

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ EST (EXPRESSED
SEQUENCE TAG) KOLEKSİYONLARINDAN ÜZÜM MİKROSATELLİT
LOKUSLARININ TANIMLANMASI

Umut KİBAR

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr. Ali ERGÜL

ANKARA

2012

**Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü EST (Expressed Sequence Tag)
Koleksiyonlarından Üzüm Mikrosatellit Lokuslarının Tanımlanması**

ÖZET

Bitkilerde SSR (Simple Sequence Repeat) tespiti için; genomik DNA kütüphaneleri kullanılarak SSR tespiti ve EST (Expressed Sequence Tag) koleksiyonları analiz edilerek SSR tespiti olmak üzere iki yaklaşım kullanılmaktadır.

Bitki EST verilerinden tespit edilen SSR' lar ile birçok bitki türünde geniş bir veri tabanı oluşturulmuştur. Bu çalışmada NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanlarında bulunan *Vitis* cinsine ait stresle ilgili kök gen dizileri kullanılarak EST koleksiyonlarından etkin ve hızlı bir şekilde SSR tespiti yapabilmek amacıyla "AUBiotek-EST-Analyzer" programı geliştirilmiştir.

NCBI veritabanında yer alan TSeq_taxid = 29760 numaralı Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidinin stres uygulanmış köklerine ait EST koleksiyonu *.xml formatında "AUBiotek-EST-Analyzer" programına yerleştirilerek (input edilerek) bu koleksiyonda bulunan tek tip motif içeren düzenli tekrar SSR bölgeleri taranmıştır. Program ile her bir EST dizisi *.xml formatında okunup, ilgili dizide bulunan tekrarlar en az 12 baz uzunluğunda olacak şekilde listelenmiş, EST sekansında bulunan her bir tekrar bölgesinin hangi motifi içerdiği, kaç tekrar yaptığı, tekrarların ilgili dizide kaçınıcı bazdan başladığı ve tamamlandığı belirlenmiştir. 16452 EST dizisinin kısa sürede analizi yapılarak tüm tekrar bölgelerinin listesi çıkarılmış, analiz sonunda bulunan veriler excel formatında kaydedilmiştir. DesignerPCR programı kullanılarak 75 çift kök SSR primeri dizayn edilmiştir. Tespit edilen primerin test edilmesi için, TTG, AAC, CAT, ATG, GAT, GA olmak üzere 6 farklı tekrar motifinden rastgele seçilen 14 adet lokus primeri ile Şam Büzgülü (*Vitis vinifera* L.)' üzüm çeşidinde gerçekleştirilen PCR analizlerinde ilgili lokus bölgeleri başarı ile çoğaltılmıştır.

Bu tezde geliştirilen yazılım ile EST koleksiyonlarından kısa sürede, maliyetsiz, kolay ve başarılı bir şekilde SSR bölgelerinin tespitini yapmak mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Biyoenformatik Yazılım, EST, kök-SSR, Vitis spp.

Description of Grape Microsatellite Loci From EST (Expressed Sequence Tag) Data Set Belongs to Ankara University Biotechnology Institute

ABSTRACT

SSR (Simple Sequence Repeat) isolation from plants is performed based on two approaches, one of which is using genomic DNA libraries and the other is analyzing the EST (Expressed Sequence Tag) data collections.

A large database for many plant type has been developed with the SSRs determined from plant EST data. In this study, the stress-related root gene sequences belonging to the genus *Vitis* in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) databases have been used and in order to make effective and rapid detection of SSR from EST collections, "AUBiotek-EST-Analyzer" software was developed.

The EST collection, belonging to the stressed-roots of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grape numbered as TSeq_taxid = 29 760 that is placed in the NCBI database, has been placed (by input) in "AUBiotek-EST-Analyzer" program in *.xml format, and the only type of perfect repeat motif SSR regions were screened in this collection. With the program, each EST sequence has been read in *.xml format and the repeats placed in relevant sequence in the base length to be at least 12 are listed and the repeat area placed in each EST sequence contains which motif, how many repeats are occurred, in which base the repeats in relevant sequence started and completed have been determined. A list of all repeat regions have been created by analyzing the 16452 EST sequence in a short time, and the data were recorded at the end of the analysis in excel format. 75 double-roots of SSR primers were designed using the DesignerPCR program. In order to test the identified primer, the relevant locus regions have been successfully accrued after the analysis of the PCR that has been conducted on the 14 loci primers Şam Büzgülü (*Vitis vinifera* L.) grape variety selected randomly from 6 repeat motif composed of TTG, AAC, CAT, ATG, GAT, GA.

Determination of SSR regions from EST collections has been achieved in a short time, cost-effective, simply and successfully with the program developed within this study.

Key words: Bioinformatic software, EST, root-SSR, Vitis spp.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Ali ERGÜL' e,

Laboratuvar uygulama aşamalarındaki yardımlarından dolayı Uzm. Bio. Melike BAKIR ve özellikle yazılım geliştirme konusunda bilgi ve tecrübeleri ile sürekli desteğini gördüğüm Salih DEMİR' e,

Çalışmalarım sırasında tüm destekleriyle her zaman yanımda olan, annem Hacer HANEDAR, kardeşim Sevda YETER ve eşim Emine KİBAR' a

en içten saygı ve sevgilerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 SSR (Simple Sequence Repeat) DNA Markörler.....	3
2.2 SSR Lokusu İzolasyon Stratejileri.....	4
2.3 EST 'lerden SSR Tespit Etmek Amacıyla Geliştirilen Analiz Araçları.....	10
2.4 Primer Dizaynı İçin Kullanılan Araçlar.....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal.....	18
3.2 Yöntem	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	28
4.1 AUBiotek-EST-Analyzer Programı ile Tespit Edilen SSR Bölgeleri.....	28
4.2 SSR Primerleri.....	36
4.3 Dizayn Edilen Primerlerin Test Edilmesi.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
KAYNAKLAR.....	47
EKLER	53
ÖZGEÇMİŞ.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve EST dizileme akış şeması.....	6
Şekil 2.2 EST analizindeki genel aşamalar	9
Şekil 3.1 AUBiotek-EST-Analyzer programı ana ekranı.....	21
Şekil 3.2 EST koleksiyonunun programa yüklenmesi.....	21
Şekil 3.3 EST koleksiyonunda SSR tespitine başlanması	22
Şekil 3.4 SSR içerdiği tespit edilen EST dizileri.....	22
Şekil 3.5 SSR içerdiği tespit edilen EST dizilerinin excele kaydedilmesi	23
Şekil 3.6 İstenilen tekrar motifinin seçilmesi	23
Şekil 3.7 İstenilen tekrar motifini içeren EST dizilerinin seçilmesi.....	24
Şekil 3.8 Belirlenen EST dizileri için primer dizayn edilmesi	25
Şekil 4.1 Test edilen SSR lokuslarının agaroz jel (%2) görüntüleri.....	42
Şekil 5.1 Tekrar eden motif uzunluklarının dağılımı	43
Şekil 5.2 Tekrar eden motiflerin dağılımı	44
Şekil 5.3 Tespit edilen SSR uzunluklarının dağılımı	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Önemli EST veri kaynakları.....	10
Çizelge 2.2 Bazı on-line SSR veritabanları.....	14
Çizelge 2.3 Popüler SSR tespit araçları.....	15
Çizelge 2.4 Bazı On-line primer dizayn araçları.....	16
Çizelge 2.5 Bazı Masaüstü primer dizayn araçları.....	17
Çizelge 3.1 Kullanılan EST koleksiyonuna ait araştırma grubu ve yayın bilgisi.....	19
Çizelge 4.1 Tespit edilen SSR lokusları.....	28
Çizelge 4.2 75 adet Reverse ve Forward Primer.....	36
Çizelge 4.3 Farklı lokuslara ait PCR da kullanılan 14 lokusun geri (reverse) ve ileri (forward) primerleri.....	40

SİMGELER DİZİNİ

*xml	Extensible Markup Language (Genişletilebilir İşaretleme Dili)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Dizi Homolojisi Arama Motoru)
bp	Base pair (Baz çifti)
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid (Tamamlayıcı DNA Dizisi)
dbEST	Database EST (EST Veritabanı)
DDJB	DNA Data Bank of Japan (Japon DNA Veri Bankası)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi-Nükleotid Trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EMBL	European Molecular Biology Laboratory (Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı)
EST	Expressed Sequence Tag (İfadenmiş Dizi Etiket)
FASTA	Bir Diziyi Temsil Eden Yazı Tabanlı Dosya Biçimi
kB	Kilobyte
Mb	Megabyte
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
M	Molar
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Mesajcı Ribonükleik Asit)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA (Rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
RNase	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarı)

1. GİRİŞ

Biyoenformatik kompleks biyolojik sorulara cevap vermek amacıyla biyolojik bilginin paylaşımı, düzenlenmesi ve analizi için bilgi teknolojilerini kullanan bir disiplin olup biyoloji ve bilgisayar biliminin bir birleşimi olarak adlandırılabilir. Kompleks biyolojik sorunları çözmek amacıyla bilgi sistem ve araçlarını kullanarak, veritabanlarından bilginin elde edilmesini, düzenlenmesini ve depolanmasını sağlar (Abd-Elsalam 2003).

Genom çalışmaları sonucunda elde edilen genom dizilerinin, bilgisayar ortamına aktarılmasıyla birlikte oluşturulan veritabanları sadece dizilerle ilgili değil aynı zamanda dizilerin elde edildiği organizmalar, oluşturduğu protein yapıları ve fonksiyonları hakkında da bilgi içerdiği için önemli bir kaynak özelliğini taşımaktadır. Bu veritabanlarından en kapsamlısı NCBI (National Center for Biotechnology Information) olup, buradaki mevcut veritabanları sadece kendi bünyesindeki verilerle değil, farklı veritabanlarından da elde edilen veriler ile sürekli güncellenmektedir. Araştırmalardan elde edilen sonuçların anlamlı hale gelmesini sağlayacak bilgisayar programları kullanılarak oluşturulan veriler, bu veritabanlarında bulunan araçlarla daha önce çalışılmış organizmalara ait verilerle karşılaştırılabilir. Bu kapsamdaki çalışmaların bilgisayar programları ve veritabanları olmadan gerçekleştirilmesinin olanaksızlıkları, biyoenformatik çalışmaları genom araştırmacıları için vazgeçilmez bir araç haline getirmektedir (Oruç 2009).

Genom çalışmalarındaki artışa paralel olarak biyoenformatik kaynaklarının araştırmacılar için doğru ve kolay bir şekilde kullanımının artması beklenmektedir. Ancak biyoenformatik bilim dalının özellikle son 15-20 yılda gelişiyor olması bu konuda çalışma yapmak isteyen araştırmacıları zorlamaktadır. Uygun programın tespiti ve bu programa ulaşmadaki güçlükler, program kullanımında uzmanlaşamama en önemli sorunlar arasındadır (Oruç 2009).

EST (Expressed Sequence Tag) verileri genel olarak 200-500 bp uzunluğunda cDNA parçaları olup, gen tespiti için hızlı ve güvenilir bir bilgi kaynağı olmasının yanında bilinen veya bilinmeyen genlerin ifade analizleri için de kaynak oluşturmaktadırlar (Adams vd 1991). Günümüzde birçok bitki türü ve diğer canlı türleri için EST dizilerinden belirlenen SSRs (Simple Sequence Repeats) markörler ile geniş bir veritabanı oluşturulmuştur ve bu

veritabanlarında bulunan EST verilerinden SSR tespit etmek amacıyla çeşitli yazılım platformlarında analiz araçları geliştirilmiştir (Sharma vd 2007).

Bu tezde stres uygulanmış Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidine kök EST koleksiyonları üzerinden çalışılarak SSR tespiti yapan kullanıcı dostu ve değişik bitki türlerinde bu alana yönelik araştırmalarda kullanılacak bir program “AUBiotek-EST-Analyzer” geliştirilmiştir. Yazılımla üzüm genetik tanımlamalarında kullanılacak ve stres genleri ile ilişkilendirilebilecek SSR lokus ve bu lokuslara ait allel bölgelerinin primerleri tespit edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 SSR (Simple Sequence Repeat) DNA Markörler

Mikrosatellit veya SSR (Simple Sequence Repeat), 2–6 baz uzunluğunda kısa tekrar (AC, AGC, GATA gibi) dizileri olup, yüksek canlılarda genoma özgünlük göstermektedir (Litt ve Luty 1989). Genotipler arası allelik varyasyonları replikasyon kaymasındaki mutasyonlara vb. dayandırılan SSR markörler (Schlotterer ve Tautz 1992) genetik kimlik çalışmalarında önemli avantajlar sağlamaktadır.

Gen kaynaklarının moleküler tanısı dominant (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD, Amplified Fragment Length Polymorphism-AFLP vb) markörlerin kullanılmasıyla yapılabilmesine karşın temel olarak SSR markörlere dayalı olarak sürdürülmektedir. PCR'a dayalı diğer tekniklere göre daha fazla bilgi içermesi, ko-dominant ve kararlı markör sistem olması, tekrarlanabilir ve otomasyona uygun olması, az miktarda DNA gerektirmesi, yüksek polimorfizm göstermesi ve çoklu allel verebilmesinden dolayı çok kullanışlı bir yöntemdir (Powell vd 1996).

SSR markörler bitkilerde genetik kimlik belirleme, evrimsel gelişimin moleküler analizi, orijin belirleme, melezleme ıslahında hibrit bitki tanısı, genetik haritalama ile markör yardımı ile seleksiyon gibi değişik amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır. Mikrosatellit lokuslarının tespiti genel olarak genomik DNA'dan ve EST (Expressed Sequence Tag) koleksiyonlarından yapılmaktadır. Genomik DNA'dan SSR tespiti masraflı ve zaman kaybettiren bir yöntemdir (Ellis ve Burke 2007). Bitki fonksiyonel genom bilimi projeleri çerçevesinde transkripsiyona giren ve girmeyen cDNA bölgelerinden (UTR – Untranslated Region) tespit edilen EST' ler tekrar bölgelerini de içermekte, SSR allellerinin geliştirilmesinde veri kaynağı oluşturmaktadır.

SSR' ların tekrar tiplerine göre sınıflandırılması yapıldığında ise; SSR tekrarları motif dizinin genomdaki dizilişine göre 4 farklı gruba ayrılmaktadır.

1- Düzenli tekrar =Perfect repeat (Tek tip motif içeren SSR)

Örnek: **CTCTCTCTCTCT**

2- Birleşmiş=Compound (İki farklı tip motif içeren SSR)

Örnek: **CTCTCTCACACACA**

3- Düzensiz tekrar = Imperfect (Tekrar motifi arasında tek bir baz içeren SSR)

Örnek: CTCTCTACTCTCT

4- Kompleks yapıda tekrar içeren SSR=Region of cryptic simplicity

Örnek: GTGTCACAGAGT

Mikrosatellit polimorfizmi (genetik farklılığı) bir lokusta değişik sayıda tekrarlar içeren allellerin bulunmasına bağlıdır. Mikrosatellit mutasyon oranının her nesil için 10^{-2} den 10^{-4} 'e kadar değişen oranlarda yüksek olduğu ve farklı türlerde mikrosatellit bölgelerinin tekrar sayılarında büyük farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (Weber ve Wong 1993). Polimorfizmler SSR bölgelerine komşu (=flanking) bölgelere özgü primerler dizayn edilerek tanımlanmakta ve flanking bölgeler tür içinde korunma eğiliminde olduğu gibi daha yüksek taksonomik seviyelerde de korunmuş olabilmektedir. Bir populasyon içerisinde nükleotid dizi tekrarlarının sayısındaki değişiklik her mikrosatellit allellerinin sayısındaki farklılığa sebep olmaktadır. Mikrosatellitler genetik çeşitliliği belirlemedeki kolaylığı yüzünden son yıllarda en çok kullanılan genetiksel yöntemlerden biri olmuştur. İki allel arasındaki tekrar sayısı farkı bireyler arasındaki farkı vermektedir. Farklı bireylere ait aynı DNA bölgesi üzerinde lokusun homozigot / heterozigot ayrımı ebeveynden almış olduğu allellerden kaynaklanmakta ve SSR markörlerin kodominatlığı ise bunun tespitine dayandırılmaktadır.

2.2 SSR Lokusu İzolasyon Stratejileri

Mikrosatellit izolasyonu temel olarak; klasik (small insert genomic) ve zenginleştirilmiş (enriched) DNA kütüphanelerinin oluşturulması, bu kütüphanelerin SSR tekrarlarına özgü oligonükleotid işaretli problarla taranması, pozitif klonlara ait dizilerin belirlenmesi, primer dizaynı ve PCR yapılması, polimorfizmlerin tanımlanması şeklindedir. Ancak izolasyonunun, etkinlik, zaman kaybı ve maliyet bakımından değerlendirilmesi sonucunda farklı stratejilerin geliştirildiğini görmek mümkündür. SSR izolasyon stratejileri;

1. Klasik (small insert genomic) DNA kütüphaneleri oluşturma, 2. Zenginleştirilmiş DNA kütüphaneleri oluşturma, 3. Veritabanları (NCBI, dbETS vb) kullanılarak SSR (EST kökenli vb) geliştirme olmak üzere genel olarak 3 başlıkta sınıflandırılabilir.

Geleneksel (1. ve 2.) mikrosatellit lokus izolasyonu, mikrosatellitce zengin genomlarda kullanılmakta ancak düşük mikrosatellit sıklığı (mikrosatellitce fakir)' na sahip türlerde verimsiz olabilmekte ve elde edilen pozitif klonların sayısı %0.04 ile %12 arasında değişmektedir (Zane vd 2002). Zaman alıcı, pahalı ve bilgi birikimi gerektiren araştırmalar olan geleneksel yöntemlere ek olarak son yıllarda EST kökenli SSR geliştirme yöntemlerinin ön plana çıktığı görülmektedir. Bu amaçla izlenen strateji ise cDNA kütüphanelerinin oluşturulması, EST tespiti, bu EST'lerin gen bankalarına sunulması ve EST'lerden uygun biyoenformatik yazılımlarla SSR lokusları geliştirilmesi şeklindedir.

