyen ve değiştiren faktörleri ortaya koymaktır. Gen lokusu; genin kromozom üzerinde yerleştiği özel bölgedir. Allel ise; genin tek bir lokusta bulunabilen, farklı şekillerinden biridir. Herhangi bir türde, populasyon içi ve populasyonlar arası genetik varyasyonun geniş bir şekilde dağılım göstermesi, farklı gen lokuslarındaki çeşitli allellerin varlığından kaynaklanmaktadır.

Populasyon genetiğindeki esas ölçü, araştırılan herhangi bir gen lokusundaki allellerin ortaya çıkma sıklığıdır. Araştırılan bir allelin populasyondaki sıklığı, yani frekansı; yinelenen mutasyon, seleksiyon, migrasyon veya rasgele örnekleme etkileriyle değişebilir. Hiçbir değiştirici gücün rol oynamadığı rasgele melezlenmiş ideal bir populasyon, araştırılan lokus bakımından sabit bir genotipik frekans gösterebilir (33).

1.3.1. Polimorfizm

Polimorfizm, bir populasyonda veya populasyonlar arasında, bir genin allelleri ya da bir kromozomun homologlarıyla birleşen çeşitli fenotipik formların varlığı, yani bir lokusta birden fazla allel bulunması olgusudur. Diğer bir ifade ile; bir populasyondaki bir lokusta bulunan allellerin, en az %5'inin farklılık göstermesidir (10, 15, 19, 31).

İnsan fenotipindeki belirgin farklılıkların da net olarak gösterdiği gibi DNA diziliminde normal bir değişkenlik vardır. DNA dizilimindeki değişkenlik, yani polimorfizm, yaklaşık her 500 nükleotidde bir görülür. Kuşkusuz, her genomda DNA kopma ve eklenmeleri ve tek baz değişiklikleri vardır. Sağlıklı toplumlarda bu değişiklikler, kodlanmış proteinin işlevinde herhangi bir değişikliğe neden olmayan noktalarda veya DNA'nın kodlayıcı olmayan bölgelerinde görülür (66).

Polimorfizm kavramı, fenotip veya karakterler üzerine önemli bir bakış açısı kazandırmaktadır. Kromozom, protein veya DNA yapısındaki bireysel farklılıklar, çoğunlukla laboratuvar metotları ile belirlenebilir. Fakat herhangi bir DNA nükleotid varyasyonunun bir hastalık mutasyonu mu yoksa bir polimorfizm mi olduğunu belirleyen, genin yapı ve ifade durumudur. Fonksiyonu etkileyen karakterler nadirdir ve hastalık olarak gözlenir; hastalık oluşturmeyen varyasyonlar ise ortaktır ve karakter, varyant veya polimorfizm olarak adlandırılır (13, 104).

1.3.2. Hastalığa Neden Olan Gen Değişiklikleri

Klasik genetik, çoğu kalıtsal hastalığın bozuk bir proteinle sonlanan nokta mutasyonlara bağlı olduğunu öğretmektedir. Örneğin 11. kromozom üzerinde yer alan β -globin geninin içinde ve çevresinde yer alan bazı lezyonlar nedeniyle, bu duruma bağlı bazı hastalıklarda β -globinin hatalı üretimi ortaya çıkar.

Tek baz mutasyonunun neden olduğu orak hücre anemisi nokta mutasyonlara iyi bir örnektir. Bu mutasyon DNA'da T'nin, A'ya değişmesine; bu da β -globin geninin 6. kodonuna karşılık gelen mRNA'da A'nın U'ya değişmesine sebep olur. Değişen kodon farklı bir amino asidi (glutamik asit yerine valin) belirler ve bu da β -globin molekülünde çatisal bir anormalliğe neden olur. β -globin geninin içi ve çevresindeki diğer nokta mutasyonları ise

β -globin üretiminin azalması ve bazen ortadan kalkması ile sonuçlanır; β -talasemiler bu mutasyonların sonucudur (66).

Hemofili A (Faktör VIII eksikliği), köpeklerdeki en yaygın koagülasyon proteini eksikliğidir. Bu hastalık polimorfik ve genetik bir hastalık olup, PCR ile teşhis edilebilmektedir (21).

Galaktozemi otozomal resesif bir metabolizma hastalığıdır. *g/g* homozigotlar, galaktozu paçalayan galaktoz-1-fosfat üridil transferaz etkinliğinden yoksundurlar. Galaktozemi hastalığı taşıyan bebekler eğer süt alıyorsa, bir süre sonra katarakt, mide rahatsızlığı, karaciğer sirozu ve zeka geriliği şeklinde ağır bir tablo geliştirirler. Mutant *g* geni seyrek (%0.5) olup, varyant allellerde bulunmaktadır. Bu allellerden biri Duarte, öteki Los Angeles varyantı diye bilinir ve elektroforez veya azalmış enzim etkinliğinin saptanmasıyla belirlenirler. Ya homozigot durumda, yahut *g* ile birlikte bazı klinik belirtilere yol açarlar.

D geni %5 kadarken, *LA* alleli %2 kadar yani polimorfiktir. *G/G* (normal) bireyler yanı sıra *G/D* ve *G/LA* genotipliler vardır ki enzim etkinliği ilkinde normalin %75'i, ikincisinde %120'si kadardır. Normal bir klinik tablo sergileyen bireylerin, normal enzim aktivitesine sahip olmadığı anlaşılmaktadır (93).

1.3.3. Genetik Çeşitliliğin İncelenmesi

Birçok deneysel populasyon genetiği çalışmaları Mendel'in çalışmalarında da olduğu gibi, genotiple basit ilişkisi olan karakterler üzerine yoğunlaşmıştır. Mesela, birçok populasyon genetikçisinin favori konusu çeşitli kan grupları olmuştur. MN grubu örneğinde olduğu gibi; belirli bir kan grubunun kalitatif olarak farklı fenotipleri, tek bir lokusta alternatif allellerce kodlanmıştır ve fenotipler çevresel varyasyonlara duyarlıdır.

Varyasyon çalışmaları iki basamakta cereyan eder. İlki fenotipik varyasyonun tanımlanmasıdır. İkincisi ise bu fenotiplerin genetik terimlere dönüştürülmesi ve varyasyonun genetik olarak yeniden belirlenmesidir. Eğer fenotiple genotip arasında kesin birebir bir uyuşma söz konusu ise o zaman bu iki basamak, MN kan grupları örneğinde olduğu gibi, birbirine dönüşebilir. Fenotipleri genotiplere dönüştürmek için, deneysel çaprazlamalar veya pedigrî gözlemleri gerekebilir.

Mendel varyasyonunun en basit tanımı; popülasyondaki genotiplerin frekans dağılımıdır. Tablo 1.1.'de çeşitli insan popülasyonlarına ait MN kan grubu lokuslarındaki üç genotipin, dağılım frekansı verilmiştir. Burada hem popülasyonlar içi, hem de popülasyonlar arası varyasyon dikkate alınmalıdır. Daha önemlisi diploid genlerin frekansı yerine alternatif allellerin frekansı kullanılmıştır. İki allelli lokustaki üç genotipin oranı f_{AA} , f_{Aa} ve f_{aa} ise o zaman $p(A)$ ve $q(a)$ frekansları allellerin hesaplanmasıyla ortaya konabilir. Her homozigot AA sadece A allellerini ve her heterozigot Aa'nın allellerinin yarısını içerdiğinden, popülasyondaki A allellerinin total frekansı (p):

$$p = f_{AA} + \frac{1}{2} f_{Aa} = A'nın \text{ frekansı}$$

benzer şekilde, a allellerinin q frekansı ise;

$$q = f_{aa} + \frac{1}{2} f_{Aa} = a'nın \text{ frekansı}$$

$$p+q = f_{AA} + f_{aa} + \frac{1}{2} f_{Aa} = 1.00$$

Eğer alleller multiple ise her bir allel için frekans; onun homozigotunun frekansı ile ortaya çıktığı tüm heterozigotların frekanslarının yarısının toplanması ile ortaya çıkar (33).

Tablo 1.1. Bazı İnsan Populasyonlarındaki MN Kan Grubu Lokusundaki Allelerin Genotip Frekansları (33)

Populasyon	Genotip			Allel Frekansları	
	<i>MM</i>	<i>MN</i>	<i>NN</i>	<i>p(M)</i>	<i>q(N)</i>
Eskimo	0.835	0.156	0.009	0.913	0.087
Aborijin	0.024	0.304	0.672	0.176	0.824
Mısırlı	0.278	0.489	0.233	0.523	0.477
Alman	0.297	0.507	0.196	0.550	0.450
Çinli	0.332	0.486	0.182	0.575	0.425
Nijeryalı	0.301	0.495	0.204	0.548	0.452

Gen frekansı veya allel frekansını temsil eden p genişletilecek olursa, varyasyon gametik frekansa benzer şekilde birden fazla lokusta tanımlanabilir. Lokus S (salgılayıcı faktör) MN lokusuyla sıkı ilişkilidir. Tablo 1.2. çeşitli populasyonlardaki dört gametik tipin (MS , Ms , NS , ve Ns) frekanslarını göstermektedir. Gametik frekans, total gamet havuzuna farklı homozigotların ve heterozigotların katılımlarının hesaplanmasıyla elde edilebilir. Örneğin MS gametinin frekansı aşağıdaki gibidir:

$$g(MS) = MS/MS \text{ nin frekansı} + \frac{1}{2} MS/NS \text{ nin frekansı} + \frac{1}{2} MS/Ms \text{ nin frekansı} + \frac{1}{2} MS/Ns \text{ nin frekansı}$$

Genetik varyasyonun ölçüsü; populasyondaki bir lokusta bulunan heterozigotluğun miktarıdır. Eğer bir allel çok yüksek bir frekansta ve tüm diğerleri sıfıra yakın ise, o zaman çok az bir heterozigotluktan bahsedilebilir; çünkü bireylerin çoğu ortak allel bakımından homozigot olacaktır. Bir lokusta eşit frekansta birçok allel bulunduğu, heterozigotluğun en yüksek düzeyde olması beklenebilir. Tablo 1.1.'deki heterozigotluk her bir populasyondaki MN genotipinin frekansına eşittir. Birden fazla lokus dikkate

alındığında heterozigotluğun tayininde iki muhtemel yol vardır: Öncelikle her bir lokusta ayrı ayrı heterozigotların frekansının ortalaması bulunabilir. Buna alternatif olarak Tablo 1.2.'de olduğu gibi gametik frekanslar alınabilir ve iki gametik form taşıyan tüm bireylerin oranı bulunabilir.

Tablo 1.2. Bazı İnsan Populasyonlarındaki MNS Sistemi İçin Gametik Tiplerin Frekansları (33)

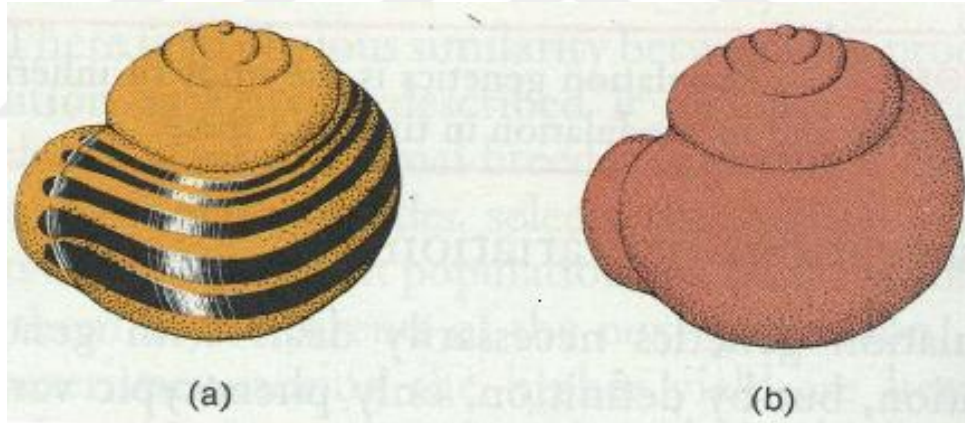
Populasyon	Gametik Tip				Heterozigotluk (<i>H</i>)	
	<i>MS</i>	<i>Ms</i>	<i>NS</i>	<i>Ns</i>	Gametik	Allelik
Ainu	0.024	0.381	0.247	0.348	0.672	0.438
Ugandalı	0.134	0.357	0.071	0.438	0.658	0.412
Pakistanlı	0.177	0.405	0.127	0.291	0.704	0.455
İngiliz	0.247	0.283	0.080	0.390	0.700	0.469
Navaho	0.185	0.702	0.062	0.051	0.467	0.286

Basit Mendel varyasyonu, türlerin populasyon içi ve populasyonlar arasındaki eksternal morfolojisinden, enzim ve proteinlerin amino asit dizilimine kadar birçok farklı şekillerde gözlenebilir. Ayrıca yeni DNA dizilim metotları kullanılarak DNA dizilimindeki varyasyonlar gözlemlenebilmektedir. Araştırılan tüm türler; populasyon içi, populasyonlar arası veya her iki düzeyde, bir veya daha fazla fenotip seviyesinde yansıyan bir genetik varyasyon veya polimorfizm göstermiştir. Evrimsel değişim için temel teşkil eden bu genetik varyasyon (polimorfizm) oldukça yaygındır (16, 33).

1.3.3.1. Polimorfizm Çeşitleri

1.3.3.1.1. Morfolojik Polimorfizm

Salyangozun (*Cepaea nemoralis*) kabuğu tek lokustaki iki allele bağlı olarak pembe (sarıya baskındır) veya sarı olabilir. Yine kabukla ilişkili diğer lokustaki polimorfizme bağlı olarak kabuk bantlı veya bantsız (bantsız baskın) olabilir (Şekil 1.6.). Tablo 1.3. salyangozun çeşitli Avrupa kolonilerindeki bu iki lokusunun düzeyini göstermektedir. Populasyonlar aynı zamanda bant sayısı ve kabuk yüksekliği bakımından farklılık göstermektedirler. Bu karakterler de kompleks genetik temellere sahiptirler (33).



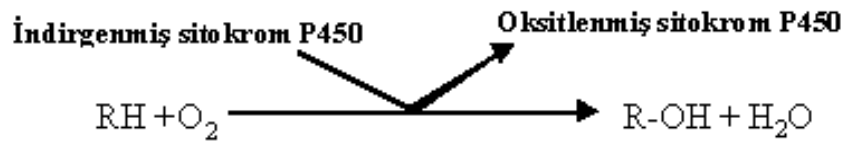
Şekil 1.6. *Cepaea nemoralis* Salyangozunun Kabuk Şekilleri: (a) Bantlı ve Sarı; (b) Bantsız ve Pembe (33)

Tablo 1.3. Fransa'daki Üç Salyangoz Populasyonundaki Farklı Kabuk Renkleri ve Kabuk Bantlarının Frekansları (33)

Populasyon	Sarı		Pembe	
	Bantlı	Bantsız	Bantlı	Bantsız
Guyancourt	0.440	0.040	0.337	0.183
Lonchez	0.196	0.145	0.564	0.095
Peyresourde	0.175	0.662	0.100	0.062

1.3.3.1.2. Sitokrom P450 Polimorfizmi

Birçok ilaç, karsinogen, pestisit, petrol ürünleri ve kimyasal kirlilik etkenlerinin detoksifikasyonundan sorumlu enzimlere monooksijenazlar veya sitokrom P450'ler denmektedir. İnsan genomu bu enzimlerin en az 11 ailesini içermektedir. Bir monooksijenaz tarafından katalizlenen tepkime aşağıdaki gibidir:



Yeni bulgular, bazı sitokrom P450'lerin polimorfik formlarda bulunduğunu ve bunlardan bazılarının ise düşük katalitik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir. Bu gözlemler birçok hastada görülen ilaç yanıtlarındaki değişkenliğin önemli bir açıklamasını teşkil etmektedir. Polimorfizm gösteren P450'lerden biri de, debrisoquin (antihipertansif) ve spartein (antiaritmik ve oksitoksik) metabolizmasına katılan CYP2D6'dır. CYP2D6'daki polimorfizm bu ve diğer

bir grup ilacın yetersiz metabolize edilmesine ve bunun sonucunda istenmeyen yan etkiler vermek üzere vücutta birikmelerine neden olur (66).

1.3.3.1.3. İmmunolojik Polimorfizm

Omurgalı genomlarındaki bazı lokuslar, ABO kan grupları gibi, bazı antijenik özellikleri kodlamaktadır (33). Türk toplumunda A grup bireyler %40, B grup bireyler %20, AB grup bireyler %10 ve 0 grup bireyler %30 dolaylarında olup gen frekansları; A için 0.29, B için 0.15, 0 için 0.55, Rh+ bireyler içinse %90 kadardır. Açıkça görülmektedir ki en düşük oranlısı bile sırf mutasyonla beklenenlerden çok daha yüksektir. Öyleyse ABO kan grupları polimorfik bir sistem oluşturmaktadırlar. Seyrek olarak tanımlanan gen eğer 1/50 veya daha fazla insanda bulunuyorsa polimorfik olarak nitelendirilebilir. Biyokimyasal yöntemler enzim ve proteinlerin de en az %30 kadarının polimorfik olduğunu ortaya çıkarmıştır (93). Hem biyosentezinde görev alan delta-aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) genindeki polimorfizm PCR tekniği kullanılarak Türk popülasyonunda incelenmiş ve gen polimorfizminde gruplar arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir (91). İnsan alyuvarlarında kırkı aşkın, sığırlar için ise yüz civarında immünolojik özellik tespit edilmiştir (33).

İnsanlardaki diğer bir polimorfizm ise doku greft uyumunda görevli selüler antijenlerindeki HLA (İnsan Lökosit Antijeni) sistemidir. Tablo 1.4.'te farklı insan popülasyonlarında ABO kan grubu lokusu için allelik frekans verilmektedir. HLA sistemindeki polimorfizm oldukça geniştir. Ayırt edilebilen her beş allel için iki ana lokus olduğu gözlenmiştir. Böylece; $5^2 = 25$ muhtemel birbirinden farklı gametik tip vardır. Bunlar 25 farklı homozigot ve $(25)(24)/2 = 300$ farklı heterozigot form oluşturur. Tüm genotipler fenotipik olarak ayırt edilebilir olmamakla birlikte 121 fenotipik sınıf gözlenebilmektedir. Yapılan araştırmalara göre 100 Avrupalıda 121 fenotipten ancak 53'ü gözlenmiştir (10, 18, 47).

1.3.3.1.4. Protein Polimorfizmi

Birçok plazma proteini polimorfizm gösterir. Polimorfizm gösteren insan plazma proteinleri arasında; α_1 -antitripsin, haptoglobin, transferrin, serüloplazmin, apolipoproteinler ve immunglobulinler bulunmaktadır. Bu proteinlerin polimorfik formları, çoğunlukla ilk kez nişasta jel elektroforezi ile tanınmış olup; bu yöntemde her polimorfik form karakteristik bir göç göstermektedir. Bu tür polimorfizmlerin çözümlenmesinin genetik, antropolojik ve klinik olarak önem taşıdığı kanıtlanmıştır (44, 66).

Tablo 1.4. Çeşitli İnsan Populasyonlarındaki ABO Kan Grubu Lokuslarında I^A , I^B ve i Allellerinin Frekansları (33)

Populasyon	I^A	I^B	i
Eskimo	0.333	0.026	0.641
Sioux	0.035	0.010	0.955
Beçikalı	0.257	0.058	0.684
Japon	0.279	0.172	0.549
Cüce	0.227	0.219	0.554

Son yıllarda, genetik polimorfizm çalışmaları yapısal genlerce kodlanan polipeptidler seviyesine indirilmiştir. Yapısal bir gende aşırılık taşımayan bir kodon değişimi (örneğin GGU yerine GAU) oluşursa, translasyon ile üretilen polipeptidde amino asit değişimi (glisin yerine aspartik asit gibi) ortaya çıkar. Aynı bireylerden spesifik bir protein saflaştırılıp dizileri belirlenirse, populasyondaki genetik varyasyon ortaya konabilir (19,33).

Bununla birlikte bir amino asit değiştiğinde, proteinin fiziksel özelliklerinde ortaya çıkan değişiklik dizilimin belirlenmesinde pratik olarak kullanılmaktadır.

Glutamik asit, aspartik asit, arjinin, lizin ve histidin amino asitleri ortamın pH'sına bağlı karakteristik net yükü veren ve iyonize olabilen yan zincirlere sahiptirler. Bu yüklü amino asitlerden birinde başka bir amino asitle yer değişimi ortaya çıkarsa veya polipeptid zincirinde bunlara yakın yüksüz bir amino asitte değişim olursa; yüklü amino asidin iyonizasyon derecesini etkileyebilir. Yine iki α heliksin birleşme yerlerinde oluşan bir değişme, katlanmış polipeptidin üç boyutlu sarmalında küçük bir değişikliğe yol açar. Tüm bu olaylarda polipeptid üzerindeki net yük değişir (33).

