

Palaemon elegans'ın TÜR İÇİ
POLİMORFİZMİNİN
RAPD-PCR TEKNİĞİ İLE İNCELENMESİ

Onur EROĞLU

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos – 2006

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Onur Eroğlu'nun "*Palaemon elegans*'ın Tür İçi Polimorfizminin RAPD-PCR Tekniği İle İncelenmesi" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 27.07.2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı): Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI SUSUZ
Üye : Yard. Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ
Üye : Doç. Dr. Yücel şAHİN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Palaemon elegans'* ın TÜR İÇİ POLİMORFİZMİNİN RAPD-PCR TEKNIĞİ İLE İNCELENMESİ**

Onur EROĞLU

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI SUSUZ

2006, 61 sayfa

Mitokondriyal DNA korunmuş yapı ve organizasyon özelliklerinden dolayı, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliği belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA kullanılarak, hem sistematik hem de genetik çalışmalar için, rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği kullanılabilir. RAPD-PCR ekonomik olması ve genomik bilgiye ihtiyaç duyulmaması nedeniyle genetik uzaklıkların belirlenmesi için tercih edilmiştir.

Bu çalışmada, *Palaemon elegans* türünden izole edilen mitokondriyal DNA'ların 39 primerle amplifikasyonu denenmiştir. Denenen primerlerden 4 tanesinin verdiği amplifikasyon sonuçlarına göre bu türün, tür içi polimorfizmi araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Palaemon elegans*, RAPD-PCR, polimorfizm, mtDNA, amplifikasyon

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF THE INTERIOR SPECIES POLYMORPHISM OF
Palaemon elegans BY RAPD-PCR TECHNIQUE****Onur EROĞLU****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Asist. Prof. Dr. Filiz ALANYALI SUSUZ****2006, 61 pages**

Mitochondrial DNA is widely used in order to estimate the amount of genetic variability within and between different populations, because of its conserved structure and organization. Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) can be used for both systematic and genetic studies. This technique was preferred because of its economic and less laborious properties.

In this work, the species of *Palaemon elegans* was studied. Amplification of mitochondrial DNA of these species was carried out with 39 primers. According to the amplification results of 4 primers, the interior species polymorphism of *Palaemon elegans* was determined.

Keywords: *Palaemon elegans*, RAPD-PCR, polymorphism, mtDNA, amplification

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında engin bilgisinden faydalandığım, her zaman manevi desteğini ve yardımını gördüğüm tez danışmanım Hocam Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI SUSUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İyi niyetini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgisini ve ilgisini vermekten hiçbir zaman kaçınmayan, iyi ve kötü günümde her zaman yanımda olan değerli Hocam Prof. Dr. H. Mehtap KUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında kullandığım örneklerin taylorlerini yapan Hocam Yard. Doç. Dr. Mustafa TANATMIŞ'a teşekkür ederim.

Çalıştığım günler sırasında laboratuvardaki yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda bana dostluklarını veren Araş. Gör. Gözde AYDOĞAN'a ve Araş. Gör. Volkan KILIÇ'a çok teşekkür ederim.

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren anneme, babama ve ablama minnettarım.

Onur EROĞLU
Ağustos - 2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Karideslerin Genel Özellikleri.....	1
1.1.1.Karideslerin morfolojik özellikleri.....	1
1.1.2.Karideslerin biyolojik özellikleri.....	2
1.1.2.1.Üreme ve gelişme.....	2
1.1.2.2.Beslenme.....	2
1.2. Palaemon'un Sistematik Özellikleri.....	3
1.2.1.Morfolojik özellikleri.....	3
1.2.2.Biyo-ekolojik özellikleri.....	3
1.2.3.Dağılımı.....	3
1.2.4.Ticari önemi.....	4
1.3. Moleküler Sistematikte Kullanılan Bazı Teknikler.....	4
1.3.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	4
1.3.1.1. PCR-RFLP'de sorunlar.....	7
1.3.1.2. RFLP'nin yararları.....	7
1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	8
1.3.2.1. İlk birkaç siklus.....	9
1.3.2.2. PCR kullanım alanları.....	10
1.3.2.3.PCR aşamaları.....	10
1.3.2.4. PCR optimizasyonu.....	14
1.3.3. Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR).....	16

2. MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1. Palaemon Materyali.....	19
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	19
2.1.3. Tampon ve çözeltiler.....	20
2.1.3.1. DNA İzolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	20
2.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda kullanılan çözeltiler....	20
2.1.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi için kullanılan çözeltiler.....	22
2.1.4. Sterilizasyon.....	22
2.2. Yöntem.....	23
2.2.1. Toplanan Palaemon örneklerinin tür tayini.....	23
2.2.2. Örneklerden Mitokondriyal DNA izolasyonu.....	23
2.2.3. DNA konsantrasyon tayini.....	23
2.2.4. Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR)	24
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
2.2.6. Genetik uzaklık tayini.....	24
3. BULGULAR	26
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	57
KAYNAKLAR	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13
3.1. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	27
3.2. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	28
3.3. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	29
3.4. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	30
3.5. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	31
3.6. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	32
3.7. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	33
3.8. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	34
3.9. Tuzla ve Bargilya istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	35
3.10. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	36
3.11. Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	37
3.12. Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	38

3.13. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	39
3.14. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	40
3.15. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	41
3.16. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	42
3.17. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	43
3.18. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	44
3.19. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	45
3.20. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	46
3.21. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	47
3.22. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	48
3.23. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	49
3.24. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	50
3.25. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	51

3.26. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	52
3.27. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	53
3.28. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	54
3.29. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	55
3.30. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan <i>Palaemon elegans</i> bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. RFLP analizi için kullanılan başlıca teknikler.....	6
1.2. RFLP'de kullanılan Southern Blotting ve PCR tekniklerin kıyaslanması....	7
2.1. Agaroz jel elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapabilecek DNA molekül büyüklükleri	12
3.1. Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve % G+C oranları	21

SİMGELER VE KISALTMALAR

- bp** : Baz çifti
- DNA** : Deoksiribonükleik Asit
- dNTP** : Deoksinükleotid tri Fosfat
- EDTA** : Etilendiamin-tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu
- HCl** : Hidroklorik Asit
- Mg⁺²** : Magnezyum
- MgCl₂** : Magnezyum Klorür
- ml** : Mililitre
- mm** : Milimetre
- mM** : Milimolar
- MW** : Moleküler ağırlık
- µM** : Mikro molar
- µl** : Mikrolitre
- ng** : Nanogram
- NaOH** : Sodyum Hidroksit
- PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RAPD** : Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
- RE** : Restriksiyon Endonükleaz
- RFLP** : Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
- g** : Devir/dakika
- T** : °C cinsinden sıcaklık
- TE** : Tris-EDTA
- T_m** : Erime sıcaklığı
- UV** : Ultraviyole
- V** : Volt
- Pop** : Popülasyon

1. GİRİŞ

1.1. Karideslerin Genel Özellikleri

Karidesler Crustacea (Kabuklular) sınıfının Decapoda (On ayaklılar) takımından olup, bilimsel olarak Natantia (Yüzücüler) grubu adı altında toplanırlar. Boyları çok değişken olup, birkaç mm'den 35 cm'ye kadar olabilirler. Bu özelliklerine göre de bölgesel olarak adlandırılırlar. Türkçe de küçük boylu türler genelde "Teke", büyük boylu türler ise "Karides" olarak adlandırılırlar.

Karidesler ekvatorlardan kutuplara kadar geniş bir yayılım alanına sahiptirler. Tatlısu, acısu ve denizlerde yaygın olarak bulunurlar. Pelajik bölgede yaşayan az sayıdaki temsilcilerine karşın çoğu bentik bölgede ve özellikle çamurlu, kumlu-çamurlu veya kayalık diplerde yaşarlar. Bazıları süngerler gibi omurgasızların içinde veya mercan resifleri arasında yaşantılarını sürdürebilirler.

Türkiye denizleri karides türleri yönünden zengin olmasına karşın bu grup üzerinde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların çoğu sistematik ve ekolojik özelliktedir.

1.1.1. Karideslerin morfolojik özellikleri

Karideslerin vücudu sefalotoraks (baş-göğüs) ve abdomen olmak üzere başlıca iki bölümden oluşur. Bu bölümleri oluşturan segmentler birer çift ekstremitte (vücut üyesi) taşır.

Sefalotoraks : Karideslerin sefalotoraks bölgesi "Karapas" adı verilen bir kabukla örtülmüştür. Bu kabuk, yarık veya çizgilerle az-çok belirgin olan bazı bölgelere ayrılmıştır. Sefalotoraksın önünde rostrum adı verilen bir uzantı bulunur.

Abdomen: Karideslerin abdomen olarak tanımlanan karın bölgesi 6 segmentten oluşmuştur. İlk 5 segment "Pleopod" (yüzme bacağı) adı verilen ekstremiteleri taşır. Son segment ekstremitersiz olup, ucunda "Telson" adı verilen

üçgenimsi bir uzantı ile bunun her iki yanında “Üropod” adı verilen birer çift uzantı bulunur. Telson ve üropodlar birlikte kuyruk yüzgecini oluştururlar.

1.1.2. Karideslerin biyolojik özellikleri

1.1.2.1. Üreme ve gelişme

Karideslerin çoğunda seksler ayrılmış olmasına rağmen, bazı türler (Ör; *Pandalina borealis*) önce bir erkeklik safhası geçirir ve daha sonra dişiye dönüşür.

Yumurta sayısı larval evre sayısına bağlı olduğu için türlere göre 10–1.000.000 arasında değişir. Larvalar planktonik olup, akıntılarla kıyıya sürüklenirler ve kıyıya ulaştıklarında postlarva evresinde olurlar. Postlarvaya ulaşma yaklaşık 3 hafta sürer. Bu evredeki larvalar kıyılardaki acısulara girer ve buradaki plajik yaşamı terk ederek bentik yaşama geçerler. Burada hızla büyüyerek genç karidesler haline gelirler ve daha sonra hızlı gelişimine devam ederek tekrar denize dönerler. Sonuç olarak açığa ulaşan erginler tekrar yumurtlar ve böylece üreme devrini yeniden başlatırlar.

1.1.2.2. Beslenme

Beslenme ile ilgili göçler gece-gündüz periyoduna bağlı olarak yapılır. Diğer bir değişle, gündüz süresince dipte yaşayan ve buradaki organizmalarla beslenen karidesler, geceleyin besin bulmak için suda vertikal veya horizontal olarak göç yaparlar.

Karideslerde izlenen mevsimsel ve günlük göçler av kıtalarını etkilediğinden, avcılarının ve araştırmacılarının bu göçleri iyi bilmesi gerekmektedir.

1.2. Palaemon'un Sistematik Özellikleri

Phylum:	Arthropoda
Classis:	Crustacea
Subclassis:	Malacostraca
Superordo:	Eucarida
Ordo:	Decapoda
Seksiyo:	Natantia
Subordo:	Caridea
Familya:	Palaemonidae
	Palaemon elegans

1.2.1. Morfolojik özellikleri

Rostrum düz ve yüksek olup, uzunluğu anten pulunun ucuna kadar erişir; dorsali 7–9, ventrali 3 (nadiren 2 veya 4) dişlidir. Anten ve solungaç dikenini karapasın anteriöründe yer alır. Antennül kamçısının kaynaşmış olan kaide kısmı serbest olan en kısa parçanın yarısından daha uzundur. İkinci çift pereiopodun pensleri kısa parmaklı olup boyları kaide kısmının yarısından biraz büyüktür. Mandibüler palp 2 segmentlidir. Maksimum boy 6 segmentlidir.

1.2.2. Biyo-ekolojik özellikleri

Littoral bölgede kayalık sahillerde yaşar. Karadeniz'de yumurtalı bireylere tüm yıl boyunca rastlanır.

1.2.3. Dağılımı

Tüm Karadeniz ve Akdeniz'de rastlanılan bu tür, ayrıca Doğu Atlantik sahillerinde de dağılım gösterir.

1.2.4. Ticari önemi

İtalya, Fransa, Fas, İspanya, Sicilya, Yugoslavya, Mısır ve Rusya pazarlarında rastlanılan bu tür taze veya balık yemi olarak tüketilir.

1.3. Moleküler Sistematikte Kullanılan Bazı Teknikler

Günümüzde türlerin tanımlanması ve karakterizasyonunda moleküler tekniklerin kullanılması, gittikçe önem kazanan bir konu haline gelmiştir. Türlerin tanımlanabilmesi ve karakterizasyonu amacıyla bunların morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin yanı sıra son yıllarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış rRNA'nın Restriksiyon Analizi (ARDRA), Pulse Alan Jel Elektroforezi (PFGE), Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve DNA dizi analizi gibi moleküler biyoloji tekniklerinden de yararlanılmaktadır.

Bu yöntemler ile canlılar cins, tür, alttür ve suş düzeyinde sınıflandırılmaya ve tanımlanmaya çalışılmaktadır. Her yöntemin uygulanabilmesinde, tekrar edilebilirlik, ekipman gereksinimi ve çözüme ulaşmadaki kesinlik düzeyleri açısından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır.