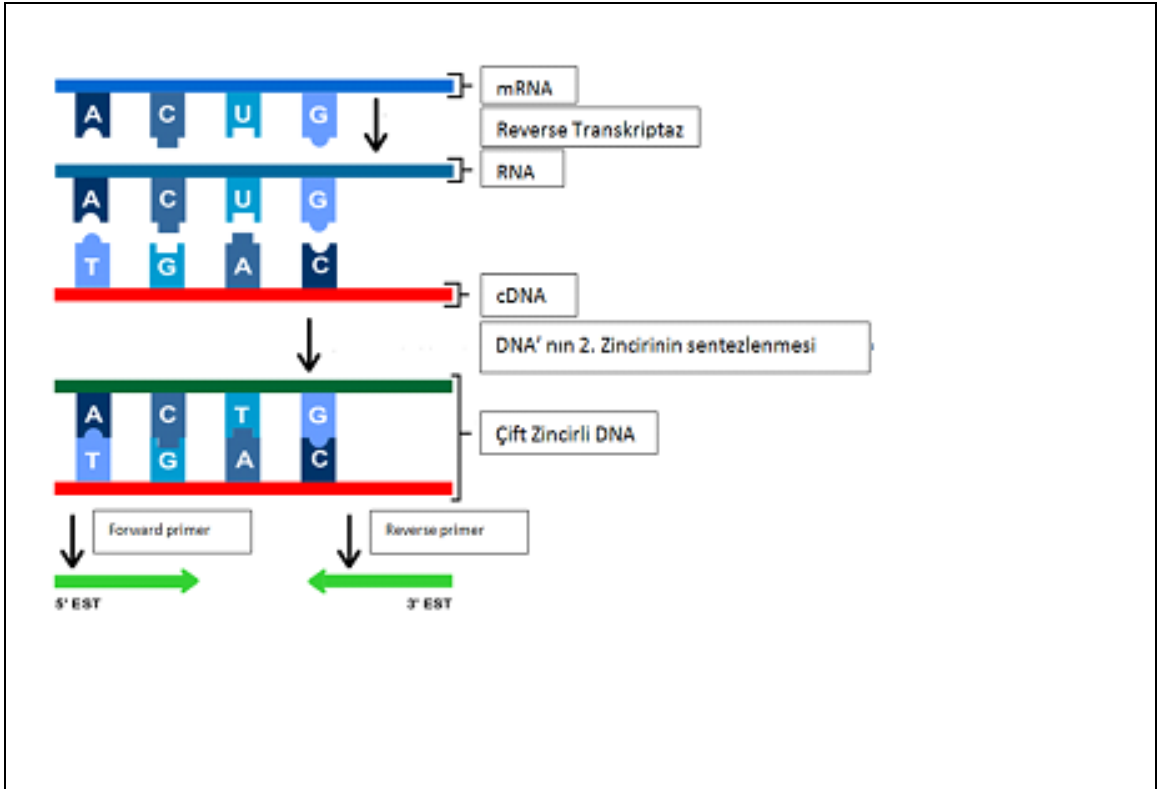
2.2.1 EST (Expressed Sequenced Tag) kökenli SSR lokus izolasyonu stratejisi

2.2.1.1 cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve EST tespiti

cDNA, reverse transkriptaz enzimi kullanılarak elde edilen bir DNA formudur. cDNA, genomik DNA' nın aksine sadece ifade olmuş DNA dizisi içermektedir. cDNA klonunun dizilenmesi ile birkaç yüz nükleotid uzunluğunda iki farklı EST dizisi belirlenmektedir. cDNA' nın protein kodlayan ve başlangıç kısmından elde edilen diziyeye "5' EST" adı verilmektedir. Bu başlangıç dizileri türler arasında korunmuştur ve gen ailesi içerisinde fazla bir değişiklik göstermemektedirler. cDNA geninin bitişine yakın kısımlardan elde edilen diziyeye ise "3' EST" adı verilmektedir. İkinci grup EST'ler ifade olmuş dizinin 3' ucuna yakın kısımlarından elde edildiklerinden, daha çok kodlama yapmayan ve translasyonu olmayan dizileri içermektedir ve kodlama yapan bölgelere göre türler arasında daha az korunmuşluk göstermektedir [1].

Bir organizmaya, dokuya veya organa ait elde edilmiş çok sayıda cDNA klonları ile cDNA kütüphaneleri oluşturulur. Bu kütüphaneler genom çalışmalarında gen fonksiyonlarına ulaşmak için kullanılır. Bu kütüphanelerden elde edilen klonların dizi analizleri sonucu ortaya çıkan EST' ler (Expressed Sequence Tags), bilgisayar ortamına fonksiyonel gen dizileri ve parçaları olarak aktarılarak çeşitli biyoenformatik analizler için veri olarak kullanılmaktadır. Böylece cDNA kütüphanelerinden elde edilen EST' ler bilinmeyen genlerin tanımlanması ve yerlerinin tespit edilmesinde, gen ifadesi ve regülasyonu hakkında veri toplanması ve genom haritalarının oluşturulması konusunda önemli bir veri sağlarken, biyoenformatik alanına ait kaynaklar ve analiz teknikleri kullanılarak bu

verilerden hızlı, güvenilir bir şekilde istenilen sonuçlara ulaşılmaktadır (Oruç 2009). Günümüzde çok sayıda genom projesinin tamamlanması ile birlikte EST'lerin sayısı hızla artmıştır ve daha fazla uygulama için veritabanında kullanılabilir hale gelmiştir. Bu EST veritabanlarındaki bilgilerin kullanımı sonucu bilinen genlerin homolojisi ile pek çok genin olası fonksiyonlarının tahmini mümkün olmaktadır. cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve EST dizisinin belirlenmesi için takip edilen araştırma aşamaları Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1 cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve EST dizileme akış şeması

Günümüzde bir çok türe ait genom tamamen dizilenmiş durumdadır. Ancak bir çok türün medikal ve tarımsal önemi bulunmadığından henüz genomik dizilenmesine öncelik verilmemektedir ve bunların temel gen dizi kaynağını cDNA'lar sağlamaktadır [2]. Bir genin dizilenmesi ile oluşturulan DNA dizisinin 200-500 nükleotid uzunluğunda küçük bir parçası [1] olan EST tespitine yönelik, dizileme projeleri çok fazla sayıda organizma için devam etmektedir. Elde edilen veriler EST veri tabanlarında toplanmaktadır. Gelişmiş bilgisayar stratejileri ile uzun veya kısa EST verilerinden gen tespiti, tek nükleotid

polimorfizmi, fonksiyonel genomik vb. analizler yapılabilir (Nagaraj vd 2006). Herhangi bir dizileme projesinin temel amacı genomik dizi elde etmek ve gen setinin tamamını tanımlamak olsa da esas hedeflenen gen ifadesi olarak adlandırılan işlemin ne zaman, nerede ve nasıl bir gene dönüştüğünü anlamaktır. EST, bilinmeyen genleri tanımlamaya yönelik başlangıç bilgisi olarak kullanılmakta ve teknolojiye gelişmeler aracılığı ile bir geni tanımlamak için gereken süre hızla azalmaktadır. EST, yeni genlerin tespiti, gen ekspresyonu ve düzenlenmesinde veri elde etmek ve genom haritalama için hızlı ve maliyetsiz bir araçtır.

2.2.1.2 EST gen bankaları ve EST analizi

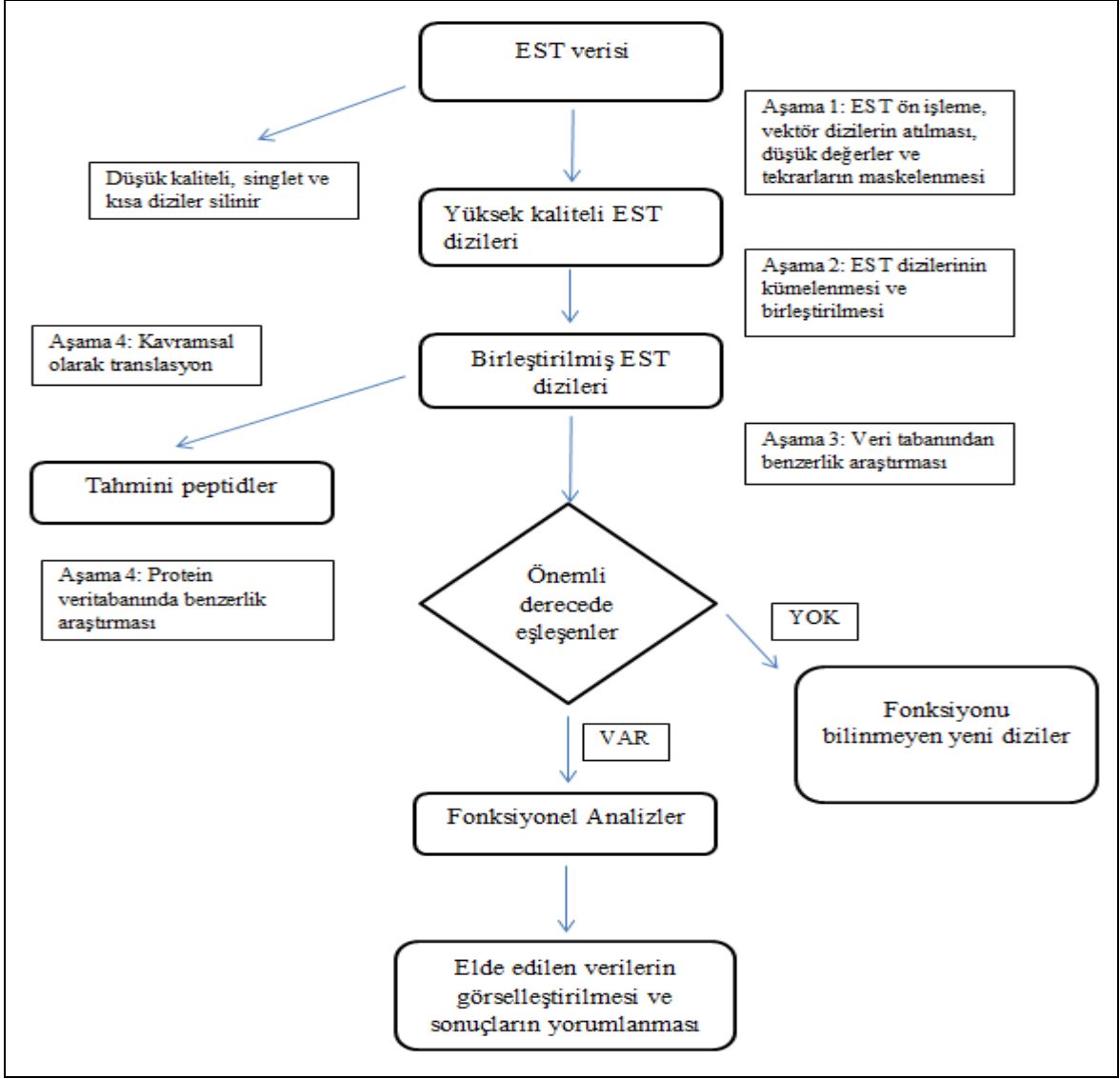
Araştırmalarda, kamu kullanımına açık olacak şekilde, kullanışlı olmaları, hızlı şekilde oluşturulabilmeleri ve teknoloji yardımıyla düşük maliyetleri olması nedeniyle EST koleksiyonları oluşturulmaktadır. Bir EST oluşturulduğunda geliştiriciler tarafından öncelikle Genbankasına (GenBank) sunulmaktadır. Bunların başında ise NCBI bünyesinde 1992 yılında kurulan dbEST veritabanı gelmektedir. Bu veri tabanı aracılığı ile, araştırmacılar EST verilerini saklayabilmekte, organize edebilmekte ve mevcut verilere erişim sağlayabilmektedir. İnsan EST verisi dışında diğer 300 organizmaya ait EST verisinin bulunduğu dbEST veritabanı aracılığı ile EST dizileri bilinen gen dizileri ile BLAST gibi analiz araçları kullanılarak karşılaştırılmakta böylece dizi benzerlikleri ve fonksiyonları tespit edilebilmektedir [1].

GenBankası (GenBank) dizi veritabanı nükleotid dizileri ve bu dizilerin protein translasyonlarının koleksiyonunun bulunduğu veritabanı özelliğinde olup, NCBI (National Center for Biotechnology Information) bünyesinde aynı zamanda EBI (European Bioinformatics Institute) bünyesinde bulunan EMBL (European Molecular Biology Laboratory) veri kütüphanesi ve DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ile de işbirliğine sahiptir. Genbank ve işbirliği yapılan veritabanları 100.000 den fazla farklı organizmadan üretilen dizileri içermekte olup hızla büyüyen oranda genişlemektedir ve her 10 ayda iki kat dizi bilgisine sahip olmaktadır. Şubat 2003 tarihi itibarıyla 23 milyondan fazla dizide 29.3 milyar baz içerirken, Nisan 2011 tarihi itibarıyla 198.1 milyondan fazla dizide yaklaşık 317,9 milyar baz içermektedir. Genbank kişisel laboratuvarlardan veri sağlarken bunun yanında çok büyük boyutlarda dizileme yapabilen merkezlerden de veriler

sağlamaktadır. EST (Expressed Sequence Tag) koleksiyonları GenBanka genelde büyük dizileme merkezleri tarafından sunulmaktadır [3, 4]. Genbanka web tabanlı form olan “BankIt” veya masaüstü uygulaması “Sequin” ile veri sunulabilmekte, veri Genbanka ulaştığında bu dizilere bir erişim numarası verilmekte, ve diziler kalite kontrollerinden geçirildikten sonra kullanıma serbest bırakılmaktadır [4].

Bir genin kopyası olan mRNA birden fazla ifade edildiğinden, bu mRNA' ların dizilenmesi ile oluşturulan EST' lerin sayısında da buna bağlı olarak fazlalık olabilmektedir. Diğer bir ifade ile, aynı EST' nin birden fazla kopyaları oluşabilmektedir. Bu gibi fazlalık EST' lerin bulunması ve dizilerin üst üste binmesinden dolayı, belirli bir EST arandığı zaman birbirine benzeyen dizilerden arama yapmak durumunda kalınmaktadır. Tüm bu EST dizilerini incelemek araştırmacılara zaman kaybettirmektedir. Bu gibi fazlalık ve dizi çakışması durumlarını çözümü ise NCBI bünyesinde 'Unigene' adında oluşturulan veritabanı ile sağlanmaktadır. Bu veritabanı Genbank dizilerini otomatik olarak tarayarak, onları gen olma ihtimali fazla olan aynı veritabanında kopyası veya herhangi bir parçası bulunmayan sadece birbirinden farklı dizilerin bulunduğu veriye, yani unigene dönüştürmektedir. Böylece kolaylıkla karşılaştırma yapılabilmektedir (Oruç 2009). EST analiz aşamaları genel olarak Şekil 2.2 de gösterilmektedir. Şekil 2.2'den de anlaşılacağı üzere EST' ler;

1. Ham EST dizilerinin kesilen veya maskelenen vektör kontaminasyonu, düşük değerlikli diziler ve tekrar bölgeleri bakımından kontrol edilmesi ile düşük kaliteli, tek (singleton) olan ve kısa dizilerin atılması,
2. Kümelenen ve birleştirilen EST'lerden birleştirilmiş dizi (contig) oluşturulması,
3. Homolog olan ve benzer fonksiyona sahip olan dizileri belirlemek için DNA veritabanında benzerlik taraması yapılması,
4. Birleştirilmiş dizilerin (Contiglerin) kavramsal translasyonu ile tahmini peptitlerin belirlenmesi,
5. Tahmini fonksiyonların belirlenmesi için protein veritabanında benzerlik araması yapılması, sonuçların görselleştirilmesi ve yorumu ile fonksiyonel anlamlandırmanın yapılması için analizin genişletilmesi aşamalarından geçilir (Nagaraj vd 2006).



Şekil 2.2 EST analizindeki genel aşamalar

Farklı organizmalara ait önemli EST veri kaynakları (Nagaraj vd 2006) ise Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1 Önemli EST veri kaynakları

Kaynak	İçerik	Organizma
ApiEST-DB	Ham veri	Parazit Apicomplexan (Protista)
dbEST (NCBI)	Ham veri	Tümü
Diatom EST Veritabanı	Ham ve küme veri	Diatom (Alg türü)
ESTree	Ham ve küme veri	Şeftali
Mantar Genom Projesi	Ham veri	Mantar
Bal Arısı Beyin EST Projesi	Ham ve küme veri	Bal Arısı
Nematod EST (Sanger Enstitüsü)	Ham ve küme veri	Parazit Solucan
NEMBASE Parazit Nematod ESTs	Ham ve küme veri	Parazit Solucan
Parazit ve Serbest Yaşayan Nematod EST Veritabanı	Ham ve küme veri	Solucan
Patojenik Mantar EST Veritabanı	Patojenik Mantar	Mantar
Bitki Gen Araştırma (Kazusa DNA Araştırma Enstitüsü)	Ham veri	Heterojenik set
Bitki Genom Veritabanı	Ham ve küme veri	Bitki
Iowa Üniversitesi Sıçan EST Veritabanı	Ham veri	Sıçan
The TIGR Gen İndeksi	Ham veri ve gen indeksi	Tümü
Unigene Veritabanı (NCBI)	Ham ve küme veri	Tümü

2.3 EST 'lerden SSR Tespit Etmek Amacıyla Geliştirilen Analiz Araçları

EST veritabanlarında bulunan farklı türlere ait EST koleksiyonlarından SSR tespiti yapmak amacıyla farklı platformlarda hazırlanmış değişik veri türlerini analiz edebilen birçok SSR tespit yazılımı geliştirilmiştir (Sharma vd 2007). Her program kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahiptir. EST'lerden SSR tespit etmek amacıyla kullanılan önemli veritabanları ve programlara yönelik çalışmalar şu şekilde özetlenebilir.

Abajian (1994) tarafından geliştirilen “**SPUTNIK**”, SSR tespiti için yaygın olarak kullanılan hızlı, etkili ve basit kullanımı olan bir uygulamadır. FASTA formatında veri kullanılırken, 2 ile 5 tekrar uzunluğunda düzenli, düzensiz ve birleşmiş tekrarları tespit etmektedir. Çıktı olarak tablo formatında SSR dosyası veren yazılımın, Unix, Linux ve Windows ortamında çalışabilen versiyonları bulunur. “SPUTNIK” arabidopsis ve arpanın (Cardle vd 2000) da içinde bulunduğu birçok türde SSR tespiti için kullanılmıştır.

Agarwal vd (1994), “**Repeat Pattern Toolkit (RPT)**” ile *C. Elegans*'ın 3. kromozomunda 7000'inin üzerinde tekrar dizisi tanımlamış ve analiz edilen dizilerin yaklaşık olarak %12.3 ünün tekrar bölgeleri içerdiğini tespit etmiştir.

Benson vd (1999), 2000 bp'lik alanda SSR tespiti yapabilen “**Tandem Repeats Finder (TRF)**” ile boyutları 3 kb ile 700 kb arasında olan insan frataxin gen dizisi, insan β T cell reseptör lokus dizisi ve iki maya kromozom dizisini analiz etmişlerdir. Bu yazılım, tespit edilen SSR'larda istatistiksel analizler (motif uzunluğu, eşleşme olasılığı, nükleotid eklenme-silinme olasılığı, değişkenlik boyutu) ve sınıflandırmalar (düzenli, düzensiz ve birleşmiş tekrarları) yapabilmektedir. Linux platformunda çalışan yazılım Çin karidesinde de (Gao ve Kong 2005) SSR tespiti için kullanılmıştır.

Kurtz vd (2001), hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip, masaüstü versiyonu çok büyük genomik dizilerle çalışabilen, sadece fasta formatında veri kabul eden ve BLAST' a benzer formatta çıktı sağlayan, istatistiksel ve grafik analiz imkanı veren “**REPuter**” yazılımını geliştirmişlerdir.