Bir türün genomundaki tüm yapısal genlerin ne oranda polimorfik olduğu ve populasyondaki heterozigotluk ortalaması, güncel ve araştırılan bir konudur. Jel elektroforez tekniği; ayrılma göstermeyen lokusların çalışılmasına olanak verdiğinden ve polipeptidin varlığı yapısal bir genin en önde gelen kanıtı olduğundan diğer genetik analiz metotlarından temelde farklılık göstermektedir. Bakteri, mantar, yüksek bitki, omurgalı ve omurgasızlar sınıflarına dahil birçok tür bu metotla incelenmiştir. Yapısal gen lokuslarının yaklaşık üçte biri polimorfik olup, populasyondaki heterozigotluğun oranı örneklenen tüm lokuslarda yaklaşık % 10'dur. Bunun anlamı şudur; genom ayrıntılı olarak incelendiğinde herhangi bir tür, her 10 lokusta bir heterozigotluk gösterir. Buna ilave olarak, herhangi bir populasyondaki tüm lokusların yaklaşık üçte biri, iki veya daha fazla allel bakımından farklılık gösterir. Bu durum evrimsel olarak yoğun potansiyelde bir varyasyonu temsil etmektedir. Elektroforetik tekniğin dezavantajı, sadece yapısal genlerdeki varyasyonu tespit etmesinden ileri gelir (41).

1.3.3.1.5. DNA Dizi Polimorfizmi

DNA analiz tekniğindeki son gelişmeler, bireyler arası ve türler arası varyasyonun araştırılmasını hızlandırmıştır. Bu tür çalışmaların yapılabildiği iki basamak vardır. Bu tekniklerden biri; restriksiyon enzimlerince tanınan bölgelerdeki varyasyonun araştırılmasını ve baz çiftindeki varyasyonun

kabaca belirlenmesini sağlar. Daha iyi bir teknikte ise DNA dizilim metotları bir baz çiftinden diğerine varyasyonu ortaya koyar (33).

1.3.3.1.5.1. Restriksiyon Enzimlerince Kesilmiş DNA Parçalarındaki Uzunluk Polimorfizmi (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism)

DNA'nın önemli bir özelliği bireyden bireye yapısal değişiklik gösterebilmesidir. Bu değişikliklerin çoğu kodlayıcı olmayan bölgelerde olmakla birlikte kodlayıcı bölgelerde de olabilir ve bu olay bir proteinde saptanabilir bir değişiklik olarak ifade edilir veya sessiz kalır. Bu değişkenliklerin yaygın bir şekli baz çiftlerinin bir ile yüzlerce kez peşpeşe değişken tekrarıdır (tandem repeats). Bu değişiklikler, çeşitli sınırlayıcı enzimler tarafından DNA'nın kesilme bölgelerinde değişikliğe neden olur ve bu bölgeler arasındaki DNA uzunluğu değişir. Bu yüzden farklı kişilerin restriksiyon enzimlerince kesilmiş DNA parçalarında uzunluk polimorfizmi (RFLP) vardır. Sonuç olarak RFLP'lerin analizi belli bir kalıp sağlamakta olup gerçekte bu kalıp DNA parmak izi'dir. DNA parmak izinin değeri diğer özel yöntemlerin de uygulanması ile arttırılmıştır. Tek yumurta ikizi olmayan kişilerde bu yöntemlerin uygulanması ile eş DNA kalıpları elde etme şansı; kullanılan enzimlerin sayısı, bireylerin birbiriyle bağı ve diğer etmenlere göre değişmektedir. Bununla beraber, bazı hesaplamalara göre bu kalıpların aynı olma şansı 1.000.000'da 1'den, 100.000'de 1'e kadar değişir. Üstelik RFLP analizi semen, kan ve diğer dokulardan alınmış küçük örneklerle uygulanabilmekte ve DNA'nın kopyalarının çıkartılmasında kullanılan üstün bir yöntem olan PCR ile DNA parçalarından çok sayıda kopya elde edilebilmektedir (30).

RFLP analizi, suçluların araştırılması ve babalık tayininde belirgin bir değere sahiptir. İnsan ve hayvan evriminin incelenmesi ve kalıtsal hastalıklara neden olan genlerin kromozom üzerindeki yerleşimini saptamada da değer taşır (11, 30, 38, 59, 107).

Bu yöntemin esası şudur; polimorfik bir bölge restriksiyon enzimlerinden biri için hedef kesim bölgesi oluşturuyorsa, RFLP yöntemiyle kesim bölgesinin varlığı veya yokluğuna bakılarak polimorfizm belirlenir (101).

1.3.3.1.5.2. Ardışık Tekrarların Değişkenliği (VNTRs: Variable Number of Tandem Repeats)

Genom ardışık olarak tekrarlayan baz dizileri içermektedir. Bu polimorfik ardışık tekrar dizileri iki farklı gruba ayrılmaktadır: 1- Variable Number of Tandem Repeats (VNTRs), 2- Short Tandem Repeats (STRs).

VNTR'lar veya minisatelitler genellikle 10-100 bp uzunluğunda olan tekrar birimlerinden oluşur. STR'lar veya mikrosatelitler ise genetik olarak VNTR'lara benzerler; ancak tekrar birimlerinin uzunluğu 1-6 bp arasındadır. VNTR ve STR lokusları gen içinde şifrelenmeyen diziler olup, genellikle kromozomların subtelomerik bölgelerinde yerleşmişlerdir ve genom içinde dağınık halde bulunurlar.

VNTR lokuslarının en önemli özellikleri ardışık tekrar sayılarının ve tekrar birimlerindeki nükleotid dizilerinin değişim göstermesidir. Bu nedenle büyük oranda allelik varyasyon gösterirler. Bu varyasyonların, eşit olmayan çapraz geçişler veya replikasyon kayması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Uzunluk polimorfizmlerinin moleküler temeli; insülin geniyle ilişkili VNTR lokusuna ait çok sayıdaki allellerin nükleotid dizisinin belirlenmesiyle açığa çıkarılmıştır. Ardından diğer VNTR lokuslarının analiziyle ardışık tekrar kopya sayılarının çok değişken olduğu, bir ile yüzlerce kez kadar değiştiği saptanmıştır. Bir lokusta çok sayıda değişken dizinin varlığı sonucu, popülasyonda çok fazla allel (hiperallelizm) oluşur ve çok sayıda birey heterozigot olur. Bazı VNTR lokuslarında heterozigotluk % 100'lere kadar varmaktadır. VNTR lokusları yüksek polimorfik özellikleri nedeniyle önemli genetik belirleyiciler olarak kabul edilirler (41, 101).

1.3.3.1.5.3. Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA)

İrk karakterizasyonu; populasyon içi ve populasyonlar arasında nükleer ve mitokondriyal DNA polimorfizmini yansıtan genetik varyasyon bilgisini gerektirmektedir (36). Genetik işaretleyiciler kullanılarak uygulanan seleksiyon stratejileri, babalık testi, ırk akrabalığı, türlerin genetik kimliklendirilmesi ve populasyon genetiğı gibi konulardaki bilgiler bu sayede artmaktadır (7, 22, 26, 80). Bu polimorfizm araştırmaları, genetik haritaların oluşturulmasına temel teşkil etmekte ve verim özelliklerindeki gelişmeyi hızlandırmaktadır (22).

DNA temeline dayalı polimorfizm araştırmaları, çiftlik hayvanlarının genetik analizlerinde ilerleme kaydedilmesini sağlamaktadır (22). Sığır populasyonlarında birbirini tamamlayıcı nitelikte olan mikrosatelit, RFLP gibi farklı moleküler işaretleyiciler kullanılmakla birlikte günümüzde RAPD tekniğı de kullanılmaktadır (12, 22, 80). RAPD, PCR bazlı DNA fingerprint metotları arasında en çok kullanılanlardandır (41). Gwakisa ve ark. (36) sığır ırklarındaki farklılıkların tespitinde RAPD'in oldukça kullanışlı bir yöntem olduğunu ileri sürmüşlerdir. RAPD tekniğı, bitki ve mikroorganizmalara ilave olarak, bazı hayvan türlerinin (sinek, fare, sığır, tavuk, köpek, at ve koyun gibi) de genetik analizinde önemli bir potansiyele sahiptir (22, 36).

Bu tekniğı ilk kez Williams ve ark. (1990), rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) olarak tanımlamış ve genetik polimorfizmi belirleyen, yeni bir teknik olarak ortaya koymuşlardır. PCR temeline dayalı olan bu teknik, rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerleri kullanarak, genomdaki farklı bölgeleri çoğaltabilmektedir (22). Bu tekniğın aşamaları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

1. PCR işleminde kullanılacak olan primerlerin, nükleotid dizileri belli bir kriter olmaksızın rasgele seçilir ve sentezi yapılır.

2. Rasgele seçilen bu primerler kullanılarak araştırılan genomik DNA'da PCR uygulamasına başlanır. PCR işlemi esnasında primerler genomik DNA'da simetriği olan bölgelere yapışır ve bu bölgeler geometrik olarak çoğalır.
3. Çoğalan bu DNA parçacıkları, elektroforez işlemiyle agaroz jelde koşturulur.
4. Molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve bantlaşma gösteren DNA parçacıkları daha sonra etidyum bromid ya da radyoaktif maddelerle boyanarak gözlenir (65, 82, 85, 103).

Standart bir PCR'da, genellikle herbiri 18-25 baz uzunluğunda, DNA iplikçiğine spesifik primerler kullanılmaktadır. Primerlerdeki baz diziliş sıraları, hedef dizinin yan bölgelerindeki DNA dizi bilgisine dayalıdır. Ayrışarak tek iplikçiğe dönüşmüş DNA kalıbındaki bu spesifik bölgelere, PCR'ın yapışma fazında primerler bağlanırlar ve çoğalacak bölgeleri tanımlarlar.

RAPD tekniğinin PCR aşamasında ise, rastgele dizilimdeki primerler kullanılmaktadır. RAPD-PCR'ın yapışma fazı boyunca rasgele seçilmiş olan primer, komplementeri olan bölgelere bağlanmaktadır. Eğer primerlerden ikisi karşılıklı iplikçiklerdeki kalıba uygun bölgede ve çoğalabilecek mesafede (yaklaşık 2500 veya daha az baz uzunluğu) bağlanırlarsa, bu durumda farklı bir parçacık çoğalabilmektedir. Her bir RAPD primeri aynı PCR esnasında, farklı lokuslardan farklı sayılarda (1-10 veya daha fazla) DNA parçacıklarını çoğaltma potansiyeline sahiptir (22). Diğer bir ifadeyle farklı primerler farklı RAPD polimorfizmlerini üretmektedir (36). Amplifikasyon sonucu oluşan DNA ürünü, agaroz jel elektroforezi işlemine tabi tutulur. Örneklerin hepsinde bulunan RAPD bantları monomorfik olarak kabul edilmektedir. Bazı bireylerde bulunmayanlar veya değişken mobiliteye sahip olanlar ise polimorfik olarak kabul edilmektedir (45). Elde edilen RAPD bantlarında gözlemlenen polimorfizmlerin, genetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli olduğu kabul edilmiştir. Gen haritalarının çıkarılmasında RAPD bantlarının çok sayıda olması arzulanmaktadır (95).

RAPD polimorfizmleri, primer yapışmasını önleyen bir veya her iki primerlenme bölgesindeki dizi farklılığından kaynaklanmaktadır. RAPD polimorfizmleri primer bağlanma bölgesinin varlığını veya bulunduğu bölgeyi etkileyen ve bu bölgeler arası kısmın ölçüsünü değiştiren mutasyonlardan kaynaklanabildiği gibi, amplifikasyonu önleyen mutasyonlardan (delesyon, inzersiyon ve inversiyon gibi) da kaynaklanabilmektedir. Tekniğin, primer ve kalıp arasındaki tek baz yanlış eşleşmelerini belirlemedeki duyarlılığı da kanıtlanmıştır (22). Varyasyon oluşumu, nokta mutasyonları örneğinde olduğu gibi, primer bağlayan bölgeler arasındaki alanların farklılıklarından kaynaklanmaktadır (36). Bu bölgelerdeki mutasyonlar, sekonder yapıların şekillenmesini sağlayabilmekte veya bozabilmekte olup, RAPD polimorfizmleri ile sonuçlanabilmektedir (8, 22). RAPD tekniğindeki ana güçlük, sonuçta oluşan bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki varyasyonlara, DNA kalitesine ve PCR ısı profiline çok duyarlı olmasıdır (41).

RAPD bantlarının Mendel kalıtım yolunu izlediği ve çeşitli türlerin gen haritalarının yapılmasında kullanıldığı bildirilmiştir (82). Amplifikasyon ürünlerinin ölçü ve sayısı, primere ve kalıp dizilerinin uyumuna bağlıdır. RAPD ile belirlenen varyasyon düzeyi türden türe değişmektedir. Örneğin kullanılan primerlerden; domateste (*Lycopersicon esculentum*) %63'ü, bal arısında (*Apis mellifera*) %20'si bireyler arası polimorfizm gösterirken, kızıl çamda ise 121 primerden sadece 2'si polimorfizm göstermektedir. RAPD polimorfizmlerinin doğası henüz tam olarak bilinmese de, en önde gelen sebebin primerin bağlandığı bölgedeki nükleotid değişikliklerinin ve yapısal farklılıkların olduğu düşünülmektedir (53). Tablo 1.5.'te, RAPD ile RFLP ve mikrosatelit parmak izi yöntemlerinin karşılaştırılması gösterilmektedir.

Tablo 1.5. RAPD ile RFLP ve Mikrosatelit Parmak İzi Yöntemlerinin Karşılaştırılması (22, 35)

Kriterler	RAPD	RFLP	Mikrosatelit
DNA Hakkında Ön Bilgi Gereksinimi	–	+	+
Restriksiyon Enzimleriyle Muamele	–	+	+
PCR Uygulaması	+	–	+
Southern Hibridizasyonu ve Transferi	–	+	–
Agar-Jel Elektroforezi	+	+	+
Elde Edilen Polimorfik Bant Sayısı	Yüksek	Orta	Yüksek
Elde edilen Bant Özelliği	Dominant	Ko-dominant	Ko-dominant
Maliyet	Düşük	Orta	Orta

RAPD-PCR yönteminin uyguladığı alanlar aşağıda belirtilmiştir (35):

- Populasyon genetiği çalışmaları
- Taksonomi çalışmaları
- Bitki ve hayvan yetiştirme uygulamaları
- Gen haritalarının yapılması
- Hastalıkların epidemiyolojik çalışmaları
- Adli tıp
- Kalıtım araştırmaları

1.4. Kars Yöresinde Yetiştirilen Sığır Irkları

Sığır türü ilk kez Anadolu'da evcilleştirilmiş ve buradan tüm dünyaya yayılmıştır. Avrupa sığır ırkları *Bos taurus* ve *Bos indicus*'tan köken almıştır. Bunlardan *Bos taurus* ırkı Anadolu'da geliştirilmiştir (3, 17). Bu nedenle Anadolu'da yetiştirilmiş ırkların önemi büyüktür. Araştırma kapsamındaki ırkların kökeni *Bos taurus* olduğundan (3), Anadolu kökenlidirler.

Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK): *Bos taurus brachicecerros*'tan köken alan bu ırk, Kuzeydoğu Anadolu'nun bir ırkıdır. Kuzeydoğu Anadolu'nun doğal yapısı, mera ve bitki florası şartları, sığır yetiştiriciliği yönünden İç Anadolu'dan çok daha uygundur. Kars ili, DAK'ın en yoğun yayılma bölgesi olup, uzun yıllar burası Doğu Anadolu Bölgesi'nin damızlık hayvanlarının kaynağı olmuştur (3). Türkiye sığır varlığının %2.7'si (300 970/11 185 000) Kars'ta bulunmaktadır (5). Türkiye'deki DAK sığırlarının sayısı ise, yerli ırklar arasında ikinci sırayı almakta ve 1.8 milyon dolayında bulunmaktadır (3).

DAK'ın rengi açık kırmızıdan koyu kestaneye kadar değişebilir. Bazı hayvanlarda, arka bacağın iç taraflarında beyaza kadar değişen açık renkler görülebilir. Boynuzlar kısa ve öne yöneliktir. Vücut yapısı, tıpkı renkte olduğu gibi büyük farklar gösterir. Bazı hayvanlar sütçü sığır tipinin inceliğine sahip olmakla birlikte diğer bazıları, etçi tipe daha yakındır. Bu farklara rağmen DAK'ın en önemli kusuru bedenin, özellikle göğüs bölgesinin, dar olmasıdır.

DAK sığırlarında cidago yüksekliği 115 cm, beden ağırlığı ise 250 kg kadardır. Irk içinde renk ve beden yapısı yönünden gözlenen büyük varyasyon, DAK ırkının diğer ırklarla bir hayli karışmış olmasından kaynaklanmaktadır. Bu karışmada, batıdan Yerli Kara, doğudan ise 19. yüzyıl sonlarında Rusya'dan getirilen İsviçre Esmeri, Simental ve Alman Kırmızıları önemli rol oynamıştır. Özellikle 1960 yılından sonra Bursa ve Balıkesir bölgelerinden getirilen bu ırklar, sığırların melezlenmesinde kullanılmıştır.

1982 yılından itibaren uygulanmaya başlanan Doğu Anadolu Hayvancılık Projesi, bu çalışmaları daha da yaygınlaştırmıştır.

DAK ırkı ineklerin süt verimleri oldukça değişkendir. Beslenme durumuna göre bazı yerlerde 600 kg olan yıllık süt verimi, bazı yerlerde %4 yağlı 1200 kg ortalamaya kadar çıkar. DAK sığırlarındaki Simental ve Esmer genotipi, hayvanların hem dış görünüş ve yapılarında hem de süt ve et verimlerinde kendisini gösterir.

DAK, Türkiye'nin en önemli sığır eti kaynağıdır. Kayseri bölgesindeki sucuk ve pastırma imalatı ile İç Anadoludaki besi işletmelerinin hayvan kaynağının önemli bir kısmını DAK oluşturur. Irkın besi kabiliyeti oldukça iyidir. Kesimde et randımanı % 53 civarındadır (3). Şekil 1.7.'de araştırma kapsamında bulunan bir DAK sığırının fotoğrafı gösterilmektedir.

Zavot Sığırı: Kars ilinin aynı isimle anılan bölgesinde yetiştirilen karışık genotipli sığırlardır. Bu ırk, Zavot'ta bulunan ve peynir yapımı ile uğraşan mandıralarda ve Kars ve Selim civarındaki köylerde halk tarafından yetiştirilir. Bölgenin yerli sığırları ile Kars yöresine Kafkasya'dan getirilen Simental ve İsviçre Esmeri genotipli sığırların birleştirilmesinden elde edilmiştir. Zavotlarda renk, yapı ve diğer özellikler, simental ya da esmer sığırdan hangisinin genotipi daha fazla ise ona göre şekillenmiştir.

Beden yapısı yönünden bu gruplar arasında belirgin farklar yoktur. Simental genotipi fazla olanlar alacalık ile diğerlerinden ayrılırlar. Son yıllarda Karacabey Esmer Boğalar yaygın olarak kullanıldığından, genel karakterler o yöne doğru gelişmektedir. %4 yağlı süt verimi yıllık ortalama 1500 kg kadardır. Besi kabiliyetleri de bölgenin yaygın ırkı olan DAK'tan daha yüksektir (3). Şekil 1.8.'de araştırma kapsamında bulunan bir Zavot sığırının fotoğrafı gösterilmektedir.

Simental: İsviçre'deki düşük verimli ırkların devamlı ve uzun seleksiyonu sonucu oluşmuş bir kültür ırkıdır. Yetiştirme ve seleksiyonda birinci sırada et olmak üzere, süt ve iş verimleri de dikkate alınmıştır. Bu ırk, Avrupa ülkelerine yayılmış ve oradaki yerli ırkların ıslahında da kullanılmıştır. Son yıllarda gelişmiş ülkelerde et üretim yetersizliğini giderme çabaları arasında, Simental genotipinden yararlanma eğilimi gittikçe artmaktadır.

Simental genotipi, Türkiye'ye ilk kez cumhuriyetin ilk yıllarında Macaristan'dan ithal edilen Bonihad sığırı ile gelmiştir. Ancak sonraları Simental çalışmalarından vazgeçilmiştir. 1970 yılında deneme amacıyla devlet yetiştirme kurumlarına Almanya'dan bir miktar Simental getirilmiştir.