1.3.1. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Bir genin lokalizasyonu için gerekli ilk bilgiler, bir ailede bilinen bir kromozomal lokalizasyonda var olan mutant bir genin kalıtımının karşılaştırılması ile elde edilir. Bir hastalık geni ile bir belirleyici genin birlikte katılması, bu iki noktanın kromozom üzerinde fiziksel olarak birlikte olduğunu düşündürür.

"LINKAGE" genetikte bilinen bir terim olup Drosophila üzerinde yapılan ilk çalışmalara kadar dayanır. Bu çalışmalarda, bu genlerin gruplar olarak katıldığı gösterilmiştir.

POLİMORFİZM: Yakın zamana kadar bir proteinin davranış farklılığı; enzimatik aktivitesi veya elektroforetik mobilitesi ile belirleniyordu. O nedenle de genetik analizler için gerekli olan polimorfizmler, sınırlı olarak bulunmaktaydı. Bu durum RE'lerin keşfi ile dramatik olarak değişmiştir.

Bir popülasyonda mevcut olan genetik çeşitliliğe polimorfizm denir. Bu doğal farklılıklar kuşaktan kuşağa Mendel yasalarına göre aktarılırlar.

İnsan genomunda tek baz değişiklikleri çok siktir. Bazılarına göre bu sıklık her 100 baz çiftinde bir olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nükleotid değişikliklerinin büyük çoğunluğu zararsızdır.

DNA Polimorfizmi, DNA üzerinde hastalığa neden olmayan, suskun nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Eğer bu polimorfizmler, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden olurlarsa; kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. Bunlara "Restriction fragment length polymorphism" (RFLP)/ "Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri" diyoruz.

Eğer bir birey, RFLP için heterozigot ise, o takdirde birey bilgilendirici (INFORMATIF) olarak tanımlanır. Böylece bu kromozomların/ işaretlerin nesilden nesile gelmelerini incelemek mümkün hale gelir.

Saptanan değişiklik bir gene yakın (Linked) olduğunda; gendeki hatanın bu polimorfizme paralel gittiği varsayılır Bu gene İNDİREKT YAKLAŞIM olarak tanımlanabilir.

RFLP analizinin temeli, anne ve babanın iki ayrı alleli taşıyan iki kromozomunun birbirinden ayırt edilmesine ve aile içinde daha önceden bulunan hasta bir çocuk yardımı ile hangi kromozomun riskli olduğunun, yani hangi kromozomun mutasyona uğramış alleli (yani bozuk geni) taşıdığına saptanmasına dayanır.

RFLP analizinde, iki kromozom birbirinden gen içinde ya da gen yakınında bulunan bir DNA polimorfizminin bulunması (+); ya da bulunmaması (-) ile ayrılır.

Analizin kesinliği kullanılan polimorfik işaretin, hastalık lokusuna yakınlığı ile doğrudan ilişkilidir. Hastalık lokusuna m¼mk¼n olduğunca yakın; gen içi işaretlerin kullanımı tanının kesinliğini % 99'a kadar arttırır. Kullanılan genetik işaret ve hastalık lokusu birbirine ne kadar yakınsa rekombinasyon olasılığı o kadar k¼c¼kt¼r ki bu da analiz için avantajdır.

Homolog kromozomlar, meiosis sırasında birleşirlerken, rekombinasyon denilen olayda parça değişimleri ortaya çıkar. RFLP genden ne kadar uzaktaysa; rekombinasyon olasılığı o denli artar.

RFLP analizinde çok farklı teknikler kullanılmakla (izelge 1,1) beraber başlıca iki temel teknik uygulanmaktadır. Bunlardan birisi Southern Tekniği; diğerisi ise PCR tekniğidir. Bu tekniklerin kıyaslanması ise izelge 1,2'de g¼r¼lmektedir.

Çizelge 1.1. RFLP analizi için kullanılan başlıca teknikler

1. Southern Blotting Tekniği
 - a) Radyoaktif
 - b) non-radyoaktif
2. Polimeraz zincir reaksiyonu ve modifikasyonları
3. Single strand Conformation Polimorfizm
4. DNA dizi analizi

RFLP analizi için ana y¼ntem Southern Blotlama tekniğidir. Buna g¼re izole edilen, herhangi bir restriksiyon enzimi ile kesilen ve agaroz jel elektroforezi yapılarak jel ¼zerinde y¼r¼t¼len DNA, daha sonra filtreye geçirilir. Filtre ¼zerindeki DNA, radyoaktif işaretlenmiş bir DNA parçası (prob) ile hibridize edilir. Bundan sonra filtre otoradyografi kaseti içine alınarak fotoğraf filmi ¼zerine geçmesi sağlanır. Film banyo edilerek ortaya çıkan fragmentlerin analizi yapılabilir (Maniatis ve ark. 1989).

Çizelge 1.2. RFLP'de kullanılan Southern Blotting ve PCR tekniklerin kıyaslanması:

Southern	PCR
Saf, temiz ve sağlam DNA gereklidir.	Herhangi bir dokudan çalışma yapılabilir
5 mg genomik DNA gereklidir	0.5mg genomic DNA [500 ng] yeterlidir
Yaklaşık 4-5 gün sürer	Yaklaşık 1 gün sürer.
Radyoaktif /non-radyoaktif	Non-radyoaktif

1.3.1.1 PCR-RFLP'de sorunlar

RFLP analizinde sık olarak kullanılan PCR tekniğinde bazı sorunlar oluşabilir. Bunlar şunlardır.

1. Kısmi kesim: "Özellikle heterozigot gibi görünenlerde dikkat etmek gerekmektedir."
2. Allelik Dropout: "Bir dizideki varyant, oligonükleotid dizisinin bir kromozoma bağlanmasına engel olur. Böylece sadece bir kromozoma ait PCR ürünü oluşur ki; bu da yanlış sonuca yol açabilir. Ya Southern Tekniği uygulanarak; ya da yeni primerler tasarımıyla bu sorun önlenir."
3. Farklı Baba: Gerçek babanın bilinmemesi ya da saklanması halinde yanlış sonuç alınır.
4. a) PCR ile RFLP yapılırken: primerler design edilirken-restriksiyon enzim kesim noktaları ortaya gelecek şekilde yapılır.

b) Bazen, bir RE, PCR tamponunda çalışmayabilir: o takdirde PCR ürünü saflaştırılır. Daha sonra enzimle muamele gerçekleştirilir. Standard fenol/kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu ile pürifikasyon yapılır. Ya da pürifikasyon için değişik kimyasal maddeler içeren ticari kitler kullanılır.

1.3.1.2. RFLP'nin yararları

RFLP'nin yararları şu şekilde sıralanabilir.

1. Kalıtım çalışması için gereklidir.
2. Yapısal heterozigotluğun kaybının incelenmesi (LOH)
3. Doku tiplendirmesinde/prenatal tanıda/babalık tayininde kullanılabilir.

4. Gen klonlanmasında kullanılabilir.
5. Enfeksiyon ajanların (bakteriler, virüsler) birbirlerinden farklılıklarının belirlenebilmesinde kullanılabilir.

1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İlk kez 1985'de bilim dünyasına sunulduğundan itibaren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir çığır açmıştır. ABD'de Cetus Corporation'da çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Metot basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır (Science,1985:230,1350). Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya Ödülüne hak kazanmıştır.

PCR, bir çeşit "in vitro klonlama" dır. PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu) (çift iplikçikle DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon / primer bağlanması / DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilir. (Sırasıyla 94°C–98°C; 37°C–65°C; 72°C). PCR tekniği tek veya çift iplikçikle DNA'yı; RNA'ya hedef olarak kullanabilir.

Bu teknikle; bir DNA hedefini 106–1012 arasında çoğaltmak mümkündür. Bu tekniği anlattıkça; yüzyılın en önemli buluşlarından birisi olduğu kolaylıkla anlaşılacaktır. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak; bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır.

PCR tekniği, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; bir çok durumda radyoaktivite kullanımını gereksiz hale gelmiştir.

PCR'nin orijinal protokolünde E.Coli DNA polimeraz T'nin Klenow Fragment'i birleşen oligonükleotidlerin polimerizasyonunda kullanılmıştır. Ancak

DNA'yı denatüre etmek için gerekli olan ısıya ulaşıldığında; enzim inaktive olur. Her ne kadar bu yöntem 200 bp altındaki reaksiyonlar için iyi çalışmışsa da; uzun segmentlerde yürümemiştir. PCR ürünü çok iyi olmayıp; mispriming (primerin yanlış bölgeye yapışması) olayına bağlı olarak-farklı büyüklüklerde PCR ürünü elde edilmiştir. Bu tip problemler ısıya dayanıklı Taq Polimerazların bulunması ile önlenmiştir. Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlanmasıyla, gerekli olan maddeleri içeren tek bir tüp içerisinde, reaksiyonu gerçekleştiren, basit ve kendi kendine çalışan termalcycler denilen cihazın geliştirilmesiyle PCR'da çok büyük gelişmeler olmuştur. Genomik DNA'dan, daha uzun PCR ürünleri amplifiye edilebilir. Taq DNA polimeraz ile sentezlenen ürünlerin uzunlukları yaklaşık 10 kb kadardır (Erich ve ark. 1991).

PCR tekniğinin uygulanabilmesi için, "Thermalcycler" adı verilen cihazda temel olarak aşağıda sıralanan maddeler olmalıdır:

- Çoğaltılacak (amplifiye edilecek) olan DNA,
- Bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan oligonükleotid primer,
- Primerlere bağlanarak bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapabilecek olan DNA polimeraz,
- Sentezde kullanılacak olan deoksiribonükleotid trifosfatlar (dNTP),
- Polimeraz enziminin çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve tuzlar
- Enzimin çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg^{+2} tuzları

1.3.2.1. İlk birkaç siklus

İlk birkaç siklus, spesifik DNA parçalarının hedef DNA'da yapışabilecekleri yerleri tarama fazıdır. Amplifikasyon daha sonra başlar. PCR'ın tüm siklusları, bir önceki siklusda sentezlenen örneklerin denatürasyonu ile başlar. İlk birkaç siklusun optimizasyonu, çok az miktarda DNA örneği ile yola çıkılan durumlarda (tek hücre veya parafin bloklardaki doku); tarama olayı aşırı miktarda sarf malzemesine karşın az DNA'ya karşı oluşmaktadır. Az DNA'nın bulunması

PCR'in tarama fazında primer ile DNA'nın birbirleri ile karşılaşma şanslarını azaltır. Öyle ki primer-primer karşılaşmaları daha fazla olur. Bu ise primer dimerlerini ve diğer artefakların oluşmasına yol açar. Bu problemi ortadan kaldırmak için Booster PCR kullanılmıştır. İlk bir kaç siklusda primer dilüe edilerek reaksiyona konur, daha sonraki sikluslarda ise primer miktarı arttırılarak reaksiyona eklenir.

1.3.2.2. PCR kullanım alanları:

PCR'in başlıca kullanım alanları şu şekilde sıralanabilir:

1. Kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı,
2. Prenatal tanıda,
3. Klinik örneklerde patojen organizmaların saptanması,
4. Adli tıpta,
5. Onkogenesisin araştırılmasında,
6. Probe'ların oluşturulmasında/klonlamada/gen ekspresyon araştırmalarında,
7. DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında,
8. Bilinmeyen dizilerin tayininde,
9. Geçmiş DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında,
10. Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm Analizinde,
11. Invitro fertilizasyon yapılan tek hücrede, implantasyon öncesi genetik testlerin yapılması ve sonra implantasyon gerçekleştirilmesi ile bebeğin normal doğmasının sağlanması,
12. DNA protein interaksiyonunun araştırılmasında (footprinting) kullanılabilir.

1.3.2.3. PCR aşamaları

PCR; DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon), primerlerin bağlanması (Annealing), primerlerin uzaması (Extension) olmak üzere 3 aşamada gerçekleşmektedir.

- a. DNA İpliklerinin Birbirinden Ayrılması (Denatürasyon):

Sıcaklık ile DNA çift iplikten tek ipliğe dönüşür. Bazı protokollerde belirtilen denatürasyon sıcaklığı 94 °C'dir (Palumbi, 1996). Bu aşamada çoğaltılmak istenen çift sarmal DNA, sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarının kopması için yüksek sıcaklık ile denatüre edilir (Saiki ve ark. 1988).

b. Primerlerin Bağlanması (Annealing):

DNA'ya özgü olan primer adı verilen oligonükleotid, birinci aşamada elde edilen DNA sarmalında kendisine tamamlayıcı olan nükleotid dizisi ile birleşir. Primerler hedef DNA sarmalının amplifikasyonunu başlattıkları için primer yani öncü olarak adlandırılır. Primerlerin bağlanması aşamasında sıcaklık 40–60 °C'ye düşürülür. Primerin bağlanması için gereken süre ve sıcaklık amplifikasyon primerlerinin derişimi ve uzunluğuna bağlıdır (Saiki ve ark. 1988).