Temnykh vd (2001), “**Simple-Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT)**” ile pirinçe (*Oryza sativa* L.) ait 57.8 Mb boyutundaki dizi setinden farklı SSR dağılımlarını ve sıklıklarını araştırmışlardır. SSR bölgelerini 20 bazdan uzun ve 12 ile 20 baz uzunluk arasında olmak üzere tekrar motiflerine göre iki gruba ayırmışlardır. “SSRIT” dizideki düzenli SSR'ları tespit etmek için Perl script kullanmakta, tek nükleotid tekrarlarını eleyerek 2 ile 10 baz uzunluğunda tekrarları bulmaktadır. Çıktı olarak tablo formatında SSR dosyası verirken, bir dizinin analizini yapmak için web tabanlı versiyonu olduğu gibi masaüstü versiyonu da kullanılabilir. Castelo vd (2002), açık kaynak kodlu, hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip düzenli, düzensiz ve birleşmiş tekrarları tespit edebilen, sadece fasta formatında veri kabul eden, aynı zamanda primer dizaynı da yapabilen “**Tandem Repeats Occurrence Locator (TROLL)**” yazılımını geliştirmişlerdir. Sreenu vd (2003), web tabanlı versiyonu bulunan ve yalnızca düzenli tekrarları tespit edebilen “**Microsatellite Analysis Server (MICAS)**” yazılımını geliştirmişlerdir.

Thiel vd (2003) tarafından geliştirilen “**MISA**” düzenli, düzensiz ve birleşmiş SSR ları tanımlar, analiz yapılırken fasta formatında veri gerektirir. Çıktı olarak bulunan tekrarların ve özet bilgilerin yer aldığı bir dosya vermekte olup Perl skript olarak yazılmıştır. Yazılım primer tespit yazılımı olan “ Primer3” ün yüklenmesi ile primer tasarlayabilme özelliklerinede sahiptir. SSR tanımlamak için geliştirdikleri “MISA” yazılımı ile 24.595 EST dizisi içeren arpa EST koleksiyonunu analiz ederek 1.856 SSR tanımlamışlar ve en

çok 3 baz tekrar motifi tespit etmişlerdir. MISA, değişik araştırıcılar tarafından SSR tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Karayosunu (Stackelberg vd 2006) ve kahve (Aggarwal vd 2006) bu türlerin başında gelmektedir. Stackelberg vd (2006) *Physcomitrella* türüne ait EST koleksiyonundan MISA ile 3.723 adet SSR tanımlamışlar, 2.951 SSR için primer dizayn etmişlerdir. Aggarwal vd (2006) ise 2.553 adet dizi içeren kahve EST koleksiyonundan MISA ile 425 adet SSR tespit etmişler, en çok bulunan motifin AG ve AAG olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Kolpakov vd (2003), hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip, platform bağımsız, farklı veri formatlarını kabul eden, düzensiz ve birleşmiş SSR tekrarları tespit edebilen aynı zamanda primer dizayn edebilen “**mreps**” yazılımını geliştirmiştir. Parisi vd (2003), hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip, düzenli, düzensiz ve birleşmiş SSR (perfect, imperfect ve compound) tekrarları tespit edebilen, büyük genomik dizilerle çalışabilen, platform bağımsız, sadece fasta formatında veri kabul eden “**Search for Tandem Repeats in Genomes (STRING)**” yazılımını geliştirmişlerdir. Bizzaro vd (2003) ise platform bağımsız, indirilebilir python script olarak hazırlanmış, istatistiksel analiz sağlayan “**Poly**” yazılımını geliştirmişlerdir.

Gao vd (2003), “**SSRFinder**” yazılımı ile 85 Mb boyutundaki 4 önemli bitki türünün (pirinç, buğday, mısır, soya fasulyesi) EST koleksiyonundan 1-6 baz uzunluğundaki motifleri araştırmak için SSR analizi yapmıştır. Pirinçte 11.81 kb, buğdayda 17.42 kb, soya fasülyesinde 23.80 kb ve mısırdaki 28.32 kb EST-SSR sıklığı tespit etmişlerdir. En çok bulunan SSR tipi olarak trinükleotid (3 baz tekrar motifi) tekrarların varlığı saptanırken, buğday için tespit edilen 597 SSR için dizayn edilen primerlerden 497 tanesi ile PCR yapılabilmiş ve bu primerlerden 255 tanesi de pirinç, soya fasülyesi ve mısırdaki kullanılabilmştir. Bu da karşılaştırmalı haritalama ve homolog gen klonlama çalışmalarında SSR bölgelerine özgü primerlerin yakın bitki türleri arasında yüksek oranda geçişkenliğini göstermiştir.

Delgrange vd (2004), hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip, platform bağımsız “**Search for Tandem Approximate Repeats (STAR)**” yazılımını, Reneker vd (2004) ise 3 ile 1000 baz uzunluğunda DNA dizilerinde bulunan tekrar bölgelerini bulmak için web server (**ACMES**) geliştirmiştir. Uygulama çapraz türler arasında korunmuş tekrar dizilerini keşfetmek içinde kullanılabilm özelliğini göstermektedir.

Nicot vd (2004) , “**SSR Search**” ile, 170.746 dizi içeren buğday EST koleksiyonundan 3.530 adet SSR tespit etmiş, bu SSR bölgeleri için %74 üne primer dizayn edebilmiş ve %70 inden ürün elde edilebilmiştir.

Robinson vd (2004), Jewell vd (2006) tarafından geliştirilen “**SSRPrimer**” SSR tespiti yapmak ve Primer dizayn etmek için Sputnik ile Primer3 kombinasyonundan oluşmaktadır. Çıktı olarak SSR listesi ve Primerleri tablo halinde vermektedir. Geliştirilen bu yazılım, turunçgil (Chen vd 2006), nane (Lindqvist vd 2006), çilek (Keniry vd 2006), *Sclerotinia* (Winton vd 2007) ve *Eragrostis curvula* (Cervigni vd2008) türlerinde SSR tespiti için kullanılmıştır.

Jayashree vd (2005) tarafından yer fıstığında SSR tespiti için kullanılan “**RepeatFinder**”, SSR tespitini dört aşamada yapmaktadır. Yazılımın girdisi tüm genom veya dizi setidir. Çıktı olarak her sınıfta birleştirilmiş tekrarların sayısını ve tekrar sınıflarını vermektedir. Sadece SSR değil tüm uzunluktaki tekrarları tespit edecek şekilde dizayn edilen yazılım Unix veya Linux’ ta çalışmaktadır. Perez vd (2006), “**Tandem Repeats Finder**” ile, *Litopenaeus vannamei* EST koleksiyonundan SSR tespiti yapmışlar ve EST’ lerin %3.8 inde SSR tespit edilmiştir. Bunlardan 206 adeti için primer sentezlenmiş ve 112 primer ürün vermiştir.

Singan vd (2005), sadece masaüstü versiyonu bulunan, Perl script olarak hazırlanmış, PhredPhrap ve Primer3 ile kombinasyon sağlayabilen, düzensiz ve birleşmiş tekrarları tespit edebilen “**MicrosatDesign**” yazılımını geliştirmişlerdir. Karaca vd (2005) ise hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip, çoklu veri formatını kabul eden, istatistiksel analiz sağlayan düzenli, düzensiz ve birleşmiş (perfect, imperfect ve compound) tekrarları tespit edebilen “**Exact Tandem Repeats Analyzer (E-TRA)**” yazılımını geliştirmişlerdir.

Thurston vd (2005), hem on-line hem de masaüstü versiyonlarına sahip, Perl script olarak hazırlanmış, düzensiz ve birleşmiş (imperfect ve compound) tekrarları tespit edebilen, çoklu veri formatını kabul eden, ek script ile istatistiksel analiz sağlayan “**msatminer**” yazılımını geliştirmişlerdir.

Faircloth (2008), indirilebilir python script olarak hazırlanmış, düzenli, düzensiz ve birleşmiş tekrarları tespit edebilen, *.csv formatında çıktı sağlayabilen, primer dizaynı yapabilen, platform bağımsız “**msatcommander**” yazılımını geliştirmişlerdir. Kofler vd

(2007), sadece masaüstü versiyonu bulunan, perfect, imperfect ve compound tekrarları tespit edebilen, istatistiksel analiz sağlayan, platform bağımsız “**SciRoko**” yazılımını geliştirmişlerdir. Mudunuri vd (2007), sadece masaüstü versiyonu bulunan, düzenli ve birleşmiş tekrarları tespit edebilen, primer dizaynı yapabilen, istatistiksel analiz sağlayan “**Imperfect Microsatellite Extraction (IMEx)**” yazılımını geliştirmiştir.

EST verileri de kullanılarak geliştirilen önemli on line SSR veritabanları ile EST’ lerden SSR tespitinde yaygın olarak kullanılan analiz programlarına (Sharma vd 2007) ait bilgiler sırasıyla Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Bazı on-line SSR veritabanları

Veritabanı adı	Tür	Veritabanı İçeriği
Mouse Microsatellite Database of Japan (MMDBJ)	Fare	6119 SSR koleksiyonu içerir.
Simple-Sequence Repeat Database (SSRD)	İnsan	SSR lara ait özet ve detaylı bilgiler içerir.
Satellog	İnsan	İnsan genomunda bulunan 1-16 tekrar birimli perfect tekrarları içeren katalog bulunmaktadır.
Microsat2006	İnsan	İnsan SSR kataloğu bulunmaktadır.
Molecular Mycology SSR Database	9 mantar genomu	Mantar genomundaki 1-6 tekrarları içerir.
EuMicroSatdb	31 ökaryotik genomu	Fiziksel clusterları ve kompleks tekrarları da içeren SSR lar bulunmaktadır.
TRBase	İnsan	11 kromozom için açıklamaların bulunduğu dosyaları ve insan-dizi verisinden 1-2000 bp uzunluğunda perfect ve imperfect tekrarları içerir.
InSatdb	Tamamen dizilenmiş 5 böcek genomu	Genomik konuma, boyuta ve dizi içeriğine göre SSR bilgisi sağlar.
TRDB	genome.ucsc.edu adresinden veri aktarır	SSR koleksiyonu ile birlikte SSR’ lara ait primerleri içerir, kullanıcının dizi kaynaklarını görüntülemeye, kullanıcının kendine ait verisini (100 MB) saklamaya ve düzenlemeye imkan sağlar.

Çizelge 2.3 Populer SSR tespit araçları

Analiz programının adı	Web Uyg.	Masa Üstü	Platform	SSR tipi [*]	Veri yapısı	Diğer özellikler
Tandem Repeats Finder (TRF)	Var	Var	Bağımsız	Pr, Ip, C	Fasta	-
REPuter	Var	Var	-	-	Fasta	İstatiksel analiz, grafik
Simple-Sequence Repeat Identification Tool (SSRIT)	Var	Var	Bağımsız	Pr	Fasta	Perl script
Tandem Repeats Occurrence Locator (TROLL)	Var	Var	-	Pr, Ip, C	Fasta	Primer dizaynı
Microsatellite Analysis Server (MICAS)	Var	Yok	-	Pr	-	-
MISA	Yok	Var	Bağımsız	-	Fasta	Perl script, İstatiksel analiz, primer dizaynı
mreps	Var	Var	Bağımsız	Pr, Ip, C	Çoklu	Primer dizaynı
Search for Tandem Repeats in Genomes (STRING)	Var	Var	Bağımsız	Pr, Ip, C	Fasta	-
Poly	Yok	Var	Bağımsız	-	-	Pyhton script, İstatiksel analiz
Search for Tandem Approximate Repeats (STAR)	Var	Var	Bağımsız	-	-	-
MicrosatDesign	Yok	Var	-	Pr, Ip, C	-	Perl script, PhredPhrap ve Primer3 ile kombinasyon
Exact Tandem Repeats Analyzer (E-TRA)	Var	Yok	-	Pr, Ip, C	Çoklu	İstatiksel analiz
msatminer	Var	Var	-	Pr, Ip, C	Çoklu	Perl script, İstatiksel analiz
msatcommander	Yok	Var	Bağımsız	Pr, Ip, C	-	Pyhton script, .csv formatında çıktı, Primer dizaynı
SciRoko	Yok	Var	Bağımsız	Pr, Ip, C	-	İstatiksel analiz
Imperfect Microsatellite Extraction (IMEx)	Yok	Var	-	Pr, Ip	-	Primer Dizaynı, İstatiksel analiz

* **Pr** (Düzenli tekrar =Perfect repeat), **C** (Birleşmiş=Compound), **Ip** (Düzensiz tekrar SSR= Imperfect), **Res** (Kompleks yapıda tekrar içeren =Region of cryptic simplicity)

2.4 Primer Dizaynı İçin Kullanılan Araçlar

Primer, DNA sentezi için bir başlangıç noktası sağlayan nükleik asit dizisidir. DNA replikasyonu için gerekli olan DNA polimeraz, ortama yeni bir nükleotid eklenmesi ile işlem yapabilir. Polimeraz, replikasyonu primerin 3'-ucunda başlatır [5]. Başarılı bir DNA

dizileme işlemi için uygun primer dizaynı en önemli adımdır. Primer dizaynı için çeşitli biyoenformatik araçlar Çizelge 2.4, 2.5’ te sunulmuştur (Abd-Elsalam 2003).

Çizelge 2.4 Bazı On-line primer dizayn araçları

Araç adı	Özellikler	Web adres
CODEHOP	Dejenere primer dizaynı: Sıralanmamış dizileri kabul eder	http://blocks.fhcrc.org/codehop.html
Gene Fisher	Standart veya Dejenere primer dizaynı: Sıralanmamış dizileri kabul eder	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/
DoPrimer	Kolay şekilde primer dizaynı ve DNA dizileme yapar	http://doprimer.interactiva.de/
Primer3	Kapsamlı primer dizaynı	http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi
Primer Selection	Nükleotid dizisinden primer dizaynı	http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
Web Primer	Dizileme veya PCR amaçlı primer dizaynı	http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer
PCR Designer	Dizi mutasyon analizi	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer.html
Primo Pro 3.4	PCR yanlış bağlanmalarını azaltma	http://www.changbioscience.com/primo/primo.html
Primo Degenerate 3.4	Tek bir peptid dizisi veya nükleotid/protein dizi sıralamaya dayalı primer dizaynı	http://www.changbioscience.com/primo/primod.html
PCR Primer Design	Dizileme veya PCR amaçlı primer dizaynı	http://pga.mgh.harvard.edu/servlet/org.mgh.proteome.Primer
The Primer Generator	Orijinal nükleotid dizisi ve istenen amino asit dizisi analizi ve primer dizaynı	http://www.med.jhu.edu/medcenter/primer/primer.cgi
PRIMO	İleri ve geri primer tahmini	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/primo.html3 http://atlas.swmed.edu/primo/primo_form.html
PrimerQuest	Primer dizayn etme aracı	http://www.idtdna.com/biotools/primer_quest/primer_quest.asp
MethPrimer	Metilasyon PCR için primer dizaynı	http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/index1.html
Rawprimer	Primer seçme aracı	http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
MEDUSA	Otomatik primer seçme ve görsel değerlendirme	http://www.cgr.ki.se/cgr/MEDUSA/
The Primer Primer Project	Tamamen otomatik primer dizayn yazılımı	http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/Primer_Primer_Project/Primer.html
GAP	Genom boyunca otomatik primer bulma sunucusu	http://promoter.ics.uci.edu/Primers/

Çizelge 2.5 Bazı Masaüstü primer dizayn araçları

Yazılım Adı	Özellikler	Web adresi
PrimerSelect	Template DNA dizi analizi ve DNA dizileme için primer seçimi	www.dnastar.com
Primer Premier 5	Windows ve Power Macintosh için primer dizaynı	http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/primerdesign.html
Primer Premier:	Windows ve Power Macintosh için kapsamlı primer dizaynı	http://www.premierbiosoft.com/
NetPrimer	Primerlerin kapsamlı analizi	http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer.html
Array Designer 2	Mikroarray için hızlı ve etkili primer dizaynı	http://www.premierbiosoft.com/dnamicarray/dnamicarray.html
GenomePRIDE 1.0	DNA-array için primer dizaynı	http://pride.molgen.mpg.de/genomepride.html
Fast PCR	Microsoft Windows' a özgü birçok PCR ve dizileme uygulaması	http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/manual.htm
OLIGO 6	Mac ve Windows için primer analiz yazılımı	http://www.oligo.net/
Primer Designer 4	DNA veya protein molekülünün hedef bölgesi için optimal primer bulma	http://www.scied.com/ses_pd5.htm
GPRIME	Primer dizaynı için yazılım	http://life.anu.edu.au/molecular/software/gprime.htm
Sarani Gold	Mikroarray çalışmaları için otomatik olarak geniş boyutlarda dizayn yazılımı	http://mail.strandgenomics.com/products/sarani/
PCR Help	Primer dizaynı ve analizi	http://www.techne.com/CatMol/pcrhelp.htm
Genorama chip Design Software	Genotipleme için gerekli olan tüm programları içeren yazılım	http://www.asperbio.com/Chip_desin_soft.htm
Primer Designer	PCR reaksiyonları için ideal primerleri tanımlamaya izin veren, oldukça güçlü, çok kolay kullanımlı	http://genamics.com/expression/primer.htm
Primer Premier	PCR için otomatik dizayn aracı, dizileme veya hibridizasyon probu, dejenere primer, Nested primer dizaynı, restriction enzim analizi	http://www.biotechniques.com/freesamples/itembtn21.html
PrimerDesign	DOS-program ortamında oligonükleotid prob veya PCR için primer seçimi	http://www.chemie.unimarburg.de/%7Ebec ker/pdhome.html

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Program hazırlama aşamasında kullanılan yazılımlar

3.1.1.1 Visual Basic 2010 Express

Microsoft Visual Studio 2010 Express ailesinin bir parçası olan Visual Basic 2010 Express, her seviyedeki Windows geliştiricisinin, temel ve daha üst seviyedeki ayarları kullanarak özel uygulamalar yaratmak için yararlanabileceği ücretsiz bir araç setidir. Visual Basic, .NET Framework tabanlı Windows uygulamaları yaratmak için hızlı ve kolay bir yol sunar. NET Framework hedefleyen tüm programlar gibi, Visual Basic' te yazılan programlar da güvenlik ve dil konusunda birlikte çalışabilme özelliğinden faydalanır [6].

Tez konusu olan “AUBiotek-EST-Analyzer” programının yazılımı için kullanılmıştır.

3.1.1.2 DesignerPCR

Jim Hudson vd (Research Genetics, Inc.) tarafından geliştirilen “DesignerPCR”, araştırmalarda kullanılan primerlerin dizaynı için en çok kullanılan parametreler dikkate alınarak hazırlanmış ve bu parametrelerin oldukça esnek bir şekilde belirlenebilmesini sağlayan bir primer sentezleme programıdır. İleri (forward) ve geri (reverse) primerleri, GC içeriklerini, dimer, saç tokası ve erime sıcaklık yapıları gibi parametreleri dikkate alarak dizayn eder ve çıktı olarak birçok istatistiksel verisi sağlar.