Simentalin hakim renk kompozisyonu sarı-beyaz veya kırmızı beyaz alacadır. Baş genellikle beyaz olup, üzerinde sarı veya kırmızılıklar bulunabilir. Fiziksel özelliklerine bakıldığında; tırnakların sağlam, sırtın uzun ve kuvvetli, göğüsün geniş ve derin, sağrının dengeli ve kaslarının gelişkin olduğu gözlenir. Vücut ağırlığı ergin dişilerde ortalama 650 kg'dır (3). Şekil 1.9.'da araştırma kapsamında bulunan bir Simental sığırının fotoğrafı gösterilmektedir.

Esmer Irk: Anavatanı İsviçre'dir. Bos taurus brachiceros grubundandır. Bu ırk İsviçre'nin daha ziyade orta, doğu ve kuzey bölgelerinde yetiştirilmekte olup, Avrupa ülkelerinde de geniş ölçüde bulunmaktadır. Yetiştirildiği ülkelere göre 'İtalya Esmeri', 'Alman Esmeri' ve 'Romanya Esmeri' gibi isimler de almaktadır.

Türkiye'de Esmer Irk yetiştiriciliği, 1925 yılında Karacabey Harası'nda başlamıştır. Aynı zamanda haranın yerli materyali olan ve esasını boz ırkın teşkil ettiği sığırların çevirme melezlemesi çalışmalarına da girilmiştir. 1935 ve 1947 yıllarında yine Esmer Irkı sığırlar, Avusturya ve İsviçre'den getirilmiş ve onarıcı saf ırk yetiştiriciliği takviye edilmiştir. İlk gelen grupların Montafon olmaları nedeniyle, halk arasında bu isim benimsenmiş ve 'Montafon',

‘Yarımkarı Montafon’ ve ‘Karacabey Montafonu’ şeklindeki tanımlamalar günümüze kadar kullanılagelmıştır. Bu tanımlamalar yerine; Ege, Marmara ve Batı Anadolu’dakilere ‘Batı Anadolu Esmeri’, Orta Anadolu’dakilere ‘Orta Anadolu Esmeri’ ve Doğu Anadolu’dakilere de ‘Doğu Anadolu Esmeri’ adları verilebilir. Ancak tüm bunlarda hakim olan Esmer genotipidir ve büyük ölçüde karışmalar da olduğundan tümüne ‘Türk Esmeri’ denilmesi en uygunudur.

Esmer Irk’ta renk gümüş griden, siyaha yakın koyu griye kadar değişir. Sırtta açık renkte bir ester çizgisi vardır. Kulak içindeki tüyler çoğunlukla uzun ve beyazdır. Burun ucu, kuyruk ucu, dil ve boynuz uçları siyahtır. Vücut yapısı kaslı ve iridir. Ortalama ağırlığı 600 kg’dır (3). Şekil 1.10.’da araştırma kapsamında bulunan Esmer Irkı bir sığırın fotoğrafı gösterilmektedir.



Şekil 1.7. Araştırma Kapsamında Bulunan Bir Doğu Anadolu Kırmızısı Sığırı



Şekil 1.8. Araştırma Kapsamında Bulunan Bir Zavot Sığırı



Şekil 1.9. Araştırma Kapsamında Bulunan Bir Simental Sığırı



Şekil 1.10. Araştırma Kapsamında Bulunan Esmer Irkı Bir Sığır

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı; üzerinde daha önce moleküler düzeyde genetik bir çalışma yapılmamış olan Kars yöresinde yetiştirilen sığır ırklarında, diğer DNA parmak izi yöntemlerine göre daha az alt yapı gerektiren RAPD-PCR yöntemini uygulamak ve halk elinde yetiştirilen bu ırkların genetik varyasyonu ve dolayısıyla saflığı hakkında bilgi edinmektir. Bu amaçla:

- 1- Araştırma kapsamındaki sığırların RAPD bant profillerinin belirlenmesine
- 2- Irk içi ve ırklar arasındaki genetik farklılıkların değerlendirilmesine
- 3- Araştırmada kullanılan primerler arasında eğer varsa, bir ırka ya da ırklara özgü RAPD bantları veren primerlerin belirlenmesine çalışılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Hayvan Materyali

Kars yöresinde yetiştirilmekte olan Doğu Anadolu Kırmızısı, Zavot, Simental ve Esmer ırklarına mensup 91 sığırdan toplanan kan örnekleri bu projenin materyalini teşkil etti. Hayvanlar arasındaki genetik ilişkinin en az düzeyde tutulması amaçlandı. Bu sebeple örneklemelerin kapsamlı bir şekilde yapılabilmesi için, örnek alınacak köy ve çiftlik sayısı mümkün olduğu kadar geniş tutuldu. Materyali teşkil edecek hayvanların saf olarak yetiştirildikleri bölgeler (Dikme, Başgedikler, Bulanık, Boğazköy, Yağkesen vb. köyler) tercih edildi. Irklara göre hayvan sayıları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.1. Örnekleme Yapılan Sığırların Irklara Göre Sayıları

İrk	Sığır Sayısı
Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK)	21
Simental (SIM)	21
Zavot (ZAV)	25
Esmer (ESM)	24

Örnekleme sonrasında yapılan DNA izolasyonu, PCR ve elektroforez işlemleri Kafkas Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi bünyesindeki Moleküler Biyoloji Birimi laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.2. DNA İzolasyonu

Kanlar, 10 ml'lik vakumlu EDTA'lı tüplere toplandı ve soğuk zincirde laboratuvara getirildi. DNA örnekleri perifer kan lökositlerinden, ticari DNA izolasyon kiti (MBI Fermentas®-Genomic DNA Purification Kit #K0512, USA) kullanılarak izole edildi.

Yöntemin prensibi; lökositlerin protein yapılarının bozularak parçalanması, yoğun tuz çözeltisi kullanılarak ortamda bulunan protein kalıntılarının çöktürülmesi ve üstte kalan sıvı kısımda bulunan genomik DNA'nın etil alkol yardımı ile biraraya getirilerek ortamdan izole edilmesine dayanmaktadır (49).

DNA izolasyon işlemi, ticari kit kapsamında bulunan çözeltiler kullanılarak ve kitte tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi. Buna göre; 1.5 ml'lik, DNA ve RNA parçalayıcı enzimlerden arındırılmış (DNAase and RNAase free) PCR tüplerine 200 µl örnek ve 400 µl eritme çözeltisi (lysis solution) konarak vortekslendikten sonra, 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 600µl saf kloroform ilave edilen tüpler kuvvetlice çalkalandı ve 10 000 devirde 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte bulunan ve DNA içeren sıvı faz alınarak, içinde 800µl presipitasyon çözeltisi bulunan PCR tüplerine aktarıldı. Karışım 1-2 dak çalkalandıktan sonra 10 000 devirde 2 dakika santrifüj edilerek üstte kalan sıvı faz atıldı. Tüpte kalan DNA peleti 1.2 M 100 µl NaCl ile vortekslenerek çözdürüldü. 300µl soğuk saf etanol ile –20°C'de 10 dakika bekletilerek presipite edildi. Presipitasyon sonrası tüpler 10 000 devirde 4 dakika santrifüj edilerek üstteki sıvı faz atıldıktan ve pelet bir kez %70 soğuk etanol ile yıkandıktan sonra DNA, 100 µl steril deiyonize su ile sulandırılarak –20°C'de PCR işleminde kullanılmaya hazır olarak bekletildi.

DNA izolasyon işlemi sonrasında DNA bütünlüğünün kontrolü amacıyla, örnekler agaroz jel elektroforezinde (Bölüm 2.5.'te anlatılan koşullarda)

yürütülerek test edildi. Elektroforez işlemi sonrasında DNA bütünlüğü uygun olmayan örnekler tekrar izolasyon işlemine tabi tutuldu.

2.2.1. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması

Genomik DNA miktarının hesaplanmasında esas; DNA içeren distile suyun emdiği ultraviyole radyasyon miktarının spektrofotometre ile ölçülmesidir. Bu amaçla, DNA miktar ölçümleri 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılmaktadır. 260 nm dalga boyunda yapılan ölçüm, örnekteki nükleik asit derişiminin hesaplanmasına olanak sağlar. 1 optik dansite (OD) örnekte yaklaşık olarak 50 µg/ml çift sarmallı DNA'nın bulunduğu kabul edilmektedir. 260 nm ve 280 nm de okunan değerlerin oranı (OD260/OD280) nükleik asidin saflığının ölçüsünü vermektedir. Yapılan çalışmalarda, DNA ve RNA örneklerinin bulunduğu sıvının OD260/OD280 oranının 1.8 ile 2.0 arasında olması arzu edilir. Nükleik asit süspansiyonunda protein ya da fenol artıklarının bulunması durumunda, bu oran önemli ölçüde azalmakta ve nükleik asit miktarının kesin olarak hesaplanması güçleşmektedir (83). Tez kapsamındaki DNA miktar ölçümleri, Spectramax® (Plus 384) marka spektrofotometre ile yapıldı. DNA miktarının hesaplanması Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Genomik DNA Miktarının Hesaplanması

	DNA Örnekleri			
	1	2	3	4
Okunan Değer (260 nm) (a)	0.73	0.68	0.78	0.82
Okunan Değer (280 nm) (b)	0.38	0.37	0.4	0.44
DNA Kalitesi (a/b)	1.92	1.83	1.95	1.86
DNA Miktarı (µg/ml)	36.5	34	39	41
Kullanma Çözeltisi (µl) (100 ng DNA için)	2.73	2.94	2.56	2.43

2.3. Primerlerin Seçimi

Bu çalışmada kullanılan primerler seçilirken, birbirinin tamamlayıcısı (komplementeri/simetriği) olmamasına ve baz sıralarının seçiminin tamamen rasgele olarak yapılmasına dikkat edildi (103). Çalışma kapsamında; 12 adet 10 bazlık, 4 adet 9 bazlık, 1 adet 19 bazlık primer ve 1 adet de 21 bazlık primer kullanıldı. Primerler, ticari bir kuruluştan (Integrated DNA Technologies Inc. USA) liyofilize olarak temin edilerek, nükleazlardan arındırılmış steril distile su (AMRESCO®) ile sulandırıldı. Araştırmada kullanılan primerlerin özellikleri Tablo 2.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Araştırmada Kullanılan Primerlerin Baz Dizileri ve Yüzde Guanin+Sitozin Oranları (%G+C)

Primer Adı:	Primer Dizini	%G+C
P1	5'- AGC TGT CTC A -3'	50.0
P2	5'- CCG CGC CGG T -3'	90.0
P3	5'- CCA GGA CGC G -3'	80.0
P4	5'- GGT CAC CTA C -3'	60.0
P5	5'- GGC TGC AGT G -3'	70.0
P6	5'- CTG CAG CCG T -3'	70.0
P7	5'- CTC AGT CAC -3'	55.6
P8	5'- CGG CTA GGT -3'	66.7
P9	5'- GCA TCA GGT -3'	55.6
P10	5'- AAC AGC ACT CTG TTC AGG C -3'	52.6
P11	5'- TTA TGT AAA ACG ACG GCC ACT -3'	42.8
P12	5'- CCC AGC GTT -3'	66.7
P13	5'- CCG GTG TGG G -3'	80.0
P14	5'- GCG TAT CTG T -3'	50.0
P15	5'- TGC CGG ATG A -3'	60.0
P16	5'- GAC AGG CGT C -3'	70.0
P17	5'- CGG TTG GCG G -3'	80.0
P18	5'- GCG CGC ACT C -3'	80.0

2.4. PCR

İzole edilen DNA'lar, RAPD-PCR uygulamasına başlanmadan önce Tablo 2.2'de örneklendiği gibi 100 ng/μl yoğunluğuna ayarlandı. Bu işlemten sonra genomik DNA örneklerine RAPD-PCR işlemi uygulandı (35).

2.4.1. PCR'da Kullanılan Reaktifler

RAPD-PCR tekniği ile daha önce yapılmış araştırmalar incelendi. Bu araştırmalarda kullanılan reaktiflerin değişik miktar ve oranları denenerek PCR için en uygun koşullar sağlanmaya çalışıldı. Kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları aşağıda gösterilmektedir:

- 1- Taq DNA Polimeraz (Fermentas[®], #EP0402, USA): 5U/μl, 500U'lik tüpler halinde.
- 2- 10X PCR Çözeltisi (PCR Buffer, Fermentas[®], USA): 15 mM MgCl₂ ihtiva eden 1 ml'lik tüplerde hazır kullanma çözeltisi.
- 3- dNTP'ler (Promega[®] #U1330, USA): Deoksinükleotid Trifosfatlar (Herbiri 100 mM'lık derişimlerdeki dATP, dGTP, dCTP, dTTP ihtiva eden tüplerden 10'ar μl alınıp, nükleazlardan arındırılmış steril distile su ile 100μl'ye tamamlanarak kullanma çözeltisi hazırlandı.)
- 4- Primerler (Integrated DNA Technologies Inc., USA): İlgili firmaya baz dizileri verilerek sipariş edildi, liyofilize olarak teslim alındı ve nükleazlardan arındırılmış steril distile su ile 500 pmol/μl derişimde sulandırıldı.

PCR döngülerinin gerçekleştirilmesinde ısı düzenleme aleti (thermocycler) olarak Techne[®] Genius (U.K.) marka thermocycler kullanıldı. Örneklerin hazırlık aşamasında, geçen sürede kimyasal maddelerin özelliklerinde değişmeye neden olmamak için her defasında en çok 20 örnek işlendi. PCR işleminin gerçekleştirilmesinde, ince duvarlı (ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirgenebilmesi için), DNAaz

ve RNAaz'lerden arındırılmış ve steril PCR tüpleri (AXYGEN®, USA) kullanıldı. Genomik DNA dışında tüm reaktifler, kullanılacak örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde 1.5 ml'lik bir PCR tüpünde (Master Mix) karıştırıldı ve 0.2 ml'lik diğer tüplere eşit miktarda dağıtıldı. Daha sonra her örneğe ait genomik DNA'lar tüplere eklendi ve bir pipetle tüpteki içerik iyice karıştırıldı. Her bir örnek için kullanılan maddeler ve miktarları Tablo 2.4.'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Her Bir Örnek İçin Kullanılan Maddeler ve Miktarları

Madde	Miktar
Genomik DNA (100ng/μl)	2.0μl
dNTP karışımı	1.25μl
Primer	1.0μl
PCR tampon çözeltisi	5.0μl
Taq Polimeraz	1.0μl
Distile Su (Nükleazlardan arındırılmış)	41.75μl
TOPLAM	52.0μl

Çalışma kapsamında nükleazdan arındırılmış steril distile su, mineral yağ, dNTP'ler ve primerler gibi PCR karışımını oluşturan bileşenler, herhangi bir kontaminasyon riskine karşı küçük miktarlara bölünerek kullanıldı.

2.4.2. Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayısı

PCR ısı düzenleme aletine yerleştirilen tüplere; ayrılma, yapışma ve uzama aşamaları uygulandı. Bu üç aşamayı içine alan işleme bir döngü adı verilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar incelenerek ve denemeler yapılarak döngülere ait en uygun zaman ve sıcaklık değerleri belirlendi (4,

55, 80, 86). Her bir döngü; 94 °C'de 1 dakika (ayrılma), 35 °C'de 1 dakika (yapışma) ve 72 °C'de 1 dakika (sentez) olacak şekilde toplam 40 döngü uygulandı. Daha sonra 72 °C'de 5 dakika bekletilerek reaksiyona son verildi. PCR ürünleri elektroforez işleminde kullanılmak üzere 4°C'de saklandı.

PCR reaksiyonu, her primer için örneklerin tümünde ikişer kez uygulandı. Primerlerin her birinde negatif kontrol amacıyla genomik DNA olmaksızın PCR uygulamaları yapılarak, DNA bantlarının oluşup oluşmadıkları gözlemlendi.

Laboratuvar çalışmalarında üç adet Eppendorf® (2-20µl, 10-100µl ve 100-1000µl) ve bir adet Rainin® (0-10µl) marka otomatik pipet kullanıldı. PCR uygulamaları için gerekli kimyasal maddeler ile araç ve gereçler Tablo 2.5. ve Tablo 2.6.'da verilmiştir.

Tablo 2.5. PCR Uygulamaları İçin Gerekli Kimyasal Maddeler (94)

Kimyasal Maddeler ve Araçlar	PCR'da Kullanımı
<i>Taq</i> DNA polimeraz	Primer uzamasını katalize eder
Primerler	Çoğalacak DNA bölgesini belirler
dNTP'ler	Enzimatik uzama için gereklidir
Agaroz	PCR ürünlerini tanımlamak için
Etidiyum bromid	Jeldeki PCR ürününü belirlemek
Bromfenol mavisi ve ksilen siyanol	Yüklenecek çözeltinin boyanmasında
Steril mineral yağ	Buharlaşmayı önler

Tablo 2.6. PCR Uygulamaları İçin Gerekli Araç ve Gereçler (94)

Araç ve Gereçler	PCR'da Kullanımı
DNA Thermal Cyclers	PCR'ı otomatikleştirir.
UV seçenekli kabin	Tepkime karışımlarında bulaşmanın önlenmesi
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi	PCR ürünlerinin analitik incelenmesi
UV Transluminatör	Jeldeki DNA bantlarının incelenmesi
Steril mikrosantrifüj tüpleri	PCR bileşenlerini içerir
Steril eldiven	Çözeltilerin bulaşma ve DNAaz'dan korunması

2.5. Elektroforez Tekniği

Elektroforez tekniği uygulanmadan önce, RAPD-PCR tekniği kullanılarak önceden yapılmış araştırmalar incelendi (50, 55, 103). Elde edilecek RAPD bantlarının uzunluğu hakkında önceden bir fikir sahibi olunmadığından, elektroforez koşullarından jel yoğunluğu, elektrik akımı, ve koşturma süresi için en uygun şartlar deneme yanılma yöntemi ile belirlendi.

2.5.1. Elektroforez zeltisi

Elektroforez zeltisi olarak TBE (Tris-Borat-EDTA) solüsyonu kullanıldı. 54g Tris, 27.5g Borik Asit ve 20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0) alınarak, balon jojede steril distile su ile 1 lt'ye tamamlandı ve koyu renkli şişelerde oda sıcaklığında saklandı. Bu stok çözeltinin 10 misli steril distile su ile sulandırılmasıyla, kullanma çözeltisi elde edildi. Bu zelti; hem elektroforez havuzuna konu hem de agaroz jelin hazırlanması için kullanıldı. Her uygulamada bu çözeltinin 250 ml'si elektroforez çözeltisi olarak, 40 ml'si de agarozun jel haline getirilmesinde kullanıldı (35).

2.5.2. Jelin Hazırlanması

Jelin hazırlanması için moleküler biyolojik çalışmalara uygun nitelikte agaroz (PRONA[®] Basica Le, PL 100g) kullanıldı. Agaroz, yukarıda hazırlanışı anlatılan elektrolit çözeltisi ile çözdürüldü. Jel hazırlanırken agaroz çözeltisine boya maddesi olarak 0.5 μ g/ml etidyum bromid katıldı. Jelin % 1-2 arasındaki yoğunlukları denendi. En iyi sonucu % 1.5'lik agarozun verdiği tespit edildi.

DNA molekülünün boyanmasında kullanılan etidyum bromid mutajenik etkiye sahiptir (94). Etidyum bromid ile bulaşık katı maddelerin tümü, atık torbasında toplanarak imha edildi.

2.5.3. Jelin Dökülmesi

Çalışmada kullanılan elektroforez havuzunun (MINICELL® PRIMO EC320 IT) elektrotları arasındaki uzaklık 15 cm'dir. Kullanılan jel kalıbı 6.5 cm genişliğinde ve 9.5 cm uzunluğundadır. Jel kuyucuklarının sayısı uygun jel tarakları kullanılarak ayarlandı. Kuyucukların boyutları yaklaşık 1x3x4 mm'dir.

Hazırlanışı ve içeriği 2.5.2.'de anlatılan jel çözeltisi erlenmayere konduktan sonra Bosch marka mikrodalga fırında karışımın homojen olması ve agarozun iyice çözünmesi için sürekli sallanarak, şeffaf bir görünüm alana kadar ısıtıldı. Daha sonra jel kalıbına dökülerek jel tarağı yerleştirildi ve jelin katılaşması bekledi. Jel katılaştıktan sonra üzerinde gömülü olan tarak çıkarılarak jel havuzuna yerleştirildi ve üzerini örtecek kadar elektrolit çözeltisi ile dolduruldu.