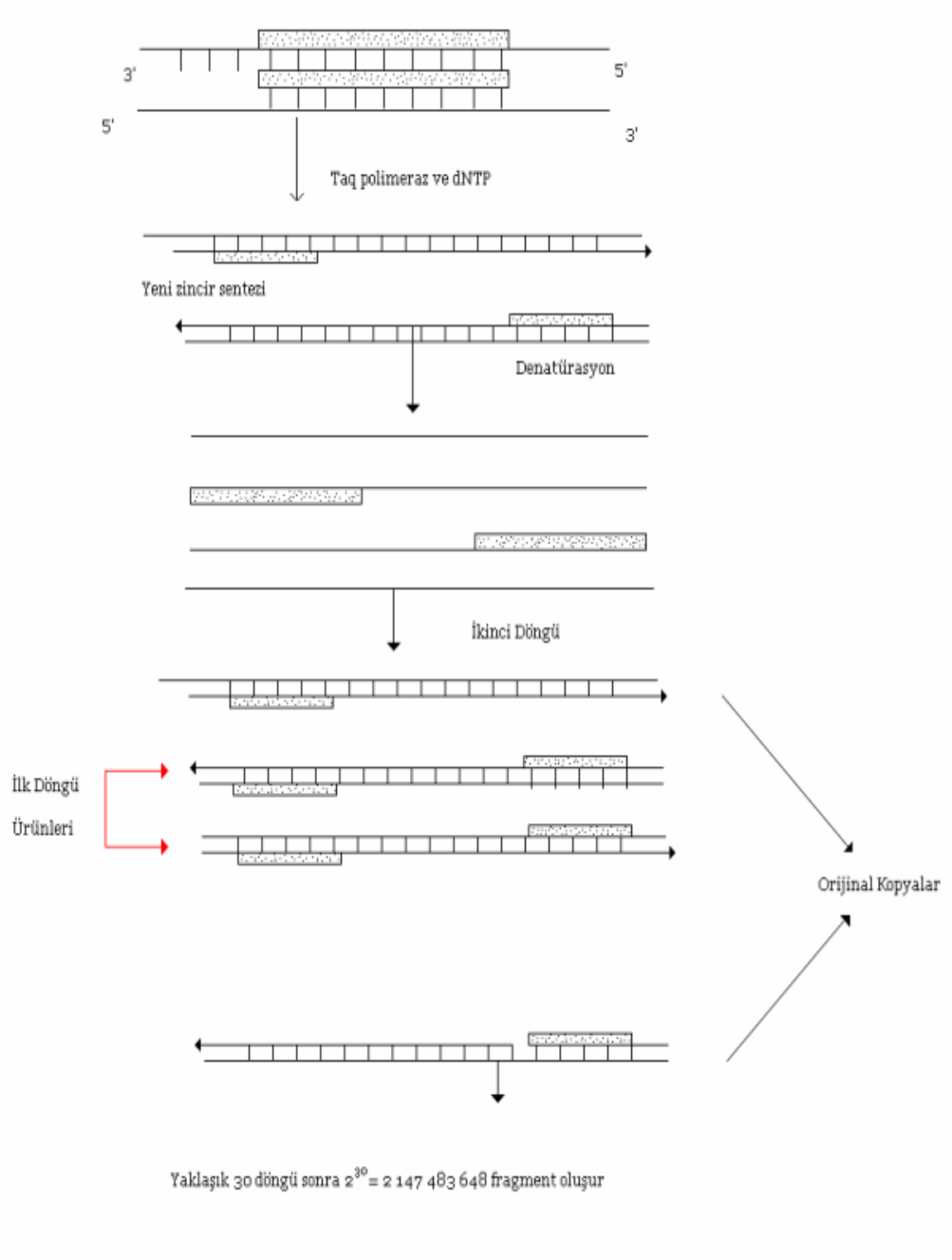
c. Primerlerin Uzaması (Extension):

Bağlanma tamamlandıktan sonra primer hibritleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için yüksek sıcaklığa dayanıklı olan Taq DNA Polimeraz kullanılır. Primerlerin uzatılması aşamasında 70–75 °C sıcaklık uygulanır.

PCR tekniğinde bu üç temel aşama (Şekil 1) bir döngüyü oluşturur ve bu döngü 25–35 kez tekrarlanır ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Bu döngüler sonunda elde edilen PCR ürünlerinin tamamlanmasında agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılır. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri ethidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. 100 baz çiftinden daha küçük moleküllerin ayrımında agaroz jel elektroforezi yetersiz kaldığı için, bunların ayrımında genellikle poliakrilamid jel elektroforezi yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen önemli bir faktördür (Çizelge 2,1) (Maniatis ve ark. 1989).

Çizelge 2.1 Agaroz jel elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapabilecek DNA molekül büyüklükleri

Jeldeki agaroz miktarı (g/100 ml)	Etkili ayırma yapılabilir DNA molekül büyüklüğü (bp)
0,3	5000 - 60000
0,6	1000 - 20000
0,7	800 - 10000
0,9	500 - 7000
1,2	400 - 6000
1,5	200 - 3000
2,0	100 - 2000



Şekil 1. 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1.3.2.4. PCR optimizasyonu

Enzim Konsantrasyonu

Taq DNA polimeraz aktivitesi için önerilen derişim, diğer parametreler en yüksek iken her 100 ml reaksiyonda 1–2,5 ünite arasındadır. Bu miktar kalıp veya primere bağlı olarak değişebilir. Bir PCR'ı planlarken her 100 ml'de 0,5–5 ünite arasında enzim derişimi denenerek sonuçlar jel elektroforezinde kontrol edilmelidir. Eğer enzim konsantrasyonu çok yüksekse oluşumu belli olmayan ürünler birikir, eğer çok düşükse istenen üründen yetersiz miktarda oluşur (Innis ve Gelfand, 1990).

Deoksinükleotid Trifosfatlar

Stok dNTP çözeltileri pH: 7,0 olmalıdır. 1mM dNTP içeren stok çalışmaları önerilir. 20–200 µM arasındaki deoksinükleotid derişimlerinde ürün miktarı, özellik ve doğruluk açısından optimal denge ile sonuçlanır. Düşük dNTP derişimleri hedef olmayan yerlerde yanlış primer seçimini minimuma indirir ve yanlış birleşim nükleotidlerin çoğalma ihtimalini azaltır. Hedef dizinin kompozisyonu ve uzunluğu için uygun olan düşük dNTP derişimine kara verilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Magnezyum İyon Derişimi

Magnezyum iyon derişimi, primerlerin bağlanması, PCR ürünleri ve kalıp DNA ipliklerinin ayrılma sıcaklığında yabancı primer-dimer oluşumuna, enzim aktivitesine ve doğruluğuna etki eder. PCR'da Mg^{+2} miktarı toplam dNTP derişiminin 0,5–2,5 mM üzerinde olmalıdır (Innis ve Gelfand, 1990).

Diğer Reaksiyon Bileşenleri

Sıcaklık 20 °C olduğunda PCR için 10–50 mM Tris-HCl (pH: 8,3–8,8) tamponu önerilir. Primerin DNA ipliğine bağlanmasını kolaylaştırmak için reaksiyon karışımına 50 mM'e kadar KCl eklenebilir (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerlerin DNA İpliğine Bağlanması

Primerlerin birleşmesi için gerekli olan sıcaklık ve süre, primerlerin konsantrasyonuna, uzunluğuna ve baz kompozisyonuna bağlıdır. Uygun bağlanma sıcaklığı primerlerin erime noktasının 5 °C altındadır. Genellikle 55-72 °C'de bağlanma sıcaklığı en iyi sonucu verir. Bağlanma sıcaklığının artması yanlış bağlanan primerlere karşı ayrımı artırır ve primerlerin 3' ucundaki yanlış nükleotid uzamasını azaltır (Innis ve Gelfand, 1990).

Primerin Uzaması

Primer uzama zamanı, hedef dizinin uzunluğu, sıcaklığı ve derişimine göre değişiklik gösterir. Genellikle 72 °C'de primer uzamaları gerçekleşir. 72 °C'de bir dakikalık uzama zamanı 2 kb uzunluğuna kadar olan ürünler için yeterli olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990).

Denatürasyon Zamanı ve Sıcaklık

PCR'in yetersizliğine en büyük neden, kalıp DNA ve PCR ürünlerinin eksik denatürasyonudur. Tipik denatürasyon durumları 30 saniye için 95 °C veya 15 saniye için 97 °C'dir. Yüksek sıcaklıklar özellikle G+C bakımından zengin hedefler için uygundur. Eksik denatürasyon DNA tortularının geri yükselmesine ve bu sebeple ürün veriminin düşmesine neden olur. Bunun tam tersi olarak çok yüksek ve çok uzun denatürasyonda gereksiz yere enzim aktivitesinin kaybına neden olur (Innis ve Gelfand, 1990).

Devir Sayısı

Diğer parametreler optimize edildiğinde optimum devir sayısı hedef DNA'nın başlangıç derişimine bağlıdır. Gereğinden fazla devir, spesifik olmayan yan ürünlerin miktarını ve karışıklığını arttırabilir. Düşük ürün verimine neden olur (Innis ve Gelfand, 1990).

Primer

Genellikle 0,1 ve 0,5 μ M arasında primer derişimleri optimaldir. Yüksek primer derişimleri ve yanlış primer seçimleri, spesifik olmayan ürünlerin toplanmasına, primer-dimer olarak adlandırılan spesifik olmayan kalıp DNA'dan bağımsız yabancı maddelerin meydana gelmesine neden olur. Spesifik olmayan bu ürünler enzim, dNTP ve primerler için istenen ürünlerle yarışan substratlardır. Tipik primerler 18–28 nükleotid uzunluğunda % 50–60 G+C özelliklerine sahiptir (Innis ve Gelfand, 1990).

1.3.3. Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR)

DNA dizi bilgisine duyulan ihtiyaçtan dolayı PCR yönteminin kullanımı sınırlıdır (Williams, 1990). PCR'ın rasgele primerlerle yapılmasıyla herhangi bir genomda rasgele bulunan bölgenin amplifikasyonu sağlanmaktadır. RAPD tekniği; genomun moleküler tanımlanmasını dizileme, klonlama gerektirmemesi ve az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması nedeniyle basit ve hızlıdır (Welsh ve McChelland, 1990; Williams ve ark. 1990; Waugh ve Powel, 1992).

Bu teknikte rasgele nükleotid dizisine sahip primerler, genomik DNA'nın çeşitli bölgelerinin çoğaltımında kullanılır. Oluşan fragmentlerin sayısı ve büyüklüğü, kullanılan primerin nükleotid dizisi ve kalıp DNA'da bu baza bağlı olarak genoma özgü parmakizi oluşur (Klein-Lankhorst ve ark. 1991).

RAPD-PCR yönteminde primerlerin genomik DNA'ya bağlandığı bölgelerdeki nokta mutasyonları ve bu bölgeler arasında insersiyon ve delesyon

gibi olaylar polimorfizmin ortaya çıkmasında rol oynar (Caetano-Anolles ve ark. 1991).

RAPD markırlar, popülasyon genetiği çalışmaları, genetik haritalama, bitki ve hayvan yetiştirme çalışmaları, DNA parmakizi çıkartılması için oldukça uygundur. RAPD markırlar aynı zamanda kromozoma özgü DNA fragmentlerinin hızlı tanımlanması ve izolasyonunu sağlayan etkili bir polimorfizm tahlili sağlar. RAPD markırlar, genom haritalama otomasyonunu, genomu tanımlamak için gerekli fenotipik markır sayısının az olduğu organizmalarda genetik analiz gücünün artmasını sağlar. Bu metodun en avantajlı yanı genotip tayininin otomatikleştirilebilmesidir. RAPD markırlarla yapılan genetik haritalamada, RFLP ya da PCR'la yapılanlara göre daha etkili ve daha büyük bir markır yoğunluğu elde edilebilir (Williams ve ark. 1990). Tüm bu bilgiler göstermiştir ki; RAPD teknolojisi, genetik farklılık çalışmaları, DNA parmakizi çalışmaları (Welsh ve ark. 1991; Michelmores ve ark. 1991; Giovannoni ve ark. 1991; Klein ve ark. 1991) ve genetik haritaların çıkarılması için uygun bir yöntemdir (Reiter ve ark. 1992). RAPD-PCR tekniği donmuş dokulardan elde edilen DNA örneklerinde yapılan denemelerde olumlu sonuçlar vermiştir (Thomson ve Henry, 1993).

Enchytraeus variatus ve *Enchytraeus crypticus* (Annelida), laboratuvar şartlarında çaprazlanamayan iki türdür. Elektron mikroskopunda bile zor ayırt edilebilirler. Ancak biyokimyasal olarak üç allozimleri ile ayırt edilebilirler. 15 farklı oligonükleotid primerle RAPD-PCR tekniği denenmiş ve iki tür arasında genetik farklılık belirlenmiştir. Uzunlukları 260'dan 1800 bp'ye kadar değişen 199 DNA parçasının karşılaştırılmasıyla *Enchytraeus crypticus* % 15 *Enchytraeus variatus* % 19 polimorfizm göstermiştir (Schirmacher ve ark. 1998).