Tespit edilen SSR lokuslarının test edilmesi için kullanılan primerlerin dizaynı için kullanılmıştır.

3.1.2 AUBiotek-EST-Analyzer programı

Bu çalışma kapsamında Visual Basic 2010 Express kullanılarak, bir EST koleksiyonunda bulunan tüm düzenli (perfect) SSR bölgelerinin kolay, hızlı ve etkin şekilde tespiti için geliştirilmiş olan programdır.

3.1.3 EST koleksiyonu

İki farklı araştırma grubu tarafından ortaklaşa Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinin stres uygulanmış köklerinden geliştirilen ve NCBI, dbETS veri tabanında **29760 tax-id** ile yayınlanmış 16.452 adet gen dizisi (Çizelge 3.1) EST koleksiyonu olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Kullanılan EST koleksiyonuna ait araştırma grubu ve yayın bilgisi

Araştırma grubu	Yayın
SUBMITTER-1 Name: Ergul A Lab: Central Lab Institution: Biotechnology Institute, Ankara University Address: Merkez Laboratuvarı, Rektörlük Binası Arkası, 06100 Ankara, Turkey Tel: +90-312-2225816 Fax: +90-312-2225872 E-mail: ergul@agri.ankara.edu.tr	PubMed ID: 21592389 Title: Identification of tissue-specific, abiotic stress-responsive gene expression patterns in wine grape (<i>Vitis vinifera</i> L.) based on curation and mining of large-scale EST data sets Authors: Tillett, R.L., Ergul, A., Albion, R.L., Schlauch, K.A., Cramer, G.R., Cushman, J.C. Citation: BMC Plant Biol. 11 (1): 86 2011
SUBMITTER-2 Name: Cushman JC Lab: Department of Biochemistry Institution: University of Nevada Address: MS200, Reno, NV 89557-0014, USA Tel: 775-784-1918 Fax: 775-784-1650 E-mail: jcushman@unr.edu	

Genel veri (*.xml) yapısı:

<TSeqSet>

<TSeq>

<TSeq_seqtype value="nucleotide" />

<TSeq_gi>XXXXXXXXXX</TSeq_gi>

<TSeq_accver>FCXXXXXX.X</TSeq_accver>

<TSeq_sid>gnl|dbEST|XXXXXXXXXX</TSeq_sid>

<TSeq_taxid>29760</TSeq_taxid>

<TSeq_orgname>Vitis vinifera</TSeq_orgname>

<TSeq_defline>, mRNA sequence</TSeq_defline>

<TSeq_sequence>ATCG.....</TSeq_sequence>

3.1.4 Bitki materyali

Araştırmada tespit edilen kök SSR primerlerinden 6 farklı motife ait 14 adet lokus primeri Şam Büzgülü üzüm çeşidi kullanılarak test edilmiştir.

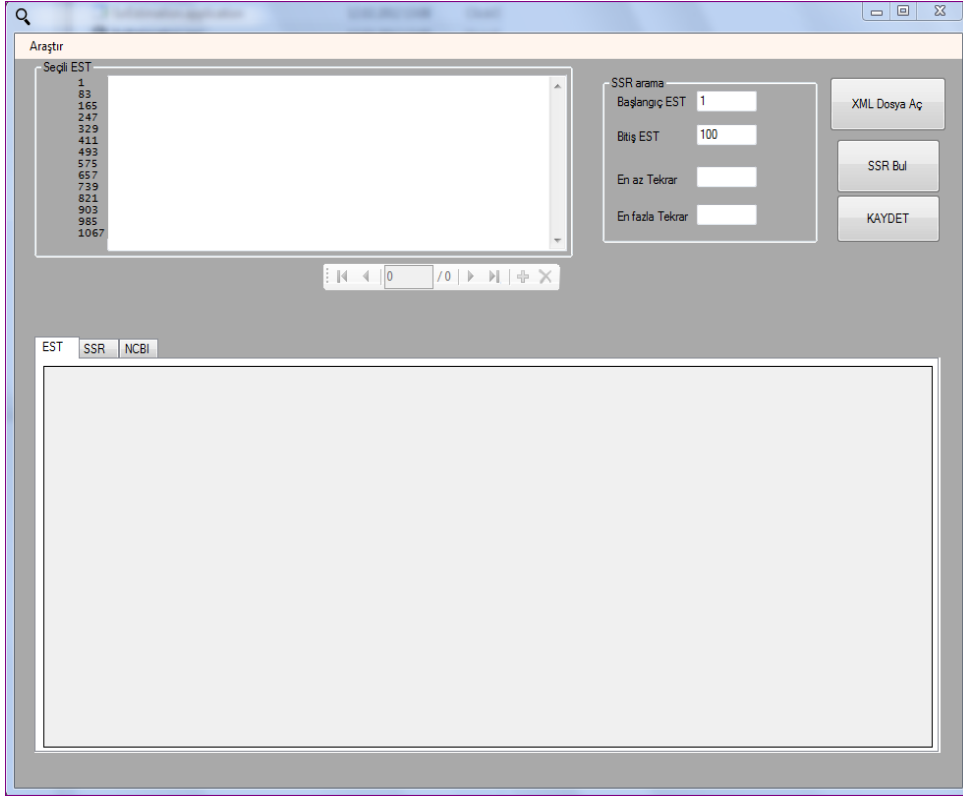
3.2 Yöntem

3.2.1 SSR tespiti için kullanılan EST koleksiyonu

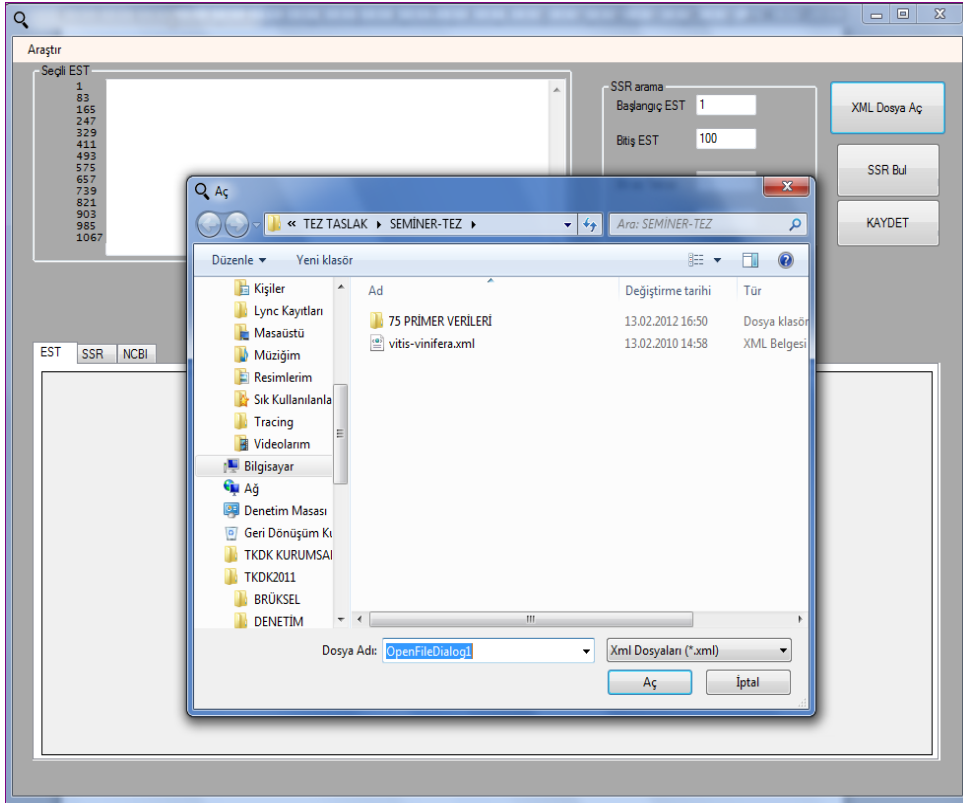
SSR tespiti için kullanılacak olan EST koleksiyonu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> internet adresinden *.xml formatında (arama parametresi “retmode = xml”) sağlanmıştır.

3.2.2 EST koleksiyonundan SSR tespiti ve primer dizaynı

NCBI veritabanında yer alan TSeq_taxid = 29760 numaralı EST koleksiyonu *.xml formatında AUBiotek-EST-Analyzer programına (Şekil 3.1) input edilerek (Şekil 3.2) bu koleksiyonda bulunan düzenli tekrar (tek tip motif içeren) SSR bölgeleri taranmıştır (Şekil 3.3). Program ile EST koleksiyonunda bulunan her bir EST dizisi *.xml formatında okunup, ilgili dizide bulunan tekrarlar en az 12 baz uzunluğunda olacak şekilde listelenmiş, EST dizisinde bulunan her bir tekrar bölgesinin hangi motifi içerdiği, kaç tekrar yaptığı, tekrarların ilgili sekansta kaçınıcı bazdan başladığı ve bittiği gösterilmiştir (Şekil 3.4). 16452 EST dizisinin tamamının 2, 3 ve 4 bazlık düzenli (perfect) tekrar içeren SSR lokuslarının tespiti 12 saniyede (Standart dizüstü bilgisayar özellikleri: Intel® Core™2 Duo 2.53 GHz CPU, 2.96 GB RAM, 7200 RPM 300 GB HDD) yapılarak tüm bu tekrar bölgelerinin listesi çıkarılmış, analiz sonunda bulunan veriler excel formatında kaydedilmiştir (Şekil 3.5). Excel dosyasından çalışılmak istenilen tekrar motifleri süzölmüş ve (Şekil 3.6) ilgili EST dizileri primer dizayn etmek üzere seçilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.1 AUBiotek-EST-Analyzer programı ana ekranı



Şekil 3.2 EST koleksiyonunun programa yüklenmesi

Arastir

Seçil EST

```

1 GAGAGATTGAACATCAAAAAGACAGGTCTAAGAAGACGCTCAAGGATGATATGAGCCAAAGACAA
83 TCAGACAGGACAGCACCATCAAAACAGTACGAAAAATGAGACGGATCATTGGAGACAGTAC
165 CCTTACTGAGGACATGGACATCCAATTGGTCTGAGAATATTTGCTACTCCTCTGATGGGAG
247 CCTGAATAGCAACAAGAGGCAAAAATACAGCTACCTCCCAATGGCAAGCATAACTTGGAAA
329 CATTTTTCGGATCCGCTCGCTCCGCAAGGCAAAAAGATCTAGAAGTGTACCCAGCAAGGG
411 ACAGCTTTCGCTCCCTGGGAAGGACTGATGCTTTTGTGCAAGAGATGTGCGATCTTGCCTC
493 TACACCTGGCAAGAGACGGAGAATCTCTGTTTTGCTTCCGG
575
657
739
821
903
985
1067

```

Toplam 16452 adet kayıt bulundu.

SSR arama

Başlangıç EST 1

Bitiş EST 100

En az Tekrar

En fazla Tekrar

XML Dosya Aç

SSR Bul

KAYDET

EST	SSR	NCBI			
TSeq_gi	TSeq_accver	TSeq_sid	TSeq_taxid	TSeq_orgname	TSeq_define
16177288	FC072703.1	gnl:dbEST 1614539	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER75C12-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER75C12 5' sim
16177287	FC072702.1	gnl:dbEST 1614538	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5A09-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5A09 5' simlar
16177286	FC072701.1	gnl:dbEST 1614537	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5C12-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5C12 5' simlar
16177285	FC072700.1	gnl:dbEST 1614536	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5C10-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5C10 5' simlar
16177284	FC072699.1	gnl:dbEST 1614535	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER11E05-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER11E05 5' sim
16177283	FC072698.1	gnl:dbEST 1614534	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5C09-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5C09 5' simlar
16177282	FC072697.1	gnl:dbEST 1614533	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5F10-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5F10 5' simlar
16177281	FC072696.1	gnl:dbEST 1614532	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER11D05-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER11D05 5' sim
16177280	FC072695.1	gnl:dbEST 1614531	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5H08-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5H08 5' simla
16177279	FC072694.1	gnl:dbEST 1614530	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5B12-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5B12 5' simlar
16177278	FC072693.1	gnl:dbEST 1614529	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5B10-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5B10 5' simlar
16177277	FC072692.1	gnl:dbEST 1614528	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER5B09-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER5B09 5' simlar
16177276	FC072691.1	gnl:dbEST 1614527	29760	Vitis vinifera	sT7aVVM_AER11C05-2 VVM Vitis vinifera cDNA clone VVM_AER11C05 5' sim

Şekil 3.3 EST koleksiyonunda SSR tespitine başlanması

Arastir

Seçil EST

```

1 GAGAGATTGAACATCAAAAAGACAGGTCTAAGAAGACGCTCAAGGATGATATGAGCCAAAGACAA
83 TCAGACAGGACAGCACCATCAAAACAGTACGAAAAATGAGACGGATCATTGGAGACAGTAC
165 CCTTACTGAGGACATGGACATCCAATTGGTCTGAGAATATTTGCTACTCCTCTGATGGGAG
247 CCTGAATAGCAACAAGAGGCAAAAATACAGCTACCTCCCAATGGCAAGCATAACTTGGAAA
329 CATTTTTCGGATCCGCTCGCTCCGCAAGGCAAAAAGATCTAGAAGTGTACCCAGCAAGGG
411 ACAGCTTTCGCTCCCTGGGAAGGACTGATGCTTTTGTGCAAGAGATGTGCGATCTTGCCTC
493 TACACCTGGCAAGAGACGGAGAATCTCTGTTTTGCTTCCGG
575
657
739
821
903
985
1067

```

Toplam 16452 adet kayıt bulundu.

SSR arama

Başlangıç EST 1

Bitiş EST 16451

En az Tekrar 3

En fazla Tekrar 5

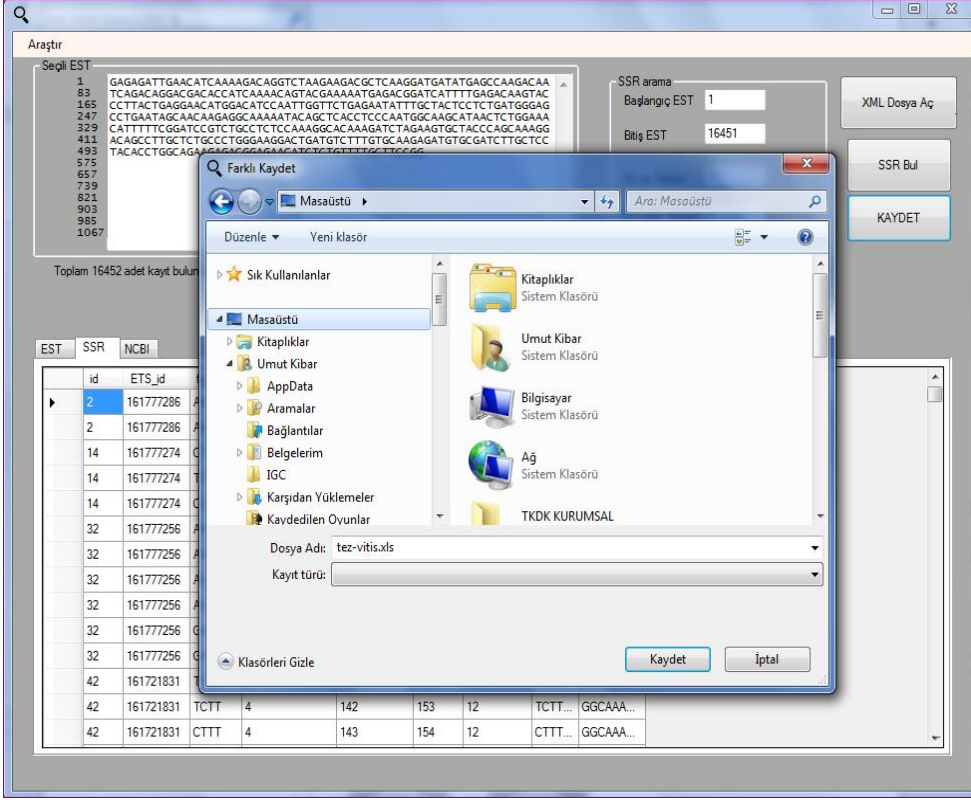
XML Dosya Aç

SSR Bul

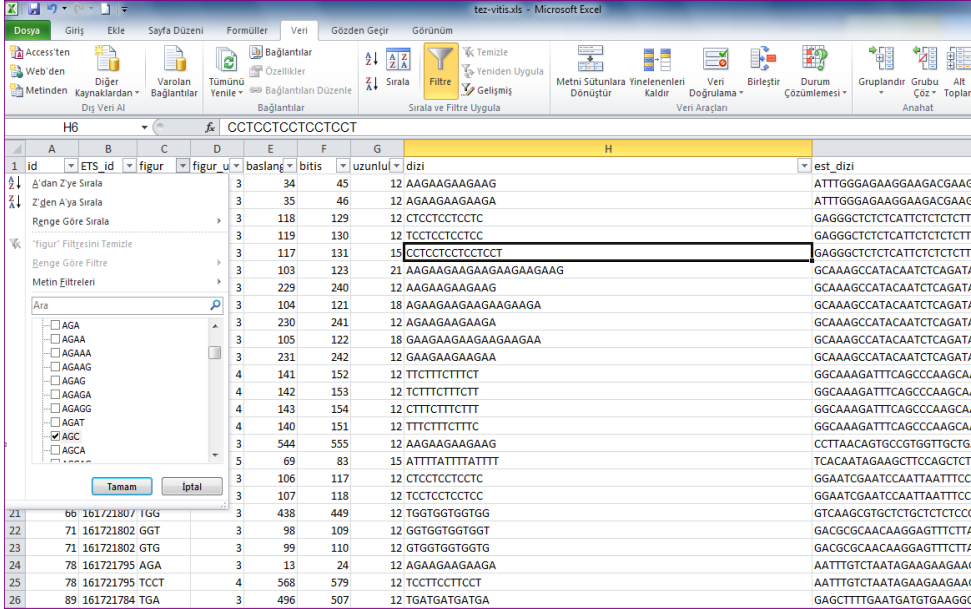
KAYDET

EST	SSR	NCBI						
id	ETS_id	figur	figur_uzunluk	başlangic	bitis	uzunluk	dizi	est_dizi
2	16177286	AAG	3	34	45	12	AAGA...	ATTTGG...
2	16177286	AGA	3	35	46	12	AGAA...	ATTTGG...
14	16177274	CTC	3	118	129	12	CTCC...	GAGGGC...
14	16177274	TCC	3	119	130	12	TCCT...	GAGGGC...
14	16177274	CCT	3	117	131	15	CCTC...	GAGGGC...
32	16177256	AAG	3	103	123	21	AAGA...	GCAAAG...
32	16177256	AAG	3	229	240	12	AAGA...	GCAAAG...
32	16177256	AGA	3	104	121	18	AGAA...	GCAAAG...
32	16177256	AGA	3	230	241	12	AGAA...	GCAAAG...
32	16177256	GAA	3	105	122	18	GAAG...	GCAAAG...
32	16177256	GAA	3	231	242	12	GAAG...	GCAAAG...
42	161721831	TTCT	4	141	152	12	TTCT...	GGCAAA...
42	161721831	TCTT	4	142	153	12	TCTT...	GGCAAA...
42	161721831	CTTT	4	143	154	12	CTTT...	GGCAAA...