2.5.4. Örneklerin Kuyucuklara Yüklenmesi

Elde edilen PCR ürünleri jel kuyucuklarına yüklenmeden önce hazır olarak (Fermantas® USA) satın alınan yükleme çözeltisi (Loading Dye) ile karıştırılarak boyanması sağlandı. Yükleme çözeltisi; kısa zincirli RAPD bantlarının jelden çıkarak elektrolit çözeltisine geçmeden tespitini sağlamaktadır (35). Yükleme çözeltisi, elektroforez uygulanacak her bir örneğe ait PCR örneğine 3'er µl konarak karıştırıldı. Bu karışımdan otomatik pipetle kuyucuklara 10'ar µl konuldu.

2.5.5. Örneklerin Elektroforez İşlemi

Örneklere ait RAPD bantları, elektroforez işlemi ile jel içerisinde koşturuldu. Bu işlem sonrasında RAPD bantları, jel içerisinde molekül büyüklüklerine göre dizildi ve UV sehpasında gözlenebilir hale geldi. Elektrotlar arası mesafe dikkate alınarak değişik elektrik akım değerleri uygulandı. Voltajın düşük, sürenin uzun olduğu hallerde bantların niteliklerinin bozulduğu gözlemlendi.

Uygun koşturma süresinin belirlenmesi amacıyla, farklı akım ve süreler denenerek 80 Volt akımda 2 saatlik koşturmanın uygulanmasına karar verildi. RAPD bantlarının uzunluklarının tespiti için MBI Fermentas® marka, pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) 34.34-500 bp (#SM0221) ve 100 bp DNA Ladder 80-1031 bp (#SM0243) olmak üzere iki ayrı standart DNA ölçeği kullanıldı.

2.6. RAPD Bantlarının Gözlenmesi

Etidyum bromid ile boyanmış DNA molekülleri, ultra viyole ışık veren görüntüleme sehpası üzerinde, 312 nm dalga boyunda fluoresan yansıma gösterirler (83). RAPD-PCR işlemiyle elde edilen ve jelde gözlenen bantlara 'RAPD bantları' adı verilmektedir. Bir bireyde gözlenip diğerinde gözlenmeyen RAPD bandı ise, polimofik RAPD bandı olarak adlandırılmaktadır.

Eşit sayıda erkek ve dişi olmak üzere; Doğu Anadolu Kırmızısı, Simental, Zavot ve Esmer ırkı sığırlardan DNA miktarı ve bütünlüğü iyi olan 10'ar örnek seçildi. Örneklerler üzerinde 18 adet primerin her biri ayrı ayrı denendi. Düzgün ve belirgin bantlaşma gösteren 10 adet primer değerlendirmeye alındı. Bu çalışmada elde edilen ve dış bakıda pembe-kırmızı gözlenen RAPD bantları, dijital fotoğraf makinesi (SONY® DSC-V1) ile yeşil filtre kullanılarak siyah-beyaz görüntülendi. Fotoğraflar, diyafram ayarı 4'te 1/8 saniye perde hızında çekildi. RAPD bantlarının moleküler uzunluğu, standart DNA ölçekleriyle karşılaştırma yolu ile yaklaşık olarak belirlendi (± 10 bp).

2.7. RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

2.7.1. RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi

PCR ve elektroforez uygulamalarının tekrarlanabilirliği denenerek, RAPD bantlarının ‘yeniden elde edilebilir olup olmadıkları’ test edildi. Sadece belirgin RAPD bantları değerlendirmeye alındı.

Araştırılan tüm örnekler, her bir primer yönünden karşılaştırılarak RAPD bantları değerlendirildi. Her bir primere göre yapılan PCR uygulamaları sonucunda ortaya çıkan RAPD bantlarının hepsi dikkatle incelenerek, örneklerde bu bantların olup olmadığı belirlendi. Bandın görüldüğü yerler gen lokusu olarak kabul edildi. Diğer örneklerde de bu lokusla aynı hızda bir bant görülüp görülmemesine göre ilgili lokustaki allel genin resesif (çekinik) ya da ‘dominant’ (baskın) özellikte olduğu kaydedildi. Bandın görülmemesi durumunda (resesif) 0 (sıfır), görülmesi durumunda ise (dominant) 1 rakamları girildi. Böylece, her bir primer için ayrı bir veri seti oluşturuldu. Verilerin kaydedilmesi bir örnekle açıklanacak olursa;

Lokus No	Örnekler			
	A	B	C	D
1	■		■	■
2	■			■
3		■	■	■
Toplam Bant Sayısı	2	1	2	3

Yukarıda jel üzerindeki görüntüsü verilen 4 örneğin DNA bantlarından oluşan veri seti aşağıda gösterilmiştir.

Lokus No	Örnekler			
	A	B	C	D
1	1	0	1	1
2	1	0	0	1
3	0	1	1	1
Toplam Bant Sayısı	2	1	2	3

2.7.2. İstatistik Analizler

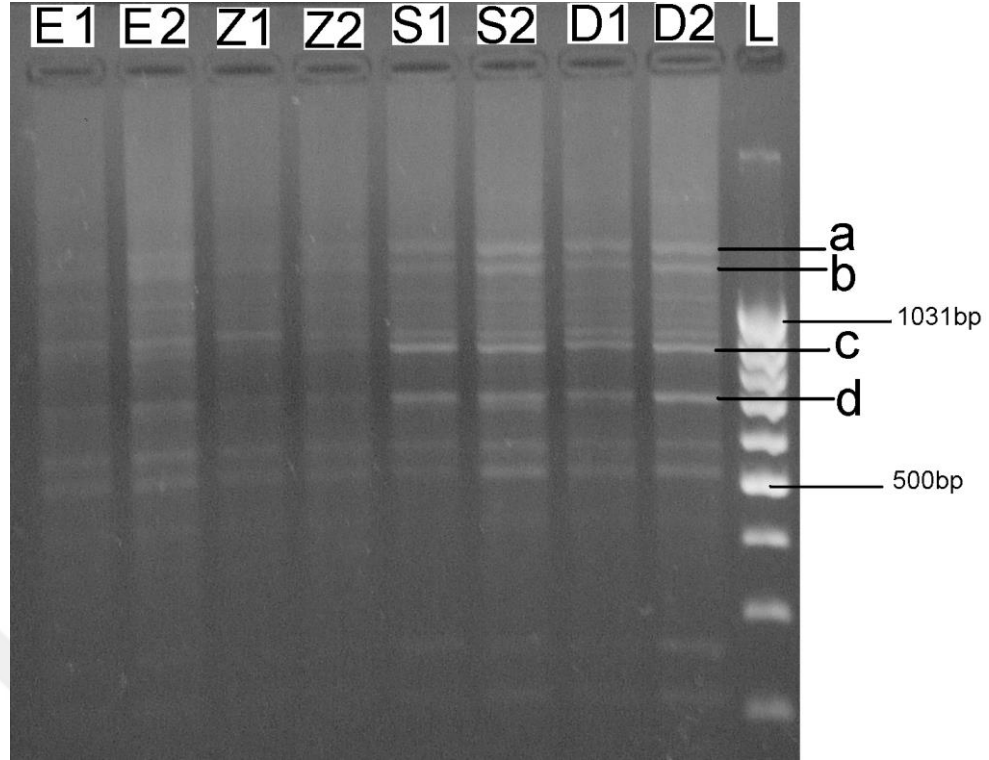
Tez kapsamında elde edilen verilerin istatistik analizleri Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı'nda bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Uzaklık matrislerinin hesaplanması ve veri setinin istatistik analize uygun şekilde biçimlendirilmesi işleminde 'POPGENE VERSION 1.31' (Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, Canada) paket programından yararlanıldı (109).

3. BULGULAR

3.1. RAPD Bantlarının Gözlenmesi

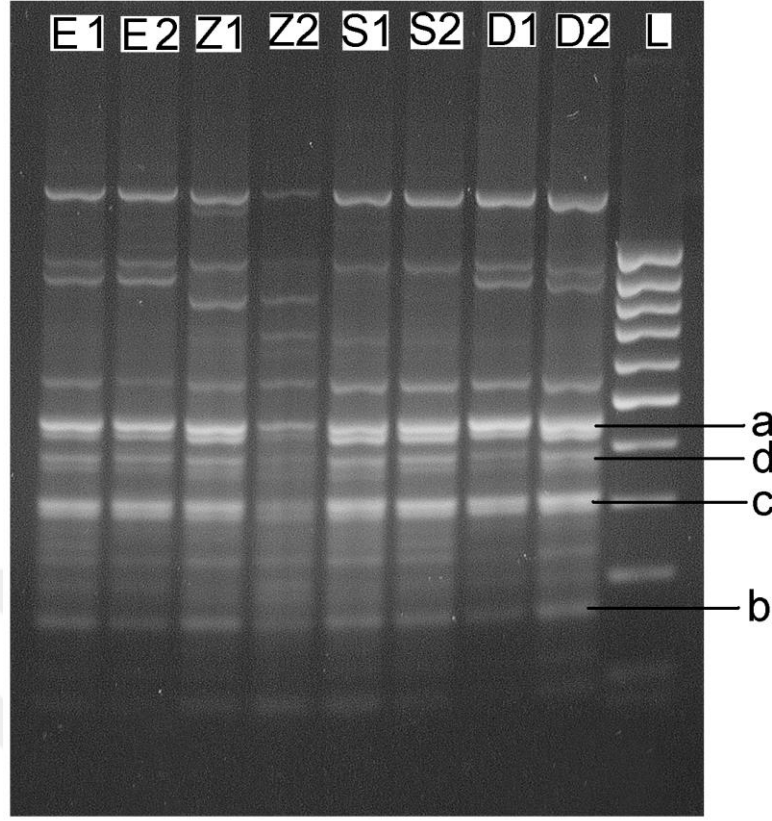
PCR ve elektroforez işlemlerinden sonra, değişik primer ve örneklerden elde edilen jel fotoğrafları ve gözlenen polimorfik ve monomorfik RAPD bantlarından bazıları aşağıda verilmiştir. Her bir primer için ırk başına 10'ar adet örnek, PCR işlemine tabi tutulmuştur. Temsilen bunlardan ırk başına 2'şer tanesi fotoğraflarda gösterilmektedir.

P1 primeriyle elde edilen RAPD bantlarının tümü incelendiğinde araştırılan tüm bireylerin hepsinde, monomorfik özellik taşıyan bir RAPD bandı olmadığı tespit edildi. 1000 bp ölçeğinin üzerinde ardışık olarak yer alan a ve b RAPD bantları ile 900 bp düzeyindeki c bandı, SIM ve DAK ırklarına mensup tüm bireylerde monomorfik olarak gözlemlendi. 700 bp düzeyindeki d bandının ise SIM, DAK ve ESM ırkları arasında monomorfik olduğu belirlendi. ZAV ırkındaki tüm bireylerin P1 primerindeki tüm RAPD bantları bakımından polimorfik bir DNA parmak izi ortaya koydukları belirlendi (Şekil 3.1.).



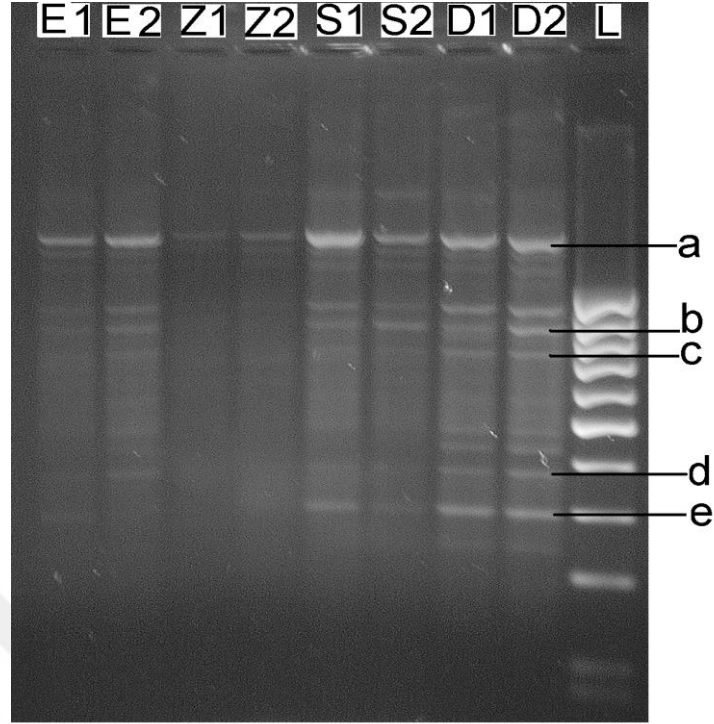
Şekil 3.1. P1 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantlarının Fotoğraf Görüntüsü. a, b ve c bantları, SIM ve DAK ırklarında, d bandı ise SIM, DAK ve ESM ırkları arasında monomorfik olarak gözlemlendi. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P2 primeri ile elde edilen RAPD bandlarından a bandı 450 bp ölçeğinde, b bandı ise 160 bp ölçeğinde, araştırılan tüm sığırlarda monomorfik olarak gözlemlendi. 300 bp ölçeğindeki c ve 390 bp ölçeğindeki d bantları ise ZAV ırkı dışındaki tüm ırklardaki araştırılan tüm bireylerde monomorfik bir DNA parmak izi sergiledi (Şekil 3.2.).



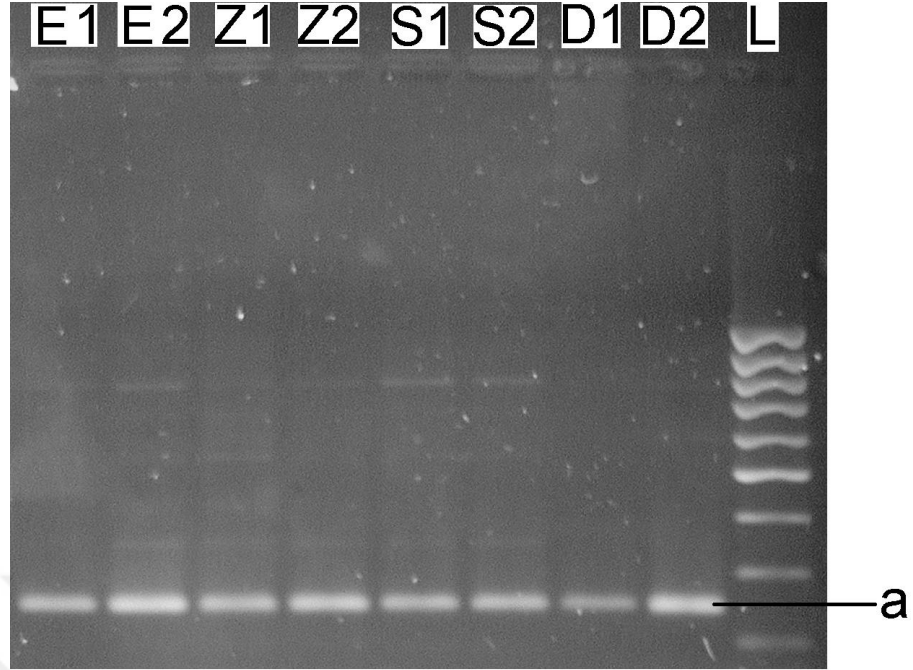
Şekil 3.2. P2 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. a ve b bantları araştırılan tüm sığırlarda monomorfik, c ve d bantları ise ZAV ırkı dışında monomorfik bir DNA parmak izi sergiledi. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P3 primeriyle elde edilen RAPD bantlarının tümü incelendiğinde, araştırılan tüm bireylerin hepsinde monomorfik özellik taşıyan bir RAPD bandı olmadığı tespit edildi. 1000 bp'den daha uzun olan ve şekilde a simgesiyle gösterilen RAPD bandı, ESM ve SIM ırklarında monomorfik bir parmak izi ortaya koydu. Yaklaşık 900 bp uzunluğundaki b, yaklaşık 750 bp uzunluğundaki c, yaklaşık 380 bp uzunluğundaki d ve yaklaşık 300 bp uzunluğundaki e bantları ise SIM ve DAK ırklarındaki tüm bireylerde monomorfik bir RAPD parmak izi sergilediler (Şekil 3.3.).



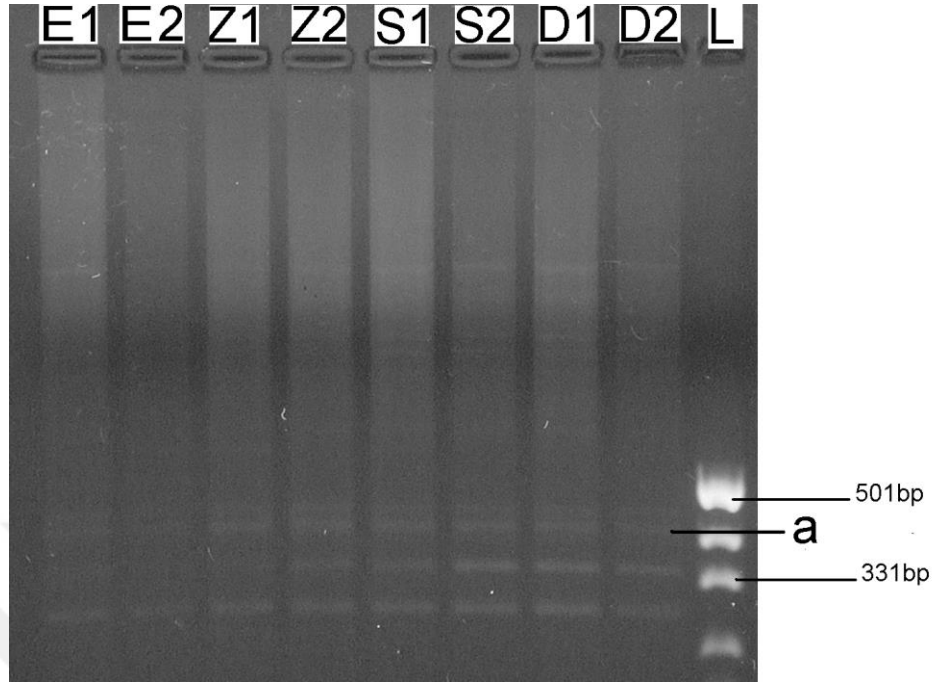
Şekil 3.3. P3 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. a simgesiyle gösterilen RAPD bandı ESM ve SIM ırklarında monomorfik; b,c,d ve e bantları ise SIM ve DAK ırklarında monomorfik bir RAPD parmak izi sergilediler. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P4 primeriyle elde edilen jeller incelendiğinde, yaklaşık 250 bp ölçeğinde bulunan ve Şekil 3.4.'de a ile simgelenen RAPD bandının, araştırma kapsamındaki tüm hayvanlarda monomorfik olduğu tespit edildi. Bu primerle elde edilen diğer bantların, bireyler arasında polimorfizm gösterdiği tespit edildi.



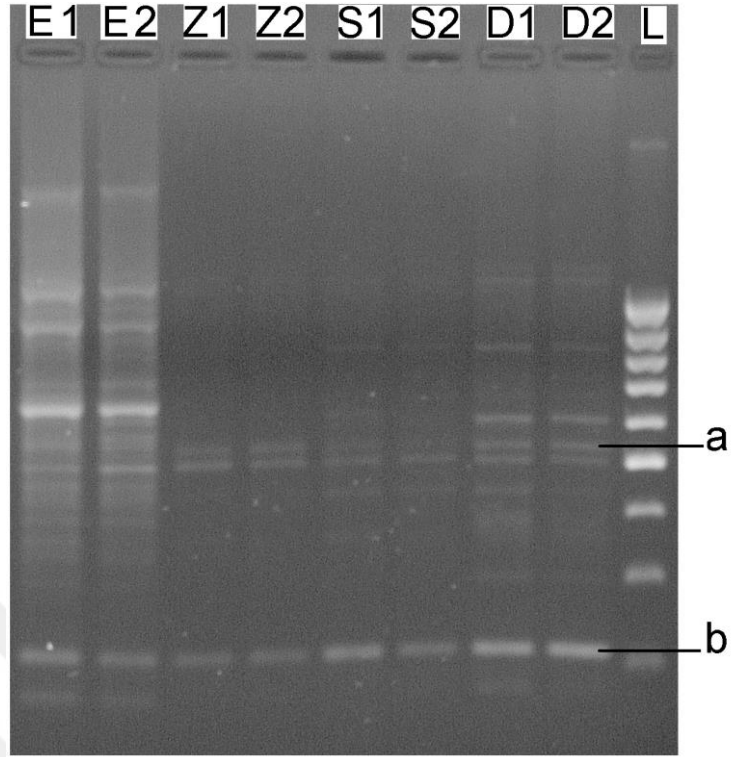
Şekil 3.4. P4 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. a ile simgelenen RAPD bandı tüm ırklarda monomorfik olarak gözlemlendi Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P5 primeriyle elde edilen RAPD bantları incelendiğinde araştırılan tüm bireylerin hepsinde monomorfik özellik taşıyan bir RAPD bandı olmadığı tespit edildi. Yaklaşık 410 bp ölçeğindeki RAPD bandı (a); DAK, SIM ve ZAV ırklarındaki tüm hayvanlarda monomorfik bir RAPD parmak izi ortaya koydu (Şekil 3.5.).