Bir Diptera olan *Cochliomyia hominivorax*, henüz erginleşmediği dönemde, *Cochliomyia macelloria*'ya morfolojik olarak benzer. Burada RAPD-PCR'ın kullanımı bu iki tür için gelişen moleküler genetik markır olarak ortaya çıkmaktadır. Yedi adet güvenilir ve tekrar üretilebilen markır; her tür için dört popülasyondaki beşer tane bireyin DNA'larıyla test edilmiştir. Bu yedi primerden elde edilen verilerin analizleri bu türlerin popülasyonları arasında türler arası

polimorfizm olduğunu göstermiştir. İstatistik sonuçları iki türü ayırt etmek için RAPD-PCR tekniğinin yeterliliğini % 100 destekler niteliktedir (Skoda ve Foster, 2002).

Bir diğer çalışmada RAPD-PCR tekniği kullanılarak yine *Cochliomyia hominivorax* türünün altı tanesi güneydoğu Brezilya'dan, bir tanesi kuzey Arjantin'den olmak üzere yedi popülasyon arasındaki genetik çeşitlilik çalışılmıştır. RAPD-PCR'da kullanılan 12 primer için yüksek oranda çeşitlilik gözlenmiştir. Bu markırlarla elde edilen sonuçlarla yalnızca potansiyel gen akışı değil, bunların genetik ilişkileri de belirlenmiştir. Sonuçlar *Cochliomyia hominivorax* popülasyonlarında taranan alt bölümlerin RAPD ile açıklanabildiğini göstermiştir (Infante ve ark. 1999).

RAPD'in popülasyon genetiğindeki dezavantajı; dominant markır olarak ayrılan allellerin yoğunluğudur. RAPD-PCR, amplifikasyonu yapılabilecek herhangi bir allel için hem homozigot hem de heterozigot olan bireylerden alınan kalıp DNA ile fragment verir. Ancak homozigot resesif bireylerde fragment oluşmaz. Dominantlık popülasyonlar içinde rasgele birleşmeyi engeller. Çünkü bireysel genotipler ayırt edilemez (Apostol, 1996).

RAPD yöntemi RFLP ve izozimlere göre birçok avantajları vardır. Yoğun laboratuvar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmez. RAPD'ler izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda markır elde edilmesini sağlar. Van Heusden ve Bachmann (1992)'a göre türler arası ve tür içinde RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm kaydedilebilmektedir (Whitkus ve ark., 1994). RAPD yönteminde izole edilen DNA'nın çok küçük miktarları (~ 25ng) PCR yöntemi ile çoğaltılır. Sıcaklık 95 °C yükseltılarak DNA denatüre edilir. DNA çoğaltımında genomik DNA'nın belirli bölgelerine homolog olan primer dizileri (tek iplikli diziler) DNA sentezini başlatmada rol oynarlar. Yüksek sıcaklıkta aktif olan Taq polimeraz enzimi ile iki primer arasında kalan DNA bölgesi çoğaltılır. Reaksiyon sonunda elde edilen ürünler, ethidyum bromid ile boyanmış jelde yürütülerek DNA fargmentleri UV altında incelenir (Maniatis, 1989).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Palaemon Materyali

Bu araştırmada *Palaemon elegans* (Rathke, 1837) türü kullanılmıştır. Araştırmada materyal olarak kullanılan bu örnek % 96'lık etil alkol içerisinde muhafaza edilmiştir.

Palaemon elegans, 1837 örneği Muğla-Bodrum Tuzla Mevkii, Muğla-Bodrum Bargilya ve Muğla-Bodrum Güllük bölgesinden toplanmıştır.

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler Tris (Sigma), HCl (Fluka), EDTA (Sigma), Sodyum Hidroksit (Sigma), Tris-HCl (Sigma), NaCl (Merk), Proteinaz K (Sigma), Chelex-100 Resin (Sigma)'dır.

Polimeraz Zincir Reaksiyon'unda 25 mM dNTP (Fermantas), 25 mM MgCl₂ (Fermantas), 10 X Taq Polimeraz Tamponu (Fermantas), 5 u/μl Taq polimeraz (Fermantas), Oligonükleotid Primerler (Biolegio, Research Genetics) tampon ve çözeltileri kullnılmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler Agaroz (Prona), Tris base (Sigma), Glasial asetik asit (Fluka), EDTA (Sigma), Bromfenol mavisi (Sigma), Ethidyum bromürdür (Sigma).

2.1.3. Tampon ve çözeltiler

2.1.3.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

- Stok Tris Çözeltisi: 500 mM Tris pH: 8.0'e HCl ile ayarlanır.
- Stok EDTA Çözeltisi: 500 mM EDTA (Etilendiamin-tetra asetik asit disodyum tuzu), 5 M NaOH (Sodyum Hidroksit) çözeltisi ile pH: 8.0'e ayarlanır.
- NET Tamponu: 30 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH: 8.0, 100 µg/ml Proteinaz K (Otoklavdan sonra eklenir).
- % 40 Chelex-100 Resin, 100 µg/ml Proteinaz K (Otoklavdan sonra eklenir).
- TE Tamponu: 10 mM Tris (pH: 8.09), 1 mM EDTA (pH: 8.0) stok çözeltileri kullanılarak hazırlanır.

2.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nda kullanılan tampon ve çözeltiler

- Nükleotid Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- MgCl₂: 25 mM
- 10 X Taq Polimeraz Tamponu: 100 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 500 mM KCl, 1mg/ml Jelatin
- Taq Polimeraz: 5 u/µl
- Primerler: Kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 3,1'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve % G+C oranları

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'.....3')	%G+C İçeriği
A1	CAGGCCCTTC	70
A2	TGCCAGCTG	70
OPB08	GTCCACACGG	70
OPI18	TGCCCAGCCT	70
B4	GGACTGGAGT	60
B6	TGCTCTGCC	70
B7	GGTGACGCAG	70
B18	CCACAGCAGT	60
M13	GAGGGTGGCGTTCT	66,7
UBC372	CCCACTGAC	70
UBC373	CTGAGGAGTG	60
UBC378	GACAACAGGA	50
UBC379	GGGCTAGGGT	70
UBC435	CTAGTAGGGG	60
UBC440	CTGTCAACC	60
UBC441	CTGCGTTCTT	50
UBC443	TGATTGCTCG	50
UBC444	GCAGCCCCAT	70
UBC571	GCGCGGCACT	80
UBC572	TTCGACCATC	50
UBC573	CCCTAATCAG	50
UBC574	GCCAGACAAG	60
UBC575	GGAGATGTAC	50
UBC576	CACCTAATGG	5
UBC577	GTCTGATGTG	50
UBC578	GGTGTCCACT	60
UBC579	TGGAATCGTG	50
UBC581	CCCGTTAGGG	60

Çizelge 3. 1. (Devamı) Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve % G+C oranları

UBC582	GGTATAGAC	50
UBC586	CCGGTTCCAG	70
UBC587	GCTACTAACC	60
UBC589	GACGGAGGTC	70
UBC590	CCGGCATGTT	60
UBC591	TCCCTCGTGG	70
UBC592	GGGCGAGTCC	80
UBC596	CCCCTCGAAT	60
UBC598	ACGGGCGCTC	80
UBC599	CAAGAACCGC	60
UBC600	GAAGAACCGC	60

2.1.3.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Çözeltiler

- Agaroz: % 0,8 veya % 2 (w/v) agaroz TAE tamponunda çözülerek hazırlanır.
- Tris asetat (TAE) Tamponu: 242 g Tris base, 57,1 ml Glasial asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA (pH: 8.0) distile su ile 1 L'ye tamamlanır.
- Yükleme Tamponu: % 40 Sukroz, % 0.025 Bromfenol mavisi, % 0.25 Ksilen siyanol (Otoklavlanmadı).
- Ethidyum bromür: 10mg/ml derişimde hazırlandı ve koyu şişelerde muhafaza edildi (Otoklavlanmadı).

2.1.4. Sterilizasyon

Steril kullanılması gereken tüm tampon ve çözeltiler 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Toplanan *Palaemon* örneklerinin tür tayini

Toplanarak % 96'lık alkolde muhafaza edilen *Palaemon* örneklerinin tür tayini Rathke, (1837)'ye göre yapıldı. Örneklerin *Palaemon elegans* türü olduğu tespit edildi.

2.2.2. Örneklerden Mitokondriyal DNA izolasyonu

Palaemon elegans örneklerinden mitokondriyal DNA elde edilmesi için, örnek önce distile suyla yıkandı ve Janke& Kunkel homojenizatörle, 1 ml Net Tamponu içinde homojenize edildi. Homojenat; nukleus ve hücrel artıkların çökmesi için 1.000 g'de, + 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant mitokondriyi pelete çökeltmek için 12.000 g'de, + 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen pelete 200 µl Proteinaz K (100 µg/ml) % 40 Chelex 100 süspansiyonu ilave edilerek çözünmesi sağlandı ve 55 °C'de 1 saat su banyosu yapıldı. 8 dakikalık kaynatmadan sonra, 13.000 g'de + 4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant tamamen dökülüp, pelet 55 °C'lik etüvde, 1 saat kurumaya bırakıldı. Kuruma gerçekleştikten sonra, 25 µl TE tamponu ilave edilen, DNA izolatu, -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.3. DNA konsantrasyonunun tayini

UV absorban spektrofotometresi ile 260 nm'de ölçüm yapıldı. Buna göre; $A_{260} = 1$ olduğunda DNA miktarı 50 µg/ml'dir. DNA saflığı için ise $A_{260} / A_{280} = 1,8$ formülü kullanılarak bulunan değer 1,8'e eşit ise saf DNA, büyük ise saf olmayan DNA elde edildiğine karar verildi.

2.2.4. Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR)

RAPD-PCR uygulamaları için Maniatis ve ark. (1989)'nın önerdiği yöntem kullanıldı. Çizelge 2.1.'de baz dizilimleri ve % G+C oranları verilen rasgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA'nın herhangi bir bölümü rasgele çoğaltıldı.

PCR reaksiyonu 0,5 ml propilen tüplerde 50 µl'lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirildi.

Uygulanan PCR programı:

94 °C'de	30 saniye (Denatürasyon)	} 45 Döngü
30 °C'de	30 saniye (Primerlerin bağlanması)	
72 °C'de	30 saniye (DNA sentezi)	

2.2.5. Agoroz Jel Elektrofözezi

RAPD-PCR ürünlerinin analizi için % 2'lik agaroz jel elektrofözezi gerçekleştirildi (Maniatis et al, 1989). Yatay konumda elektrofözezi kullanıldı. % 2 agaroz, TAE tamponunda kaynatılarak çözüldükten sonra 1 µl Etidyum bromür eklendi. Hazırlanan agaroz biraz soğuduktan sonra, uygun tarak yerleştirilen elektrofözezi plağına döküldü. Jel polimerleştikten sonra tarak çekildi ve plak, TAE tamponu içeren elektrofözezi tankına yerleştirildi. Her bir PCR örneğinden 10 µl, yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi.

PCR ürünleri 40–90 V arasında serbest akımda yürütüldü. Jeller UV translüminatör üzerinde görüntüldü. Jellerin fotoğrafları polaroid makine (DS Polaroid Screen Instant Camera 100 X 81mm) da Polaroid black & White 667 filmi ile çekildi.

2.2.6. Genetik uzaklık tayini

Her Palaemon örneği için her bir primerden elde edilen PCR ürününün agaroz jelde oluşturduğu DNA bantları birbirleri ile karşılaştırılarak, bant varlığında 1, yokluğunda 0 olarak kabul edildi ve bu veriye dayanan tablo hazırlandı.

Her bir primer için elde edilen bu tablolar, Phylip 3,5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik Uzaklık Dendogram programında değerlendirilerek, çalışılan Palaemon türlerinin arasındaki ve ayrıca, tür içinde gözlenen genetik yakınlıklar ortaya konulmuştur.

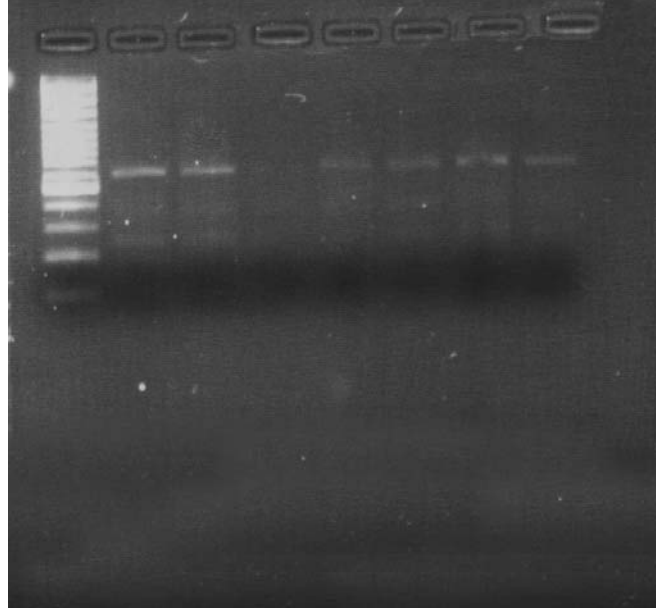
3. BULGULAR

Palaemon elegans örneklerinden toplam 45 mitokondriyal DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, RAPD-PCR tekniği ile Çizelge 3,1’de belirtilen primerlerle DNA amplifikasyonu denenmiştir.