Şekil 3.4 SSR içerdiği tespit edilen EST dizileri



Şekil 3.5 SSR içerdiği tespit edilen EST dizilerinin excele kaydedilmesi



Şekil 3.6 İstenilen tekrar motifinin seçilmesi

1	id	ETS_id	figur	figur_u	başlang	bitis	uzunlul	est_dizi
74	254	161721619	AGC	3	245	256	12	AGCAGCAGCAGC
95	287	161721586	AGC	3	495	506	12	AGCAGCAGCAGC
340	854	161721019	AGC	3	277	291	15	AGCAGCAGCAGCAGC
344	867	161721006	AGC	3	44	58	15	AGCAGCAGCAGCAGC
353	911	161720962	AGC	3	65	76	12	AGCAGCAGCAGC
420	1105	161720768	AGC	3	249	281	33	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
612	1610	161720263	AGC	3	377	391	15	AGCAGCAGCAGCAGC
676	1793	161720080	AGC	3	80	91	12	AGCAGCAGCAGC
713	1864	161720009	AGC	3	188	199	12	AGCAGCAGCAGC
761	1939	161719934	AGC	3	112	126	15	AGCAGCAGCAGCAGC
787	1985	161719888	AGC	3	70	81	12	AGCAGCAGCAGC
798	2025	161719848	AGC	3	133	153	21	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
818	2059	161719814	AGC	3	355	366	12	AGCAGCAGCAGC
827	2060	161719813	AGC	3	136	147	12	AGCAGCAGCAGC
948	2340	161719533	AGC	3	110	124	15	AGCAGCAGCAGCAGC
990	2470	161719403	AGC	3	112	123	12	AGCAGCAGCAGC
1002	2508	161719365	AGC	3	73	84	12	AGCAGCAGCAGC
1019	2549	161719324	AGC	3	575	586	12	AGCAGCAGCAGC
1067	2722	161719151	AGC	3	131	151	21	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
1349	3516	161718357	AGC	3	102	113	12	AGCAGCAGCAGC
1435	3746	161718127	AGC	3	123	143	21	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
1452	3837	161718036	AGC	3	70	81	12	AGCAGCAGCAGC
1506	4019	161717854	AGC	3	446	457	12	AGCAGCAGCAGC
1540	4116	161717757	AGC	3	29	40	12	AGCAGCAGCAGC
1613	4271	161717602	AGC	3	115	126	12	AGCAGCAGCAGC
1704	4580	161717293	AGC	3	166	177	12	AGCAGCAGCAGC
1717	4608	161717265	AGC	3	132	152	21	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
1764	4747	161717126	AGC	3	599	610	12	AGCAGCAGCAGC
1819	4937	161716936	AGC	3	90	122	33	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
1868	5123	161716750	AGC	3	638	649	12	AGCAGCAGCAGC
1935	5382	161716491	AGC	3	407	418	12	AGCAGCAGCAGC
2095	5878	161715995	AGC	3	73	87	15	AGCAGCAGCAGCAGC
2238	6179	161715694	AGC	3	384	398	15	AGCAGCAGCAGCAGC
2360	6521	161715352	AGC	3	64	78	15	AGCAGCAGCAGCAGC

Şekil 3.7 İstenilen tekrar motifini içeren EST dizilerinin seçilmesi

311 adet EST dizisinden aşağıda belirtilen primer seçme kriterleri dikkate alınarak DesignerPCR programı (Şekil 3.8) 75 lokusa primer oluşturulmuş bunlar 14 adet lokus primeri PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır.

Primer Seçme Parametreleri

Minimum Primer Uzunluğu: 20

Maksimum Primer Uzunluğu: 22

Minimum Primer Tm: 50 C

Maksimum Primer Tm: 60 C

Primer Tm Varyansı $\pm 1 C$

Minimum GC içeriği: %35

Maksimum GC içeriği: %65

Primer Konsantrasyonu: (uMol) 50

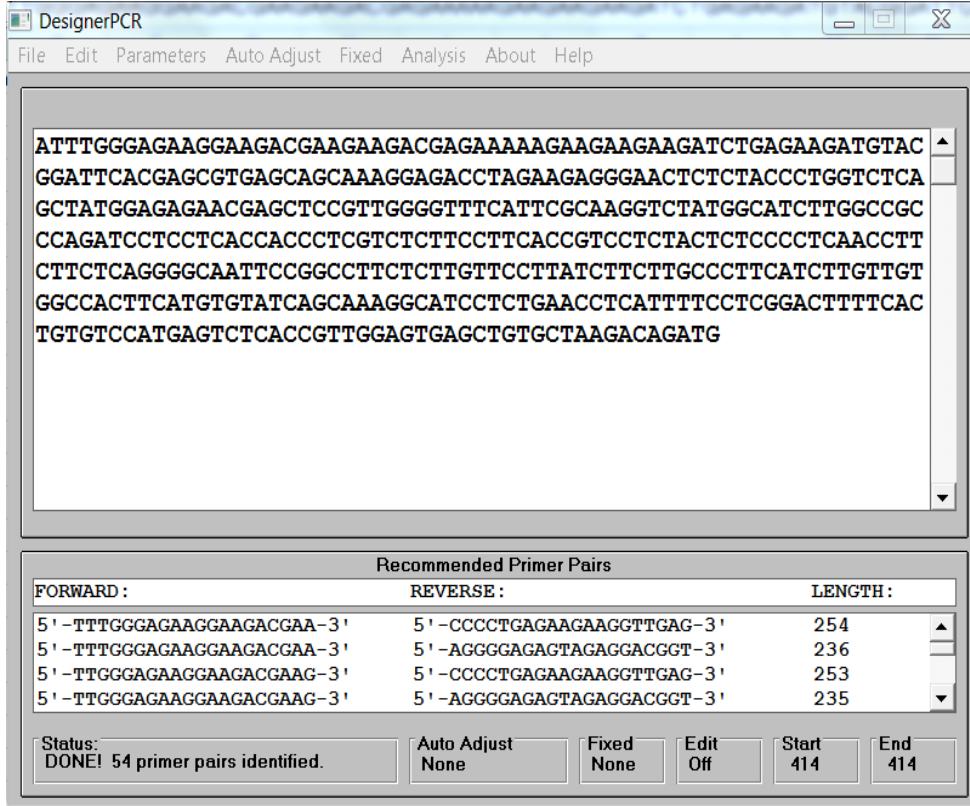
Tuz Konsantrasyonu: (mMol) 50

Minimum Ürün Uzunluğu: 100 baz

Maksimum Ürün Uzunluğu: 300 baz

Arama Tipi : Tekrar Bölgesi Etrafında

Saç tokası ≥ 4 , Dimerler için $Tm \geq 22$, 3'/kalıp homoloji ≥ 5 , 3' dimerler ≥ 2 olan diziler elenmiştir.



Şekil 3.8 Belirlenen EST dizileri için primer dizayn edilmesi

3.2.2.1 Algoritma

Programın tekrar bölgelerini bulmak için gerçekleştirdiği adımlar şu şekilde özetlenebilir:

Adım 1: Girdi

Girdi 1: *.xml formatta SSR tespiti yapmak istenilen EST seti.

Girdi 2: EST setinde SSR tespiti için hangi EST den başlanacağı ve biteceği.

Girdi 3: En az ve en çok kaç baz tekrar aranma bilgisi.

Adım 2: Koşul

Tekrar arama koşulu 1: Girdi 3 bilgilerine göre dizi içerisinde en az 12 baz uzunluğunda tekrar var mı?

Tekrar arama koşulu 2: Tekrar bölgesi tek bir baz çeşidi mi içeriyor?

Adım 3: Döngü

Döngü: Girdi 1 için seçilen Girdi 2 de yer alan her dizi için Girdi 3 taraması.

Adım 4: Çıktı

Çıktı: Tekrar arama koşulu 1 için listele, değilse Döngü, Tekrar arama koşulu 2 için listeleme ve döngü.

3.2.3 Primerlerin test edilmesi

Bu amaçla Şam Büzgülü üzüm çeşidinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Farklı tekrar motiflerinden 14 lokusa ait primerler [TTG (Vvr 1, Vvr 2), AAC (Vvr 3, Vvr 5, Vvr 6, Vvr 8 R), CAT (Vvr 9, Vvr 10), ATG (Vvr 20, Vvr 21), GAT (Vvr 37, Vvr 38), GA (Vvr 58, Vvr 59)] kullanılarak PCR ve agaroz görüntülerin alınması aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

3.2.3.1 DNA izolasyonu ve ölçümleri

DNA izolasyonları Şam Büzgülü üzüm çeşidine ait köklerden aşağıda metot açıklaması verilen Lefort vd (1998) yöntemine göre yapılırken, DNA kalite ve miktar ölçümleri %1'lik jel ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

- Kök sıvı azotla ezildi,
- 100 mg alınarak 2 µl ependorf tüplere aktarıldı,
- Tüplerin üzerine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu eklendi,
- 65 °C'de arasıra çalkalanarak 15 dk bekletildi,
- 0,5 ml kloroform/isoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek, 30 dk buz üzerinde bekletildi,
- Oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi,
- Üst sıvı, temiz bir ependorf tüpe aktarıldı,
- Üzerine 0,8 ml isopropanol eklendi,
- Örnekler, 15-20 dk buz üzerinde tutularak 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi,
- Üst sıvı tekrar yeni bir ependorf tüpe aktarıldı,
- Pellet (alt katı) üzerine 1 ml % 70'lik etanol eklenerek, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi,
- DNA, 50-100 µl H₂O'da çözüldü,

- Her 100 µl için 1 µl RNase-A eklenerek, 37 °C’de 15 dk bekletilerek, RNA uzaklaştırıldı.

İzolasyon çözeltisi (50 ml için);

2 ml TRIS (50 mM, pH 8,0)

4 ml EDTA (50 mM, pH 8,0)

10 ml LiCl (4M)

1 g CTAB (% 1)

2 g PVP (% 2)

0,5 ml TWEEN 20 (% 0,5)

%0,2 β-Mercapto Ethanol

Kloroform/isoamil alkol; (24:1) (hacim: hacim)

RNase-A (Applichem); 100mg/ml

3.2.3.2 PCR reaksiyonlarının hazırlanması ve PCR

PCR reaksiyonu; 15–200 ng DNA, 5 pmol ileri (forward) primer, 5 pmol geri (revers) primer, 0.5 mM toplam dNTP, 0.5 ünite Go Taq DNA Polymerase (Promega) (1,5 mM MgCl₂ içermekte), 3 µl buffer (5x buffer) olmak üzere 15µl’de gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı:

1. 94 °C’ de 3 dk., **2.** 94 °C’ de 1 dk., **3.** 50-55 °C’de 1 dk., **4.** 72 °C’ de 2 dk., **5.** 72 °C’ de 10 dk olmak üzere toplam 35 döngü olarak uygulanmıştır. PCR sonrası lokuslara ait PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde elektroforeze tabii tutulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 AUBiotek-EST-Analyzer Programı ile Tespit Edilen SSR Bölgeleri

AUBiotek-EST-Analyzer Programı ile yapılan SSR analizi sonucunda elde edilen AAC, ATG, CAT, GA, GAT, TTG motiflerini içeren 311 adet SSR lokusu Çizelge 4.1’ de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Tespit edilen SSR tekrar bölgeleri

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161721491	AAC	3	430	441	12	AACAACAACAAC
161720014	AAC	3	435	446	12	AACAACAACAAC
161717699	AAC	3	478	489	12	AACAACAACAAC
161717604	AAC	3	170	181	12	AACAACAACAAC
161716272	AAC	3	122	133	12	AACAACAACAAC
161716208	AAC	3	404	415	12	AACAACAACAAC
161715383	AAC	3	482	496	15	AACAACAACAACAAC
161715185	AAC	3	614	625	12	AACAACAACAAC
161714817	AAC	3	619	630	12	AACAACAACAAC
161714779	AAC	3	20	31	12	AACAACAACAAC
161714323	AAC	3	106	117	12	AACAACAACAAC
161713692	AAC	3	321	335	15	AACAACAACAACAAC
161710166	AAC	3	460	471	12	AACAACAACAAC
161707118	AAC	3	413	430	18	AACAACAACAACAACAAC
161721474	ATG	3	223	234	12	ATGATGATGATG
161720815	ATG	3	375	386	12	ATGATGATGATG
161720810	ATG	3	413	424	12	ATGATGATGATG
161720479	ATG	3	476	487	12	ATGATGATGATG
161720479	ATG	3	506	517	12	ATGATGATGATG
161720416	ATG	3	518	529	12	ATGATGATGATG
161720293	ATG	3	610	621	12	ATGATGATGATG
161720037	ATG	3	98	109	12	ATGATGATGATG
161719820	ATG	3	214	228	15	ATGATGATGATGATG
161719689	ATG	3	684	695	12	ATGATGATGATG
161719604	ATG	3	44	55	12	ATGATGATGATG
161719255	ATG	3	167	178	12	ATGATGATGATG
161719198	ATG	3	482	493	12	ATGATGATGATG
161718903	ATG	3	614	625	12	ATGATGATGATG
161718799	ATG	3	500	511	12	ATGATGATGATG
161718588	ATG	3	574	585	12	ATGATGATGATG

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161718541	ATG	3	81	92	12	ATGATGATGATG
161717588	ATG	3	663	674	12	ATGATGATGATG
161717351	ATG	3	541	552	12	ATGATGATGATG
161715983	ATG	3	625	639	15	ATGATGATGATGATG
161715399	ATG	3	231	242	12	ATGATGATGATG
161715395	ATG	3	15	29	15	ATGATGATGATGATG
161715208	ATG	3	375	386	12	ATGATGATGATG
161714991	ATG	3	90	101	12	ATGATGATGATG
161714885	ATG	3	312	323	12	ATGATGATGATG
161714798	ATG	3	491	502	12	ATGATGATGATG
161714477	ATG	3	160	171	12	ATGATGATGATG
161714444	ATG	3	482	493	12	ATGATGATGATG
161713931	ATG	3	538	549	12	ATGATGATGATG
161713534	ATG	3	77	97	21	ATGATGATGATGATGATGATG
161713352	ATG	3	206	220	15	ATGATGATGATGATG
161713119	ATG	3	222	233	12	ATGATGATGATG
161713111	ATG	3	243	257	15	ATGATGATGATGATG
161712851	ATG	3	152	163	12	ATGATGATGATG
161712371	ATG	3	530	541	12	ATGATGATGATG
161711772	ATG	3	115	126	12	ATGATGATGATG
161711219	ATG	3	480	494	15	ATGATGATGATGATG
161710377	ATG	3	290	304	15	ATGATGATGATGATG
161709092	ATG	3	131	142	12	ATGATGATGATG
161708680	ATG	3	138	149	12	ATGATGATGATG
161708506	ATG	3	351	362	12	ATGATGATGATG
161708281	ATG	3	21	35	15	ATGATGATGATGATG
161707809	ATG	3	95	115	21	ATGATGATGATGATGATGATG
161706786	ATG	3	230	241	12	ATGATGATGATG
161706094	ATG	3	236	250	15	ATGATGATGATGATG
161705727	ATG	3	366	377	12	ATGATGATGATG
161705667	ATG	3	327	341	15	ATGATGATGATGATG
161721771	CAT	3	256	267	12	CATCATCATCAT
161721639	CAT	3	191	202	12	CATCATCATCAT
161721491	CAT	3	20	34	15	CATCATCATCATCAT
161721304	CAT	3	74	88	15	CATCATCATCATCAT
161721147	CAT	3	72	92	21	CATCATCATCATCATCATCAT
161720870	CAT	3	78	95	18	CATCATCATCATCATCAT
161720870	CAT	3	207	218	12	CATCATCATCAT
161720547	CAT	3	163	174	12	CATCATCATCAT
161720433	CAT	3	292	312	21	CATCATCATCATCATCATCAT
161720433	CAT	3	319	330	12	CATCATCATCAT
161720014	CAT	3	25	39	15	CATCATCATCATCAT
161719709	CAT	3	40	51	12	CATCATCATCAT
161719631	CAT	3	62	79	18	CATCATCATCATCATCAT

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161719452	CAT	3	155	169	15	CATCATCATCATCAT
161719114	CAT	3	11	22	12	CATCATCATCAT
161718847	CAT	3	75	89	15	CATCATCATCATCAT
161718788	CAT	3	85	111	27	CATCATCATCATCATCATCATCA TCAT
161718245	CAT	3	638	652	15	CATCATCATCATCAT
161717836	CAT	3	550	561	12	CATCATCATCAT
161717699	CAT	3	32	46	15	CATCATCATCATCAT
161717340	CAT	3	78	89	12	CATCATCATCAT
161717172	CAT	3	170	181	12	CATCATCATCAT
161716935	CAT	3	632	643	12	CATCATCATCAT
161716454	CAT	3	632	643	12	CATCATCATCAT
161716383	CAT	3	58	69	12	CATCATCATCAT
161715700	CAT	3	44	61	18	CATCATCATCATCATCAT
161715383	CAT	3	36	50	15	CATCATCATCATCAT
161715302	CAT	3	68	82	15	CATCATCATCATCAT
161713223	CAT	3	298	318	21	CATCATCATCATCATCATCAT
161712752	CAT	3	232	255	24	CATCATCATCATCATCATCATCA T
161712624	CAT	3	70	84	15	CATCATCATCATCAT
161711924	CAT	3	88	99	12	CATCATCATCAT
161711860	CAT	3	15	29	15	CATCATCATCATCAT
161711386	CAT	3	73	87	15	CATCATCATCATCAT
161711230	CAT	3	81	92	12	CATCATCATCAT
161710520	CAT	3	259	270	12	CATCATCATCAT
161710447	CAT	3	80	100	21	CATCATCATCATCATCATCAT
161710245	CAT	3	88	99	12	CATCATCATCAT
161710166	CAT	3	14	28	15	CATCATCATCATCAT
161708266	CAT	3	188	199	12	CATCATCATCAT
161707814	CAT	3	453	467	15	CATCATCATCATCAT
161707500	CAT	3	211	222	12	CATCATCATCAT
161707096	CAT	3	74	88	15	CATCATCATCATCAT
161707087	CAT	3	20	31	12	CATCATCATCAT
161707081	CAT	3	58	69	12	CATCATCATCAT
161706850	CAT	3	16	30	15	CATCATCATCATCAT
161705632	CAT	3	57	68	12	CATCATCATCAT
161705473	CAT	3	36	53	18	CATCATCATCATCATCAT
161721665	GA	2	1	30	30	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGA
161721580	GA	2	498	511	14	GAGAGAGAGAGAGA
161721574	GA	2	5	24	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161721286	GA	2	48	59	12	GAGAGAGAGAGA
161721220	GA	2	64	85	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161721084	GA	2	10	25	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161721079	GA	2	48	59	12	GAGAGAGAGAGA
161721060	GA	2	17	32	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161720951	GA	2	98	115	18	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
161720880	GA	2	34	47	14	GAGAGAGAGAGAGA
161720730	GA	2	39	62	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161720325	GA	2	101	112	12	GAGAGAGAGAGA
161720178	GA	2	8	19	12	GAGAGAGAGAGA
161720006	GA	2	1	34	34	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGAGA
161719953	GA	2	30	49	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161719936	GA	2	3	18	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161719894	GA	2	332	343	12	GAGAGAGAGAGA
161719844	GA	2	28	39	12	GAGAGAGAGAGA
161719742	GA	2	140	153	14	GAGAGAGAGAGAGA
161719577	GA	2	19	32	14	GAGAGAGAGAGAGA
161719493	GA	2	129	150	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161719135	GA	2	2	31	30	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGA
161719093	GA	2	150	161	12	GAGAGAGAGAGA
161719048	GA	2	26	47	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161719009	GA	2	49	66	18	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
161718451	GA	2	17	36	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161718277	GA	2	1	24	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161717951	GA	2	9	24	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161717900	GA	2	2	17	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161717794	GA	2	89	100	12	GAGAGAGAGAGA
161717669	GA	2	8	19	12	GAGAGAGAGAGA
161717558	GA	2	26	47	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161717518	GA	2	28	45	18	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
161717458	GA	2	2	21	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161717449	GA	2	5	16	12	GAGAGAGAGAGA
161717142	GA	2	1	22	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161717060	GA	2	57	72	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161717045	GA	2	17	46	30	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGA
161716971	GA	2	15	30	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161716875	GA	2	24	35	12	GAGAGAGAGAGA