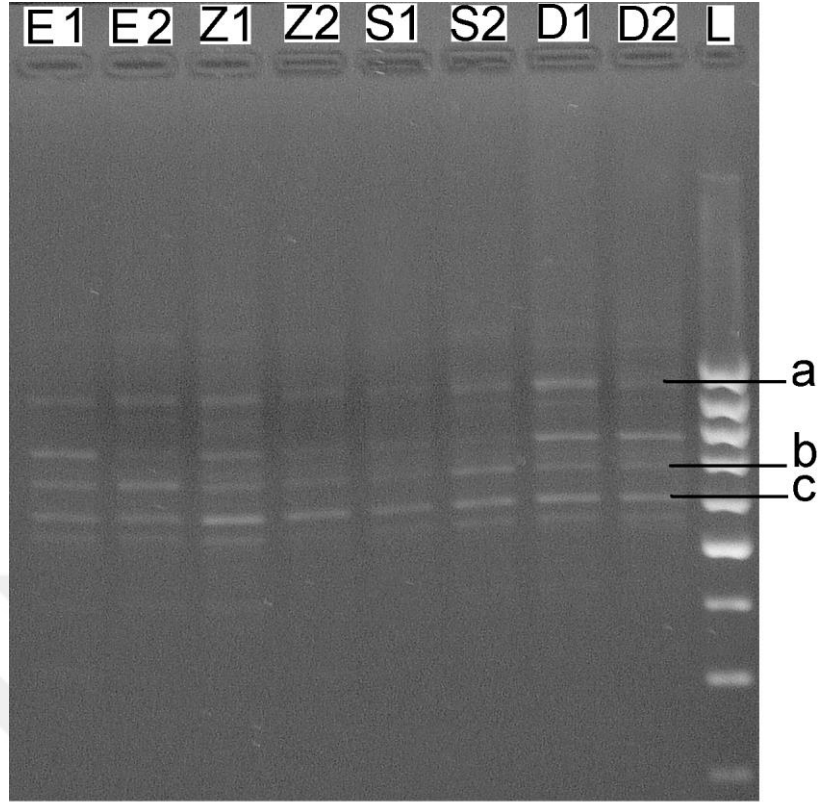
Şekil 3.5. P5 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. a ile simgelenen RAPD bandı DAK, SIM ve ZAV ırklarında monomorfik bir RAPD parmak izi ortaya koydu. Fotoğraftaki jelde pUC19 DNA/*Msp* (*Hpa*II) (Fermentas®, USA) DNA ölçeği kullanılmıştır. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

Toplam 17 adet ile en fazla RAPD bandı veren P6 primerinden elde edilen, yaklaşık 530 bp (a ile simgelenen) ve yaklaşık 190 bp (b ile simgelenen) ölçeklerinde iki adet RAPD bandının, araştırma kapsamındaki tüm hayvanlarda monomorfik olduğu tespit edildi. Bu primerle elde edilen diğer bantların bireyler arasında polimorfizm gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.6.).



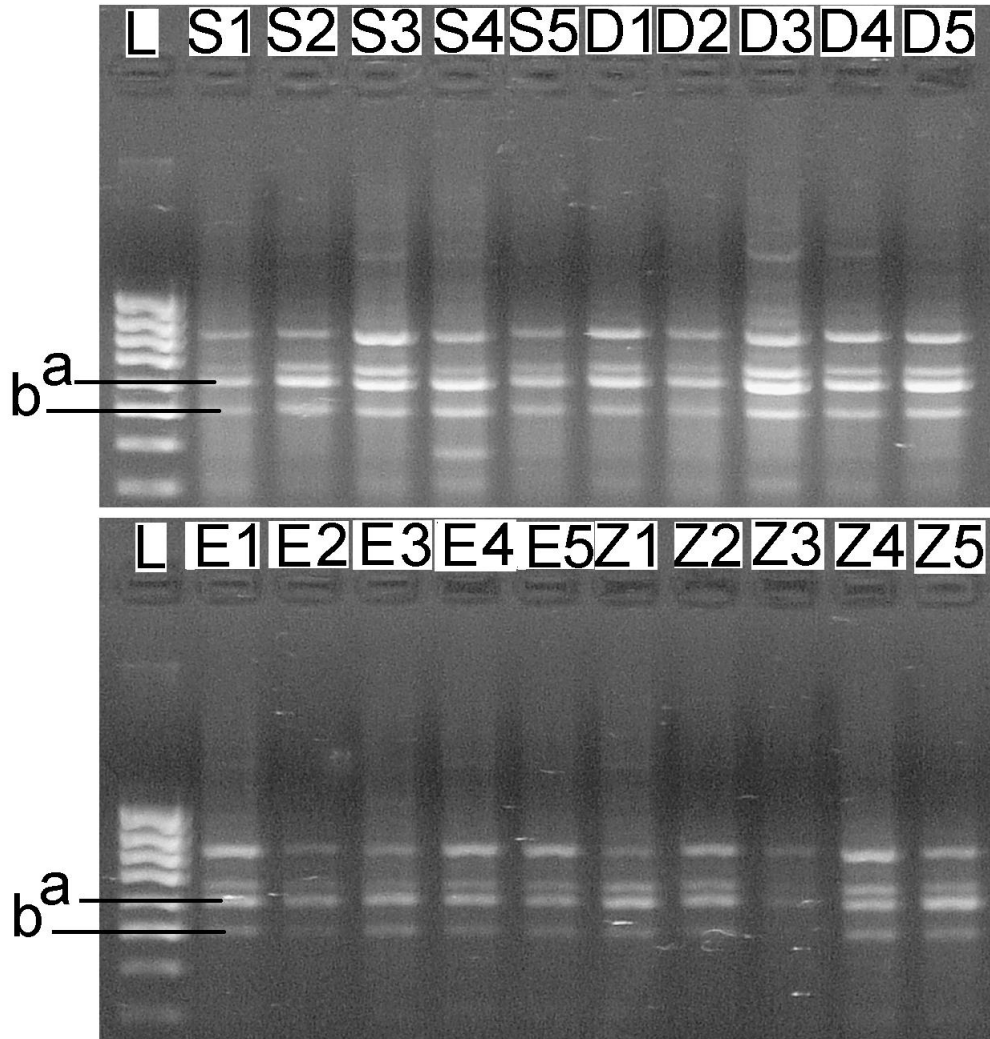
Şekil 3.6. P6 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P7 primeriyle elde edilen RAPD bantlarının tümü incelendiğinde, araştırılan tüm bireylerin hepsinde monomorfik özellik taşıyan bir RAPD bandının olmadığı tespit edildi. Ancak yaklaşık 1000 bp ölçeğindeki a bandı, DAK ve ZAV ırklarında, yaklaşık 700 bp düzeyindeki b ve yaklaşık 600 bp düzeyindeki c bantları ise DAK, ZAV ve ESM ırklarında monomorfikti (Şekil 3.7.). Bu primerle elde edilen diğer RAPD bantlarının, bireyler arasında polimorfizm gösterdiği tespit edildi.



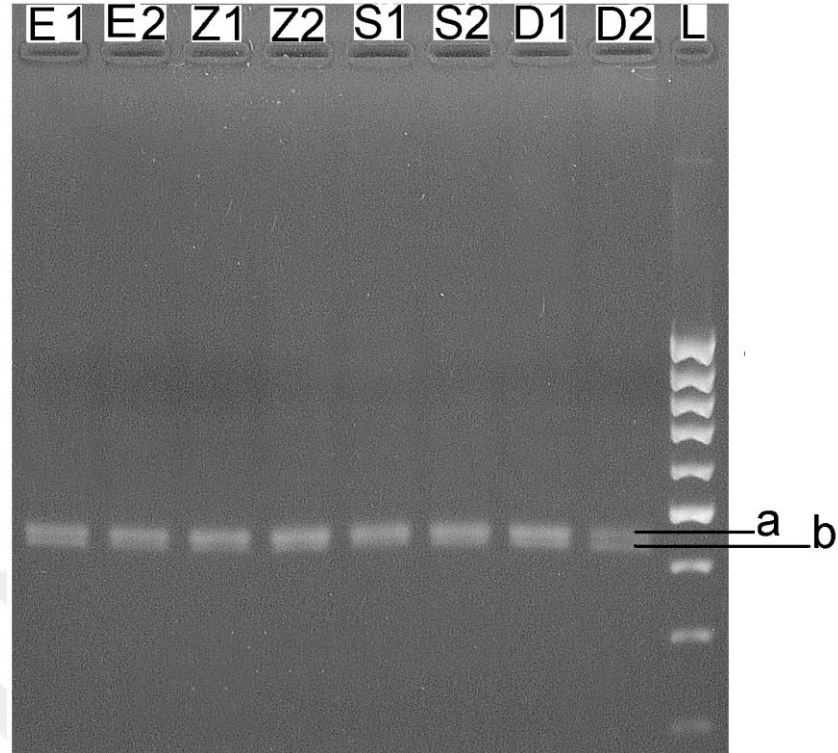
Şekil 3.7. P7 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. a bandı, DAK ve ZAV ırklarında; b ve c bantları ise DAK, ZAV ve ESM ırklarında monomorfik olarak görüldü. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P8 primeri ile elde edilen RAPD bantlarından, yaklaşık 600 bp ölçeğindeki bant (a) araştırılan tüm örneklerde görüldü. 500 bp ölçeğindeki RAPD bantı (b) ise ESM, SIM ve DAK ırklarındaki tüm örneklerde monomorfik olarak görüldü. Bu primerle elde edilen diğer RAPD bantlarının bireyler arasında polimorfizm gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.8.).



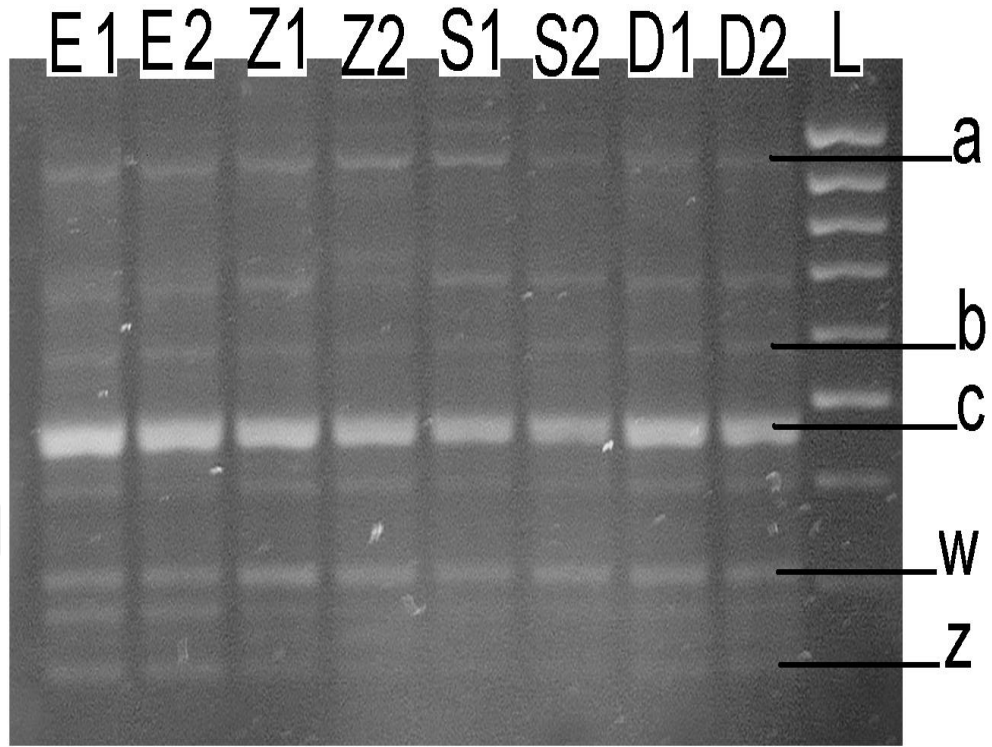
Şekil 3.8. P8 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. a bandı tüm ırklarda, b bandı ise ESM, SIM ve DAK ırklarında monomorfik olarak gözlemlendi. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, rakamlar ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P9 primeri ile elde edilen ve yaklaşık 440 bp (a) ve 460 bp (b) ölçeklerindeki toplam iki adet RAPD bandı, tüm bireylerde monomorfik olarak gözlemlendi (Şekil 3.9.). Bu primerle polimorfik bir RAPD bandı gözlenmedi.



Şekil 3.9. P9 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantlarının Fotoğraf Görüntüsü. a ve b bantları tüm bireylerde monomorfik olarak gözlemlendi. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

P10 primeri ile elde edilen ve yaklaşık 950 bp (a), 590 bp (b) ve 470 bp (c) düzeylerindeki toplam üç adet RAPD bandı, tüm bireylerde monomorfik olarak gözlenmiştir. 300 bp (w) ve 250 bp (z) ölçeklerinde iki RAPD bandı ise DAK, SIM ve ESM ırklarındaki tüm örneklerde monomorfik olarak gözlemlendi. Bu primerle elde edilen diğer RAPD bantlarının bireyler arasında polimorfizm gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. P10 Primeri Kullanılarak Yapılan PCR İşlemleri Sonucu Elde Edilen RAPD Bantları. a, b ve c tüm ırklarda monomorfik olarak gözlemlendi. w ve z ise DAK, SIM ve ESM ırklarındaki tüm örneklerde monomorfik olarak gözlemlendi. Fotoğraftaki jelde, L: DNA ölçeği (Fermentas®, USA), yaklaşık 1000 bp'den başlayarak 100 bp'lik aralıklarla azalan bantları göstermektedir. Fotoğraftaki harflerden; D: DAK, S: SIM, Z: ZAV ve E: ESM ırklarını, 1 ve 2 sayıları ise bu ırklardaki farklı örnekleri simgelemektedir.

3.2. RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

RAPD bantları değerlendirilerek elde edilen tüm lokuslardaki allellerin frekansları Tablo 3.1.'de verilmektedir. Lokuslardaki frekans değerleri 0 ile 1 arasında değişmektedir. Allel-1'in 1.000 frekans değerine sahip olduğu lokuslardaki söz konusu RAPD bandı, tüm bireylerde gözlenmiştir.

Tablo 3.1. Tüm Lokuslardaki Allel Frekansları

Allel	Pr1-1	Pr1-2	Pr1-3	Pr1-4	Pr1-5	Pr1-6	Pr1-7	Pr2-1
Allel-0	0.2950	0.2372	0.1118	0.3518	0.2699	0.2160	0.2886	0.2236
Allel-1	0.7050	0.7628	0.8882	0.6482	0.7301	0.7840	0.7114	0.7764
Allel	Pr2-2	Pr2-3	Pr2-4	Pr2-5	Pr2-6	Pr2-7	Pr2-8	Pr2-9
Allel-0		0.2699	0.1118	0.0791	0.1118		0.3027	0.7053
Allel-1	1.0000	0.7301	0.8882	0.9209	0.8882	1.0000	0.6973	0.2947
Allel	Pr2-10	Pr2-11	Pr2-12	Pr2-13	Pr2-14	Pr3-1	Pr3-2	Pr3-3
Allel-0	0.7732	0.6053	0.4280	0.6699	0.5386	0.2699	0.3490	0.8008
Allel-1	0.2268	0.3947	0.5720	0.3301	0.4614	0.7301	0.6510	0.1992
Allel	Pr3-4	Pr3-5	Pr3-6	Pr3-7	Pr3-8	Pr3-9	Pr3-10	Pr4-1
Allel-0	0.3490	0.7302	0.2739	0.2487	0.3027	0.6192	0.2160	
Allel-1	0.6510	0.2698	0.7261	0.7513	0.6973	0.3808	0.7840	1.0000
Allel	Pr4-2	Pr4-3	Pr4-4	Pr4-5	Pr4-6	Pr4-7	Pr4-8	Pr5-1
Allel-0	0.3741	0.4718	0.4532	0.8673	0.4532	0.2487	0.7071	0.3278
Allel-1	0.6259	0.5282	0.5468	0.1327	0.5468	0.7513	0.2929	0.6722
Allel	Pr5-2	Pr5-3	Pr6-1	Pr6-2	Pr6-3	Pr6-4	Pr6-5	Pr6-6
Allel-0	0.4664	0.0791	0.7803		0.8595	0.8731	0.6699	0.8137
Allel-1	0.5336	0.9209	0.2197	1.0000	0.1405	0.1269	0.3301	0.1863

Allel	Pr6-7	Pr6-8	Pr6-9	Pr6-10	Pr6-11	Pr6-12	Pr6-13	Pr6-14
Allel-0		0.1909	0.8125	0.6528	0.8306	0.6882	0.7092	0.7882
Allel-1	1.0000	0.8091	0.1875	0.3472	0.1694	0.3118	0.2908	0.2118

Allel	Pr6-15	Pr6-16	Pr6-17	Pr7-1	Pr7-2	Pr7-3	Pr7-4	Pr7-5
Allel-0	0.9328	0.9592	0.8673	0.3741	0.1118	0.1118	0.5861	0.8176
Allel-1	0.0672	0.0408	0.1327	0.6259	0.8882	0.8882	0.4139	0.1824

Allel	Pr7-6	Pr8-1	Pr8-2	Pr8-3	Pr8-4	Pr8-5	Pr8-6	Pr8-7
Allel-0	0.1581	0.6343	0.7558	0.0791		0.3027	0.4608	0.7478
Allel-1	0.8419	0.3657	0.2442	0.9209	1.0000	0.6973	0.5392	0.2522

Allel	Pr8-8	Pr8-9	Pr8-10	Pr8-11	Pr9-1	Pr9-2	Pr10-1	Pr10-2
Allel-0	0.7470	0.8636	0.7053	0.7863			0.1581	0.2699
Allel-1	0.2530	0.1364	0.2947	0.2137	1.0000	1.0000	0.8419	0.7301

Allel	Pr10-3	Pr10-4	Pr10-5	Pr10-6	Pr10-7	Pr10-8	Pr10-9	Pr10-10
Allel-0	0.0791	0.6632			0.1118		0.2699	0.8181
Allel-1	0.9209	0.3368	1.0000	1.0000	0.8882	1.0000	0.7301	0.1819

Allel	Pr10-11
Allel-0	0.8772
Allel-1	0.1228

Tablo 3.2.'de tüm lokuslardaki gözlenen allel sayısı (na), etkili allel sayısı (ne), gen farklılığı (h) ve Shannon enformasyon içeriği (I) değerleri verilmektedir. na değerinin 1 olduğu lokuslarda, ilgili RAPD bandı tüm bireylerde gözlenmiş olup, h ve I değerleri 0.000, ne ise 1.000'dir. Dolayısıyla bu tür lokusların polimorfik değerleri de sıfırdır. Etkili allel sayısı arttıkça, gen farklılığı ve enformasyon içeriği değerleri de artmaktadır. En yüksek etkili allel değeri (1.9937) Pr4-3 lokusunda gözlenmektedir.