Palaemon elegans örneklerinin A1, B7, M13, UBC577 primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu yapılmıştır. Reaksiyon ürünleri % 2’lik agaroz jel elektroforezinde 80 V’da 40 dakika yürütülerek UV translüminatörde incelendi ve polaroid film kullanılarak fotoğrafları çekildi. (Şekil 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 3,10, 3,11, 3,12, 3,13, 3,14, 3,15, 3,16, 3,17, 3,18, 3,19, 3,20, 3,21, 3,22, 3,23, 3,24, 3,25, 3,26, 3,27, 3,28, 3,29, 3,30). Her bireyin jelde oluşturduğu bantların varlığı ve yokluğu sırasıyla 1 ve 0 olarak sayıldı. Her bir primer için elde edilen değerler, Philip 3,5 versiyonundan modifiye edilmiş olan; Nei (1972) Genetik Uzaklık Dendogram programıyla değerlendirilerek dendogramları elde edildi. Oluşan dendogramla bireyler genetik yakınlıklarına göre gruplandırıldı.

Buna göre 3 farklı istasyondan toplanan örnekler (Tuzla Mevkii istasyon izolatu), (Güllük Mevkii istasyon izolatu) ve (Bargilya Mevkii izolatu), A1, M13, UBC577 ve B7 primerleriyle amplifikasyon sonuçları değerlendirildi.

Popülasyon 1–4, 21–25, 40-45’e kadar olan örnekler Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* örnekleridir. Popülasyon 5–8, 17–20, 30-36’ya kadar örnekler Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* örnekleridir. Popülasyon 9–16, 26–29, 37-39’a kadar olan örnekler Bargilya istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* örnekleridir. Bu örneklerin değerlendirilmesi (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.30) sonucunda *Palaemon elegans* örnekleri arasında genetik uzaklık 0’dır, tür içi polimorfizm bulunmamaktadır.



Şekil 3. 1. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe6T

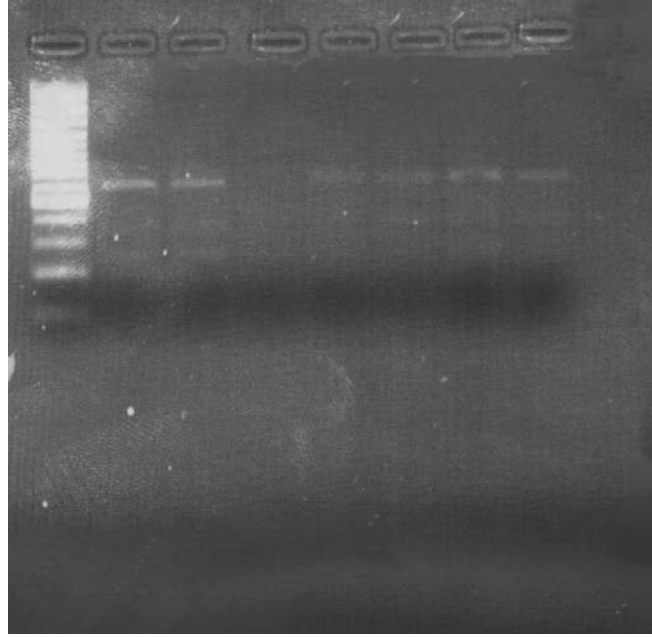
Hat 4 : Pe3G

Hat 5 : Pe4G

Hat 6 : Pe9B

Hat 7 : Pe11B

Hat 8 : Pe12B



Şekil 3. 2. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe17T

Hat 3 : Pe18T

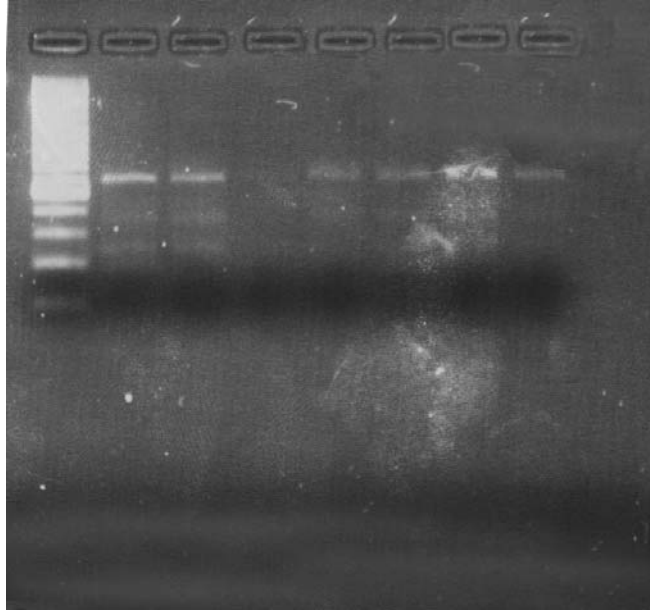
Hat 4 : Pe1G

Hat 5 : Pe2G

Hat 6 : Pe13B

Hat 7 : Pe14B

Hat 8 : Pe15B



Şekil 3. 3. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe35T

Hat 3 : Pe36T

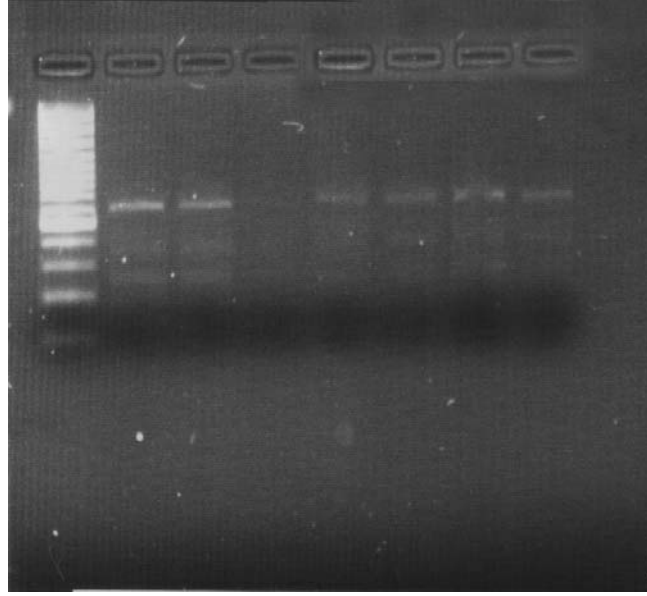
Hat 4 : Pe40G

Hat 5 : Pe41G

Hat 6 : Pe10B

Hat 7 : Pe16B

Hat 8 : Pe9B



Şekil 3. 4. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe6T

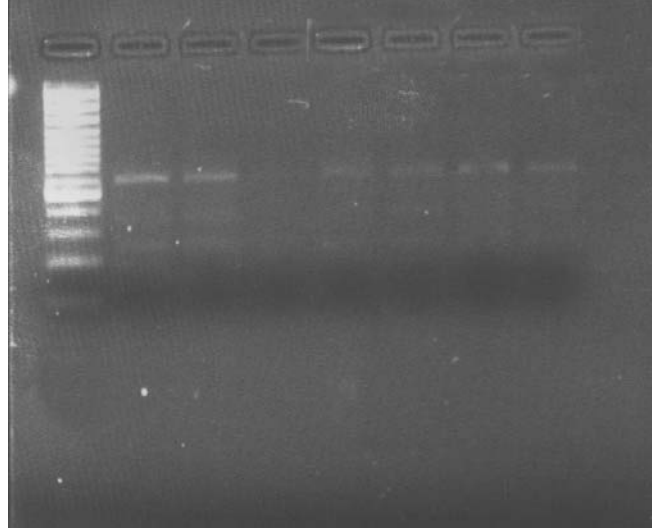
Hat 4 : Pe3G

Hat 5 : Pe4G

Hat 6 : Pe9B

Hat 7 : Pe11B

Hat 8 : Pe12B



Şekil 3. 5. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe30T

Hat 3 : Pe31T

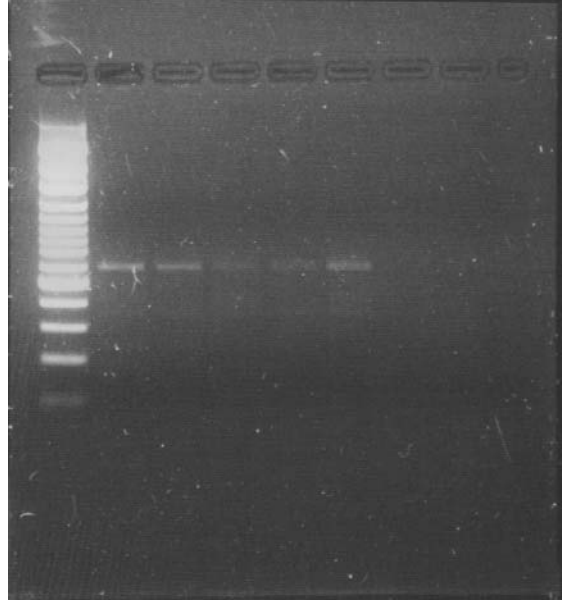
Hat 4 : Pe24G

Hat 5 : Pe25G

Hat 6 : Pe37B

Hat 7 : Pe38B

Hat 8 : Pe39B



Şekil 3. 6. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe35T

Hat 3 : Pe36T

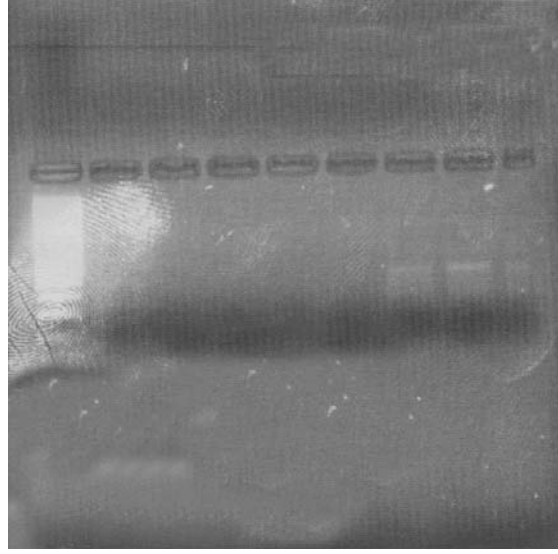
Hat 4 : Pe9B

Hat 5 : Pe10B

Hat 6 : Pe11B

Hat 7 : Pe43G

Hat 8 : Pe44G



Şekil 3. 7. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe6T

Hat 4 : Pe7T

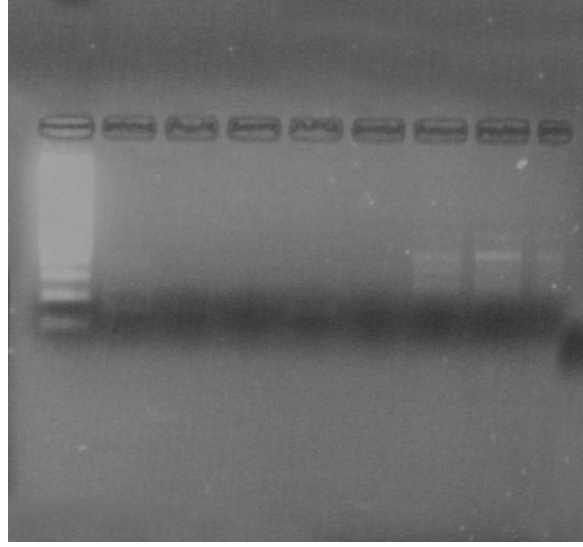
Hat 5 : Pe21G

Hat 6 : Pe22G

Hat 7 : Pe10B

Hat 8 : Pe11B

Hat 9 : Pe12B



Şekil 3. 8. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe17T

Hat 4 : Pe18T

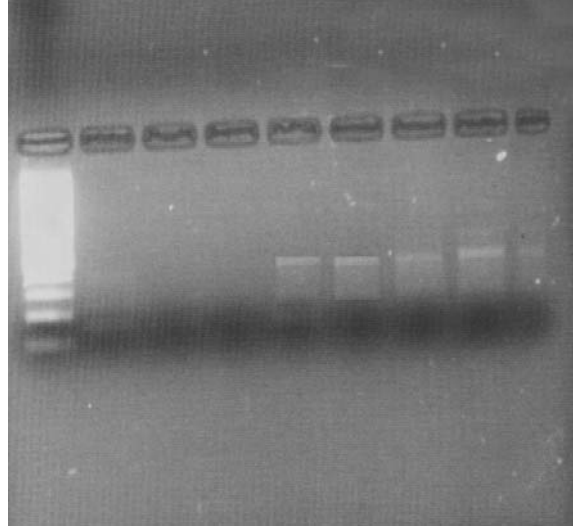
Hat 5 : Pe40G

Hat 6 : Pe41G

Hat 7 : Pe10B

Hat 8 : Pe11B

Hat 9 : Pe12B



Şekil 3. 9. Tuzla ve Bargilya istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe30T