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161716766	GA	2	30	43	14	GAGAGAGAGAGAGA
161716643	GA	2	7	18	12	GAGAGAGAGAGA
161716441	GA	2	119	132	14	GAGAGAGAGAGAGA
161716364	GA	2	6	21	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161716286	GA	2	9	28	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161716218	GA	2	31	62	32	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGA
161716055	GA	2	24	55	32	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGA
161716036	GA	2	32	45	14	GAGAGAGAGAGAGA
161715945	GA	2	28	45	18	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
161715897	GA	2	1	30	30	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGA
161715865	GA	2	37	52	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161715859	GA	2	32	47	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161715825	GA	2	37	48	12	GAGAGAGAGAGA
161715593	GA	2	38	49	12	GAGAGAGAGAGA
161715562	GA	2	30	49	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161715534	GA	2	9	24	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161715130	GA	2	50	61	12	GAGAGAGAGAGA
161715123	GA	2	31	46	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161715114	GA	2	33	46	14	GAGAGAGAGAGAGA
161714934	GA	2	7	22	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161714766	GA	2	30	45	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161714559	GA	2	652	669	18	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
161714465	GA	2	1	32	32	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGA
161714449	GA	2	3	16	14	GAGAGAGAGAGAGA
161714244	GA	2	17	28	12	GAGAGAGAGAGA
161714037	GA	2	41	54	14	GAGAGAGAGAGAGA
161714006	GA	2	17	28	12	GAGAGAGAGAGA
161713912	GA	2	147	160	14	GAGAGAGAGAGAGA
161713566	GA	2	189	202	14	GAGAGAGAGAGAGA
161713471	GA	2	1	14	14	GAGAGAGAGAGAGA
161713105	GA	2	23	38	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161712898	GA	2	35	50	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161712795	GA	2	12	35	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161712664	GA	2	1	12	12	GAGAGAGAGAGA
161712616	GA	2	40	51	12	GAGAGAGAGAGA
161712511	GA	2	148	161	14	GAGAGAGAGAGAGA
161712488	GA	2	24	37	14	GAGAGAGAGAGAGA
161712335	GA	2	151	162	12	GAGAGAGAGAGA
161712327	GA	2	10	23	14	GAGAGAGAGAGAGA

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161711946	GA	2	1	20	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161711904	GA	2	1	12	12	GAGAGAGAGAGA
161711903	GA	2	182	195	14	GAGAGAGAGAGAGA
161711873	GA	2	47	64	18	GAGAGAGAGAGAGAGAGA
161711783	GA	2	23	34	12	GAGAGAGAGAGA
161711737	GA	2	50	61	12	GAGAGAGAGAGA
161711398	GA	2	5	20	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161711315	GA	2	40	51	12	GAGAGAGAGAGA
161711152	GA	2	135	154	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161710692	GA	2	1	20	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161710604	GA	2	37	48	12	GAGAGAGAGAGA
161710479	GA	2	30	59	30	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGA
161710398	GA	2	40	53	14	GAGAGAGAGAGAGA
161710289	GA	2	9	24	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161710278	GA	2	46	59	14	GAGAGAGAGAGAGA
161710192	GA	2	20	31	12	GAGAGAGAGAGA
161710083	GA	2	26	41	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161710068	GA	2	143	164	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161709875	GA	2	15	42	28	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGA
161709752	GA	2	16	35	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161709442	GA	2	19	30	12	GAGAGAGAGAGA
161709289	GA	2	12	23	12	GAGAGAGAGAGA
161709208	GA	2	50	73	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161709152	GA	2	4	15	12	GAGAGAGAGAGA
161708951	GA	2	38	61	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161708883	GA	2	25	46	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161708842	GA	2	32	43	12	GAGAGAGAGAGA
161708805	GA	2	38	61	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161708528	GA	2	62	73	12	GAGAGAGAGAGA
161708440	GA	2	8	19	12	GAGAGAGAGAGA
161708418	GA	2	31	46	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161708342	GA	2	9	20	12	GAGAGAGAGAGA
161708330	GA	2	6	29	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161708221	GA	2	1	12	12	GAGAGAGAGAGA
161708162	GA	2	85	100	16	GAGAGAGAGAGAGAGA
161707969	GA	2	173	192	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161707561	GA	2	55	68	14	GAGAGAGAGAGAGA
161707472	GA	2	1	20	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161707447	GA	2	1	42	42	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161707028	GA	2	68	87	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706993	GA	2	35	46	12	GAGAGAGAGAGA
161706891	GA	2	55	78	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161706829	GA	2	34	47	14	GAGAGAGAGAGAGA
161706814	GA	2	21	34	14	GAGAGAGAGAGAGA
161706794	GA	2	33	54	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706724	GA	2	84	97	14	GAGAGAGAGAGAGA
161706595	GA	2	4	25	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706567	GA	2	5	26	22	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706520	GA	2	341	360	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706445	GA	2	3	28	26	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGA
161706437	GA	2	10	29	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706145	GA	2	5	16	12	GAGAGAGAGAGA
161706070	GA	2	17	36	20	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161706021	GA	2	39	62	24	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GA
161705884	GA	2	50	61	12	GAGAGAGAGAGA
161705624	GA	2	49	60	12	GAGAGAGAGAGA
161705515	GA	2	1	42	42	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
161705422	GA	2	1	52	52	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA GAGAGAGA
161721764	GAT	3	739	750	12	GATGATGATGAT
161721474	GAT	3	225	236	12	GATGATGATGAT
161720815	GAT	3	374	385	12	GATGATGATGAT
161720810	GAT	3	412	423	12	GATGATGATGAT
161720479	GAT	3	475	486	12	GATGATGATGAT
161720479	GAT	3	505	516	12	GATGATGATGAT
161720440	GAT	3	230	241	12	GATGATGATGAT
161720416	GAT	3	517	531	15	GATGATGATGATGAT
161720037	GAT	3	97	108	12	GATGATGATGAT
161719923	GAT	3	235	246	12	GATGATGATGAT
161719825	GAT	3	552	563	12	GATGATGATGAT

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161719820	GAT	3	213	227	15	GATGATGATGATGAT
161719604	GAT	3	43	54	12	GATGATGATGAT
161719346	GAT	3	521	532	12	GATGATGATGAT
161719198	GAT	3	481	492	12	GATGATGATGAT
161719165	GAT	3	429	440	12	GATGATGATGAT
161718541	GAT	3	80	91	12	GATGATGATGAT
161718225	GAT	3	391	402	12	GATGATGATGAT
161717588	GAT	3	662	673	12	GATGATGATGAT
161717351	GAT	3	540	554	15	GATGATGATGATGAT
161716917	GAT	3	239	250	12	GATGATGATGAT
161715983	GAT	3	627	641	15	GATGATGATGATGAT
161715785	GAT	3	350	361	12	GATGATGATGAT
161715481	GAT	3	441	452	12	GATGATGATGAT
161715399	GAT	3	233	244	12	GATGATGATGAT
161715395	GAT	3	14	28	15	GATGATGATGATGAT
161715208	GAT	3	374	388	15	GATGATGATGATGAT
161715148	GAT	3	559	570	12	GATGATGATGAT
161714991	GAT	3	89	100	12	GATGATGATGAT
161714885	GAT	3	311	325	15	GATGATGATGATGAT
161714477	GAT	3	159	170	12	GATGATGATGAT
161713931	GAT	3	537	548	12	GATGATGATGAT
161713534	GAT	3	76	96	21	GATGATGATGATGATGATGAT
161713352	GAT	3	208	219	12	GATGATGATGAT
161713119	GAT	3	224	235	12	GATGATGATGAT
161713111	GAT	3	245	256	12	GATGATGATGAT
161713036	GAT	3	192	203	12	GATGATGATGAT
161712990	GAT	3	416	427	12	GATGATGATGAT
161712851	GAT	3	154	165	12	GATGATGATGAT
161712648	GAT	3	230	241	12	GATGATGATGAT
161712371	GAT	3	529	540	12	GATGATGATGAT
161712300	GAT	3	192	203	12	GATGATGATGAT
161712285	GAT	3	370	381	12	GATGATGATGAT
161711219	GAT	3	479	493	15	GATGATGATGATGAT
161710377	GAT	3	289	303	15	GATGATGATGATGAT
161709231	GAT	3	370	381	12	GATGATGATGAT
161709092	GAT	3	130	141	12	GATGATGATGAT
161708680	GAT	3	137	148	12	GATGATGATGAT
161708506	GAT	3	350	361	12	GATGATGATGAT
161708379	GAT	3	443	454	12	GATGATGATGAT
161708281	GAT	3	20	34	15	GATGATGATGATGAT
161708261	GAT	3	229	240	12	GATGATGATGAT
161707809	GAT	3	94	114	21	GATGATGATGATGATGATGAT
161706786	GAT	3	232	243	12	GATGATGATGAT
161706094	GAT	3	238	249	12	GATGATGATGAT

EST_Id (NCBI)	SSR Motifi	Motif uzunluğu	Başlangıç Bazı	Bitiş Bazı	Tekrar Uzunluğu	Tekrar Dizisi
161705727	GAT	3	365	376	12	GATGATGATGAT
161705667	GAT	3	326	340	15	GATGATGATGATGAT
161720104	TTG	3	249	260	12	TTGTTGTTGTTG
161717737	TTG	3	171	185	15	TTGTTGTTGTTGTTG
161713126	TTG	3	570	581	12	TTGTTGTTGTTG
161711839	TTG	3	227	238	12	TTGTTGTTGTTG
161709350	TTG	3	304	315	12	TTGTTGTTGTTG
161706994	TTG	3	211	222	12	TTGTTGTTGTTG
161706332	TTG	3	227	238	12	TTGTTGTTGTTG
161706165	TTG	3	270	281	12	TTGTTGTTGTTG

4.2 SSR Primerleri

DesignerPCR ile edilen 75 adet geri (reverse) ve ileri (forward) primer aşağıda listelenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 75 adet geri (Reverse) ve ileri (Forward) Primerler (F: Forward, R: Reverse)

Motif	TTG	Yaklaşık PCR ürünü büyüklüğü (bp)
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 1 F	GGA-GAG-GTA-AAG-GAA-GTG-AA	199
Vvr 2 F	ATC-TGC-GTC-TGG-AGA-GTT-TT	215
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 1 R	GTG-GGA-AAG-TAG-CAA-CAT-CT	199
Vvr 2 R	AAT-AGG-GGT-CCC-ACA-CTT-CT	215
Motif	AAC	
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 3 F	TTT-CTT-CCT-CTA-CCC-TTC-TG	298
Vvr 4 F	GTG-GAA-CCA-GAG-AGA-GAA-GA	110
Vvr 5 F	AGG-AAA-CAG-GTC-TAA-AGC-AT	232
Vvr 6 F	CAC-TCC-TCC-CAG-TAA-ACA-AT	118
Vvr 7 F	GAA-CCA-GAG-AGA-GAA-GAG-TAA	153
Vvr 8 F	GGA-GTC-TCA-GTC-TCA-GTC-TC	275
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 3 R	AAG-CAC-AAG-CCT-CTT-CTA-AC	298
Vvr 4 R	GAG-AGC-ACG-ACA-TTT-AGG-AG	110
Vvr 5 R	CCC-AGA-ACT-ACT-ATG-TGA-AGC	232
Vvr 6 R	TTT-TGG-AAT-CAC-AGT-AGG-TG	118
Vvr 7 R	GAG-GAG-TGG-GGT-ATT-TAG-TA	153
Vvr 8 R	TGT-CCA-CTT-CTC-TTA-CAC-AC	275

Çizelge 4.2 devam

Motif	CAT	
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 9 F	CTC-GCC-CCT-CAA-TCT-TAG-TC	190
Vvr 10 F	CAT-CTT-CTT-CTT-CTT-CTC-TTG-A	293
Vvr 11 F	CTT-GAG-TTT-TGA-AGC-ACA-TTA-G	250
Vvr 12 F	GAG-CAG-GTA-GTG-AGA-CAG-GT	246
Vvr 13 F	TGT-GCG-GAA-GAG-TAA-TAG-GG	298
Vvr 14 F	TAC-GCT-TTT-TCT-GGT-CCA-TT	275
Vvr 15 F	GGT-GGA-GGA-GAA-GAG-AAG-AA	124
Vvr 16 F	ATC-CTC-CCC-TCT-CTC-TTT-CT	127
Vvr 17 F	ATT-TTT-GAG-CCA-AGA-CTA-CG	153
Vvr 18 F	TCG-TCA-AAT-CCC-CTA-TTG-TC	299
Vvr 19 F	GGG-TTT-CTT-CGG-TGT-TTA-GG	197
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 9 R	TGC-TGA-TGA-TGA-TGA-TGT-CG	190
Vvr 10 R	CTT-CCA-TAC-TCC-AAC-ATA-CTG	293
Vvr 11 R	GTA-GCA-ACC-TCT-CCC-AAT-AC	250
Vvr 12 R	CGA-TGA-TGA-TGA-TGA-AGA-CA	246
Vvr 13 R	ACA-TCC-CCA-ATG-ACT-ACA-GC	298
Vvr 14 R	CCT-ATC-AAA-CTG-AAG-GGT-CTG-A	275
Vvr 15 R	CTT-TTT-GGA-GTT-TGC-TGA-GA	124
Vvr 16 R	GAA-TCT-GTC-CCT-CCT-CTT-GT	127
Vvr 17 R	GGT-GCT-TCA-GTT-TCA-GAG-AT	153
Vvr 18 R	CAA-ACG-GTT-AGC-ACA-GTG-TC	299
Vvr 19 R	CGG-TGC-TTC-AGT-TTC-AGA-GA	197
Motif	ATG	
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 20 F	AAG-AGG-AGG-GCT-ACG-AGA-AG	128
Vvr 21 F	GGG-AAG-AGG-GAA-ATA-AAG-AG	146
Vvr 22 F	GGT-GCT-GTC-TGT-GGA-TAA-TC	274
Vvr 23 F	TAC-CTC-TCC-ACT-GGG-AAG-TC	300
Vvr 24 F	TGA-AGG-ATA-CTG-ATG-AAA-GAG	270
Vvr 25 F	ATT-TGA-AGT-CCT-CCC-ATC-TC	263
Vvr 26 F	CAT-CCT-CTC-CAG-GGT-AGT-AG	216
Vvr 27 F	ACT-TTC-CTC-CCT-CAC-ATT-TA	160
Vvr 28 F	ATC-TGG-AGA-GGC-ACT-TTG-AC	280
Vvr 29 F	TTA-CGC-ATC-AAG-AAA-CGA-AG	133
Vvr 30 F	CAA-ATG-GGA-CAG-TGC-TTT-AT	229
Vvr 31 F	GGA-AAA-GAT-ACA-ACA-CAA-CAG	139
Vvr 32 F	TTA-TCC-AAT-CGC-TGT-TCT-GA	253
Vvr 33 F	AGG-ATT-TAT-TGG-TGG-GAC-TA	221
Vvr 34 F	GAT-TAT-GAA-ATG-GCA-GAA-GTA-G	111
Vvr 35 F	TTG-AGG-ATG-AAG-ATG-ACG-AA	177
Vvr 36 F	GCT-GTT-CTG-ATA-GAT-GAG-TTG	251
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	

Çizelge 4.2 devam

Vvr 20 R	CTC-ATC-ATC-ATC-GGA-GTT-GTC	128
Vvr 21 R	CTC-ATC-ACC-ATC-ATC-ACT-GT	146
Vvr 22 R	TGA-AGT-AGG-CTG-AGT-TGT-GAG	274
Vvr 23 R	CAT-TCT-GAC-CAC-CTC-TGA-CA	300
Vvr 24 R	CCC-TGA-CTG-TTG-TAA-ATA-GC	270
Vvr 25 R	TGG-ATT-GGT-TTG-GTG-AGT-TA	263
Vvr 26 R	GGA-AGG-TTT-CTT-AGA-TTT-TGG	216
Vvr 27 R	TAC-ATT-GCC-CGT-AAT-ACT-GA	160
Vvr 28 R	TCC-CTA-TGG-TAT-GGA-CTT-GG	280
Vvr 29 R	TTT-ACT-CAC-CGC-TGC-TAC-AC	133
Vvr 30 R	GGT-GTG-CCT-CAG-ATA-GTT-CA	229
Vvr 31 R	GGA-AAA-CTT-CAT-CAG-AAC-AC	139
Vvr 32 R	TCC-AAA-GGT-GGT-AGC-AAA-AC	253
Vvr 33 R	GCA-AAG-AAA-AGG-ACT-GTC-AT	221
Vvr 34 R	TGG-TAT-CTT-ATT-GTC-CAA-GTG	111
Vvr 35 R	TGG-TAA-CAC-GAC-TGA-CAC-CT	177
Vvr 36 R	CAA-AGA-GTT-TCC-AAA-GGT-AG	251
Motif	GAT	
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 37 F	AAG-AGG-AGG-GCT-ACG-AGA-AG	127
Vvr 38 F	GGG-AAG-AGG-GAA-ATA-AAG-AG	146
Vvr 39 F	CTT-TCG-GGT-TTC-TTG-AGG-AC	267
Vvr 40 F	CGG-AAA-GAG-AAT-CAA-TAA-TGG	118
Vvr 41 F	GGT-GCT-GTC-TGT-GGA-TAA-TC	274
Vvr 42 F	GGA-GAC-ATC-GGA-AAG-AGA-AT	125
Vvr 43 F	TGA-AGG-ATA-CTG-ATG-AAA-GAG	270
Vvr 44 F	GAA-ACC-CTA-AAT-GTG-TGG-AC	217
Vvr 45 F	CTT-TCC-TCC-CTC-ACA-TTT-AG	159
Vvr 46 F	ATC-TGG-AGA-GGC-ACT-TTG-AC	280
Vvr 47 F	TTA-CGC-ATC-AAG-AAA-CGA-AG	133
Vvr 48 F	CGA-GTC-TCC-AAC-TTC-ACT-TG	280
Vvr 49 F	CAA-ATG-GGA-CAG-TGC-TTT-AT	229
Vvr 50 F	GGA-AAA-GAT-ACA-ACA-CAA-CAG	139
Vvr 51 F	TTA-TCC-AAT-CGC-TGT-TCT-GA	253
Vvr 52 F	AGG-ATT-TAT-TGG-TGG-GAC-TA	221
Vvr 53 F	CAA-GAG-GCT-GTA-TCA-AGT-CT	272
Vvr 54 F	CGT-GAG-TAT-CAA-AGG-GAG-TC	230
Vvr 55 F	GAT-TAT-GAA-ATG-GCA-GAA-GTA-G	111
Vvr 56 F	TTG-AGG-ATG-AAG-ATG-ACG-AA	177
Vvr 57 F	GCT-GTT-CTG-ATA-GAT-GAG-TTG	251
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 37 R	TCA-TCA-TCA-TCG-GAG-TTG-TC	127
Vvr 38 R	CTC-ATC-ACC-ATC-ATC-ACT-GT	146
Vvr 39 R	GGG-CAC-TGT-TTG-GTT-GAA-TA	267