Tablo 3.2. Tüm Lokuslardaki Gen Varyasyonları

Lokus Adı	Numune Sayısı	na*	ne*	h*	I*
Pr1-1	40	2.0000	1.7123	0.4160	0.6066
Pr1-2	40	2.0000	1.5670	0.3618	0.5478
Pr1-3	40	2.0000	1.2478	0.1986	0.3503
Pr1-4	40	2.0000	1.8384	0.4561	0.6485
Pr1-5	40	2.0000	1.6505	0.3941	0.5832
Pr1-6	40	2.0000	1.5121	0.3387	0.5218
Pr1-7	40	2.0000	1.6966	0.4106	0.6009
Pr2-1	40	2.0000	1.5319	0.3472	0.5314
Pr2-2	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr2-3	40	2.0000	1.6505	0.3941	0.5832
Pr2-4	40	2.0000	1.2478	0.1986	0.3503
Pr2-5	40	2.0000	1.1704	0.1456	0.2765
Pr2-6	40	2.0000	1.2478	0.1986	0.3503
Pr2-7	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr2-8	40	2.0000	1.7305	0.4221	0.6131
Pr2-9	40	2.0000	1.7114	0.4157	0.6063
Pr2-10	40	2.0000	1.5401	0.3507	0.5353
Pr2-11	40	2.0000	1.9150	0.4778	0.6708
Pr2-12	40	2.0000	1.9594	0.4896	0.6828
Pr2-13	40	2.0000	1.7929	0.4422	0.6342
Pr2-14	40	2.0000	1.9882	0.4970	0.6902
Pr3-1	40	2.0000	1.6505	0.3941	0.5832
Pr3-2	40	2.0000	1.8328	0.4544	0.6468
Pr3-3	40	2.0000	1.4686	0.3191	0.4993
Pr3-4	40	2.0000	1.8328	0.4544	0.6468
Pr3-5	40	2.0000	1.6503	0.3940	0.5831
Pr3-6	40	2.0000	1.6604	0.3977	0.5871
Pr3-7	40	2.0000	1.5968	0.3737	0.5609
Pr3-8	40	2.0000	1.7305	0.4221	0.6131
Pr3-9	40	2.0000	1.8925	0.4716	0.6645
Pr3-10	40	2.0000	1.5121	0.3387	0.5218
Pr4-1	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr4-2	40	2.0000	1.8808	0.4683	0.6611
Pr4-3	40	2.0000	1.9937	0.4984	0.6916
Pr4-4	40	2.0000	1.9826	0.4956	0.6888
Pr4-5	40	2.0000	1.2991	0.2302	0.3915
Pr4-6	40	2.0000	1.9826	0.4956	0.6888
Pr4-7	40	2.0000	1.5968	0.3737	0.5609
Pr4-8	40	2.0000	1.7071	0.4142	0.6047
Pr5-1	40	2.0000	1.7879	0.4407	0.6326
Pr5-2	40	2.0000	1.9910	0.4977	0.6909
Pr5-3	40	2.0000	1.1704	0.1456	0.2765
Pr6-1	40	2.0000	1.5217	0.3428	0.5265
Pr6-2	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr6-3	40	2.0000	1.3183	0.2414	0.4058
Pr6-4	40	2.0000	1.2846	0.2216	0.3804
Pr6-5	40	2.0000	1.7929	0.4422	0.6342
Pr6-6	40	2.0000	1.4351	0.3032	0.4808
Pr6-7	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr6-8	40	2.0000	1.4469	0.3089	0.4875
Pr6-9	40	2.0000	1.4381	0.3046	0.4825
Pr6-10	40	2.0000	1.8291	0.4533	0.6457

Pr6-11	40	2.0000	1.3917	0.2814	0.4550
Pr6-12	40	2.0000	1.7517	0.4291	0.6205
Pr6-13	40	2.0000	1.7021	0.4125	0.6029
Pr6-14	40	2.0000	1.5012	0.3339	0.5163
Pr6-15	40	2.0000	1.1434	0.1254	0.2464
Pr6-16	40	2.0000	1.0850	0.0783	0.1706
Pr6-17	40	2.0000	1.2991	0.2302	0.3915
Pr7-1	40	2.0000	1.8808	0.4683	0.6611
Pr7-2	40	2.0000	1.2478	0.1986	0.3503
Pr7-3	40	2.0000	1.2478	0.1986	0.3503
Pr7-4	40	2.0000	1.9423	0.4852	0.6782
Pr7-5	40	2.0000	1.4249	0.2982	0.4750
Pr7-6	40	2.0000	1.3628	0.2662	0.4365
Pr8-1	40	2.0000	1.8654	0.4639	0.6566
Pr8-2	40	2.0000	1.5851	0.3691	0.5558
Pr8-3	40	2.0000	1.1704	0.1456	0.2765
Pr8-4	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr8-5	40	2.0000	1.7305	0.4221	0.6131
Pr8-6	40	2.0000	1.9878	0.4969	0.6901
Pr8-7	40	2.0000	1.6055	0.3772	0.5647
Pr8-8	40	2.0000	1.6075	0.3779	0.5656
Pr8-9	40	2.0000	1.3082	0.2356	0.3984
Pr8-10	40	2.0000	1.7114	0.4157	0.6063
Pr8-11	40	2.0000	1.5061	0.3360	0.5188
Pr9-1	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr9-2	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr10-1	40	2.0000	1.3628	0.2662	0.4365
Pr10-2	40	2.0000	1.6505	0.3941	0.5832
Pr10-3	40	2.0000	1.1704	0.1456	0.2765
Pr10-4	40	2.0000	1.8074	0.4467	0.6389
Pr10-5	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr10-6	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr10-7	40	2.0000	1.2478	0.1986	0.3503
Pr10-8	40	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
Pr10-9	40	2.0000	1.6505	0.3941	0.5832
Pr10-10	40	2.0000	1.4237	0.2976	0.4742
Pr10-11	40	2.0000	1.2747	0.2155	0.3726
Ortalama	40	1.8764	1.5128	0.3085	0.4645
Standart Sapma		0.3310	0.3061	0.1554	0.2131

* na = Gözlenen Allel Sayısı

* ne = Etkili Allel Sayısı (56)

* I = Shannon Bilgi İndeksi (109)

* h = Nei Gen Farklılığı (67)

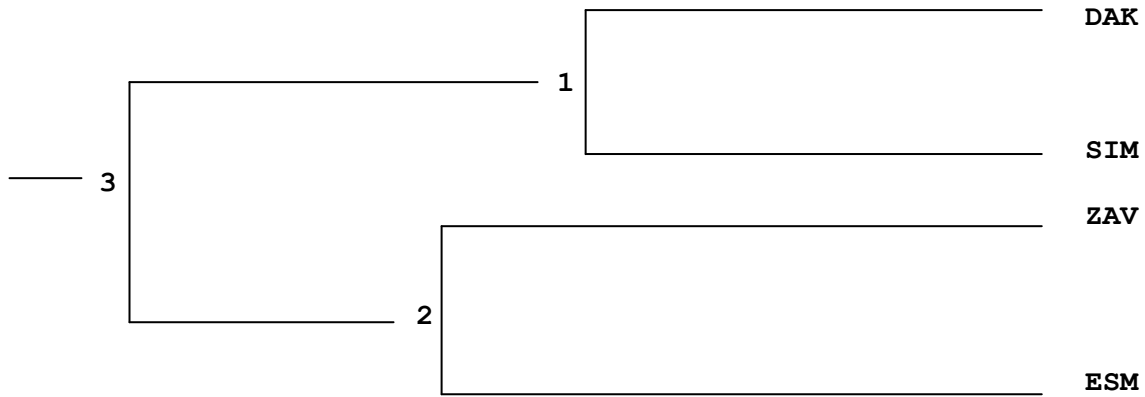
Tablo 3.3'te populasyonlar arasındaki genetik kimlik ve genetik uzaklık değerleri gösterilmektedir. Çapraz eksenin üstünde kalan rakamlar genetik kimliği, altında kalan rakamlar ise genetik uzaklığı ifade etmektedir. Genetik kimlik değerinin yüksekliği ve genetik uzaklık değerinin düşüklüğü, ırkların birbirine yakınlığını ifade etmektedir (109). Buna göre DAK ve SIM ırkları 0.9333 genetik kimlik değeri ve 0.0690 genetik uzaklık değeri ile birbirine en

yakın iki ırkı, ZAV ve SIM ırkları ise 0.8556 genetik kimlik değeri ve 0.1559 genetik uzaklık değeri ile birbirine en uzak ırkları oluşturmaktadırlar.

Tablo 3.3. Populasyonlar Arasındaki Genetik Kimlik ve Genetik Uzaklık Değerleri

İrk Adı	DAK	SIM	ZAV	ESM
DAK	****	0.9333	0.9023	0.8670
SIM	0.0690	****	0.8556	0.8573
ZAV	0.1028	0.1559	****	0.9093
ESM	0.1427	0.1540	0.0951	****

Şekil 3.11.'de genetik uzaklık değerlerinden (Tablo 3.3) yararlanılarak, kümeleme analizi (UPGMA) ile çizilen ve ırklar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram gözlenmektedir (109). Buna göre DAK ve SIM ırkları ile ZAV ve ESM ırklarını içeren iki ana sınıfın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Populasyonlar Arasındaki Genetik İlişkileri Gösteren UPGMA Dendogramı

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1. DNA Örnekleri ve DNA İzolasyonu

Çalışmada incelenen sığır ırklarını temsil edecek hayvanların seçimi, ait oldukları ırkın fenotipik (don rengi, vücut yapısı ve boynuz gibi) özelliklerine göre yapıldı (3). Simental ırkından 25, DAK ırkından 21, Esmer ırkından 24, Zavot ırkından 21 adet olmak üzere toplam 91 adet sığır hayvan materyali olarak belirlendi. Bu hayvanların kanları alınarak DNA'ları çıkarıldı. Ancak araştırma bütçesi ve bazı ırklar bakımından, saf örnek sayısının kısıtlı olması sebebiyle hayvan sayısı, her bir ırktan 10'ar adet olmak üzere toplam 40 adet olarak belirlendi. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, bir popülasyonu temsil eden hayvan sayısının 6'ya kadar düşebildiği gözlemlendi (53).

Örnekleme çalışmalarının yürütülmesi esnasında; Zavot sığırlarının Dikme Köyü, Selim İlçesi ve Boğatepe Köyü olmak üzere birkaç yerde sınırlı sayıda kaldığı ve yöredeki Esmer ırkı yönünde melezlemeye maruz bırakıldığı tespit edildi. Literatürde bildirilen fenotipik özellikleri gösteren DAK ırkı sığır sayısının da yörede oldukça azaldığı ve bu ırkın yörede bulunan Simental ve Esmer ırkları lehinde, düzensiz olarak melezlendiği tespit edildi. Örnekleme yapıldığı popülasyonlarda, birleşme ve melezlemelerin kontrolsüz olarak yapılması nedeniyle, fenotipik olarak o ırkın tüm kalitatif karakterlerini taşıyan bireylerin ele alınan özellikleri yönünden, homozigot ya da heterozigot dominant olmaları beklenmektedir (35).

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, ırkların genetik yapıları bakımından ön bilgi arz edecek ve karşılaştırma imkanı sağlayacak herhangi bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Türkiye'deki çeşitli sığır ırklarının kan grubu (29) ve protein polimorfizmlerini (70, 71) araştıran bazı çalışmalar var

olmakla birlikte, bu çalışmadaki ırkların genetik ilişkilerini inceleyen bir çalışma bulunamamıştır. Güneren (35), RAPD-PCR tekniğini kullanarak yaptığı çalışmada; Yerli Kara, Güney Anadolu Kırmızısı, Boz Irk ve DAK ırklarının genetik ilişkilerini incelemiştir. Ancak bu çalışma ile bizim çalışmamız, incelenen ırklar (DAK hariç) ve RAPD-PCR reaksiyon koşulları bakımından farklılık göstermektedir.

DNA parmak izi tekniğinde 'Fenol Kloroform Ekstraksiyonu' ve 'Konsantre Tuz Solüsyonu' yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Fenol-kloroform ekstraksiyonu yönteminde; Proteinaz K tarafından parçalanan çekirdek zarı ve proteinlerinden ayrılan DNA, fenol kullanılarak bu protein artıklarından temizlenir. Daha sonra kloroform uygulaması ile fenolün etkisi giderilir. Kloroform, proteinlerle reaksiyona girdiğinden ortamda köpük oluşturur. Köpüğün önlenmesi için, karışıma izoamilalkol eklenerek yüzey gerilimi azaltılır. DNA izolasyon işleminin uzun sürmesi ve fenolün çok zehirli bir madde olması dikate alınarak, konsantre tuz çözeltisi yöntemi prensibine dayalı bir ticari izolasyon setinin bu araştırmada kullanılmasına karar verilmiştir. Bu yöntemle elde edilen DNA , fenol kloroform ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen DNA ile miktar yönünden aynıdır (49, 63).

DNA izolasyon yöntemlerinden biri olan kaynatma yönteminde ise; maliyet düşük olmakla birlikte izole edilen genomik DNA'ların fosfodiester bağları, izolasyon esnasında uygulanan yüksek ısının etkisiyle zayıflamış olduğundan, genomik DNA çalışmaları için uygun görülmemektedir.

İzolasyon sonrasında elde edilen ve içinde DNA'nın olduğu varsayılan sıvı, önce agar jelde koşturulmuş ve DNA bantlarının tespiti ile DNA bütünlüğünün kontrolü yapılmıştır. UV sehpasında DNA bandına rastlanılmayan örnekler araştırmaya alınmamıştır. Agar jelde DNA bandı veren örneklerin ise spektrofotometrede miktar tayinleri yapılmıştır. DNA miktarının saptanması, DNA'nın emdiği UV ışık miktarının spektrofotometre ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır (83).

4.2. Primerler

RAPD-PCR tekniği ile yapılan genetik çalışmalarda, daha çok 10 bazlık primerler kullanılmakla birlikte, 8-22 baz uzunluğundaki primerlerin de kullanılabileceği tespit edilmiştir (86). Kantanen ve ark. (53), sığır ve koyunlar üzerinde yaptıkları araştırmada; 10, 11 ve 12 bazlık primerler denemişlerdir. Primerlerin çok kısa olması durumunda, elektroforez sonucunda jel üzerinde sayılamayacak kadar çok sayıda DNA bantları oluşmakta ve bireyin tanınması güçleşmektedir (55). Primerlerin fazla uzun olmaları halinde ise genomik DNA'daki tamamlayıcı bölgelerin çok az ya da hiç olmaması durumu ile karşılaşılabileceği dşnlerek, 9 ve 10 bazlık primerlerin sayısı fazla tutuldu (36, 103). Bu sebeple çalışmada 12 adet 10 bazlık, 4 adet 9 bazlık, 1 adet 19 bazlık ve 1 adet de 21 bazlık primer kullanıldı.

Araştırmada kullanılması dşnlen primer sayısının mümkün olduğunca çok olması, araştırmanın başarısı bakımından önem arz etmektedir (32). Daha önce yapılan çalışmaların çoğunda, 10'dan fazla primer kullanılırken (20, 50, 53) daha az sayıda primerle de (82) başarılı sonuç alınmıştır. Örneğin; Rothuizen ve Wolferen (82) köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada toplam 6 adet primer kullanmışlardır. Bu çalışmada ise 18 adet primerle ırk ilişkilerinin incelenmesi bakımından, başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Araştırıcılar, eldeki DNA kalıpları ile amplifiye olmamalarından veya kompleks bant profillerinden dolayı, denedikleri primerlerin tümünü değerlendirmeye almamışlardır (20, 50, 53). Jenderek ve ark. (50) gl populasyonlarının tanımlanmasında 40 adet primer kullanmış, ancak bunlardan 16 tanesinde (%40'ı) değerlendirmeye alınabilecek düzeyde DNA bandı tespit etmişlerdir. Carpio ve ark. (20) ise, sığırılar üzerinde yaptıkları çalışmada 40 primerden 18 tanesini değerlendirmeye almışlardır. Kantanen ve ark. (53) ise 57 primer incelemiş ve bunlardan 24'n araştırmada kullanmıştır.

Bu çalışmada toplam 18 adet primer denenmiş, ancak elde edilen RAPD bant profilleri yönünden 10 tanesinin kullanılmasına karar verilmiştir. 12 adet 10 bazlık primerden 6 tanesi, 4 adet 9 bazlık primerden 3 tanesi ve bir tane de 19 bazlık primer araştırmada kullanılabilecek nitelikte RAPD bandı oluşturmuştur. Bu araştırmada, araştırma olanakları dikkate alınarak, ikili primer kombinasyonları uygulaması denenmemiştir.

4.3. PCR Tekniği

RAPD-PCR tekniğinin başarılı olması için, PCR'ın koşullarının seçimi büyük önem taşımaktadır. Bantların yeniden elde edilebilme özelliği (reproductibility), primerlerin genomik DNA'ya birleşmeleri için uygulanan birleşme ısısından belirgin bir şekilde etkilenmektedir (82).

Williams ve ark. (103), primerin genomik DNA ile birleşme ısısının (annealing temp.) 40°C'nin üzerinde olduğu hallerde jel üzerinde froti şeklinde belirgin olmayan bantlar gözlendiğini bildirmişlerdir. Bu durumun önlenmesi için, *Taq* DNA polimerazın veya genomik DNA miktarının azaltılması gerektiği bildirilmiştir. Rothuizen ve Wolferen (82), RAPD-PCR tekniğinde primer ile genomik DNA'nın birleşme sıcaklığının, standart PCR birleşme ısısı olan 60°C'nin altında olması gerektiğini ve en uygun birleşme ısısının 35°C olduğunu bildirmişlerdir. Kemp ve Teale (55), Gwakisa ve ark. (36), Jenderek ve ark. (50) 35°C, Kantanen ve ark. (53) ve Rincon ve ark. (80) ise 36°C'lik yapışma ısılarını kullandıklarını belirtmişlerdir.

Yukarıdaki bilgiler dikkate alınarak ve yapılan denemeler sonucu 35°C'lik yapışma ısısının uygulanmasına karar verildi. PCR için hazırlanan karışımı oluşturan reaktiflerin, mümkün olduğunca birbiriyle homojen bir şekilde karışmasına özen gösterildi. Bir çoğalma yarışı olarak cereyan eden PCR döngülerinde, tüm primerlerin kalıp DNA'ya eşit şartlarda bağlanabileceği ortam böylece hazırlanmış oldu.

RAPD tekniği prosedürlerinde en çok varyasyon gösteren değişkenlerden biri yapışma ısısı, diğeri ise hem polimeraz aktivitesini hem de yapışma performansını etkileyen magnezyum derişimidir. Çalışmalarda ifade edilen optimum $MgCl_2$ derişimi 0.5 mM ile 5.0 mM arasında değişebilmektedir (98). Farklı $MgCl_2$ derişimleri ile aynı türden canlıların DNA'ları üzerinde, başarılı bir şekilde çalışabilmektedir. Genom tipinin tek başına optimal konsantasyonları belirlemediği söylenebilir. Optimum derişimler, primer uzunluğu ve Mg iyonları ile primerlerin bağlanabilme oranı gibi koşullara da bağlıdır. Primer derişimleri artınca Mg derişimlerinin de artırılması gerekir (82). Bu çalışmada ise 1,5 mM'lık $MgCl_2$ derişimi ile başarılı sonuçlar elde edildi.

Döngü sayısı, başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA derişimine bağlıdır. Çok döngü, hatalara yol açarak spesifik olmayan arka plan ürünlerini oluşturur (92). Sığırlar üzerinde yapılmış olan çalışmalardan Gwakisa ve ark. (36), Kemp ve Teale (55) ile Appa Rao ve ark.'nın (7) araştırmalarında 40 döngü, Rincon ve ark.'nın (80) çalışmasında ise 35 döngü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada ise, gerçekleştirilen denemeler sonucu 40 döngü yapılmasına karar verilmiştir.

Genellikle araştırmalarda kullanılan *Taq* DNA polimeraz miktarı; 100µl'lik bir hacim için 1-5 ünedir. Bununla beraber amplifikasyon bölgesine göre bu miktar değişebilir. *Taq* DNA polimeraz kullanımı; yüksek derişimlerde, spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına, düşük derişimlerde ise yetersiz ürün oluşmasına sebep olabilir (92). Kemp ve Teale (55) ile Gwakisa ve ark. (36)

5 U/100 μ l, Rincon ve ark. (80) ise 3 U/100 μ l derişimlerinde *Taq* DNA polimeraz kullanmışlardır. Bu çalışmada yapılan denemeler neticesinde ise 5 U/50 μ l derişiminin kullanılmasına karar verildi.

Taq DNA polimeraz, düşük dNTP derişimlerinde (10-100 μ M) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100 μ M dNTP derişimi ile gerçekleştirilir. Uygulanacak PCR için en uygun dNTP derişimi deneysel olarak belirlenmelidir (98). Sığırlar üzerinde çalışan araştırmacılar Gwakisa ve ark. (36) ile Kemp ve ark. (55) 50 μ M; Kantanen ve ark. (53) ile Ambady ve ark. (4) ise 200 μ M'lık dNTP derişimlerinde başarılı sonuçlar elde ettiklerini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada yapılan denemeler neticesinde ise 100 μ M dNTP derişiminin kullanılmasına karar verildi.

4.4. Elektroforez

PCR ile rasgele çoğaltılan DNA bantlarının uzunluğunun, önceden tahmin edilmesi mümkün değildir. Ayrıca değişik uzunluklarda çok sayıda RAPD bandının sınırlı bir bölgede gözlemlenme zorunluluğu vardır. Bu durum elektroforez uygulamasında sonucu etkileyen faktörlerin (jel yoğunluğu, elektrik gerilimi, koşturma süresi gibi) ayrı ayrı denenmesini gerektirmektedir. Araştırmalarda bildirilen miktar ve sürelerin mevcut laboratuvar koşullarına göre düzenlenmesi önemlidir (35). Bu bakımdan faktörlerin uygun süre ve miktarları deneme-yanılma yolu ile belirlendi.