Hat 4 : Pe31T

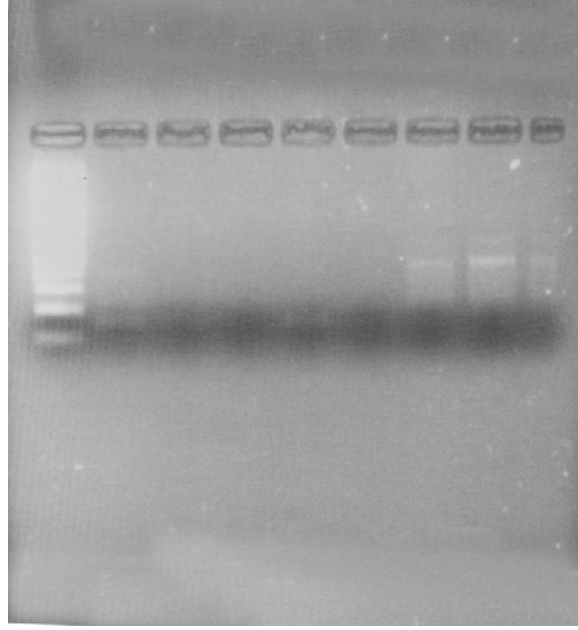
Hat 5 : Pe13B

Hat 6 : Pe14B

Hat 7 : Pe10B

Hat 8 : Pe11B

Hat 9 : Pe12B



Şekil 3. 10. Tuzla, Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe30T

Hat 4 : Pe31T

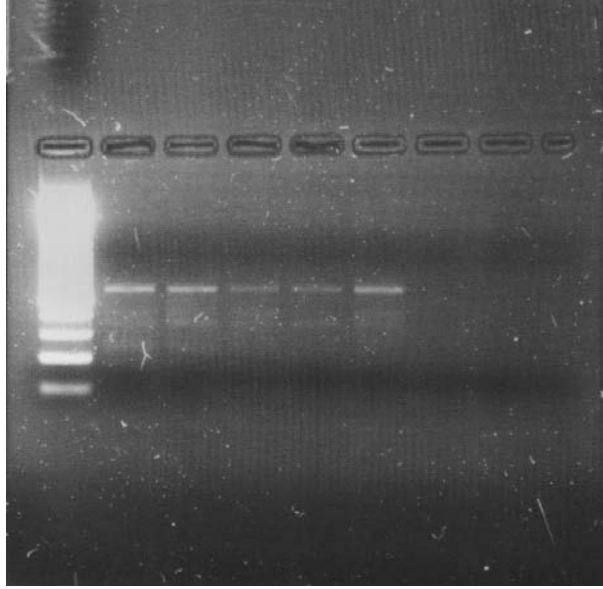
Hat 5 : Pe23G

Hat 6 : Pe24G

Hat 7 : Pe10B

Hat 8 : Pe13B

Hat 9 : Pe14B



Şekil 3. 11. Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe38B

Hat 3 : Pe39B

Hat 4 : Pe9B

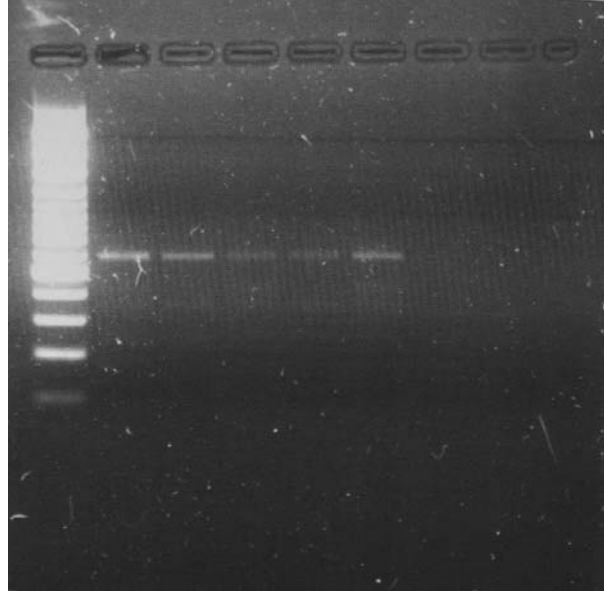
Hat 5 : Pe10B

Hat 6 : Pe11B

Hat 7 : Pe1G

Hat 8 : Pe2G

Hat 9 : Pe3G



Şekil 3. 12. Bargilya ve Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe13B