Çizelge 4.2 devam

Vvr 40 R	CCG-CCT-AAA-TAG-TCC-ACC-TA	118
Vvr 41 R	TGA-AGT-AGG-CTG-AGT-TGT-GAG	274
Vvr 42 R	CGC-CTA-AAT-AGT-CCA-CCT-TC	125
Vvr 43 R	CCC-TGA-CTG-TTG-TAA-ATA-GC	270
Vvr 44 R	ATG-GCT-GTG-AAA-AGT-GTC-TC	217
Vvr 45 R	TAC-ATT-GCC-CGT-AAT-ACT-GA	159
Vvr 46 R	TCC-CTA-TGG-TAT-GGA-CTT-GG	280
Vvr 47 R	TTT-ACT-CAC-CGC-TGC-TAC-AC	133
Vvr 48 R	GCC-TTG-ATG-GTA-GAA-ACA-GA	280
Vvr 49 R	GGT-GTG-CCT-CAG-ATA-GTT-CA	229
Vvr 50 R	GGA-AAA-CTT-CAT-CAG-AAC-AC	139
Vvr 51 R	TCC-AAA-GGT-GGT-AGC-AAA-AC	253
Vvr 52 R	GCA-AAG-AAA-AGG-ACT-GTC-AT	221
Vvr 53 R	TAC-TGG-ATG-TCA-CAA-AGA-GA	272
Vvr 54 R	CTT-CGC-CTA-TCA-TAA-TCT-CG	230
Vvr 55 R	TGG-TAT-CTT-ATT-GTC-CAA-GTG	111
Vvr 56 R	TGG-TAA-CAC-GAC-TGA-CAC-CT	177
Vvr 57 R	CAA-AGA-GTT-TCC-AAA-GGT-AG	251
Motif	GA	
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 58 F	GAG-AAT-CCA-TTG-CCA-TAC-TT	120
Vvr 59 F	AGA-AGC-AAG-AAG-TGA-AGT-GA	159
Vvr 60 F	AGC-AGT-GTT-ACG-CTT-ACA-AA	131
Vvr 61 F	GAG-AGA-AAG-ACA-GAG-AGT-TGT-A	270
Vvr 62 F	GCT-CTC-TCT-TCC-CTC-ACT-TT	131
Vvr 63 F	GGC-ATC-CCT-ACT-ACC-TAC-CT	261
Vvr 64 F	GAC-AAG-AGG-TCT-GTG-TGT-GT	165
Vvr 65 F	CTT-CTC-AAC-GCC-AAA-GTA-AG	186
Vvr 66 F	CTT-ACG-GAA-GCA-GAA-GTG-GA	175
Vvr 67 F	AAC-CAA-GAC-ACT-GGA-ATC-TG	138
Vvr 68 F	CTC-TTT-CTC-CGT-TGT-GTG-TT	169
Vvr 69 F	GGT-TTT-GAG-GAA-TCC-AGA-AT	159
Vvr 70 F	GAG-GTG-AGG-CGA-AGT-AGA-TG	149
Vvr 71 F	CAG-CCA-GTA-AGC-GTA-GAA-AC	175
Vvr 72 F	GAT-GGA-GTA-GTG-GAG-TGT-GT	123
Vvr 73 F	TCA-AAG-GGA-AAA-GAG-AAC-AG	274
Vvr 74 F	CGC-CAT-CTC-TGA-TTT-ACC-TA	212
Vvr 75 F	CTC-TCC-CTC-TCA-CAC-TCA-AC	223
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	
Vvr 58 R	CAT-AAA-CAC-CTC-ACA-AAC-ACA	120
Vvr 59 R	GGA-CAG-AAG-GAG-AAT-CAG-AT	159
Vvr 60 R	CTC-TCT-TCT-CTC-TCC-TCT-CTG-T	131
Vvr 61 R	CTT-GGT-CAG-TAT-TTG-AAC-AG	270
Vvr 62 R	CTC-CCT-CTT-CTT-CCT-CAG-AT	131

Çizelge 4.2 devam

Vvr 63 R	AGC-ACA-GGA-CAT-ACA-CAA-TG	261
Vvr 64 R	GGA-GAA-TGT-AGG-GTT-GAA-TC	165
Vvr 65 R	CTG-ATG-GTG-AAA-ATC-CTA-ACA	186
Vvr 66 R	TAA-CCG-CAG-ACT-CAG-CAA-CT	175
Vvr 67 R	TCA-AGG-GAA-AAA-CAC-TTC-AG	138
Vvr 68 R	TGT-GGC-TGC-TAC-TGT-TAC-TG	169
Vvr 69 R	ACC-AGG-GAG-ATA-GAA-GGA-AC	159
Vvr 70 R	GGC-GTG-TTA-GGG-TTG-AGT-AG	149
Vvr 71 R	TGT-AAA-ACA-CCC-CAA-CAA-TC	175
Vvr 72 R	TCT-CTC-ACC-CTC-TCT-CTC-TA	123
Vvr 73 R	GGA-ACT-GAT-ACA-ACG-CTA-CA	274
Vvr 74 R	CGG-TTG-ACC-TTT-TTT-GTT-AG	212
Vvr 75 R	CCA-CTC-TAA-TGG-CTT-CTG-AT	223

4.3 Dizayn Edilen Primerlerin Test Edilmesi

AUBiotek-EST-Analyzer programı ile tespit edilen SSR lokusları için dizayn edilen 75 primerin farklı her tekrar motifden rastgele seçilen 14 primer [**TTG** (Vvr 1, Vvr 2), **AAC** (Vvr 3, Vvr 5, Vvr 6, Vvr 8 R), **CAT** (Vvr 9, Vvr 10), **ATG** (Vvr 20, Vvr 21), **GAT** (Vvr 37, Vvr 38 R), **GA** (Vvr 58 F, Vvr 59 F)] (Çizelge 4.3) ile amplifiye edilmiştir.

Çizelge 4.3 Farklı lokuslara ait PCR da kullanılan 14 lokusun geri (reverse) ve ileri (forward) primerleri

Lokus adı	Dizisi (5'-3')	Yaklaşık PCR ürünü büyüklüğü (bp)
Motif: TTG		
Vvr 1 F	GGA-GAG-GTA-AAG-GAA-GTG-AA	199
Vvr 1 R	GTG-GGA-AAG-TAG-CAA-CAT-CT	
Vvr 2 F	ATC-TGC-GTC-TGG-AGA-GTT-TT	215
Vvr 2 R	AAT-AGG-GGT-CCC-ACA-CTT-CT	
Motif:AAC		
Vvr 3 F	TTT-CTT-CCT-CTA-CCC-TTC-TG	298
Vvr 3 R	AAG-CAC-AAG-CCT-CTT-CTA-AC	
Vvr 5 F	AGG-AAA-CAG-GTC-TAA-AGC-AT	232
Vvr 5 R	CCC-AGA-ACT-ACT-ATG-TGA-AGC	
Vvr 6 F	CAC-TCC-TCC-CAG-TAA-ACA-AT	118
Vvr 6 R	TTT-TGG-AAT-CAC-AGT-AGG-TG	

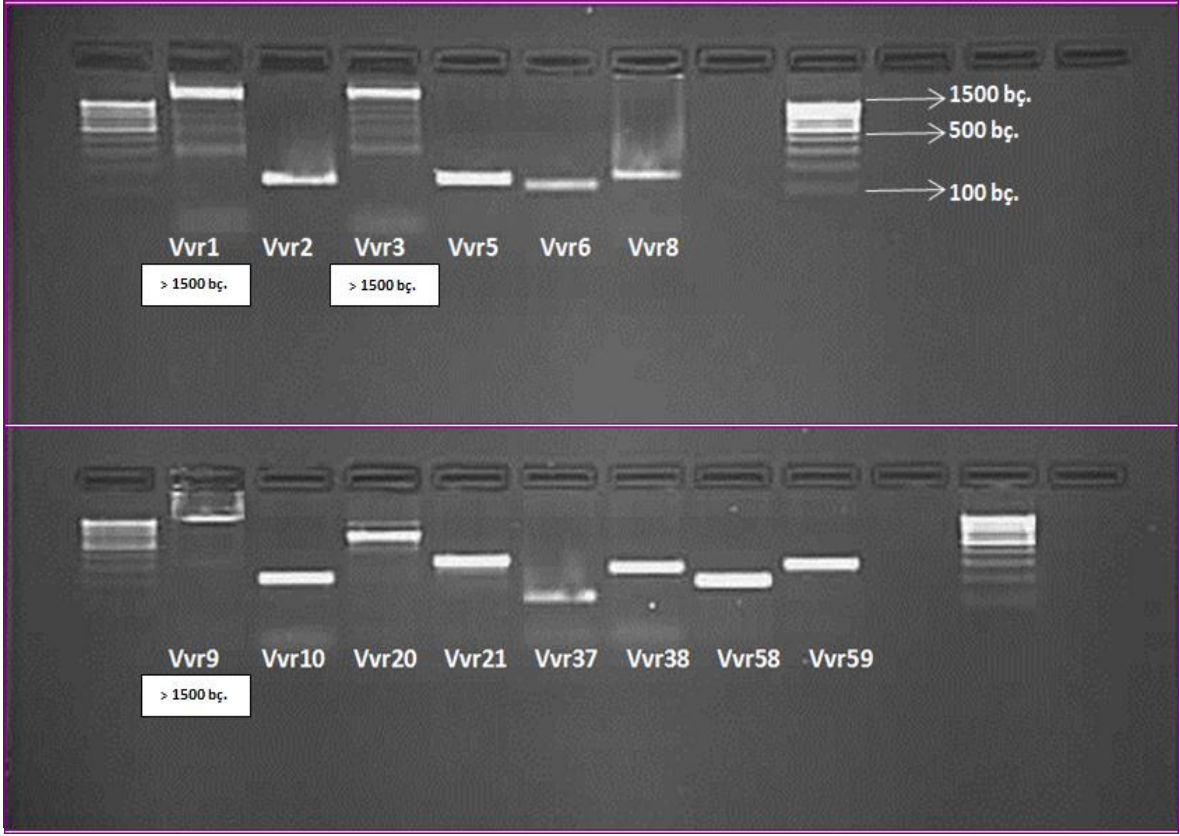
Lokus adı	Dizisi (5'-3')	Yaklaşık PCR ürünü büyüklüğü (bp)
Vvr 8 F	GGA-GTC-TCA-GTC-TCA-GTC-TC	275
Vvr 8 R	TGT-CCA-CTT-CTC-TTA-CAC-AC	
Motif: CAT		
Vvr 9 F	CTC-GCC-CCT-CAA-TCT-TAG-TC	190
Vvr 9 R	TGC-TGA-TGA-TGA-TGA-TGT-CG	
Vvr 10 F	CAT-CTT-CTT-CTT-CTT-CTC-TTG-A	293
Vvr 10 R	CTT-CCA-TAC-TCC-AAC-ATA-CTG	
Motif: ATG		
Vvr 20 F	AAG-AGG-AGG-GCT-ACG-AGA-AG	128
Vvr 20 R	CTC-ATC-ATC-ATC-GGA-GTT-GTC	
Vvr 21 F	GGG-AAG-AGG-GAA-ATA-AAG-AG	146
Vvr 21 R	CTC-ATC-ACC-ATC-ATC-ACT-GT	
Motif: GAT		
Vvr 37 F	AAG-AGG-AGG-GCT-ACG-AGA-AG	127
Vvr 37 R	TCA-TCA-TCA-TCG-GAG-TTG-TC	
Vvr 38 F	GGG-AAG-AGG-GAA-ATA-AAG-AG	146
Vvr 38 R	CTC-ATC-ACC-ATC-ATC-ACT-GT	
Motif: GA		
Vvr 58 F	GAG-AAT-CCA-TTG-CCA-TAC-TT	120
Vvr 58 R	CAT-AAA-CAC-CTC-ACA-AAC-ACA	
Vvr 59 F	AGA-AGC-AAG-AAG-TGA-AGT-GA	159
Vvr 59 R	GGA-CAG-AAG-GAG-AAT-CAG-AT	

4.3.1 DNA izolasyonu ve ölçümleri

Şam Büzgülü çeşidinde DNA başarı ile izole edilmiş, spektrofotometrik ölçümlerle ve agaroz jel görüntüleri ile PCR uygulamalarına uygun DNA olduğu teyit edilmiştir.

4.3.2 SSR lokuslarının PCR reaksiyonu

PCR reaksiyonları sonucunda 14 lokusa ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1 de sunulmuştur. Beklenildiği üzere agaroz jel koşullarında allelerine ayrılamayan (Bir bant/iki bant) lokusların, PCR ampfikasyonları başarılı görülmektedir.



Şekil 4.1. Test edilen SSR lokuslarının agaroz jel (%2) görüntüleri. Üst (soldan - sağa), M, Vvr 1, Vvr 2, Vvr 3, Vvr 5, Vvr 6, Vvr 8 NK, M. Alt (soldan - sağa), M, Vvr 9, Vvr 10, Vvr 20, Vvr 21, Vvr 37, Vvr 38, Vvr 58, Vvr 59 NK, M. NK: Negatif kontrol, M: 100bp DNA ladder (Promega)

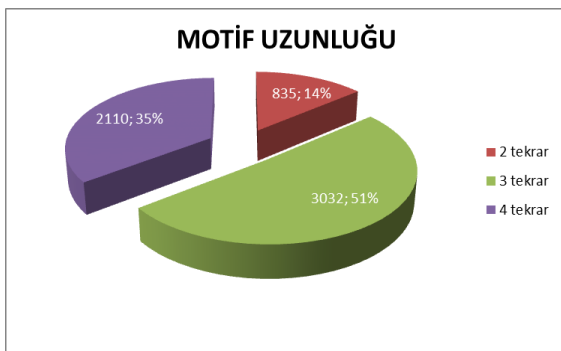
Ancak her bir lokusun PCR ürün büyüklükleri dikkate alındığında Vvr 1, Vvr 3 ve Vvr 9 olmak üzere 3 lokusun PCR ürünü 1500 bç 'den daha büyük olup genel olarak 500 bç büyüklüğü ve altında beklenen SSR büyüklüğünden daha büyük bant vermiştir (Şekil 4.1).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

EST koleksiyonundan SSR tespiti zaman ve ekonomiklik bakımından tercih edilebilecek bir yöntemdir. EST verilerini elde etmek için uluslararası veritabanlarına erişmek ve analiz yapmak için gerekli araçları temin etmek mümkündür (Sharma vd 2007). Bu analiz araçlarının benzer veya farklı çalışma prensipleri ile avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. EST analiz aşamalarının her biri için farklı bilgisayar uygulamaları kullanılabilir. Bu amaçla her aşamada seçenekler belirlenmeli ve en uygun araçlar değerlendirilmelidir. Farklı kombinasyonlar kullanarak alternatif analizler de yapılabilmektedir.

Bu çalışmada NCBI da bulunan *Vitis Vinifera* ya ait toplam 16452 EST dizisinden oluşan 29760 TSeq_tax ID' li EST koleksiyonunda bulunan düzenli (perfect) SSR bölgeleri bu tez kapsamında geliştirilen "AUBiotek-EST-Analyzer" programı ile taranmıştır. Analiz sonucunda 16452 EST dizisinden 1946 (%11,83) tanesinde en az 12 baz uzunluğunda 2, 3 ve 4 tekrar içeren 5977¹ tekrar bölgesi tespit edilmiştir. Bütün SSR bölgelerinin tespit edilmesi normal özelliklerdeki bir bilgisayar ile 12 saniyede tamamlanmıştır. Bu sonuca göre, program ile 1 saniyede ortalama uzunluktaki 1400 EST dizisi taranmaktadır.

5977 tekrar bölgesi içeren EST dizilerinde 835 adet 2 baz tekrar eden motif, 3032 adet 3 baz tekrar eden motif, 2110 adet 4 baz tekrar eden motif (Şekil 5.1) ve toplamda 201 adet birbirinden farklı SSR motifi tespit edilmiştir.