TBE (Tris-Borat-EDTA) ve TAE (Tris-Asetat-EDTA) elektroforez çözeltisi olarak kullanılabilir (7, 80). TAE çözeltisinin her uygulama için taze olarak hazırlanması gerektiğinden bu çalışmada TBE çözeltisi tercih edilmiştir.

Jel hazırlanırken agaroz çözeltisinin soğuması esnasında karışıma boya maddesi olarak 0,5 µg/ml derişiminde etidyum bromid katılmıştır. Bu işlemin elektroforez sonrasında da yapılabileceği bildirilmektedir (83). Bu çalışmada daha homojen bir karışmaya olanak verdiği düşünölen ilk yöntem uygulanmıştır.

RAPD-PCR ürünleri elektroforez işleminden önce yükleme çözeltisi (loading dye) ile boyanmıştır. Kontaminasyon riski bulunduğundan yükleme çözeltisi hazır olarak satın alınmış ve -20°C'de saklanmıştır. Ürünlerin kuyucuklara yerleşip yerleşmediğini göstermesi bakımından önem taşıdığı için, ürünle yükleme çözeltisinin iyice karışmasına özen gösterilmiştir.

4.5. RAPD Bantlarının Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

RAPD bantları değerlendirilirken, bandın fotoğrafta görülmesi veya görülmemesi durumu esas alınmaktadır (103). Sadece belirgin ve parlak bantlar değerlendirmeye alınırken, çok zayıf görünümdeki bantlar değerlendirme dışı bırakılmıştır (36). Ayrıca bantların kalınlık veya parlaklık farkları da değerlendirmeye alınmamıştır.

Elde edilen RAPD bantlarının ölçülerinin tespitinde, aynı jelde koşturulan standart DNA ölçeği ile fotoğraf üzerindeki RAPD bant görüntülerinin karşılaştırılmasından yararlanılmıştır. Bu tespit esnasında ±10 bp'lik bir farklılık olabilmektedir.

Araştırma esnasında ortaya çıkan bantlar tür, ırk, aile ve birey gibi farklı zoolojik birimlere özgü bantlar olabilir. Ayrıca cinsiyet farklılıklarından kaynaklanan polimorfik bantların da olabileceği düşünölerek, araştırma esnasında her iki cinsiyetten eşit sayıda hayvan bulundurulmuştur.

Araştırılan primerlerden elde edilen jellerde cinsiyete özgü banda rastlanmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar incelenerek, aynı primerle hiç RAPD bandı vermeyen bireyler ise araştırmaya dahil edilmemiştir (6, 35). Bir RAPD bandının belirgin bir şekilde boyanması, bandı oluşturan DNA moleküllerinin sayısı ile doğru orantılıdır. Çünkü etidyum bromidin DNA moleküllerine bağlanması durumunda ultraviyole ışık altında floresan renk gözlenir. Bu rengin belirgin olarak gözlenmesi de boyanan moleküllerin azlığı ya da çokluğuna bağlıdır. Dolayısıyla bantların çıplak gözle görülememesi durumunda çok az miktarda da olsa RAPD bandı elde edilmiş olabilir. Ancak tüm örneklerde uygulanan PCR tekniğinin aynı olması nedeniyle, bu RAPD moleküllerinin miktarının ya da floresan yansımasının bireyler arasındaki sınıflandırmaya etki edebileceği bildirilmiştir (35).

Herhangi bir bireye ait birden fazla primer tarafından oluşturulmuş RAPD bantlarının birarada değerlendirilmesi durumu, aşağıda açıklanan nedenlerden dolayı sonuçlarda çelişki doğmasına neden olabilir. Örneğin P1, P6 ve P9 primerlerinin; farklı ırklardan A, B ve C bireylerinde uygulama sonuçlarının aynı veri setinde işlenmesi halinde G169 primer grubu veri seti aşağıdaki gibi olacaktır (35):

Birey	P1	P6	P9
A	0000000	10101111	11111010
B	0000000	01010000	10010111
C	1010010	10101010	10100110

Yukarıdaki veri setinde bir bireye ait tüm satır dikkate alınmaktadır. P6 ve P9 primerlerinden elde edilen RAPD bantları A ve B bireylerinde oldukça farklı lokuslarda gözlenmesine rağmen; A ve B bireylerinde P1 uygulaması sonucu hiçbir bant gözlenmemesi sebebiyle bu iki bireyde sanki P1 yönünden aynı resesif lokuslara sahipmiş gibi bir durum söz konusu olacaktır. Bu da bireylerin farklı şekilde sınıflandırılmasına neden olmaktadır. Aynı şekilde, farklı primer derişimlerinin kullanıldığı veri setlerine bağlı olarak yapılan

sınıflandırma da değişebilmektedir. Ortak bantların ırk içinde görülmeleri bu bantların o ırka özgü olabileceği fikrini verirken, farklı ırklarda gözlenmeleri bu bantların daha üst zoolojik sınıflara özgü bantlar olduğu sonucunu düşündürmektedir (35).

Güneren (35) tarafından örneklerle anlatılan yukarıdaki sebepler dikkate alınarak ve başta Gwakisa ve ark. (36) olmak üzere sığırlarla ilgili birçok çalışmada da tercih edilmediğinden, araştırma kapsamında iki ya da daha fazla primerin birarada kullanıldığı PCR uygulamaları (primer kombinasyonları) yapılmamıştır.

Genotipik varyasyon RAPD bantlarının göstermiş olduğu varyasyon olduğundan, aynı primerle elde edilen RAPD bantlarının frekansları hesaplanarak ortaya konmaktadır. Bir ırkın bireylerinde bulunan ortak bant sayısının diğer bir ırkın bireylerinden fazla veya az olması, o ırkın saf veya karışık olduğunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Genotipik varyasyon hem teker teker primerler bazında hem de tüm primerler ortalaması olarak kullanılan paket istatistik programı ile hesaplanmıştır.

Yapılan bu çalışmada farklı primerlerin, beklendiği gibi aynı ırkta farklı RAPD bant formasyonlarını verdiği tespit edildi. Irk içi genotipik varyasyon değerleri de kullanılan primerlere göre değişiklik gösterdi. Genotipik varyasyonlardaki farklılıkların; araştırma kapsamında kullanılan örnek sayısının sınırlı olması, genomik DNA'daki komplementer bölgelerin üst zoolojik sınıflara (cins, aile, soy vb.) özgün olması ve yörede kontolsüz melezlemelerin yaygın olması gibi sebeplerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

RAPD polimorfizmlerinin belirlenmesinde RAPD bantlarının varyasyonları önem taşıdığından, mümkün olduğunca çok RAPD bantının elde edilmesi önemlidir. Holstein ırkı boğalarda yapılan ve RAPD-PCR yönteminin optimize edilmesi amacını taşıyan bir çalışmada Ambady ve ark. (4) 10 baz

uzunluğunda ve %60-70 düzeyinde G+C içeren primerler kullanmış ve primer başına 4-14 arasında değişen RAPD bandı elde etmiştir. Bu araştırmada ise primer başına düşen RAPD bant sayısı 2-17 arasında değişmektedir. Değerler benzerlik göstermekle birlikte, bant sayılarındaki farkın bu araştırmada kullanılan primer uzunluklarının farklı olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ambady ve ark. (4) Holstein boğalarındaki varyasyonu hesaplamamışlardır. Bu çalışmadaki sığır ırklarında hesaplanan genetik varyasyonun, seleksiyon uygulanmış olan Holstein boğalarındaki varyasyondan daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Sığırlar üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Kantanen ve ark. (53) tarafından her ırktan ortalama 20 hayvan alınarak 5 ırk üzerinde araştırmalar yapılmıştır. 57 primerin denendiği ancak bunlardan 11 tanesinin araştırmada kullanılabilecek nitelikte olduğu ve bu 11 primere ait toplam 46 RAPD bandının değerlendirilmeye alındığı bildirilmiştir.

Birey, ırk, tür, cins gibi düzeylerdeki polimorfik bantlar RAPD-PCR yöntemiyle elde edilebilmektedir. Ancak elde edilen bantların hangi sınıflandırma düzeyinde olduğunu belirlemek güçtür.

Gwakisa ve ark. (36) Tanzanya'daki bazı sığır ırkları üzerinde RAPD yöntemi ile yaptıkları çalışmada ırk, populasyon ve bireye özgü genetik işaretleyicilerin belirlenebileceğini ifade etmişlerdir. Önce ırka özgü DNA havuzlarında, takiben bireysel olarak hayvanların DNA bantları değerlendirilerek ve RAPD bantlarına ait parmak izindeki varyasyon kullanılarak, sığır ırklarının genetik özelliklerini tanımlamışlardır. Araştırmacılar; 141 rasgele primerin kısa sürede görüntülenmesine, üç ırk havuzunun jel üzerinde yakın konumda karşılaştırılmasına ve ortalama ırka özgü DNA bant parmak izlerinin hızlı olarak tanımlanmasına DNA havuz uygulamasının olarak verdiğini belirtmişlerdir. Kullanılan 141 primerden birinin ise TSZ (Tanganyika Shorthorned Zebu) sığırlarında %61 oranında gözlenen bir RAPD parmak izi sergilediği ifade edilmiştir. Hem erkek hem de dişi

hayvanlarda bu parmak izi gözlenebildiğinden, bu ırkın örneklenmiş alt populasyonları için potansiyel bir genetik işaretleyici olduğu belirtilmiştir. TSZ sığırlarının % 39'unun bu bandı ortaya koymaması, ülke içinde farklı populasyonlardan ibaret olan bu ırktaki genetik çeşitliliği yansıtmaktadır. Diğer bir primer ise Boran sığırlarının %89'unda gözlenen bir RAPD parmak izi ortaya koymuştur. Özet olarak; araştırmacılar 141 primeri ırka özgü havuzlarda denemiş ve bunlardan ancak iki tanesinde ırka özgü RAPD bant profiline rastlayarak, bu primerlerle bireysel DNA'ları araştırmışlardır.

İrk havuzları uygulamasında, her ırkı temsil eden hayvanlara ait genomik DNA'lar bir tüpte biraraya getirilerek karıştırılmaktadır. Bu uygulamanın, primer sayısının çok olduğu araştırmalarda, zaman ve maliyet açısından avantaj sağlayabileceği düşünülebilir. Ancak çok sayıda hayvana ait genomik DNA'ların bir tüpte birleştirilmesi ve bu havuzlardan alınan DNA'nın tek bir genommuş gibi muamele görmesinin o ırkı temsil etmeyebileceği akla gelmektedir. Ortama ilave edilen primerin, her bir hayvana ait ve kendi aralarında bütünlük arz eden genomlardan bir veya birkaçı ile buluşabilirken, yine bir kısmını da kaçırabileceği ve hatalı bant profillerinin ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. Araştırma kapsamında, Gwakisa ve ark.'nın (36) kullandığı kadar çok sayıda primer kullanılmadığından, primerlerin her ırka ait bireysel DNA'lara uygulanması ve ırk havuzları uygulamasının gerçekleştirilmemesi uygun görülmüştür.

Araştırılan primerlerle elde edilen jel görüntülerinden hiçbirinde ırka özgü banda rastlanmamıştır. Bununla birlikte araştırılan primerlerden bir kısmı, bazı ırklardaki tüm sığırlarda monomorfik bir DNA parmak izi taşıması sebebiyle bu özelliği göstermeyen sığırların bu ırklara mensup olmayacağı bilgisini verebilir. Bu konuda yapılacak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

P9 primeri ile elde edilen ve yaklaşık 440 bp ve 460 bp düzeylerindeki iki adet RAPD bandı tüm bireylerde monomorfik olarak gözlemlendi. Diğer bir

ifadeyle primer 9 ile elde edilen RAPD bantlarına bakıldığında, ırklar arasında herhangi bir polimorfizm göstermediği tespit edilmiştir. Bu primerle elde edilen bant sayısının 2 olması ve tüm hayvanlarda gözlemlenmesi sebebiyle bu primerin tür ve türden daha büyük (cins, aile vb.) zoolojik sınıflandırmalara özgü bir parmak izi olabileceği düşünülmektedir. Bu primerin araştırılan tüm sığırlarda monomorfik bir DNA parmak izi taşıması sebebiyle, ileride başka türlerle karşılaştırmalı olarak yapılacak daha kapsamlı araştırmalarda sığır türüne özgü bir özellik taşıyıp taşımadığı anlaşılabılır.

Toplam 17 adet ile en fazla RAPD bandı elde edilen P6 primerinin ortaya koyduğu polimorfik parmak izinden dolayı, sığır türünde ileride yapılacak çalışmalarda kullanılması önerilebilir. P6 ve P9 primerleri ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, kullanılan primerin baz uzunluğu ile elde edilen RAPD bant sayısı arasında direkt bir ilişkinin olmadığı gözlenmiştir.

RAPD-PCR ile sığır ırklarını araştıran çalışmalar (36, 55) incelendiğinde, ırklar arasındaki ilişkinin çoğunlukla sadece ırka özgü RAPD parmak izi düzeyinde araştırıldığı ve dendogram düzeyinde verilmediği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen dendogram (Şekil 3.11.) incelendiğinde; Esmer ve Zavot ırklarının bir grupta, Simental ve Doğu Anadolu Kırmızısı ırklarının ise başka bir grupta yer aldığı gözlemlenmektedir. Esmer ve Zavot ırklarının aynı grupta yer alması, her iki ırkın da İsviçre esmeri genotipi taşımasından dolayı, beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Alpan ve Arpacık (3), DAK ırkının diğer ırklarla bir hayli karışmış olduğunu ve bu karışmada batıdan Yerli Kara, doğudan ise 19. yüzyıl sonlarında Rusya'dan getirilen İsviçre Esmeri, Simental ve Alman Kırmızıları'nın önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar 1982 yılından itibaren uygulanmaya başlanan Doğu Anadolu Hayvancılık Projesi'nin bu durumu daha da yaygınlaştırdığını ifade etmişlerdir. Son yıllarda Kars yöresindeki kontrolsüz melezlemelerin daha da arttığı ve DAK ve SIM ırklarının filogenetik yakınlıklarının, yöreye hayvancılık kooperatiflerince 1995 yılından itibaren (34) getirilmeye başlanan SIM boğaları ile eldeki DAK ineklerinin melezlenmelerinden, diğer bir ifadeyle

DAK'ın zamanla ağırlıklı olarak SIM ırkı yönüne kaymasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma ile karmaşık bir genetik yapıya sahip olan sığır türü üzerinde, belirli ölçekteki bütçelerle de olsa moleküler genetik çalışmaların yapılabileceği anlaşılmıştır. Yörede bulunan gen kaynaklarını incelemeye yönelik olarak ileride yapılabilecek moleküler biyolojik araştırmalara temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

Araştırmada kullanılan primerler bakımından, ırka özgü banda rastlanamamıştır. Ancak kullanılan primerler ile elde edilen RAPD bant profilleri değerlendirilerek; ırkların saflığı, ırklar arasındaki genetik ilişki ve akrabalık belirlenmiştir.

Bu çalışmada üzerinde çalışılan sığır ırklarının genetik yapılarını ortaya koyma bakımından RAPD-PCR yönteminin uygulanabilir olduğu ve benzer genetik yöntemlere nazaran yüksek maliyetler gerektirmemesi, yöntemin başka araştırmacılar tarafından ileride yapılabilecek çalışmalarda da tercih edilebilir olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma, Türkiye hayvancılığında önemli bir yeri olan Kars'ta bulunan sığır popülasyonunu RAPD-PCR parmak izi yöntemiyle araştırması bakımından ilk olması nedeniyle önem arz etmektedir.

İrkların birbiriyle genetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan RAPD-PCR işleminde kullanılan primer sayısının ve araştırılan hayvan sayısının, ekonomik şartlar da dikkate alınarak, fazla olmasında fayda vardır.

Bu çalışma ile elde edilen bulgular ve toplam 18 adet primerle elde edilen başarılı sonuçlar; daha iyi araştırma bütçeleri ile daha çok primer ve örnek incelenerek daha da başarılı sonuçlar alınabileceğinin ve böylece gen kaynaklarının başarılı bir şekilde ortaya konabileceğinin göstergesidir.

Araştırma kapsamında kullanılan her primerin araştırma maliyetlerini arttırdığı düşünülürse, yapılacak çalışmalarda çok sayıda RAPD bandı veren ve en fazla polimorfizm gösteren primerlerin kullanılması önerilebilir.

Kars yöresinde yetiştirilen sığır ırklarının genetik yapılarının incelenmesi iki yönden önem arz etmektedir. Birincisi; Türkiye’de hayvancılığın en önemli merkezlerinden biri olan ve Kafkasların Anadolu’ya geçiş bölgesinde bulunan Kars yöresindeki gen kaynaklarının tanınması ve korunması, ikincisi ise ortaya konacak genetik varyasyondan yararlanarak hastalıklara ve evre şartlarına direncin arttırılması için yapılacak çalışmalara temel oluşturmasıdır.

İleride yapılacak çalışmalarda RAPD-PCR yöntemi kullanılarak yöre ve ülke ekonomisinde önemi olan hayvan türlerinin ve gen kaynaklarının araştırılması önerilebilir. Türkiye sahip olduğu fauna yönünden dünyanın önde gelen ülkelerindendir. Evcil hayvanlar bakımından da sahip olduğu genetik varyasyon oldukça yüksektir. Bu gen kaynaklarının tespiti, korunması ve bilime kazandırılması önem arz etmektedir.

5. ÖZET

Kars Yöresinde Yetiştirilen Sığır Irklarındaki DNA Polimorfizminin RAPD-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi

Rasgele çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği; rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerleri kullanarak ve genomdaki farklı bölgeleri çoğaltarak, genetik polimorfizmi belirleyen bir PCR tekniğidir. Bu çalışmanın amacı; Türkiye hayvancılığında önemli bir yeri olan Kars yöresinde yetiştirilen sığır ırklarındaki RAPD bant profillerinin belirlenmesi, ırk içi ve ırklar arasındaki genetik farklılıkların değerlendirilmesi ve araştırmada kullanılan primerler arasında eğer varsa bir ırka ya da ırklara özgü RAPD bantları veren primerlerin belirlenmesi olmuştur.

Örneklemler her bir ırkın bulunduğu köy ve çiftliklerden hayvanların fenotiplerine göre yapıldı. DNA izolasyonu periferik kan lökositlerinden konsantre tuz solüsyonu yöntemine dayalı olarak ticari kitle gerçekleştirildi. Kars yöresinde yetiştirilmekte olan Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK), Zavot (ZAV), Esmer (ESM) ve Simental (SIM) ırklarına mensup 91 sığırdan izole edilen DNA örnekleri bu projenin materyalini teşkil etti. İzole edilen DNA'lar, RAPD-PCR uygulamasına başlanmadan önce 100 ng/μl yoğunluğuna ayarlandı. Irk başına 10'ar hayvan üzerinde, toplam 18 adet primerle RAPD-PCR tekniği gerçekleştirildi. Reaksiyonlar bantların yeniden elde edilebilme özelliği denenerek ve 94 °C'de 1 dakika (ayrılma), 35 °C'de 1 dakika (yapışma) ve 72 °C'de 1 dakika (sentez) olacak şekilde toplam 40 döngü halinde gerçekleştirildi. Çalışma kapsamında; 12 adet 10 bazlık, 4 adet 9 bazlık, 1 adet 19 bazlık primer ve 1 adet de 21 bazlık primer kullanıldı. PCR işlemi ile elde edilen RAPD bantları elektroforez yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla %1.5'lik agaroz ile hazırlanan jele boya maddesi olarak 0.5 μg/ml

etidyum bromid katıldı. İncelenen 18 adet primerden yeterli sayıda ve belirgin RAPD bandı veren 10 tanesi değerlendirilmeye alındı.

İrklar arasındaki genetik ilişkiler, toplam 89 lokustan elde edilen RAPD polimorfizmleriyle tayin edildi. Veri setinin istatistik analizi, ırklar arası genetik uzaklıkların belirlenmesi ve UPGMA yöntemiyle dendogramların çizilmesi işlemleri bilgisayar ile paket programdan yararlanılarak yapıldı.

İrklar arasında bu çalışma ile ortaya konan genetik ilişkiler incelendiğinde araştırılan dört sığır ırkının iki farklı kümede toplandıkları görüldü. Bunlardan ilkinde DAK ve SIM ırkları toplandı. İkinci kümede ise ESM ve ZAV ırkları yer aldı. Araştırma kapsamında ırka ve cinsiyete özgü RAPD bandına rastlanamadı.