Hat 3 : Pe14B

Hat 4 : Pe15B

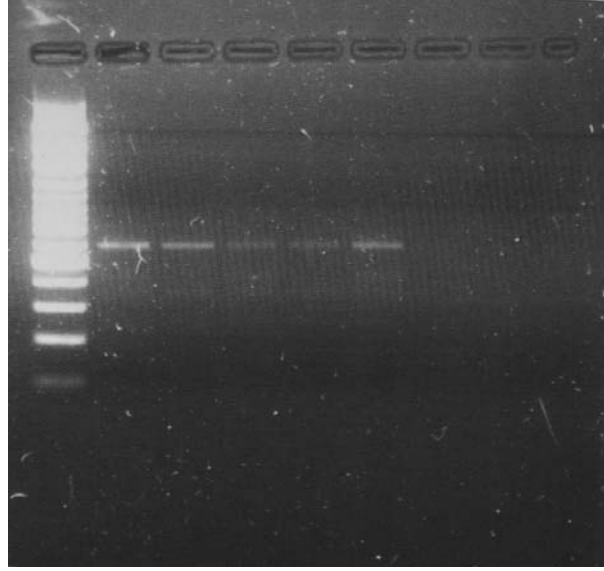
Hat 5 : Pe16B

Hat 6 : Pe11B

Hat 7 : Pe21G

Hat 8 : Pe22G

Hat 9 : Pe23G



Şekil 3. 13. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe38B

Hat 3 : Pe39B

Hat 4 : Pe26B

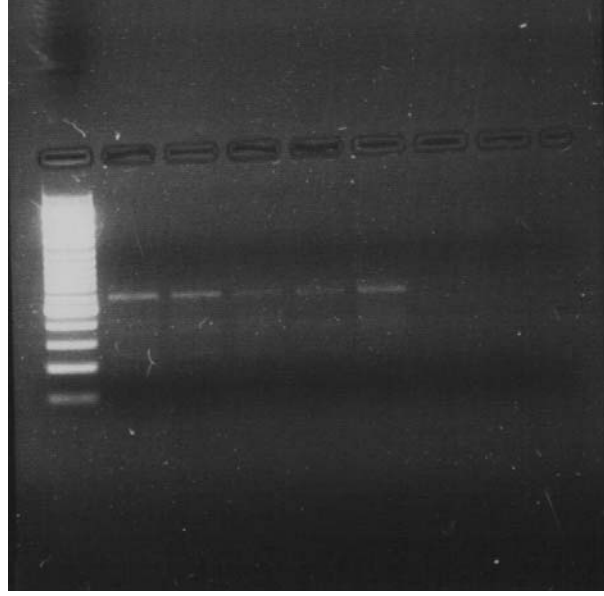
Hat 5 : Pe27B

Hat 6 : Pe28B

Hat 7 : Pe5T

Hat 8 : Pe6T

Hat 9 : Pe7T



Şekil 3. 14. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe13B

Hat 3 : Pe14B

Hat 4 : Pe15B

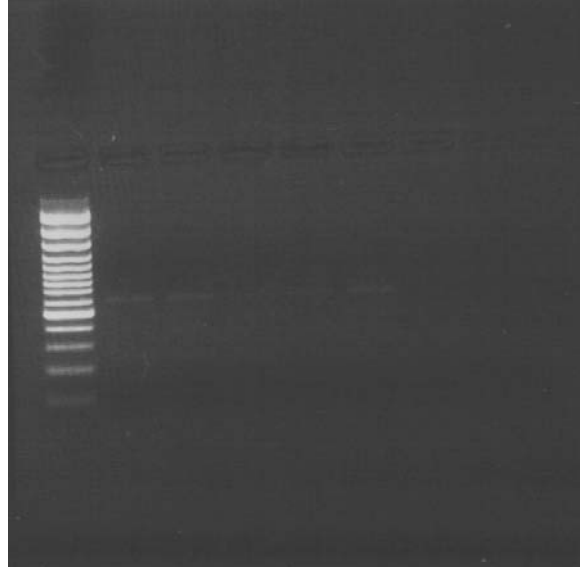
Hat 5 : Pe16B

Hat 6 : Pe9B

Hat 7 : Pe17T

Hat 8 : Pe18T

Hat 9 : Pe19T



Şekil 3. 15. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe27B

Hat 3 : Pe28B

Hat 4 : Pe29B

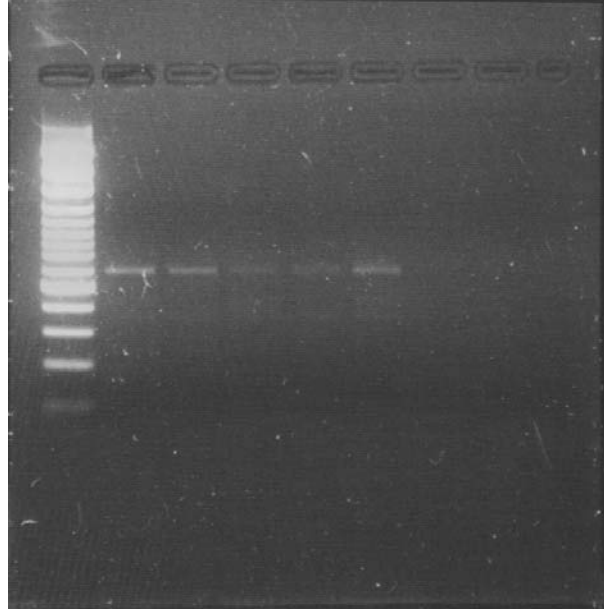
Hat 5 : Pe37B

Hat 6 : Pe10B

Hat 7 : Pe30T

Hat 8 : Pe31T

Hat 9 : Pe32T



Şekil 3. 16. Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe12B

Hat 3 : Pe13B

Hat 4 : Pe14B

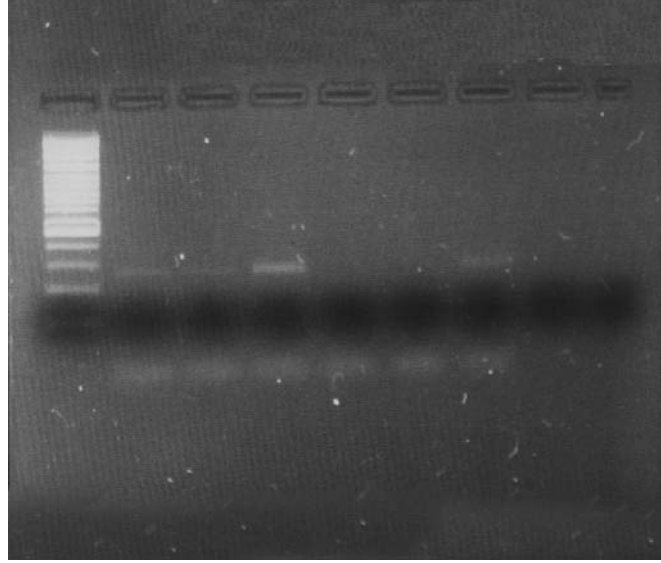
Hat 5 : Pe15B

Hat 6 : Pe16B

Hat 7 : Pe33T

Hat 8 : Pe34T

Hat 9 : Pe35T



Şekil 3. 17. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe5T

Hat 3 : Pe6T

Hat 4 : Pe7T

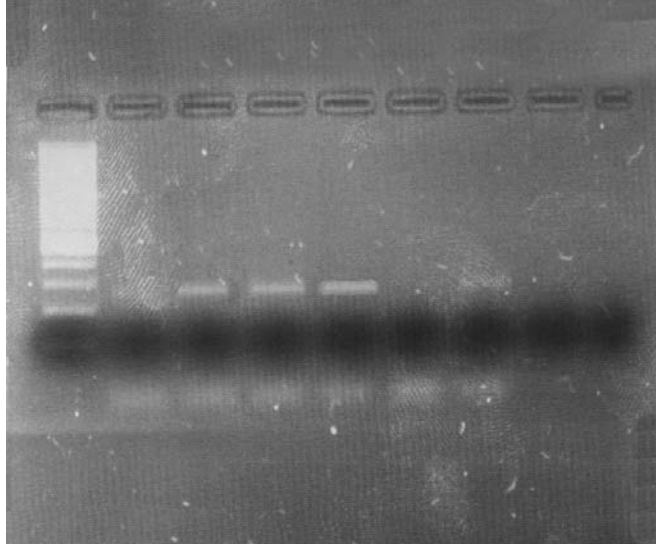
Hat 5 : Pe23G

Hat 6 : Pe24G

Hat 7 : Pe10B

Hat 8 : Pe13B

Hat 9 : Pe14B



Şekil 3. 18. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe17T

Hat 3 : Pe18T

Hat 4 : Pe19T

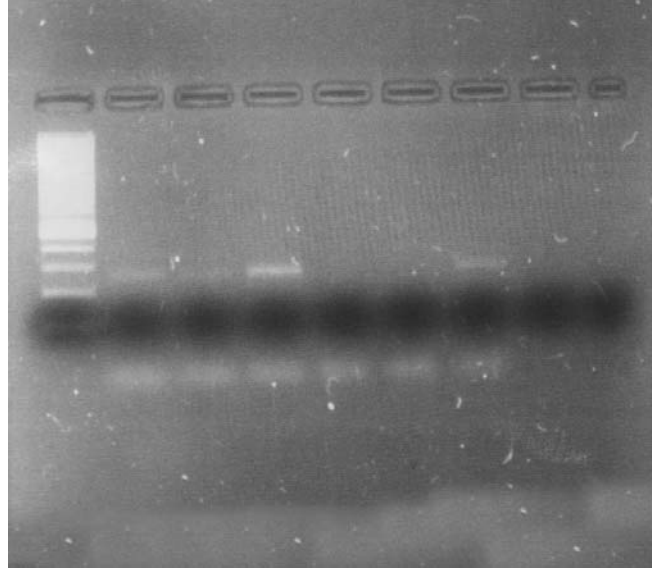
Hat 5 : Pe40G

Hat 6 : Pe41G

Hat 7 : Pe42G

Hat 8 : Pe13B

Hat 9 : Pe14B



Şekil 3. 19. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe30T

Hat 3 : Pe31T

Hat 4 : Pe32T

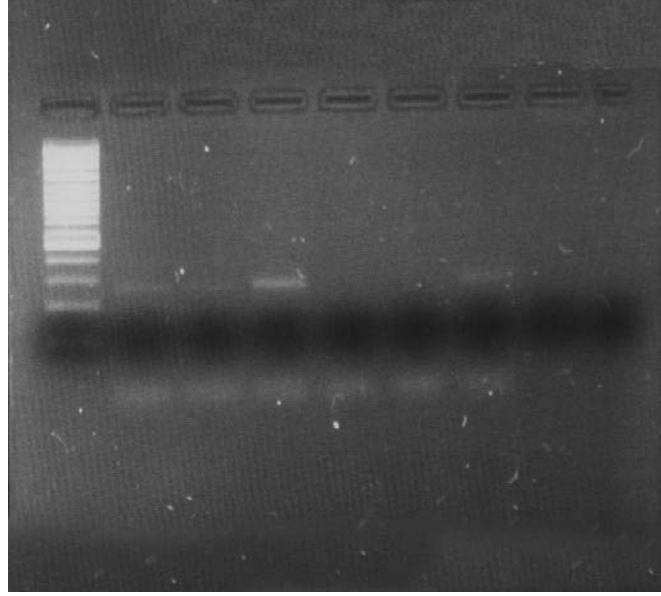
Hat 5 : Pe38B

Hat 6 : Pe39B

Hat 7 : Pe42G

Hat 8 : Pe15B

Hat 9 : Pe16B



Şekil 3. 20. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe33T

Hat 3 : Pe34T

Hat 4 : Pe35T

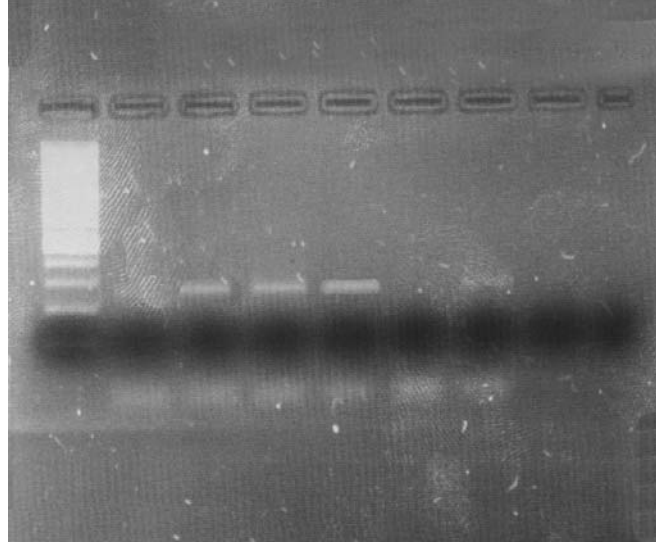
Hat 5 : Pe28B

Hat 6 : Pe29B

Hat 7 : Pe43G

Hat 8 : Pe44B

Hat 9 : Pe45B



Şekil 3. 21. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer M13 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe36T

Hat 3 : Pe5T

Hat 4 : Pe6T

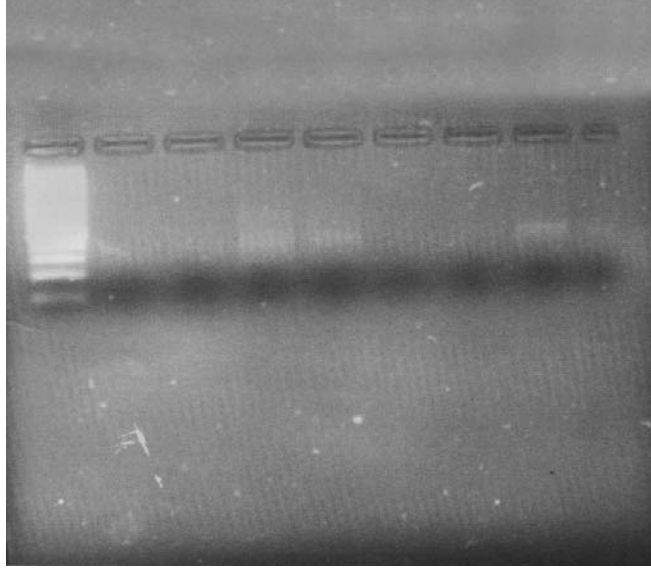
Hat 5 : Pe13B

Hat 6 : Pe26B

Hat 7 : Pe21G

Hat 8 : Pe25B

Hat 9 : Pe41B



Şekil 3. 22. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe17T

Hat 3 : Pe18T

Hat 4 : Pe21G

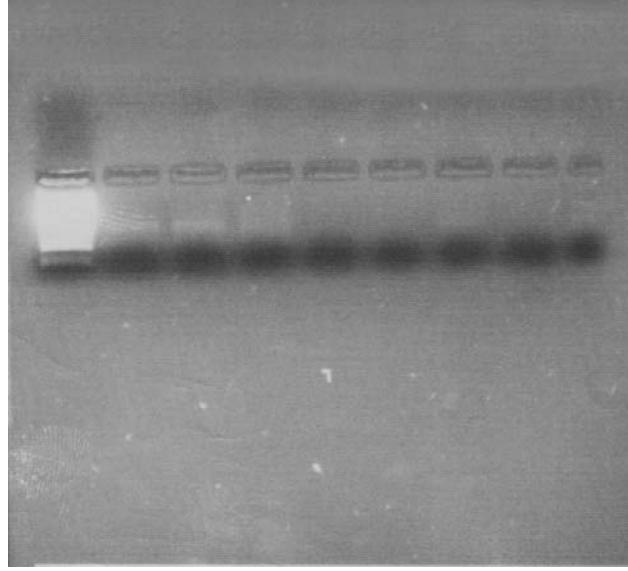
Hat 5 : Pe22G

Hat 6 : Pe26B

Hat 7 : Pe27B

Hat 8 : Pe44G

Hat 9 : Pe45G



Şekil 3. 23. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe23G

Hat 3 : Pe24G

Hat 4 : Pe25G

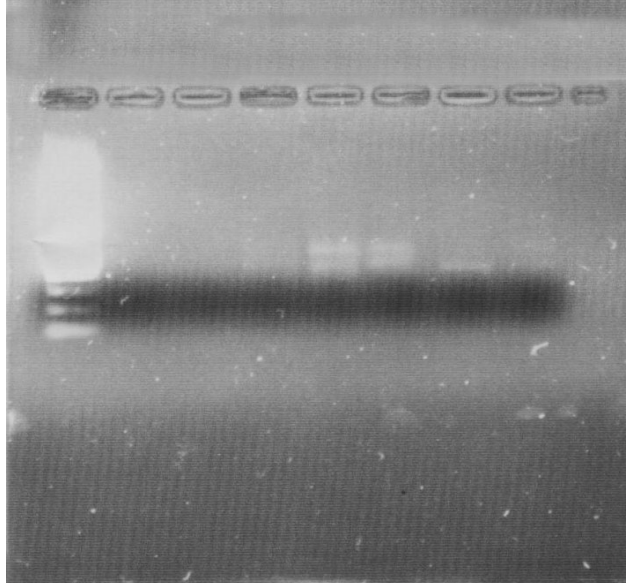
Hat 5 : Pe5T

Hat 6 : Pe6T

Hat 7 : Pe9B

Hat 8 : Pe10B

Hat 9 : Pe11B



Şekil 3. 24. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe40T

Hat 3 : Pe41T

Hat 4 : Pe4G

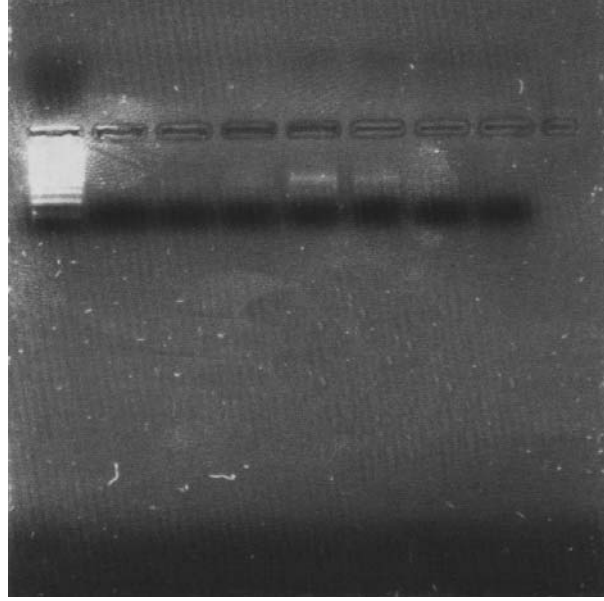
Hat 5 : Pe21G

Hat 6 : Pe22G

Hat 7 : Pe12B

Hat 8 : Pe13B

Hat 9 : Pe14B



Şekil 3. 25. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe19T

Hat 3 : Pe20T

Hat 4 : Pe30T

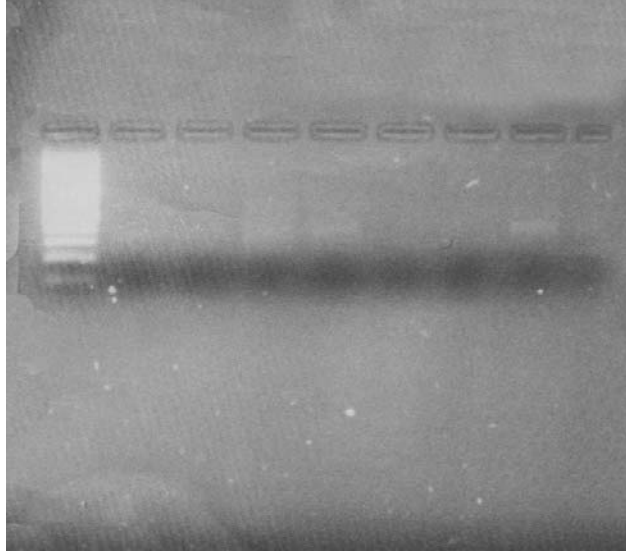
Hat 5 : Pe25G

Hat 6 : Pe22G

Hat 7 : Pe45G

Hat 8 : Pe29B

Hat 9 : Pe37B



Şekil 3. 26. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireyelerine ait, Primer B7 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe7T