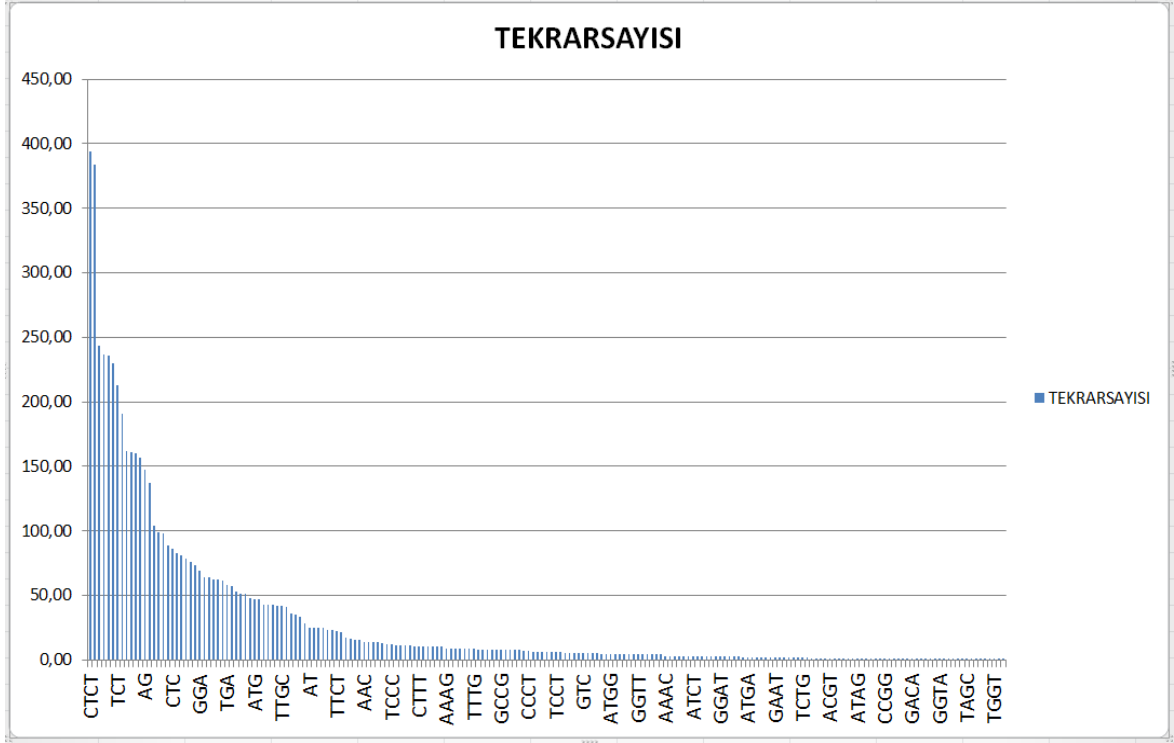


Şekil 5.1 Tekrar eden motif uzunluklarının dağılımı

¹ 2, 3 ve 4 bazlık tekrarlar EST dizisi içinde aynı SSR lokusunda bulunabilmektedir. Örneğin ACAC tekrar motifi hem 2 bazlık tekrar hem de 4 bazlık tekrar olarak değerlendirilebilir. Aynı şekilde 15 baz uzunluğunda olan bir SSR tekrar bölgesi 12 baz uzunluktaki bir SSR tekrar bölgesinide içermektedir. Bununla birlikte birbirlerine karşılık gelen GA/CT gibi tekrarlar da ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır.

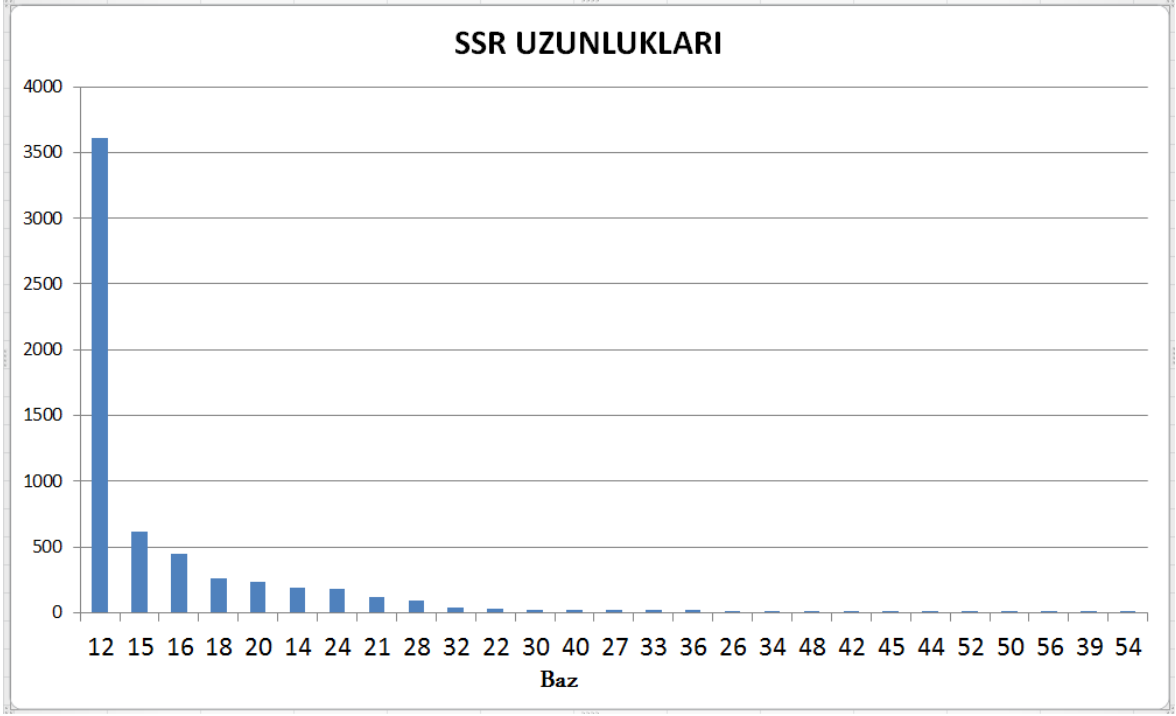
Toplam motifler arasında 3 baz tekrar eden motiflerin %50 nin üzerinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç Huang vd (2012) tarafından 381.609 dizi içeren üzümde ait EST koleksiyonundan tespit ettikleri SSR bölgelerinde 3 baz tekrar içeren motif oranının % 45.4 olması ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir.

En çok tekrar eden motif, Scott vd (2000) tarafından üzümde yapılan çalışmaya uygun şekilde, CTCT/GAGA (394 adet) olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Tekrar eden motiflerin dağılımı

En fazla tekrar motifi içeren SSR uzunluğu 12 baz uzunluğundadır ve toplam 5977 tekrar bölgesi içeren EST dizisi içinde 3607 (% 60.34) adeti 12 baz uzunluğundadır (Şekil 5.3). Tespit edilen en uzun SSR bölgesi 56 baz (2 adet) uzunluğundadır.



Şekil 5.3 Tespit edilen SSR uzunluklarının dağılımı

Bu motifler arasından AAC, ATG, CAT, GA, GAT, TTG motiflerini içeren 311 adet SSR lokusu tespit edilmiş ve bunlardan 75 adeti için primer sentezlenmiştir. Rastgele seçilen 14 primer PCR ile çalışılabilmiş ve 11 lokustan (%78,6) SSR bant büyüklüğü sınırlarında ürün elde edilebilmiştir. Bu lokuslarda allel büyüklükleri beklenildiği şekilde (Çizelge 4.3). 90-500 bç. büyüklüğünde bulunmuştur. Test edilen 14 lokustan 11'nin başarılı amplifikasyonu ise, Huang vd (2011) tarafından 215.609 dizi içeren *Vitis*'e ait EST koleksiyonundan tespit ettikleri SSR bölgeleri için dizayn edilmiş 1037 primerden rastgele seçtikleri 150 primerin 145 adetinden ürün almış olmaları, Scott vd (2000) tarafından 5000 dizi içeren *Vitis*'e ait EST koleksiyonundan tespit ettikleri 124 SSR bölgesi için dizayn edilen 16 primerin tamamından ürün almış olmaları ile de uyumlu görünmektedir ve "AUBiotek-EST-Analyzer" programı ile tespit edilen SSR bölgelerinin doğru şekilde tespit edildiğinin kanıtı olarak yorumlanabilir.

Araştırmada elde edilen SSR primerleri, kök bölgesine ait stres gen bölgelerinden elde edildiği için özellikle üzüm genetiğinde çalışan araştırmacılara, genetik ayrımın yanında stresle ilgili ıslah çalışmalarında (dayanıklı genotipin seçimi vb.) katkılar sağlayabilecektir.

Sonuç olarak; Geliştirilmiş olan yazılım EST koleksiyonundan etkin olarak ve çok kısa sürede SSR tespiti yapmaktadır. Bu programın biyoenformatik çalışmaları için işık tutacağı ve araştırmacılara kolaylık sağlayacağı mit edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abajian, C. (1994) SPUTNIK: <http://espressosoftware.com/sputnik/index.html>.
- Abd-Elsalam, K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology* 2: 91-95.
- Adams, M.D. , Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F. *et al.* 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome Project. *Science* 252: 1651-1656.
- Agarwal, P. and States, D.J. 1994. The repeat pattern toolkit (RPT): analyzing the structure and evolution of *C. elegans*. *Proc. Int. Conf. Intell. Sys. Mol. Biol.* 2: 1–9.
- Aggarwal, R.K., Hendre, P.S., Varshney, R.K., Bhat, P.R., Krishnakumar, V., Singh, L. 2006. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 359-372.
- Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27: 573–580.
- Bizzaro, J.W. and Marx, K.A. 2003. Poly: a quantitative analysis tool for simple sequence repeat (SSR) tracts in DNA. *BMC Bioinformatics* 4: 22.
- Cardle, L., Ramsey, L., Milbourne, D., Macaulay, M., Marshall, D., Waugh, R. 2000. Computational and experimental characterisation of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics* 156: 847-854.
- Castelo, A.T., Martins W., Gao, G.R. 2002. TROLL – tandem repeat occurrence locator. *Bioinformatics* 18: 634–636.
- Cervigni, G.D.L., Paniego, N., Pessino, S., Selva, J.P., Diaz, M., Spangenberg, G., Echenique, V. 2008. Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy levels. *Plant Molecular Biology* 67: 11–23.

- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y.A., Huang, S., Gmitter, F.G. 2006. Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1248-1257.
- Delgrange, O. and Rivals, E. 2004. STAR: an algorithm to search for tandem approximate repeats. *Bioinformatics* 20: 2812–2820.
- Ellis J.R. and Burke J.M. 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity* 99: 125–132.
- Faircloth, B.C. 2008. Msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol. Ecol. Resources* 8: 92–94.
- Gao, H. and Kong, J. 2005. The microsatellite and minisatellites in the genome of *Fenneropenaeus chinensis*. *DNA Sequence* 16: 426-436.
- Gao, L., Tang, J., Li, H., Jia, J. 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Mol. Breed.* 12: 245–261.
- Huang, H., Lu, J., Ren, Z., Hunter, W., Dowd, S.E., Dang, P. 2011. Mining and validating grape (*Vitis L.*) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping. *Molecular Breeding* 28: 241-254.
- Huang, H., Lu, J., Xu, X., Yang, X., Liang, S., Wu, J. 2012. EST-SSRs characterization and in-silico alignments with linkage map SSR loci in grape (*Vitis L.*) genome. *Genes & Genomics* 34: 19-26.
- Jayashree, B., Ferguson, M., Ilut, D., Doyle, J., Crouch, J.H. 2005. Analysis of genomic sequences from peanut (*Arachis hypogaea*) *Electronic Journal of Biotechnology* 8: 1-12.
- Jewell, E., Robinson A., Savage D., Erwin, T., Love, C.G., Lim, G.A.C., Li, X., Batley, J., Spangenberg, G.C., Edwards D. 2006. SSR Primer and SSR Taxonomy Tree: Biome SSR discovery. *Nucleic Acids Research* 34: 656–659.
- Karaca, M., Bilgen, M., Onus, A.N., İnce A.G., Elmasulu S.Y. 2005. Exact tandem repeats analyzer: A new program for DNA sequence mining. *J. Genet.* 84: 49–54.

- Keniry, A., Hopkins, C.J., Jewell, E., Morrison, B., Spangenberg, G.C., Edwards, D., Batley, J. 2006. Identification and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers from *Fragaria* × *ananassa* expressed sequences. *Molecular Ecology Notes* 6: 319–322.
- Kofler, R., Schlotterer C., Lelley, T. 2007. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics* 23: 1683–1685.
- Kolpakov, R., Bana G., Kucherov G. 2003. Efficient and flexible detection of tandem repeats in DNA. *Nucleic Acids Res.* 31: 3672–3678.
- Kurtz, S., Choudhuri, J.V., Ohlebusch E., Schleiermacher, C., Stoye, J., Giegerich R. 2001. REPuter: the manifold application of repeats analysis on a genomic scale. *Nucleic Acids Res.* 29: 4633–4642.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., Douglas G.C. 1998. Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tullynally, Ireland. *Silvae Genetica* 47: 257–262.
- Lindqvist, C., Scheen, A.C., Yoo, M.J., Grey, P., Oppenheimer, D.G., Leebens-Mack, J.H., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Albert, V.A. 2006. An expressed sequence tag (EST) library from developing fruits of an Hawaiian endemic mint (*Stenogyne rugosa*, Lamiaceae): characterization and microsatellite markers. *BMC Plant Biology* 6: 16.
- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet.* 44: 397-401.
- Mudunuri, S.B. and Nagarajaram, H.A. 2007. IMEx: Imperfect microsatellite extractor. *Bioinformatics* 23: 1181–1187.
- Nagaraj, S.H., Gasser, R.B., Ranganathan S. 2006. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Briefings In Bioinformatics.* 8: 6-21.
- Nicot, N., Chiquet, V., Gandon, B., Amilhat, L., Legeai, F., Leroy, P., Bernard, M., Sourdille, P. 2004. Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 109: 800–805.

- Oruç, F. 2009. *Olea Europaea* Cv Gemlik (Zeytin) Bitkisine Ait Cdna Kütüphanesinin Hazırlanması Ve Sonuçların Bioenformatik Analiz Yöntemleri İle Değerlendirilmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Türkiye.
- Parisi, V., Fonzo V.D., Aluffi-Pentini, F. 2003. STRING: finding tandem repeats in DNA sequences. *Bioinformatics* 19: 1733–1738.
- Perez, F., Ortiz, J., Zhinaula, M., Gonzabay, C., Calderon, J., Volckaert, F.A.M.J. 2006. Development of EST-SSR Markers by Data Mining in Three Species of Shrimp: *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris*, and *Trachypenaeus birdy*. *Marine Biotechnology* 7: 554–569.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science* 1: 215-222.
- Reneker, J., Shyu, C.R., Zeng, P., Pocallo, J.C., Gassmann, W. 2004. ACMES: fast multiple-genome searches for short repeat sequences with concurrent cross-species information retrieval. *Nucleic Acids Res.* 32: 649–653.
- Robinson, A.J., Love, C.G., Batley, J., Barker, G., Edwards, D. 2004. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics* 20: 1475-1476.
- Schlotterer, C. and Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 211-215.
- Scott, K.D., Egler, P. Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S., Henry R.J. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 723-726.
- Sharma, P.C., Grover, A., Kahl, G. 2007. Mining microsatellites in eukaryotic Genomes. *Trends in Biotechnology* 25: 490-498.
- Singan, V. and Colbourne, J.K. 2005. MicrosatDesign is a pipeline for transforming sequencer trace files into DNA markers. CGB Technical Report 2005–01. The Center for Genomics and Bioinformatics, Indiana University, Bloomington.

- Sreenu, V.B., Ranjitkumar, G., Swaminathan, S., Priya, S., Bose, B., Pavan, M.N., Thanu, G., Nagaraju, J., Nagarajaram, H.A. 2003. MICAS: A fully automated web server for microsatellite extraction and analysis from prokaryote and viral genomic sequences. *Appl. Bioinformatics* 2: 165–168.
- Stackelberg, M., Rensing S.A., Reski, R. 2006. Identification of genic moss SSR markers and a comparative analysis of twenty-four algal and plant gene indices reveal species-specific rather than group-specific characteristics of microsatellites *BMC Plant Biology* 6: 9.
- Temnykh, S., DeClerk, G., Lukashova, A. *et al.* 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11: 1441–1452.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A. 2003. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 411–422.
- Thurston, M. and Field, D. 2005. Msatminer: detection and characterization of microsatellites. Distributed by the authors at <http://www.genomics.ceh.ac.uk/msatfinder>.
- Weber, J.L. and Wong, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123-1128.
- Winton, L.M., Krohn, A.L., Leiner, R.H. 2007. Microsatellite markers for *Sclerotinia subarctica* nom. prov., a new vegetable pathogen of the High North. *Molecular Ecology Notes* 7: 1077–1079.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

İNTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>
- [2] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21083/>
- [3] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- [4] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21105/>
- [5] [http://en.wikipedia.org/wiki/Primer_\(molecular_biology\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology))
- [6] <http://www.microsoft.com/visualstudio/tr-tr/products>

EKLER

Program SSR bulma kodu:

```
Private Sub SSRBUL_Click(ByVal sender As System.Object, ByVal e As System.EventArgs)
Handles SSRBUL.Click, SsrBulToolStripMenuItem.Click
```

```
Dim t As Long
```

```
Dim dsDetay As New DataTable
dsDetay.Columns.Add("id")
dsDetay.Columns.Add("EST_id")
dsDetay.Columns.Add("figur")
dsDetay.Columns.Add("figur_uzunluk")
dsDetay.Columns.Add("baslangic")
dsDetay.Columns.Add("bitis")
dsDetay.Columns.Add("uzunluk")
dsDetay.Columns.Add("dizi")
dsDetay.Columns.Add("est_dizi")
```

```
Dim drDetay As DataRow
```

```
For t = TextBoxX.Text - 1 To TextBoxY.Text
```

```
Dim i, j, indis, sayac, baslangic, bitis, karakter As Integer
Dim tekrarlar(5, 100) As Integer
Dim karsilastirilan As String
```

```
indis = 0
Dim dizi As String
dizi = (ds.Tables(0).Rows(t).Item(8))
```

```
For karakter = TextBoxZ.Text To TextBoxT.Text
For j = 1 To karakter
sayac = 1
i = j
```

```
While i < dizi.Length()
If sayac = 1 Then
baslangic = i
Else
bitis = i + karakter - 1
End If
```

```
karsilastirilan = Mid(dizi, i, karakter)
```

```
If Not (karsilastirilan = Mid("AAAA", 1, karakter) Or
karsilastirilan = Mid("TTTT", 1, karakter) Or karsilastirilan = Mid("CCCC", 1,
karakter) Or karsilastirilan = Mid("GGGG", 1, karakter)) Then
If karsilastirilan = Mid(dizi, i + karakter, karakter) Then
sayac = sayac + 1
Else
If ((sayac * karakter) >= 12) Then
```

```

Dim tekrar As String
indis = indis + 1
tekrarlar(0, indis) = karakter
tekrarlar(1, indis) = sayac * karakter
tekrarlar(2, indis) = baslangic
tekrarlar(3, indis) = bitis
tekrar = Mid(dizi, baslangic, bitis - baslangic + 1)

drDetay = dsDetay.NewRow
drDetay("id") = ds.Tables(0).Rows(t).Item(0)
drDetay("EST_id") = ds.Tables(0).Rows(t).Item(1)
drDetay("figur") = tekrar.Substring(0,
karakter.ToString())
drDetay("figur_uzunluk") = karakter.ToString()
drDetay("baslangic") = baslangic.ToString()
drDetay("bitis") = bitis.ToString()
drDetay("uzunluk") = bitis - baslangic + 1
drDetay("dizi") = tekrar
drDetay("est_dizi") = dizi

dsDetay.Rows.Add(drDetay)

        sayac = 1
    Else
        sayac = 1
    End If

End If
End If
i = i + karakter
End While
Next

Next
Next
SSR_bank.DataSource = dsDetay

End Sub

```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Umut KİBAR

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 02.02.1979

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1996-2002)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü – Biyoenformatik (2008-2012)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

Ankara Üniversitesi Enformatik Bölümü – Bilgisayar İşletmeni (2006 - 2009)

Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu – Uzman (2009 - Devam Ediyor)