Bu çalışma ile elde edilen veriler, RAPD-PCR yönteminin Kars yöresinde yetiştirilen sığır ırklarının genetik yapılarının ve bu ırklar arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Sığır, RAPD-PCR, DNA Parmak İzi, Filogeni, Irk Karakterizasyonu

6. SUMMARY

An Investigation on DNA Polymorphism of the Cattle Breeds in the Province of Kars by RAPD-PCR Technique

Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) is a technique that determines genetic polymorphism by using randomly sequenced short oligonucleotide primers and amplifying different regions in the genome. The aim of this study was to determine the breed-specific primers and designate the RAPD fingerprints and genetic diversities of cattle breeds in Kars an important province where cattle rearing is common.

Animals were sampled from their native breeding ranches and villages regarding to the phenotypic appearances. The DNA samples were isolated from the leukocytes of peripheral blood by commercial kit using the salting out DNA extraction method. The DNA samples were isolated from a total of 91 animals from four breeds; East Anatholian Red (DAK), Zavot (ZAV), Turkish Brown Swiss (ESM) and Simmental (SIM) which are the cattle breeds in the province of Kars. Isolated DNA samples were concentrated at 100ng/μl prior to RAPD-PCR process. A total of 18 primers were performed on 10 animals per breed. Duplicate PCR reactions of each animal were carried out for 40 cycles; 1 min. at 94 °C (denaturation), 1 min. at 35 °C (annealing) and 1 min. at 72 °C (extension). Amplification products were separated by agarose gel (%1.5) electrophoresis and detected by ethidium bromide (0.5 μg/ml) staining. Eighteen primers were screened and 10 of them were selected for further use as their clear and capable number of amplified bands.

Genetic relations between breeds were determined by RAPD polymorphisms obtained from a total of 89 loci. Statistical analysis of the data, estimating the genetic distances between breeds and sketching the cluster trees by UPGMA method were performed by a computer program.

Estimation of genetic relationships between the breeds revealed two clearly distinct groups of breeds: one was consisted of DAK and SIM, and the other was ESM and ZAV. No breed-specific or sex-specific RAPD bands were detected in this study.

The study showed that the polymorphisms generated by RAPD-PCR in the cattle breeds of the province of Kars enables this method for the determination of genetic relationships and fingerprints.

Key Words: Cattle, RAPD-PCR, DNA Fingerprinting, Phylogeny, Breed Characterisation

7. KAYNAKLAR

- 1- Akbay, A.: Fenotipden ilaç hedeflendirmesine; moleküler biyoloji ve informatik bilgilerinin kullanımını örnekleyen metodolojik bir yaklaşım. *Biyokimya Derg.*, 4: 3-10, 1998.
- 2- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Edition, Garland Publishing, 316-317. New York. 1994.
- 3- Alpan, O., Arpacık, R.: *Sığır Yetiştiriciliği*. Şahin Matbaası. 35-59. Ankara. 1996.
- 4- Ambady, S., Carpio, C.M., Ponce de Leon, F.A.: Optimization of RAPD-PCR conditions in cattle. *Anim. Biotechnol.*, 7:(2), 99-112, 1996.
- 5- Anon.: DAP; Doğu Anadolu Projesi Ana Planı: Mevcut Durum ve Analizi; Tarım, Cilt II. DPT. 2000.
- 6- Apostol, B.L., Black, W.C., William, I., Reiter, P., Miller, B.: Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 76:325-334, 1996.
- 7- Appa Rao, K.B.C., Bhat, K.V., Totey, S.M. : Detection of species-specific genetic markers in farm animals through random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 13: 135-138, 1996.
- 8- Asakura, N., Nakamura, C., Ohtsuka, I.: RAPD markers linked to the nuclear gene from *Triticum timopheevi* that confers compatibility with

Aegilops squarrosa cytoplasm on alloplasmic durum wheat. *Genome*, 40: 201-210, 1997.

9- Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., Johansson, K.E.: Application of the polymerase chain reaction for the routine identification of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.*, 20: 307-309, 1997.

10- Becker, W.M., Deamer, D.W.: *The World of the Cell*. 2nd Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Co., 748-9, Redwood City. 1991.

11- Beckmann, J.S., Kashi, Y., Hallerman, E.M., Nave, A., Soller, M.: Restriction fragment length polymorphism among Israeli Holstein-Friesian dairy bulls. *Anim. Genet.*, 17: 25-38, 1986.

12- Beuzen, N.D., Stear, M.J., Chang, K.C.: Molecular markers and their use in animal breeding. *Vet. J.*, 160: 42-52, 2000.

13- Birdsell, J.B.: *Human Evolution*. Rand Mc Nally and Company, 240-488, Chicago. 1972.

14- Bock, R.E., Lew, A.E., Minchin, C.M., Jeston, P.J., Jorgensen, W.K.: Application of PCR assays to determine the genotype of *Babesia bovis* parasites Isolated from cattle with clinical babesiosis soon after vaccination against tick fever. *Aust. Vet. J.*, 78: 179-181, 2000.

15- Bourdon, R.M.: *Understanding Animal Breeding*. Prentice-Hall Inc., 29-412, London. 1997.

16- Bradley, D.G.: Genetic characterisation of cattle in west and central Africa. Summary Reports of European Commission Supported STD-3 Projects, CTA, 1998.

- 17- Bradley, D.G., MacHugh, R.T., Cunningham, E.P., Loftus, R.T.: Mitochondrial diversity and origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:5131-5135, 1994.
- 18- Brock, T.D., Madigan, M.T.: *Biology of Microorganisms*. 6th Edition, Prentice Hall, 434, New Jersey. 1991.
- 19- Camp, P.S., Arms, K.: *Exploring Biology*. 2nd Edition, Saunders College Publishing, 587, Philadelphia. 1984.
- 20- Carpio, C.M., Ambady, S., Ponce de Leon, F.A.: Bovine DNA polymorphisms uncovered by RAPD-PCR. *Anim. Biotechnol.*, 7:(2), 125-134, 1996.
- 21- Clark, P., Bowden, D.K., Parry, B.W.: Studies to detect carriers of Haemophilia A in German Shepherd Dogs using diagnostic DNA polymorphisms in the human factor VIII gene. *Vet. J.*, 153: 71-74, 1997.
- 22- Cushwa, W.T., Medrano, J.F.: Applications of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for genetic analysis of livestock species. *Anim. Biotechnol.*, 7:1, 11-31, 1996.
- 23- Çetinkaya, B., Egan, K., Harbour, D.A., Morgan, K.L.: An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's Disease in adult cattle in South West England. *Epidemiol. Infect.*, 116: 373-379, 1996.
- 24- Çetinkaya, B., Ertaş, H.B., Öngör, H., Muz, A.: Detection of *Leptospira* species by polymerase chain reaction in urine of cattle. *Tr. J. Vet. Ani. Sci.*, 24: 123-130, 2000.
- 25- Davis, L.G., Dibner, M.D., Battey, J.F.: *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, 23-58, New York. 1986.

26- Dieffenbach, C.W., Dveksler, G.S.: PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-287, New York. 1995.

27- Dixon, A.K., Richardson, P.J., Pinnock, R.D., Lee, K.: Gene-Expression Analysis at the Single-Cell Level. *TiPS* 21: 65-70, 2000.

28- Erlich, H.A., Gelfand, D., Sninsky, J.J.: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Sci.*, 252: 1643-1651, 1991.

29- Ertuğrul, O., Alpan, O.: Türkiye sığır ırklarında kan grubu genetik polimorfizmi. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.*, 15:328-337, 1991.

30- Ganong, W.F.: Tıbbi Fizyoloji. 19. Baskı, 21, Barış Kitabevi, İstanbul. 1999.

31- Goldstein, D.B., Schlötter, C.: Microsatellites. 2nd Edition, 1-22, Oxford. 2000.

32- Gonzales, J.M., Ferrer, E.: RAPD analysis in *Hordeum* species. *Genome*, 36:1029-1031, 1993.

33- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M.: An Introduction To Genetic Analysis. W.H. Freeman and Company, 34-761, New York-1993.

34- Gülbaz, K.: Kişisel Görüşme. Tarım İl Müdürlüğü Destekleme Şubesi Arşivi, Kars. 2004.

35- Güneren, G.: Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Parmak izi Yöntemi'nin (RAPD-PCR) Türkiye Yerli Sığır

İrklarında Uygulanma Olanakları. Doktora Tezi. Ankara Üniv. Sağlık Bil. Enst. 1999.

36- Gwakisa, P.S., Kemp, S.J., Teale, A.J.: Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers. *Anim. Genet.*, 25:89-94, 1994.

37- Hale, C.S., Herring, W.O., Johnson, G.S., Shibuya, H., Lubahn, D.B., Keisler, D.H.: Evaluation of the leptin gene as a possible marker of carcass traits in Angus cattle. UMC Anim. Sci. Departmental Report, 25-27, 1998.

38- Hallerman, E.M., Nave, A., Kashi, Y., Holzer, Z., Soller, M., Beckmann, J.S.: RFLP in dairy and beef cattle at the growth hormone and prolactin loci. *Anim. Genet.*, 18: 213-222, 1987.

39- Harwood, A.J.: Basic DNA and RNA Protocols. Humana Press, 11-290, Totowa. 1996.

40- Herrera, E.A., Perez, O., Segovia, M.: Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by a multiplex-polymerase chain reaction. *J. Applied Bacteriol.*, 80: 596-604, 1996.

41- Hoelzel A.R.: Molecular Genetic Analysis of Populations. 2nd Edition. Oxford University Press, 229-235, Oxford. 1998.

42- Horng, Y.M., Huang, M.C.: Male-specific band in random amplified microsatellite polymorphism fingerprints of Holstein cattle. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC, (B)* 24: 41-46, 2000.

43- Howe, C.J., Ward, E.S.: Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach. IRL Press at Oxford University Press, 53-114, Oxford. 1989.

- 44- Hubacek, J.A., Waterworth, D.M., Poledne, R., Pitha, J., Skodova, Z., Humphries, S.E., Talmud, P.J.: Genetic determination of plasma lipids and insulin in the Czech population, Clin. Bioc., 34: 113-118, 2001.
- 45- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.: PCR Strategies. Academic Press, 39-67, San Diego. 1995.
- 46- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.: PCR Protocols. Academic Press, 21-26, San Diego. 1992.
- 47- Janeway, C.A., Travers, P.: Immunobiology. 2nd Edition, Current Biology Limited, 429-629, London. 1996.
- 48- Jansson, J.K.: Tracking genetically engineered microorganisms in nature. Curr. Op. Biotechnol., 6: 275-283, 1995.
- 49- Jeanpierre, M.: A RAPD Method for purification of DNA from Blood. Nucleic Acids Res., 15: (22) 9611, 1987.
- 50- Jenderek, M.M., Schierenbeck, K.A., Olney, A.J.: Development of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers Characteristic of *Hibiscus rosa-sinensis* and *H. Syriacus*. CATI Publications. 1997.
- 51- Johnson, J.R.: Development of polymerase chain reaction-based assays for bacterial gene detection. J. Microbiol. Methods, 41: 201-209, 2000.
- 52- Kaiser, M.G., Yonash, N., Cahaner A., Lamont, S.J.: Microsatellite Polymorphism between and within Broiler Populations. Poul. Sci., 79: 626-628, 2000.

53- Kantanen, J., Vilkki, J., Elo, K., Mäki-Tanila, A.: Random amplified polymorphic DNA in cattle and sheep: Application for detecting genetic variation. *Anim. Genet.*, 26, 315-320, 1995.

54- Kaya, N.: *Biyokimya*. Atatürk Üniversitesi Yayınları No:743, 208-219, Erzurum. 1993.

55- Kemp, S.J., Teale, A.J.: Randomly primed PCR amplification of pooled DNA reveals polymorphism in a ruminant. repetitive DNA sequence which differentiates *Bos indicus* and *B. taurus*. *Anim. Genet.*, 25: 83-88. 1994.

56- Kimura, M., Crow, J.F.: The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genet.*, 49:725-38, 1964.

57- Lehninger, A.L.: *Biochemistry*. Kalyani Publishers, 309-331, New Delhi. 1995.

58- Lie, Y.S., Petropoulos, C.J.: Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Curr. Op. Biotechnol.*, 9: 43-48, 1998.

59- Lovette, J.I., Bermingham, E., Rohwer, S., Wood, C.: Mitochondrial restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequence variation among closely related avian species and the genetic characterization of hybrid *Dendroica* warblers. *Mol. Eco.*, 8: 1431-1444, 1999.

60- Mandrell, R.E., Wachtel, M.R.: Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. *Curr. Op. Biotechnol.*, 10: 273-278, 1999.

61- Mariani, B.D., Tuan, R.S.: Advances in the diagnosis of infection in prosthetic joint implants. *Molecular Medicine Today*, 4: 207-213, 1998.

- 62- McPherson, M.J., Hames, B.D., Taylor, G.R.: PCR 2: A Practical Approach. Oxford University Press, 7-118, Oxford. 1995.
- 63- McPherson, M.J., Quirke, P., Taylor, G.R.: PCR: A Practical Approach. IRL Press, 1-14. Oxford, 1991.
- 64- Moazami-Goudarzi, K., Laloe, D., Furet, J.P., Grosclaude, F.: Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. Anim. Genet., 28: 338-345, 1997.
- 65- Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K., Thompson, R.C.: RAPD analysis of Giardia DNA and correlation with isoenzyme data. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 87:(6) 702-5, 1993.
- 66- Murray, R., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., Granner, D.K.: Harper'ın Biyokimyası. 24. Baskı, Barış Kitabevi, 420-801, İSTANBUL. 1996.
- 67- Nei, M.: Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 70:3321-3323, 1973.
- 68- Newton, C.R.: PCR Essential Data. John Wiley & Sons Ltd, 1-56, Chichester. 1995.
- 69- Orlando, V.: Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. TIBS 25: 99-103, 2000.
- 70- Özbeyaz, C.: Türkiye yerli sığır ırkları arasında hemoglobin polimorfizmi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 38: 53-59, 1991.
- 71- Özbeyaz, C., Yıldız, M.A., Çamdeviren, H.: Türkiye'de yetiştirilen farklı esmer sığır sürüleri arasındaki genetik ilişkiler. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 25: 453-461, 2001.

72- Özkara, H.A., Kocagöz, T., Özçelik, U., Akçaören, Z., Göçmen, A.: Parafine gömülmüş doku örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu ile *Mycobacterium tuberculosis* tanısında üç farklı primer çiftinin karşılaştırılması. *Biyokimya Derg.*, 1: 5-8, 1997.

73- Pfaller, M.A.: Enfeksiyon hastalıklarının tanı ve tedavisi; yeni millenyum için moleküler yöntemler. *Biyokimya Derg.*, 4: 61-64, 1999.

74- Pirottin D., Poncelet, D., Grobet, L., Royo, L.J., Brouwers, B., Masabanda, J., Takeda, H., Fries, R., Sugimoto, Y., Womack, J.E., Dunner, S., Georges, M.: High-resolution, human-bovine comparative mapping based on a closed YAC contig spanning the bovine *mh* locus. *Mammalian Genome*, 10: 289-293, 1999.

75- Polat, F.M., Nalbantoğlu, B.: Investigation of expression of HOX 2C and HOX 4B homeobox genes in human colorectal cancer by using an RT-PCR method. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 30(1): 23-29, 2000.

76- Pommepuy, M., Le Guyader, F.: Molecular approaches to measuring microbial marine pollution. *Curr. Op. Biotechnol.*, 9: 292-299, 1998.

77- Press, R.D., Deloughery, T.G.: Trombotik risk değerlendirmesi; sık rastlanan, tedavi edilebilir genetik bir hastalık için moleküler ve konvansiyonel testler. *Biyokimya Derg.*, 3: 42-46, 1999.

78- Rashtchian, A.: Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction. *Curr. Op. Biotechnol.*, 6: 30-36, 1995.

79- Rassman, K., Schlottere, C., Tautz, D.: Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12:113-118, 1991.

- 80- Rincon, G., D'Angelo, M., Gagliardi, R., Kelly, L., Llambi, S., Postiglioni, A.: Genomic polymorphism in Uruguayan Creole cattle using RAPD and microsatellite markers. *Res. Vet. Sci.*, 69: 171-174, 2000.
- 81- Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber-Rolfs, I.: *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. 1-32, Berlin. 1992.
- 82- Rothuizen, J., Van Wolferen, M.: Randomly amplified DNA polymorphism in dogs are reproducible and display Mendelian transmission. *Anim. Genet.*, 25: 13-18, 1994.
- 83- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
- 84- Schalkwyk, L.C., Francis, F., Lehrach, H.: Techniques in mammalian genome mapping. *Curr. Op. Biotechnol.*, 6: 37-43, 1995.
- 85- Scott, M.P., Haymes, K.M., Williams, S.M.: Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.*, 20:5493, 1992.
- 86- Sineo L., Martini G., Borghi M., Failli M.: Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Boll. Chim. Farmacol.*, 132:6, 201-202, 1993.
- 87- Sinkora, M., Sun, J., Butler, J.E.: antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets; V. VDJ gene Chimeras resembling gene conversion products are generated at high frequency by PCR *in vitro*. *Mol. Immunol.*, 37: 1025-1034, 2000.
- 88- Siriratmanawong, N., Fucharoen, G., Sanchaisuriya, K., Ratanasiri, T., Ratanasiri, T., Fucharoen, S.: Simultaneous PCR detection of β -

thalassemia and α -thalassemia 1 (SEA type) in Prenatal diagnosis of complex thalassemia syndrome. Clin. Biochem., 34: 377-380, 2001.

89- Steffen, P., Eggen, A., Dietz, A.B., Womack, J.E., Stranzinger, G., Fries, R.: isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. Anim. Genet., 24: 121-124, 1993.

90- Sterky, F., Lundeberg, J.: Sequence analysis of genes and genomes. J. Biotechnol., 76: 1-31, 2000.

91- Süzen, H.S.: Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) genetic polymorphism in Turkish population. J. Fac. Pharmacol. Ank., 30: 27-38, 2001.

92- Şahin, F., Çiftçi, M., Pirim, İ.: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR). II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kurs Notları. Atatürk Üniv. Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Erzurum. 2000.

93- Şaylı, B.S.: Medikal Genetik İlkeler. 3. Baskı, Türkiye Klinikleri Yayınevi, 77-149, Ankara. 1995.

94- Taga, Y., Aslan, D., Güner, G., Kutay, F.Z.: Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. Mart Matbaacılık A.Ş., 426-434, İstanbul. 2001.

95- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., Bonierbale, M.W.: RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/Technol., 7:257-264, 1989.

96- Taylor, G.R., Logan, W.P.: The polymerase chain reaction: new variations on an old theme. Curr. Op. Biotechnol., 6: 24-29, 1995.

- 97- Taylor, G. R., Robinson, P.: The polymerase chain reaction: From functional genomics to high-school practical classes . Curr. Op. Biotechnol., 9: 35-42, 1998.
- 98- Temizkan, G., Arda, N.: Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. BİYOGEN Yayınları No:1, Nobel Tıp Kitabevleri, 57-66, İstanbul. 1999.
- 99- Tham, K.M.: Molecular and clinicopathological diagnosis of malignant catarrhal fever in cattle, deer and buffalo in New Zealand. Vet. Rec., 141: 303-306, 1997.
- 100- Tillib, S.V., Mirzabekov, A.D.: Advances in the analysis of DNA sequence variations using oligonucleotide microchip technology. Curr. Op. Biotechnol., 12: 53-58, 2001.
- 101- Tuli, A., Aksoy, K., Kayrın, L., Attila, G: Tanıda DNA Teknikleri. Çukurova Üniv. Tıp Fak. Yay., 1-86, Adana. 2001.
- 102- Viana, J.L., Fernandez, A., Sanchez, L., Rodriguez-Calvo, M.S., Iglesias, A.: Analysis of ILSTS002 microsatellite locus in Barrosa cattle breed. Arch. Zootec., 47: 157-162, 1998.
- 103- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18:22, 6531-35, 1990.
- 104- Wilson, G.N.: Clinical Genetics. Wiley-Liss, 9-63, New York. 2000.
- 105- Yonash, N., Cheng, H.H., Hillel, D.E., Channer, A.: DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. Poul. Sci., 80: 22-28, 2001.

106- www.accessexcellence.org/AB/GG/

107- www.agis.nlri.go.kr/

108- www.extension.iastate.edu/Pages/ansci/swinereports/asl-1377.pdf

109- www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm



8. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Karabük'te doğdu. İlk ve orta öğrenimini sırasıyla; Kars Fevzi Paşa İlkokulu ve Kars Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 1994 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 1999 yılında mezun oldu. Aynı yıl Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve atandı. 2000 yılı güz döneminde Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde doktora öğrenimine başladı ve halen aynı üniversitede görevine devam etmektedir.