Hat 3 : Pe8T

Hat 4 : Pe43G

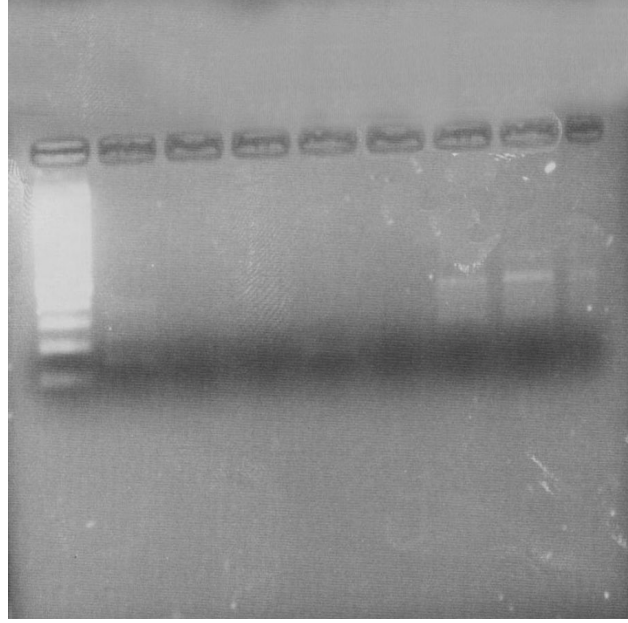
Hat 5 : Pe1G

Hat 6 : Pe3G

Hat 7 : Pe14B

Hat 8 : Pe2G

Hat 9 : Pe22G



Şekil 3. 27. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe9B

Hat 3 : Pe18T

Hat 4 : Pe32T

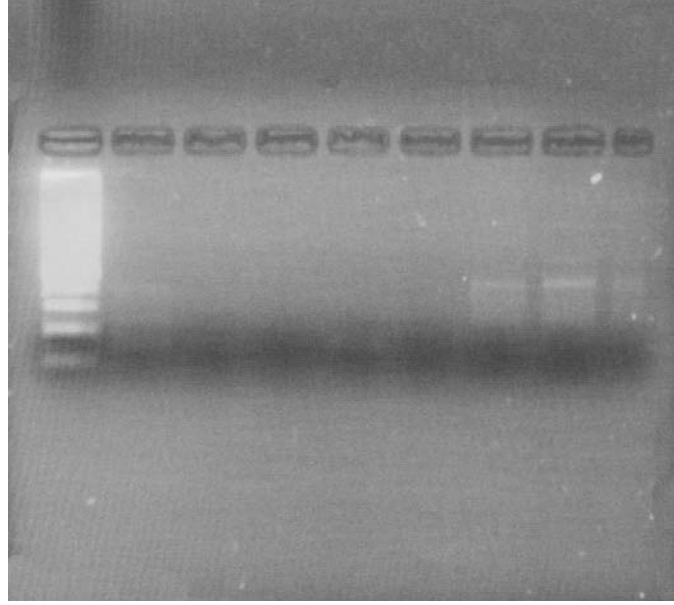
Hat 5 : Pe23G

Hat 6 : Pe24G

Hat 7 : Pe14B

Hat 8 : Pe15B

Hat 9 : Pe16B



Şekil 3. 28. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer UBC577 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe10B

Hat 3 : Pe19T

Hat 4 : Pe20T

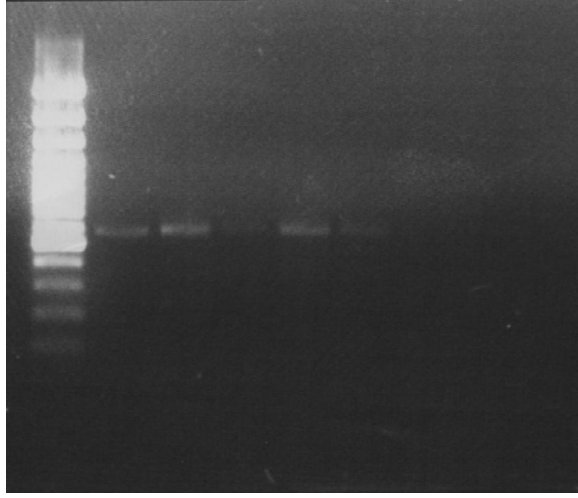
Hat 5 : Pe40G

Hat 6 : Pe41G

Hat 7 : Pe26B

Hat 8 : Pe27B

Hat 9 : Pe28B



Şekil 3. 29. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe32T

Hat 3 : Pe33T

Hat 4 : Pe4G

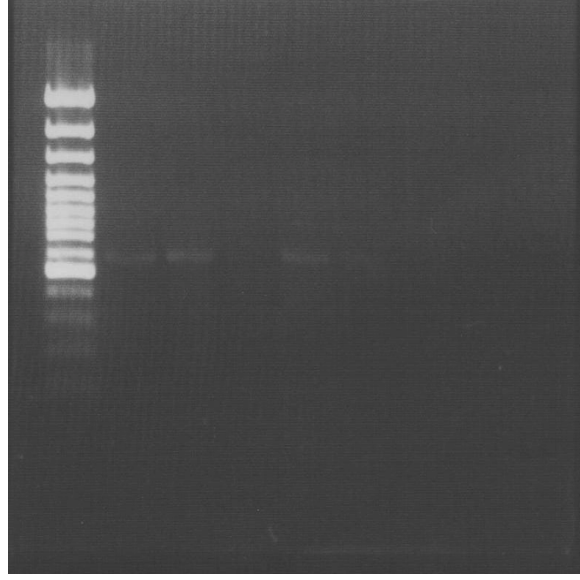
Hat 5 : Pe19T

Hat 6 : Pe20T

Hat 7 : Pe37B

Hat 8 : Pe38B

Hat 9 : Pe39B



Şekil 3. 30. Güllük, Bargilya ve Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* bireylerine ait, Primer A1 ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Hat 1 : DNA ladder Plus

Hat 2 : Pe6T

Hat 3 : Pe7T

Hat 4 : Pe25G

Hat 5 : Pe8T

Hat 6 : Pe17T

Hat 7 : Pe10B

Hat 8 : Pe11B

Hat 9 : Pe12B

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, *Palaemon elegans* türünün, RAPD-PCR yöntemiyle incelenmesidir. Bu amaçla örneklerin mitokondriyal DNA'ları kullanılmıştır. Mitokondriyal DNA'nın korunmuş yapı ve organizasyonu özelliklerinden dolayı, tür içi ve türler arası genetik çeşitliliği belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Avisé ve ark. 1979; Moritz, 1987). Crustacea grubunda yapılan incelemelerde, mitokondriyal DNA'nın Sitokrom c Oksidaz I (COI) alt ünitesinin, hem tür içi hem de türler arası farklılığın ortaya konulması için çok güçlü bir materyal olduğu tespit edilmiştir (Palumbi ve ark. 1991).

Toplanan örneklerin mitokondriyal DNA'ları izole edildikten sonra RAPD-PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan DNA'lar üzerinde bazı değerlendirilmeler yapılarak tür içi polimorfizm olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır.

RAPD-PCR tekniğinde rasgele nükleotid dizisine sahip oligonükleotid primerler, genomik DNA'nın çeşitli bölgelerinin çoğaltımında kullanılır. Oluşan fragmentlerin sayısı ve büyüklüğü, kullanılan primerin nükleotid dizisi ve kalıp DNA'da bu baza bağlı olarak genoma özgü parmak izi oluşturur (Klein-Lankhorst ve ark. 1991).

RAPD markırlar, popülasyon genetiği çalışmaları, genetik haritalama, bitki ve hayvan yetiştirme çalışmaları, DNA parmak izi çıkarılması için oldukça uygundur. RAPD markırlar aynı zamanda kromozoma özgü DNA fragmentlerinin çabuk tanımlanması ve izolasyonunu sağlayan etkili bir polimorfizm tahlili sağlar. RAPD markırlar, genom haritalama otomasyonunu, genomu tanımlamak için gerekli fenotipik markır sayısının az olduğu organizmalarda genetik analiz gücünün artmasını sağlar. Bu metodun en avantajlı yanı genotip tayininin otomatikleştirilebilmesidir (Williams ve ark. 1990).

Arjantin'de, RAPD-PCR kullanılarak yapılan bir çalışmada, Arjantin ve Porto Rico'dan toplanan 5 *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) popülasyonları arasında tür içi polimorfizm varlığı araştırılmıştır. Bu popülasyonlar arasında yüksek oranda genetik benzerlik olduğu ortaya konulmuştur (Sousa ve ark.2001).

RAPD markırları *Gliricidia* (Chalmers ve ark. 1992), siyah *Aspergilli*'nin yakın türleri (Megnegneau ve ark., 1993), parazitlik protozoa'larda (Tibayrenc ve ark., 1993), genetik çeşitliliği kontrol etmede ve ekonomik açıdan önemi olan *Tilapia* tür ve alt türlerini ayırt etmede (Bardakçı ve Skibiski, 1994; Naish ve ark. 1995) başarıyla uygulanmıştır.

RAPD-PCR yapılan diğer bir çalışmada ise bazı Batı Anadolu *Gammarus* popülasyonları arasındaki polimorfizm araştırılmıştır. Bu popülasyonlar arasında tür içi ve türler arası genetik farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada *Gammarus arduus* örnekleri arasında genetik uzaklık 0'dır, tür içi polimorfizm bulunmamaktadır (Susuz F., 2002).

Buna göre 3 farklı istasyondan toplanan örnekler (Tuzla Mevkii istasyon izolatu), (Güllük Mevkii istasyon izolatu) ve (Bargilya Mevkii izolatu), A1, M13, UBC577 ve B7 primerleriyle amplifikasyon sonuçları değerlendirildi.

Popülasyon 1-4, 21-25, 40-45'e kadar olan örnekler Güllük istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* örnekleridir. Popülasyon 5-8, 17-20, 30-36'ya kadar olan örnekler Tuzla istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* örnekleridir. Popülasyon 9-16, 26-29, 37-39'a kadar olan örnekler Bargilya istasyonundan toplanan *Palaemon elegans* örnekleridir. Bu örneklerin değerlendirilmesi sonucunda *Palaemon elegans* örnekleri arasında genetik uzaklık 0'dır, tür içi polimorfizm bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Arı, Ş., Ed. Temizkan, G.; Arda, N., (1999), *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, “DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması”*, Nobel Kitabevi, s. 57-67.
<http://www.accessexcellence.org>
<http://www.biology.ucsa.edu>
- Avise J.C. ve Felley J., (1979), *Population structure of bluegill *Lepomis macrochirus* population in man-made reservoirs*, *Evolution*, **33**, 15-26.
- Bardakçı, F. ve Skibinski, D.O.F., (1994), *Application of the RAPD technique in tilapia fish. Species and subspecies identification*, *Heredity*, **73**, 117–123.
- Botstein, D., White- R.L., Skolnick, M. ve Davis, R.L., (1980), *Construction of a genetic linkage map in man using restriction Fragment length polimorphism*, *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314-331.
- Erlich H.A., Gelfald D. ve Sninsky L., (1991), *Recent advances in the polymerase chain reaction*, *Science*, **252**, 1643-1650.
- Giovannoni, J.J., Wing, R.A., Ganal, M.W. ve Tanskley, S.D., (1991), *Isolation of molecular markers from spesific choromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations*, *Nucleic Acid Res.*, **19**, 6553-6558.
- Infante M.E., Yotokokis, C. ve Lima de Azerado Espin, A.M., (1999), *Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and nouthern Argentina*, *Genome*, **42 (4)**, 772-779.
- Innis, M.A. ve Gelfald, D.H., (1990), *PCR protocols: A guide to methods and application*, Academic Pres, San Diego, USA.
- Klug, S. William, Cummings, R. Michael, (1997), *Concepts of Genetics*, p. 515, University of Ilinois, Chicago.
- Kumar, R. ve Barbacid, M., (1988), *Oncogene detection at the single cell evel*, *Oncogene*, **3**, 647-651.
- Kumar, R., (1989), *The technique of polymerase chain reaction*, *Technique A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, **1 (3)**, 133-152.

- Laurie, D.A., Smape, J.W. ve Gale, M.D., (1992), *DNA marker techniques for genetic analysis in Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, The Aden Pres, Oxford.
- Maniatis, T., Sambrook, J. ve Fritchi, F.F., (1989), *In molecular cloning a laboratory manual*, Second Edition, Cold Spring Harbour.
- Moritz, C., Dowling, T.E. and Brown W.M., (1987), *Evolution of animal mitochondrial DNA relevance for population biology and systematics*, Annual Review of Ecology and systematics, **18**, 269-292.
- Mullis, K.B., Faloona ve F.A., (1987), *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction*, Met. Enzymol., **155**, 35-350.
- Paabo, S., Higuchi, R.G. ve Wilson, A.C., (1989), *Ancient DNA and the polymerase chain reaction*, J. Biol. Chem., **264**, 9709-9712.
- Palumbi, S.R., (1996), *The polymerase chain reaction in molecular systematics*, Nucleic Acids II, Second II, Sunderland USA.
- Pediatric Moleküler Patoloji ve Genetik, Ankara Üniversitesi,
http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/pediatrics/mol-gen/index.php?PgId=81
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Eerlich, H.A. ve Arnheim, N., (1985), *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*, Science, **230**, 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfald, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. ve Erlich, H.A., (1988), *Primer,-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, Science, **239**, 487-491.
- Skoda, S.R. ve Foster, J.E., (2002), *Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera Calliphoridae)*, Bull. Entomol. Res., **92**, 89-96.
- Susuz, F., (2002), *Bazı Batı Anadolu Gammarus Türlerinin Mitokondrial DNA'larının RAPD-PCR Tekniği İle İncelenmesi*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. ve Bonierbale, M.W., (1989), *RFLP mapping in plant breeding new tools for and old sciences*, Biotechnology, **7**, 258-264.
- Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Su Ürünleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bodrum., (1991), *Türkiye Karidesleri ve Karides Yetiştiriciliği.*, Seri A, Yayın No: 4.
- Triglia, T., Peterson, M.G., ve Kemp, D.J., (1988), *A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences*, Nucleic Acids Res., **16**, 8186.
- Welsh, J. ve McChelland, M., (1990), *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*, Nucl. Acids Res., **18**, 7213-7218.
- Welsh, J. ve McChelland, M., Sobral, B.W.S., (1991), *Parantage determination in maize hybrids using arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR)*, Ther. Appl. Genet., **82**, 473-476.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. ve Tingey, S.V., (1990), *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*, Nucl. Acid. Res., **18**, 6531-6535.